

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

STEFANY GRÜTZMANN ARCARI

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE VINHOS FORTIFICADOS
PRODUZIDOS EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

Florianópolis
2010

Stefany Grützmann Arcari

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE VINHOS FORTIFICADOS
PRODUZIDOS EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciência dos Alimentos

Orientador: Profa. Dra. Marilde T. Bordignon-Luiz

Florianópolis
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

A668c Arcari, Stefany Grützmann

Caracterização química de vinhos fortificados produzidos em diferentes regiões do Brasil [dissertação] / Stefany Grützmann Arcari ; orientadora, Marilde Terezinha Bordignon Luiz. - Florianópolis, SC, 2010.

198 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos alimentos. 2. Fenóis. 3. Ácidos orgânicos. 4. Minerais. 5. Álcoois. 6. Carbono - Isótopos. 7. Inibidores químicos. 8. vinho. I. Luiz, Marilde Terezinha Bordignon. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

CDU 663

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE VINHOS FORTIFICADOS
PRODUZIDOS EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

Por

Stefany Grützmann Arcari

Dissertação aprovada como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos na Universidade Federal de Santa Catarina, pela banca examinadora:

Presidente: _____
Marilde T. Bordignon Luiz, Profa. Dra.

Membro: _____
Jean Pierre Rosier, PhD.

Membro: _____
Edna Regina Amante, Profa. Dra.

Membro: _____
Ana Carolina M. Arisi, Profa. PhD.

Coordenadora: _____
Renata Dia de Mello Castanho, Profa. Dra.

Florianópolis, maio de 2010

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, meu sincero reconhecimento e agradecimento.

À minha família, pelo apoio em todos os momentos e por sempre acreditarem em mim.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marilde T. Bordignon Luiz, pela oportunidade concedida, aprendizado e confiança.

À equipe do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, por todos os momentos compartilhados, pela amizade e parceria nos trabalhos desenvolvidos durante o período de realização do Mestrado.

A todos os colegas e amigos de sala de aula pela amizade e companheirismo. Agradeço profundamente à amiga Cristiane de Souza, pela amizade, companheirismo, apoio e pelos momentos agradáveis que passamos juntas nestes últimos dois anos.

À Quinta Santa Maria, especialmente ao Sr. Nazário dos Santos, por acreditar neste trabalho e pelo fornecimento das amostras.

À Epagri, Estação Experimental de Urussanga, pelo fornecimento de amostras e, à Estação Experimental de Videira pela oportunidade de realização das análises físico-químicas e de álcoois superiores. Meus sinceros agradecimentos aos pesquisadores Dr. Jean Pierre Rosier e MSc. Vinícius Caliari, pela disposição em sempre colaborar e, à analista Patrícia Zardo Posanski, pelo apoio na realização das análises físico-químicas e de álcoois superiores.

À Dra. Léa Luzia Freitas Costa, por compartilhar seus conhecimentos e pelo constante apoio na realização das análises cromatográficas. Muito obrigada pela oportunidade de aprendizado.

Ao professor Dr. Paulo Ogliari, por contribuir para o delineamento experimental e a aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta.

À equipe do Laboratório de Eletroforese Capilar do Departamento de Química da UFSC, especialmente ao professor Gustavo Micke e aos alunos Melina Heller e Marcel Piovezan, pelo apoio na realização das análises de açúcares, ácidos orgânicos e cátions inorgânicos. Obrigada pela dedicação e por compartilharem o conhecimento sobre a técnica de eletroforese capilar.

Ao Eduardo Chaves, pela colaboração nas análises de minerais por ICP-MS. Muito obrigada pela disposição em sempre ajudar.

À Dra. Regina Vanderlinde e à equipe do Laboratório de Referência em Enologia – LAREN, pela realização das análises de razão de isótopos estáveis de carbono. Obrigada pela disposição.

À professora Dra. Renata Dias de Mello Castanho Amboni, por oportunizar a realização das análises de cor.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos e professores, pela oportunidade para adquirir conhecimento e, aos funcionários, por serem sempre prestativos.

À Capes, pela bolsa de estudos.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

ARCARI, Stefany Grützmann. **Caracterização química de vinhos fortificados produzidos em diferentes regiões do Brasil**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo caracterizar os vinhos fortificados produzidos em diferentes regiões do Brasil através da determinação dos principais grupos de compostos químicos, da razão de isótopos estáveis de carbono e da atividade antioxidante. Os compostos fenólicos não coloridos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência e um procedimento de extração em fase sólida foi otimizado para o pré-tratamento de amostra, utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta. Composição fenólica, cor e atividade antioxidante foram determinadas por espectrofotometria, colorimetria e cromatografia líquida de alta eficiência. Eletroforese capilar foi empregada para determinação de cátions inorgânicos, ácidos orgânicos e açúcares. Os minerais foram analisados por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, os álcoois superiores por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama e a razão de isótopos estáveis de carbono por espectrometria de massa para razões isotópicas. A aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta revelou que as condições ideais de extração em fase sólida de compostos fenólicos foram 5 mL de amostra, 20 mL do solvente de eluição e vazão de $0,06 \text{ mL s}^{-1}$, apresentando bons resultados para a determinação de ácido gálico, (+)catequina, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e quercetina. As amostras de vinhos fortificados brancos e tintos produzidos em diferentes regiões do Brasil mostraram-se ativas no sequestro dos radicais DPPH e ABTS e na redução do ferro e, a atividade antioxidante *in vitro* dos vinhos fortificados apresentou forte correlação positiva com o conteúdo de polifenóis totais, *orto*-difenóis, ésteres tartáricos, flavonóis, taninos totais, ácido gálico e *trans*-resveratrol. Os vinhos fortificados produzidos na Região da Serra Gaúcha apresentaram maior tonalidade de cor, maior atividade antioxidante, maiores conteúdos de catequina, quercetina, *trans*-resveratrol, *orto*-difenóis, flavonóis, ésteres tartáricos, polifenóis totais, maior conteúdo de alumínio, ferro, cobre, chumbo, níquel, zinco, cádmio, tálio, potássio, cálcio, magnésio e sódio. Os vinhos fortificados

produzidos no Planalto Catarinense apresentaram maior intensidade e densidade de cor, maior conteúdo de ácido cafeico e de taninos totais, menor relação glicose/ frutose, maior conteúdo de ácido málico e menor conteúdo de ácido acético, razão de isótopos estáveis de carbono mais negativa, maior conteúdo de álcoois isoamílicos, isobutanol, cobalto e manganês. Os vinhos da Região Carbonífera apresentaram maior luminosidade ($> L^*$), menor conteúdo de ácido succínico e de ácido acético, alto conteúdo de ácido málico, razão de isótopos estáveis de carbono menos negativa e maior concentração de etanal. A amostra de referência, produzida na região do Douro, Portugal, apresentou menor luminosidade, maior conteúdo de ácido ferúlico, ácido cumárico, compostos fenólicos não polimerizados e níquel. Os métodos analíticos empregados mostraram-se eficientes e confiáveis para a análise de amostras de vinhos fortificados e, a combinação dos resultados das variáveis analíticas e de estatística multivariada evidenciou as características das amostras de vinhos fortificados provenientes de diferentes regiões do Brasil.

Palavras-chave: vinhos fortificados; compostos fenólicos; açúcares; ácidos orgânicos; minerais; álcoois superiores; razão de isótopos estáveis de carbono; atividade antioxidante.

ARCARI, Stefany Grützmann. **Chemical characterization of fortified wines produced in different regions of Brazil**. 2010. Dissertation (Master's in Food Science) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

ABSTRACT

The objective of this study was characterize the fortified wines produced in different regions of Brazil through the determination of the main groups of chemical compounds, stable carbon isotope ratio and the antioxidant activity. Non-coloured phenolic compounds were determined to high performance liquid chromatography and a solid-phase extraction procedute was optimized for pretreatment of sample, using the Surface Response Methodology. Phenolic composition, colour and antioxidant activity were determined by spectrophotometry, colorimetry and high performance liquid chromatography. Capillary electrophoresis was employed for the determination of inorganic cations, organic acids and sugars. The minerals were analyzed by inductively coupled plasma-mass spectrometry, the higher alcohols by gaseous chromatography with flame ionization detector and the stable carbon isotope ratio by isotope ratio mass spectrometer. Application of the Surface Response Methodology revealed that the conditions for solid-phase extraction to the phenolic compounds were 5 mL of sample, 20 mL of elution solvent and flow rate 0.06 mL s^{-1} , with good results for determination of gallic acid, (+)catechin, caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid and quercetin. Sample to white and red fortified wines produced in different regions of Brazil showed to be active in the scavenging of radicals DPPH and ABTS and on the reduction of iron, and, the in vitro antioxidant activity of fortified wines showed a strong positive correlation with the total polyphenol content, *ortho*-diphenols, tartaric esters, flavonols, tannins, gallic acid and *trans*-resveratrol. Fortified wines produced in the “Serra Gaucha” region showed greater tonality, higher antioxidant activity, higher contents of catechin, quercetin, *trans*-resveratrol, *ortho*-diphenols, flavonols, tartaric esters, phenolic compounds, the highest content of aluminum, iron, copper, lead, nickel, zinc, cadmium, thallium, potassium, calcium, magnesium and sodium. Fortified wines produced in the “Planalto Catarinense” region showed greater intensity and density of colour, the higher content of caffeic acid and tannins, the lower glucose/ fructose ratio, high content of malic acid and lower content of acetic acid, stable carbon

isotope ratio more negative, the highest content of isoamyl alcohol, isobutanol, coo balt and manganese. The wines of the “Carbonífera” region had higher lightness ($> L^*$), lower contents of succinic acid and acetic acid, high content of malic acid, stable carbon isotope ratio less negative and higher concentration of ethanal. The reference sample, produced in the Douro, Portugal, showed a lower lightness, higher content of ferulic acid, coumaric acid, non-polymerized phenolic compounds and nickel. The analytical methods used were effective and reliable for the analysis of samples of fortified wines and the combining the results of analytical variables and multivariate analysis showed the characteristics of samples of fortified wines from the different regions of Brazil.

Keywords: fortified wines; phenolic compounds; sugars; organic acids; minerals; higher alcohols; stable carbon isotope ratio; antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1	Etapas da elaboração de vinho fortificado Xerez.	36
Figura 1.2	Exemplos de ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b).	44
Figura 1.3	Estrutura do <i>trans</i> -resveratrol.	45
Figura 1.4	Estrutura genérica das moléculas dos flavonóides.	46
Figura 1.5	Estrutura química das antocianinas.	47

CAPÍTULO 2

Figura 2.1	Superfície de resposta (a) e curva de contornos (b) para a variação na área dos picos cromatográficos de seis compostos fenólicos não coloridos em função do volume de solvente (mL) e vazão (mL s ⁻¹) com volume de amostra fixado em 7,5 mL.	90
Figura 2.2	Probabilidade normal dos resíduos para a área total dos picos cromatográficos de seis compostos fenólicos não coloridos.	91
Figura 2.3	Perfil cromatográfico típico de uma amostra de vinho fortificado após pré-tratamento por extração em fase sólida. Os picos correspondem a: 1, ácido gálico; 2, catequina; 3, ácido cafeico; 4, ácido <i>p</i> -cumárico; 5, ácido ferúlico e 6, quecetina.	93

CAPÍTULO 3

Figura 3.1	Análise de Componentes Principais das determinações de compostos fenólicos e atividade antioxidante para amostras de vinhos fortificados brancos e tintos produzidos em diferentes regiões do Brasil.	129
-------------------	---	-----

CAPÍTULO 4

Figura 4.1	Perfil eletroforético dos padrões de cátions 5 mg L ⁻¹ (A) e de uma amostra de vinho fortificado com diluição 1:10 (v/v) (B). Identificação dos picos: 1 – potássio; 2 – bário (PI); 3 – cálcio; 4 – sódio; 5 –
-------------------	--

magnésio. Condições eletroforéticas: capilar com 50 μm D.I. e comprimento de 32,5 cm (24 cm até o detector); eletrólito: 10 mmol L^{-1} de imidazol e 40 mmol L^{-1} de ácido acético; detecção indireta 214 nm; voltagem + 30 kV. 151

Figura 4.2 Perfil eletroforético dos padrões de ácidos orgânicos (A) e de uma amostra de vinho branco fortificado (B). Identificação dos picos: 1 – ácido tartárico, 2 – ácido cítrico, 3 – ácido málico, 4 – ácido láctico, 5 – ácido aspártico (PI), 6 – ácido succínico, 7 – ácido acético. Condições eletroforéticas: capilar com 50 μm D.I. e comprimento de 40 cm (30 cm até o detector); eletrólito consistindo de 8,5 mmol L^{-1} TRIS, 10 mmol L^{-1} ácido 3,5-dinitrobenzóico e 0,2 mmol L^{-1} CTAB; detecção indireta em 254 nm; voltagem de -15 kV. 154

Figura 4.3 Perfil eletroforético dos padrões de açúcares (A), de uma amostra de vinho tinto fortificado (B) e de uma amostra de vinho branco fortificado (C). Identificação dos picos: 1 – frutose, 2 – glicose, 3 – fucose (PI). Condições eletroforéticas: capilar com 50 μm D.I. e comprimento de 40 cm (30 cm até o detector); eletrólito consistindo de 35 mmol L^{-1} NaOH, 10 mmol L^{-1} de ácido sórbico e 0,2 mmol L^{-1} CTAB; detecção indireta em 254 nm; voltagem de -30 kV. 157

CAPÍTULO 5

Figura 5.1 Análise de componentes principais das determinações de minerais, álcoois superiores e razão de isótopos estáveis de carbono para amostras de vinhos brancos fortificados produzidos no Sul do Brasil. Regiões de procedência das amostras: SG – Serra Gaúcha; PC – Planalto Catarinense; RC – Região Carbonífera. 184

Figura 5.2 Análise de componentes principais das determinações de minerais, álcoois superiores e razão de isótopos estáveis de carbono para amostras de vinhos tintos fortificados produzidos no Sul do Brasil. Regiões de procedência das amostras: SG – 186

Serra Gaúcha; PC – Planalto Catarinense; DO – Região do Douro, Portugal.

Figura 5.3 Análise discriminante canônica das determinações de compostos minerais e razão de isótopos estáveis de carbono para vinhos fortificados produzidos em diferentes regiões do Brasil, com a região de produção como variável de classificação. Regiões de procedência das amostras: SG – Serra Gaúcha; PC – Planalto Catarinense; RC – Região Carbonífera; DO – Região do Douro, Portugal. 187

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.1	Localização geográfica e índices climáticos geovítcolas das regiões da Serra Gaúcha, Planalto Catarinense e Região Carbonífera.	41
-------------------	---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1	Delineamento central composto e resposta para a otimização da extração em fase sólida de compostos fenólicos não coloridos de amostra de vinho fortificado.	87
Tabela 2.2	Análise de Variância (ANOVA) para o modelo quadrático de superfície de resposta da extração em fase sólida de compostos fenólicos não coloridos de vinhos fortificados.	89
Tabela 2.3	Linearidade, limites de detecção e quantificação e exatidão do estudo de compostos fenólicos não coloridos em vinhos fortificados, obtidos por CLAE e pré-tratamento de amostra por SPE.	92
Tabela 2.4	Concentração de compostos fenólicos não coloridos em amostras de vinhos fortificados.	94

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1	Análises físico-químicas de vinhos fortificados brancos e tintos produzidos em diferentes regiões do Brasil.	119
Tabela 3.2	Compostos fenólicos de vinhos fortificados brancos e tintos produzidos em diferentes regiões do Brasil.	120
Tabela 3.3	Cor de vinhos fortificados brancos e tintos produzidos em diferentes regiões do Brasil.	125
Tabela 3.4	Atividade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP) de vinhos fortificados brancos e tintos produzidos em diferentes regiões do Brasil.	127

CAPÍTULO 4

Tabela 4.1	Características de desempenho dos métodos de eletroforese capilar.	148
Tabela 4.2	Composição de cátions inorgânicos, ácidos orgânicos e açúcares em vinhos fortificados brancos e tintos por eletroforese capilar.	155

CAPÍTULO 5

Tabela 5.1	Localização geográfica e índices climáticos geovítcolas das regiões da Serra Gaúcha, Planalto Catarinense e Região Carbonífera.	174
Tabela 5.2	Composição mineral, conteúdo de álcoois superiores e razão dos isótopos estáveis $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ do etanol de vinhos fortificados produzidos em diferentes regiões do Brasil.	181

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico
ACP	Análise de Componentes Principais
BaCl ₂	Cloreto de Bário
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CG-FID	Cromatografia Gasosa Acoplada a Detector de Ionização de Chama
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DCC	Delineamento Central Composto
DI	Diâmetro Interno
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DOC	Denominação de Origem Controlada
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FRAP	Potencial Antioxidante Redutor Férrico
g	Gramas
g L ⁻¹	Gramas por Litro
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico
ha	Hectare
HCl	Ácido Clorídrico
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICP-MS	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado
IRMS	Espectrometria de Massa para Razões Isotópicas
IVDP	Instituto dos Vinhos do Douro e Porto
KIO ₃	Iodeto de Potássio
kV	Quilovolts
L	Litro
LAREN	Laboratório de Referência em Enologia
LBV	<i>Late Bottled Vintage</i>
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
m/z	Massa/ Carga

mAU	Mili Unidades de Absorbância
mEq L ⁻¹	Miliequivalente por litro
mg	Miligrama
mg L ⁻¹	Miligrama por Litro
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Cloreto de Magnésio Hexahidratado
min	Minutos
mL	Mililitro
mL s ⁻¹	Mililitros por segundo
mm	Milímetros
mMol	Milimoles
mol L ⁻¹	Moles por Litro
MΩ	Ohm Metro
NaNO ₃	Nitrato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
Nm	Nanômetros
O	Oeste
° C	Graus Celsius
PI	Padrão Interno
psi	Libra por Polegada Quadrada
R	Coefficiente de Correlação
R ²	Coefficiente de Determinação
R ² _{adj}	Coefficiente de Determinação adjacente
s	Segundos
S	Sul
SO ₂	Dióxido de Enxofre
SPE	Extração em Fase Sólida
TEAC	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
TRIS	Trishidroxiaminometano
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UV	Ultravioleta
v	Volume
UV-VIS	Ultravioleta - Visível
δ ¹³ C	Razão de Isótopos Estáveis de Carbono
μL	Microlitro
(Mg(ClO ₄) ₂)	Perclorato de Magnésio
μ	Micra
μA	Microamperes
μg L ⁻¹	Micrograma por Litro
‰	Per mil

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	25
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
1 VINHOS FORTIFICADOS	30
1.1 VINHOS FORTIFICADOS BRASILEIROS	31
1.2 VINHO DO PORTO	31
2 TRADICIONAIS REGIÕES DE PRODUÇÃO DE VINHOS FORTIFICADOS	33
2.1 REGIÃO DO DOURO – PORTUGAL	33
2.2 ILHA DA MADEIRA – PORTUGAL	33
2.3 REGIÃO DE SETÚBAL – PORTUGAL	34
2.4 REGIÃO DE TOKAY – HUNGRIA	34
2.5 REGIÃO DE XEREZ – ESPANHA	35
2.6 REGIÃO DE SAUTERNES – FRANÇA	37
2.7 REGIÃO DA SICÍLIA – ITÁLIA	37
3 REGIÕES VITIVINÍCOLAS BRASILEIRAS	38
4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO VINHO	42
4.1 COMPOSTOS FENÓLICOS	42
4.1.1 Compostos Não Flavonóides	44
4.1.2 Flavonóides	46
4.2 AÇÚCARES	49
4.3 ÁCIDOS ORGÂNICOS	51
4.4 MINERAIS	53
4.5 ÁLCOOIS SUPERIORES	56
5 RAZÃO ISOTÓPICA	58
5.1 RAZÃO DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO	59
6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
CAPÍTULO 2 - OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DE COMPOSTOS FENÓLICOS NÃO COLORIDOS DE VINHOS FORTIFICADOS UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE RESPOSTA	79
RESUMO	80

ABSTRACT	81
1 INTRODUÇÃO	82
2 MATERIAL E MÉTODOS	83
2.1 PADRÕES E REAGENTES	83
2.2 AMOSTRAS	84
2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NÃO COLORIDOS DE AMOSTRA DE VINHO FORTIFICADO	84
2.4 PRÉ-TRATAMENTO DAS AMOSTRAS	85
2.5 ANÁLISE POR CLAE UV-VIS	85
2.6 EFICIÊNCIA DO MÉTODO	86
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
3.1 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DE COMPOSTOS FENÓLICOS NÃO COLORIDOS DE AMOSTRA DE VINHO FORTIFICADO	86
3.2 EFICIÊNCIA ANALÍTICA	92
3.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NÃO COLORIDOS EM AMOSTRAS REAIS DE VINHO FORTIFICADO	93
4 CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
CAPÍTULO 3 - COMPOSIÇÃO FENÓLICA, COR E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE VINHOS FORTIFICADOS PRODUZIDOS EM DIFERENTES REGIÕES BRASILEIRAS	101
RESUMO	102
ABSTRACT	103
1 INTRODUÇÃO	104
2 MATERIAL E MÉTODOS	105
2.1 AMOSTRAS	105
2.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	106
2.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	106
2.3.1 Análises Espectrofotométricas	106
2.3.2 Análises Cromatográficas	107
2.4 DETERMINAÇÕES DE COR	109
2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	110
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	111
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	111

3.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	111
3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS, COR E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	113
3.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS	128
4 CONCLUSÕES	130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

CAPÍTULO 4 - DETERMINAÇÃO DE CÁTIOS INORGÂNICOS, ÁCIDOS ORGÂNICOS E AÇÚCARES EM VINHOS FORTIFICADOS POR ELETROFORESE CAPILAR	139
---	-----

RESUMO	140
ABSTRACT	141
1 INTRODUÇÃO	142
2 MATERIAL E MÉTODOS	144
2.1 INSTRUMENTAÇÃO	144
2.2 REAGENTES E SOLUÇÕES	144
2.3 AMOSTRAS	145
2.4 CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA	145
2.4.1 Determinação de Cátions Inorgânicos	145
2.4.2 Determinação de Ácidos Orgânicos	146
2.4.3 Determinação de Açúcares	146
2.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MÉTODOS	147
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	147
3.1 DESEMPENHO DOS MÉTODOS	147
3.2 ANÁLISES DE AMOSTRAS DE VINHOS FORTIFICADOS	148
4 CONCLUSÕES	158
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	159

CAPÍTULO 5 - COMPOSIÇÃO DE MINERAIS, ÁLCOOIS SUPERIORES E ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO DE VINHOS FORTIFICADOS PRODUZIDOS EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL	165
---	-----

RESUMO	166
ABSTRACT	167
1 INTRODUÇÃO	168
2 MATERIAL E MÉTODOS	170
2.1 AMOSTRAS	170

2.2 REAGENTES	170
2.3 METODOLOGIAS	171
2.3.1 Determinação de Elementos Mineiras por ICP-MS	171
2.3.2 Determinação de Etanal e Álcoois Superiores por CG-FID	171
2.3.3 Determinação da Razão de Isótopos Estáveis de Carbono por IRMS	172
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	173
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	173
3.1 COMPOSIÇÃO MINERAL	174
3.2 ÁLCOOIS SUPERIORES E ETANAL	178
3.3 RAZÃO DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO	180
3.4 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS	184
3.5 ANÁLISE DISCRIMINANTE CANÔNICA	187
4 CONCLUSÕES	188
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	189
CONSIDERAÇÕES FINAIS	197

INTRODUÇÃO

Os vinhos fortificados são produtos diferenciados devido a sua longevidade, complexidade de sabores e aromas, características de cor e de doçura. Caracterizam-se por um processo de vinificação típico que inclui a etapa de fortificação, em que se procede a adição de álcool vínico com o objetivo de parar a fermentação alcoólica, proporcionando ao produto final teor alcoólico próximo a 18 % e conservando a doçura natural das uvas. São vinhos que desafiam o paladar, pois pouco se assemelham aos vinhos brancos e tintos secos e suaves, ou aos espumantes, usualmente mais consumidos.

Apesar de não possuir tradição para a produção de vinhos fortificados, no Brasil já existem produtos que são reconhecidos e apreciados, principalmente por apresentarem características diferenciadas. Os vinhos fortificados brasileiros são, na grande maioria, tintos, possuem mais de uma variedade de uva em sua composição, têm sua fermentação interrompida quando parte do açúcar se transformou em álcool, sendo fortificados com aguardente vínica preparada das próprias uvas que entram em sua composição e, geralmente são maturados em carvalho. A produção de vinhos fortificados apresenta maior expressão na Região Sul do Brasil, com destaque para as Regiões vitivinícolas da Serra Gaúcha, Planalto Catarinense e Região Carbonífera.

Dos vinhos fortificados tradicionalmente produzidos nos países europeus, o de maior consumo no Brasil é o Vinho do Porto. Segundo dados do IVDP - Instituto dos Vinhos do Douro e Porto (IVDP, 2010), o Brasil importou 93.228 litros de Vinho do Porto durante o ano de 2009, o que representa um volume de negócios da ordem de 4.162.470 Euros. O Brasil está classificado entre os principais mercados consumidores de vinho do Porto, ocupando o décimo primeiro lugar em volume de importação.

A tipicidade e a qualidade dos vinhos são determinadas pela composição química e pelas características sensoriais. Conhecendo-se a composição química, comprova-se a qualidade, a estabilidade, bem como a concentração de componentes básicos, que refletem a tecnologia de vinificação, possibilitando também a condição de traçar o perfil dos vinhos de uma determinada região. Diversos compostos interferem na cor, aroma e sabor dos vinhos, dos quais os principais são os compostos fenólicos, açúcares, ácidos orgânicos, minerais e álcoois superiores. Além destes compostos, a razão de isótopos estáveis de carbono também

interfere na caracterização da tipicidade dos vinhos produzidos em diferentes regiões.

Os vinhos fortificados, bem como os demais tipos de vinhos, são considerados itens de qualidade de vida, devido à importância de seus constituintes químicos para a saúde humana. Diversos estudos têm mostrado os benefícios destes compostos como agentes antioxidantes e antiinflamatórios, na proteção contra doenças cardiovasculares e câncer, na redução da obesidade e na prevenção do envelhecimento. Dos compostos com propriedades antioxidantes destacam-se os compostos fenólicos, presentes nas formas livres ou complexadas. Entre as principais fontes destes compostos com atividade antioxidante destacam-se os vinhos, principalmente tintos.

Diversos estudos foram realizados sobre a composição química e atividade antioxidante de vinhos fortificados produzidos em diversos países, porém, pesquisas sobre os vinhos fortificados produzidos no Brasil são inexistentes. Tendo em vista que a composição química dos vinhos é influenciada por diversos fatores relacionados à região de produção e às tecnologias de vinificação empregadas, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar os vinhos fortificados produzidos em diferentes regiões do Brasil segundo a sua composição química. O Vinho do Porto, oriundo da Região do Douro – Portugal, foi apontado como referencial para a realização deste estudo, por apresentar processo de elaboração semelhante aos vinhos brasileiros e, por ser o vinho fortificado tradicionalmente mais consumido no país.

O Capítulo 1 apresenta uma breve revisão bibliográfica sobre os vinhos fortificados, as tradicionais regiões de produção e os principais vinhos fortificados produzidos em todo o mundo, as principais regiões vitivinícolas brasileiras, os principais grupos de compostos químicos presentes no vinho, a razão isotópica e, a atividade antioxidante.

Os Capítulos foram elaborados no formato de artigos científicos e são apresentados da seguinte forma:

Capítulo 2 – Otimização da extração em fase sólida de compostos fenólicos não coloridos de vinhos fortificados utilizando a metodologia de superfície resposta - Neste capítulo um procedimento de extração em fase sólida foi otimizado para o pré-tratamento de amostras de vinhos fortificados para posterior análise por CLAE-UV-Vis. As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos, do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC.

Capítulo 3 – Composição fenólica, cor e atividade antioxidante de vinhos fortificados produzidos em diferentes regiões brasileiras - Neste

capítulo foram realizadas análises físico-químicas e determinações de composição fenólica, cor e atividade antioxidante de doze amostras de vinhos fortificados brasileiros. As análises físico-químicas foram executadas no Laboratório de Análise de Bebidas da Estação Experimental da Epagri de Videira. Composição fenólica, cor e atividade antioxidante foram analisadas nos laboratórios do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC.

Capítulo 4 – Determinação de cátions inorgânicos, ácidos orgânicos e açúcares em vinhos fortificados por eletroforese capilar - Neste capítulo foram determinadas as concentrações de cátions inorgânicos, ácidos orgânicos e açúcares em vinhos fortificados brasileiros. As análises foram realizadas no Laboratório de Eletroforese Capilar do Departamento de Química da UFSC.

Capítulo 5 - Composição de minerais, álcoois superiores e isótopos estáveis de carbono de vinhos fortificados produzidos em diferentes regiões do Brasil - Neste capítulo foram determinadas as concentrações de elementos minerais, álcoois superiores e etanal e, foi enumerada a razão de isótopos estáveis de carbono em amostras de vinhos fortificados brasileiros. As análises de minerais foram realizadas no Laboratório de Análises de Elementos Traço e Laboratório de Eletroforese Capilar, ambos do Departamento de Química da UFSC. Os álcoois superiores foram determinados no Laboratório de Análise de Bebidas da Estação Experimental da Epagri de Videira. A razão de isótopos estáveis de carbono foi determinada no Laboratório de Referência em Enologia – LAREN, situado junto à sede da Divisão de Enologia do Departamento de Produção Vegetal, da Secretaria Estadual da Agricultura, Pecuária, Pesca e Agronegócio do Rio Grande do Sul, em Caxias do Sul.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 VINHOS FORTIFICADOS

Os vinhos fortificados caracterizam-se por um processo de vinificação típico que inclui a etapa de fortificação, ou adição de álcool vínico (contendo 95% de etanol v/v), com o objetivo de interromper a fermentação alcoólica, proporcionando ao produto final teor alcoólico próximo a 18% (v/v) e, de conservar a doçura natural das uvas (HO; HOGG; SILVA, 1999; CÂMARA; ALVES; MARQUES, 2006a; CAMPO et al., 2006). Estes vinhos incluem produtos tão diversos quanto os tradicionais vinhos fortificados: Vinho do Porto e Vinho Madeira (Portugal), Xerez (Espanha) e Sauternes (França) e vários outros produtos da Austrália, África do Sul ou Estados Unidos, que são produzidos de modo semelhante aos produtos europeus citados (HO; HOGG; SILVA, 1999).

O processo de vinificação dos vinhos fortificados inicia com a colheita e esmagamento das uvas, seguido de fermentação do mosto. Quando o conteúdo de açúcar do mosto é de aproximadamente 90 a 100 g L⁻¹, álcool vínico é adicionado para interromper o processo de fermentação. Para produção de vinhos tintos fortificados, a etapa de fermentação ocorre na presença das cascas das uvas (maceração), enquanto os vinhos brancos fortificados, em sua maioria, são fermentados na ausência das cascas. Após a fortificação e estabilização, o vinho fortificado é então transferido para barris de carvalho, onde é maturado durante alguns meses (BRAVO et al., 2006).

Os processos de maturação e de envelhecimento, que ocorrem respectivamente nos barris de carvalho e nas garrafas, conferem importantes características aos vinhos fortificados, contribuindo para a composição química e características sensoriais finais (HO; HOGG; SILVA, 1999). Devido ao elevado conteúdo de etanol, as leveduras não estão envolvidas nos processos de maturação e envelhecimento dos vinhos fortificados (CÂMARA, ALVES, MARQUES, 2006b). O aroma “madeirizado” típico dos vinhos doces fortificados, maturados sob condições de oxidação, é desenvolvido nestas etapas. A presença de oxigênio determina a ocorrência de reações de oxidação em que antocianinas, flavonóides e ésteres tartáricos dos ácidos hidroxicinâmicos, bem como os compostos fenólicos extraídos da madeira estão envolvidos (CÂMARA, ALVES, MARQUES, 2006 b). A oxidação de compostos fenólicos e a extração de compostos voláteis da madeira para os vinhos são consideradas etapas indispensáveis para o

desenvolvimento dos aromas e sabores dos vinhos doces fortificados (RUDNITSKAYA et al., 2010).

1.1 VINHOS FORTIFICADOS BRASILEIROS

Segundo a legislação brasileira, vinho licoroso é o vinho com teor alcoólico de 14% (catorze por cento) a 18% (dezoito por cento) em volume, sendo permitido, na sua elaboração, o uso de álcool etílico potável de origem agrícola, mosto concentrado, caramelo, mistela simples, sacarose e caramelo de uva (BRASIL, 2004). Os vinhos licorosos são internacionalmente subdivididos em duas classes, os vinhos doces naturais, em que o açúcar residual provém da própria fruta e, os vinhos doces fortificados, em que a fermentação é interrompida antes de todo o açúcar ser transformado em álcool pela fortificação com álcool vínico (ROSA, 2008).

Os vinhos doces fortificados brasileiros são, em grande maioria, tintos e preparados de modo muito semelhante aos vinhos fortificados portugueses, pois levam mais de uma variedade de uva em sua composição, têm sua fermentação interrompida quando nem todo o açúcar se transformou em álcool, são fortificados com álcool vínico preparado das próprias variedades de uvas que entram em sua composição e em geral, são envelhecidos em carvalho (ROSA, 2008).

No Brasil, os vinhos fortificados são produzidos principalmente com as variedades de uva branca Moscato e com as tintas Cabernet Sauvignon e Merlot (ROSA, 2008). Mesmo sem tradição de produzir vinhos doces fortificados e com mercado ainda restrito, as vinícolas brasileiras iniciaram a produção destes vinhos que, por apresentarem características diferenciadas, vem sendo apreciados pelo consumidor brasileiro.

1.2 VINHO DO PORTO

O processo de vinificação do Vinho do Porto inclui a interrupção do processo de fermentação do mosto por adição de álcool vínico, produzindo uma vasta gama de graus de doçura – muito doce, doce, meio-seco ou extra-seco – dependendo do momento em que o álcool vínico é adicionado para interromper a fermentação (ESTEVES et al., 2004).

O Vinho do Porto é elaborado com diversas variedades de uvas, das quais se destacam as uvas tintas Touriga Nacional, Tinta Roriz, Tinta Barroca, Touriga Francesa, Tinta Cão, Bastardo, Donzelinho,

Tinta Francisca e Mourisco Tinto e, as uvas brancas Viosinho, Donzelinho Branco, Esgana-Cão, Folgazão, Malvasia Corada, Malvasia Fina, Rabigato e Gouveio (ESTEVES et al., 2004).

O método tradicional, ainda hoje praticado em algumas vinícolas, consiste em desengajar as uvas, depois colocá-las em lagares (recipientes abertos de pedra com altura máxima de 60 cm), onde são esmagadas. Esta operação é tradicionalmente feita por homens e pode ser executada por modelos mecânicos que simulam a pisa com os pés. O mosto em fermentação fica em repouso durante algumas horas e é novamente esmagado até o momento em que é separado das partes sólidas e fermenta nos lagares de 24 a 36 horas (IVDP, 2010). Quando o volume de álcool atinge 9% em volume, o álcool vínico é adicionado. A quantidade de álcool acrescentada corresponde a 25% do volume do vinho, o que eleva o nível de álcool do Vinho do Porto a aproximadamente 18% (v/v), interrompendo a atividade fermentativa das leveduras. O açúcar não convertido em álcool permanece no vinho (GARCÍA-VIGUERA et al., 1997).

A adição de álcool vínico confere ao vinho características sensoriais mais complexas e melhora a estabilidade químico-enológica. É determinante se fazer uma escolha criteriosa do tipo de álcool vínico aplicado na fortificação, pois a sua composição química e o seu potencial aromático são fundamentais para a obtenção de um vinho fortificado de alta qualidade. O Instituto dos Vinhos do Douro e Porto (IVDP) aplica metodologias rigorosas de controle a todos os lotes de álcool vínico que serão utilizados na produção do Vinho do Porto. O controle qualitativo é realizado através de análises físico-químicas e sensoriais (IVDP, 2010).

Depois das primeiras trasfegas os vinhos são classificados segundo sua qualidade sensorial. Os melhores lotes de vinhos produzidos em um ano excepcional recebem a declaração *Vintage*. Contudo, a maior parte dos vinhos é utilizada para a elaboração de *blends* de características particulares e obedecem a padrões de qualidade pré-estabelecidos (IVDP, 2010).

O Vinho do Porto é envelhecido em carvalho por períodos que variam de dois anos até muitas décadas. Os diferentes tempos de envelhecimento aumentam a diversidade de estilos de Porto, cada qual com características distintas de sabor, aroma e cor (CRISTOVAM; PATERSON; PIGGOTT, 2000).

Para o Porto *Vintage* e o LBV (Porto Late Bottled *Vintage*) a maturação é efetuada em carvalho português. Com o envelhecimento nas garrafas, o vinho melhora consideravelmente as suas características

em virtude de se operar um desenvolvimento dos aromas e sabores a um baixo potencial de oxidação (IVDP, 2010).

2 TRADICIONAIS REGIÕES DE PRODUÇÃO DE VINHOS FORTIFICADOS

2.1 REGIÃO DO DOURO – PORTUGAL

Situada no nordeste de Portugal, na bacia hidrográfica do Douro, a Região do Douro estende-se por uma área de aproximadamente 250.000 ha, dividida em três sub-regiões: Baixo Corgo, Cima Corgo e Douro Superior. Protegida dos fortes ventos do Oceano Atlântico pelas serras do Marão e Montemuro, a Região do Douro apresenta solos de xisto e calcário, com riqueza de potássio, mas pobres em matéria orgânica. No inverno o clima é muito frio, com ventos fortes e, no verão, muito quente. As uvas são cultivadas em encostas recortadas como grandes patamares e sustentadas por muros. As videiras localizam-se em altitudes que variam de 40 a 700 metros (IVDP, 2010).

Uma grande coleção de variedades de uvas é encontrada na Região do Douro e, é a combinação dos vinhos originários dessas variedades que dá origem ao Vinho do Porto. A viticultura se desenvolve em condições rudes e as formas de condução dos vinhedos são a solução encontrada para ajustar à influência do clima e do solo às necessidades da planta e aos objetivos de produção (IVDP, 2010).

Os vinhos fortificados produzidos na Região Demarcada do Douro apresentam certificado de Denominação de Origem Controlada (DOC), cujo objetivo é o controle da produção e comercialização dos vinhos da região. A região vitivinícola do Douro foi demarcada e regulamentada há mais de dois séculos, sendo a DOC mais antiga do mundo (IVDP, 2010).

2.2 ILHA DA MADEIRA – PORTUGAL

A Ilha da Madeira apresenta solo rico em materiais vulcânicos e compostos calcários e, montanhas cercadas de nuvens permanentes que atingem altitudes próximas a 2 mil metros (CÂMARA; ALVES; MARQUES, 2006a).

O vinho fortificado Madeira, produzido nesta região destaca-se quanto ao processo de vinificação em que o álcool vínico pode ser acrescentado durante ou após a fermentação e, quanto mais tarde isso acontecer mais seca será a bebida resultante. Após a fortificação, o

vinho passa por um processo de estufagem, que consiste na maturação dos vinhos em barris de carvalho em salas com temperaturas entre 40 e 46 °C, por aproximadamente três meses (RUDNITSKAYA et al., 2010).

2.3 REGIÃO DE SETÚBAL – PORTUGAL

A Denominação de Origem de Setúbal, criada em 1907, é uma das mais antigas e destacadas regiões vitícolas portuguesas. A produção de vinhos doces fortificados é expressiva, principalmente a partir da variedade de uva branca Moscatel de Alexandria. O Moscatel de Setúbal tem graduação alcoólica entre 18 e 20 % (v/v), cor topázio e aromas característicos (BRAVO et al., 2006).

Durante o processo de vinificação o álcool vínico é adicionado para interromper o processo de fermentação (BRAVO et al., 2008). As sementes e cascas das uvas brancas Moscato ficam em contato com o vinho durante meses, para maior extração de compostos fenólicos e aromas. O vinho é separado do bagaço por prensagem e posteriormente é transferido para barris de carvalho onde permanece durante 24 meses (BRAVO et al., 2006).

2.4 REGIÃO DE TOKAY – HUNGRIA

A área vitícola de Tokay está localizada no nordeste da Hungria na área agroecológica de montanhas de Tokay/ Zemplén, a uma altitude média de 500 metros. O clima é de caráter continental, com verões levemente ensolarados e outonos chuvosos e nublados. Esta área possui solos consideravelmente diversificados, com predominância de rochas de origem vulcânica. Na região vitícola de Tokay são produzidos exclusivamente vinhos brancos, particularmente de variedades de uvas adequadas à produção de vinho onde são selecionadas aquelas com podridão nobre ou *aszú* (MURÁNYI; KOÁCS, 2000). O *Botrytis cinerea* se desenvolve nas bagas sobrematuradas, em condições climáticas específicas, com a alternância de manhãs úmidas e tardes ensolaradas (SARRAZIN; DUBOURDIEU; DARRIET, 2007).

A atividade fisiológica do *Botrytis cinerea* conduz a alterações significativas na composição das bagas botritizadas, as paredes celulares das cascas são degradadas, a glicose é oxidada produzindo glicerol e, são produzidos ácidos orgânicos como ácido acético, cítrico e glucônico. Simultaneamente, durante as tardes ensolaradas, as uvas são desidratadas, concentrando os açúcares e compostos fenólicos. Portanto,

a composição das uvas botritizadas não se deve apenas ao metabolismo do *Botrytis cinerea*, mas também à desidratação (SARRAZIN; DUBOURDIEU; DARRIET, 2007).

O método de elaboração dos vinhos fortificados Tokay inicia com a colheita das uvas botritizadas baga por baga. As bagas *aszú* são incorporadas ao mosto em fermentação e, prensadas após maceração de um a três dias. A etapa de fermentação se estende por vários meses. O número de cestos (*puttonyos*) de bagas *aszú* adicionados ao volume de 136 litros de vinho fortificado determina a concentração e a qualidade do vinho: 3, 4, 5, 6 *puttonyos*. Os vinhos *aszú* são maturados em barris de carvalho por muitos anos (MIKLÓSY; KERÉNYI, 2004).

2.5 REGIÃO DE XEREZ – ESPANHA

Situada na província de Cádiz, na extremidade sudoeste da Andaluzia, no Sul da Espanha, diante do Atlântico, a Região de Xerez ocupa o centro de um triângulo formado por três cidades, ao norte de Cádiz: Jerez de la Frontera, Sanlúcar de Barrameda e Puerto de Santa Maria (BENÍTEZ et al., 2002).

O clima, geralmente quente, pode se tornar muito quente e muito seco durante o verão. O solo calcário é denominado albariza. A associação desse solo, ideal para a produção de uvas brancas, com o clima quente, oferece excelentes condições para a cultura da videira, com destaque para as variedades Palomino, responsável por 90% da produção da região, a Pedro Ximénez e a Moscato (PANEQUE et al., 2010).

Quando maduras, as uvas são colhidas e, ainda em cachos, são espalhadas sobre tapetes e expostas ao sol antes da prensagem. Os cachos são virados regularmente e cobertos durante a noite para evitar os efeitos adversos da alta umidade do ar. As uvas atingem um nível de açúcar de aproximadamente 300 g L⁻¹ e são esmagadas. Depois disso, o mosto com alto conteúdo de açúcares é fermentado e fortificado com álcool vínico (HERNÁNDEZ et al., 2006; MÁRQUEZ et al., 2008). Quando a fermentação termina, o vinho é transferido para barris de 500 litros que não são completamente preenchidos. Enquanto os vinhos maturam nas adegas, um biofilme de leveduras ou “flor” (*Sacharomyces beticus*) aparece na superfície do vinho, protegendo-o contra a oxidação em contato com o ar (BENÍTEZ, 2002; MUÑOZ et al., 2007).

O sistema de envelhecimento é muito tradicional e é conhecido como “envelhecimento na *solera*” (Figura 1.1). A *solera* consiste de filas de barris de carvalho americano, empilhadas uma após a outra, com

os barris dispostos a uma distância que facilite a progressiva mistura das frações dos vinhos; cada nível é uma fila de um sistema cuja numeração é efetuada de baixo para cima, de modo que a primeira fila é de descanso dos barris no chão da adega. O vinho novo é introduzido no sistema de *solera* no topo da fila, nas numerações mais altas. A cada quatro meses ou mais, os barris de cada fila são parcialmente esvaziados, com uma proporção do seu conteúdo sendo adicionada à fila imediatamente inferior. Por sua vez, os barris das fileiras imediatamente acima são preenchidos com vinhos mais jovens. O vinho envelhecido que será engarrafado é retirado da fila no primeiro nível da *solera* (MÁRQUEZ et al., 2008; VILLAMIEL; POLO; MORENO-ARRIBAS, 2008).

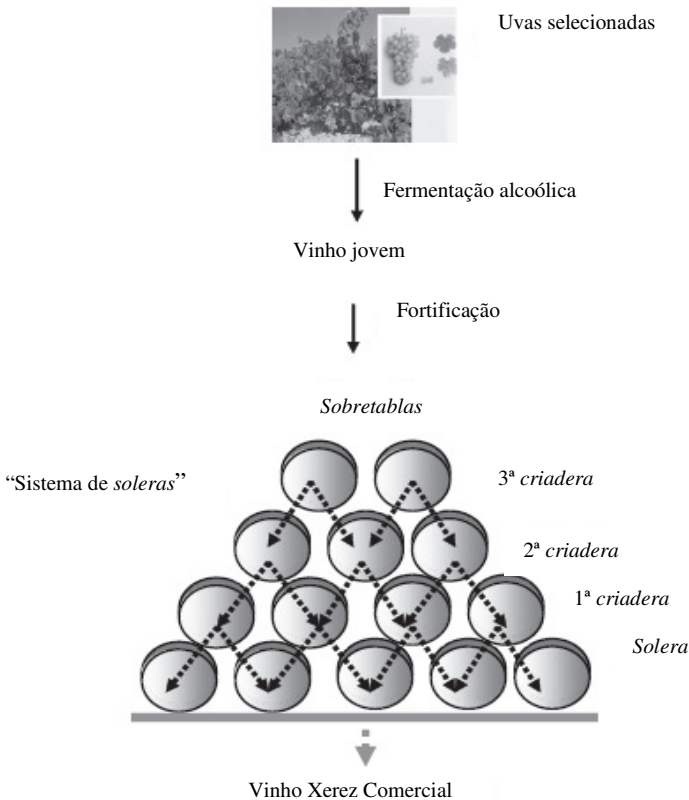


Figura 1.1 Etapas da elaboração de vinho fortificado Xerez (VILLAMIEL; POLO; MORENO-ARRIBAS, 2008).

2.6 REGIÃO DE SAUTERNES – FRANÇA

O vinho fortificado Sauternes, procedente da região de Sauternes, situada ao sul de Graves, na região de Bordeaux, França, é considerado um dos melhores vinhos brancos licorosos do mundo. As variedades utilizadas na sua produção são Sauvignon Blanc, Sémillon e Muscadelle (BAILLY et al., 2006).

A Região de Sauternes apresenta condições climáticas que garantem a doçura e sobrematuração das uvas para a elaboração de vinhos fortificados de qualidade. O clima favorece o surgimento e a ação do *Botrytis cinerea*, que age descolorindo as bagas, enrugando-as e concentrando seu conteúdo de açúcares, ácidos e glicerol (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

A seleção das bagas sobrematuradas e botritizadas no momento da colheita é o fator determinante da qualidade e da tipicidade do vinho fortificado Sauternes. Em algumas safras o *Botrytis cinerea* é muito limitado e tardio. Se a uva é colhida muito madura e saudável, obtém-se um vinho rico e suave, mas sem os aromas específicos e complexos conferidos pela ação do *Botrytis cinerea* (JACKSON, 2008). O processo de vinificação do Sauternes inclui a fortificação, maturação por seis meses em carvalho francês e envelhecimento em garrafa por dezoito meses (BAILLY et al., 2006).

2.7 REGIÃO DA SICÍLIA – ITÁLIA

O vinho fortificado Marsala foi o primeiro vinho italiano que recebeu Denominação de Origem Controlada (DOC), reconhecida em 1969. Ele é exclusivamente produzido na província de Trapani, nos arredores da cidade portuária de Marsala, no oeste da Sicília e é caracterizado por uma proporção de conteúdo alcoólico próximo a 18 % (v/v) (LA TORRE et al., 2008).

Todas as uvas utilizadas na elaboração do vinho fortificado Marsala são produzidas na região leste da Sicília, particularmente quente e ensolarada (DUGO et al., 2005). O processo de vinificação inclui a fermentação do mosto e posterior adição de uma pequena proporção de agente edulcorante denominado mistela, que consiste na combinação de uvas sobrematuradas e álcool vínico (DUGO et al., 2005).

Os vinhos fortificados Marsala são classificados de acordo com o conteúdo de açúcar e o tempo de envelhecimento. Os vinhos Marsala mais doces são denominados “Dolce” (açúcares totais $> 100 \text{ g L}^{-1}$), os mais secos “Secco” (açúcares totais $< 40 \text{ g L}^{-1}$), e “Semi-secco”

(açúcares totais de 40 a 100 g L⁻¹). De acordo com o tempo de envelhecimento são denominados “Fine” (> 1 ano de envelhecimento, 17% álcool), “Superiore” (> 2 anos de envelhecimento, 18% álcool), “Superiore-Riserva” (> 4 anos de envelhecimento, 18% álcool), “Vergine” (> 5 anos de envelhecimento) e “Stravecchio” (> 10 anos de envelhecimento). “Vergine” e “Stravecchio” são fortificados apenas com álcool vínico (DUGO et al., 2005; LA TORRE et al., 2008).

3 REGIÕES VITIVINÍCOLAS BRASILEIRAS

Dados históricos revelam que a videira foi introduzida no Brasil pelos colonizadores portugueses em 1532, através de Martin Afonso de Souza, na então Capitania de São Vicente, hoje Estado de São Paulo. A partir deste ponto e através de introduções posteriores, a viticultura expandiu-se para outras regiões do País, sempre com cultivares de *Vitis vinifera* procedentes de Portugal e Espanha. A viticultura tornou-se atividade comercial a partir do início do século XX, por iniciativa dos imigrantes italianos estabelecidos no sul do país a partir de 1875 (IBRAVIN, 2008; PROTAS; CAMARGO; MELO, 2008). No Estado do Rio Grande do Sul, foi incentivado o cultivo de castas viníferas através de estímulos governamentais. Nesse período a atividade vitivinícola expandiu-se para outras regiões do sul e sudeste do País, sempre em zonas com período hibernal definido e com o predomínio de cultivares americanas e híbridas. Entretanto, na década de 70, com a chegada de algumas empresas multinacionais nas regiões da Serra Gaúcha e da Fronteira Oeste (município de Santana do Livramento), verificou-se um incremento significativo da área de parreirais com cultivares *Vitis vinifera* (PROTAS; CAMARGO; MELO, 2008).

A viticultura tropical brasileira foi efetivamente desenvolvida a partir da década de 1960, com o plantio de vinhedos comerciais de uva de mesa na região do vale do Rio São Francisco, no nordeste semi-árido brasileiro. Nos anos 70 surgiu o pólo vitícola do norte do Estado do Paraná e na década de 1980 desenvolveram-se as regiões do noroeste do Estado de São Paulo e do norte de Minas Gerais, todas voltadas à produção de uvas finas para consumo *in natura*. Iniciativas mais recentes de desenvolvimento da atividade vitivinícola estão sendo verificadas nas regiões Centro-Oeste, nos Estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás, e Nordeste, nos Estados da Bahia e Ceará (PROTAS; CAMARGO; MELO, 2008).

A viticultura, no Brasil, ocupa uma área de, aproximadamente, 77 mil hectares, com vinhedos estabelecidos desde o extremo sul do País,

em latitude de 30° 56' 15''S, até regiões situadas muito próximas à Linha do Equador, em latitude de 5° 11' 15''S. Em função da diversidade ambiental, existem pólos com viticultura característica de regiões temperadas, com um período de repouso hibernar; pólos em áreas subtropicais, onde a videira é cultivada com dois ciclos anuais, definidos em função de um período de temperaturas mais baixas, no qual há risco de geadas; e, pólos de viticultura tropical, onde é possível a realização de podas sucessivas, com a realização de dois e meio a três ciclos vegetativos por ano. A produção de uvas é da ordem de 1,2 milhões de toneladas/ano. Deste volume, cerca de 45 % é destinado ao processamento, para a elaboração de vinhos, sucos e outros derivados, e 55 % comercializado como uvas de mesa (IBRAVIN, 2008). Dentre as múltiplas variedades de uvas cultivadas no Brasil, as de *Vitis vinifera* são consideradas de alta qualidade, mas muito sensíveis às doenças fúngicas (CAMARGO, 2003).

Do total de produtos industrializados, 77 % são vinhos de mesa e 9 % são sucos de uva, ambos elaborados a partir de uvas de origem americana, especialmente cultivares de *Vitis labrusca*, *Vitis bourquina* e híbridos diversos. Cerca de 13 % são vinhos finos, elaborados com castas de *Vitis vinifera*; o restante dos produtos industrializados, 1 % do total, são outros derivados da uva e do vinho (IBRAVIN, 2008).

No Estado do Rio Grande do Sul, a principal região produtora é a da Serra Gaúcha, cujas coordenadas geográficas e indicadores climáticos médios são latitude 29° S, longitude 51° O, altitude 600-800 metros, precipitação 1.700 mm distribuídos ao longo do ano, temperatura média de 17,2 °C e umidade relativa do ar 76 %. A região nordeste do Estado do Rio Grande do Sul é a maior região vinícola do País (PROTAS; CAMARGO; MELO, 2008). Ainda no Rio Grande do Sul, na região da Campanha Central, que tem como principal pólo produtor o município de Santana do Livramento, encontra-se um pólo vitícola implantado e consolidado há mais de 20 anos. As uvas produzidas neste pólo representam cerca de 15 % da produção de uvas viníferas do Estado. Nos últimos anos, um novo pólo vitícola começa a surgir com investimentos na implantação de vinhedos de *Vitis vinifera*, destacando-se os municípios de Bagé e Candiota, na região da Campanha Meridional e Pinheiro Machado e Encruzilhada do Sul, na região da Serra do Sudeste. Além destes, a viticultura está sendo implantada em outros municípios não tradicionais como alternativa de diversificação de pequenas propriedades, principalmente na região do Alto Uruguai do Rio Grande do Sul (PROTAS; CAMARGO; MELO, 2008). No ano de 2009, foram elaborados 341,82 milhões de litros de

vinhos e derivados no Estado do Rio Grande do Sul, dos quais 39,90 milhões de litros são de vinhos viníferas e 205,42 milhões de litros são de vinho de mesa (IBRAVIN, 2010).

Em Santa Catarina, a vitivinicultura apresenta expressão econômica principalmente na região do Vale do Rio do Peixe, com latitude 27° S, longitude 51° O, altitude 600-800 metros. Esta região apresenta como indicadores climáticos médios uma precipitação de 1.800 mm ao ano, temperatura média de 17,1 °C e umidade relativa do ar de 80 %. Santa Catarina é o quarto Estado em área plantada com uvas no Brasil, mas fica em sexto lugar no que se refere à produção de uvas. Ainda assim, é o segundo Estado produtor de vinhos, demonstrando sua vocação para a vitivinicultura (CORDEIRO, 2006). Santa Catarina apresenta três regiões vitivinícolas definidas a partir de sua formação: a região tradicional (Vale do Rio do Peixe, no oeste catarinense e Região Carbonífera no sul do Estado), a nova região (municípios de Nova Trento, no Vale do Rio Tijucas, Rodeio, no Vale do Rio Itajaí e Chapecó, no oeste catarinense) e, a região super-nova ou de altitude (Planalto Catarinense, incluindo os municípios de São Joaquim, Bom Retiro e Urubici) (BRDE, 2005).

Em Santa Catarina, a vitivinicultura é uma exploração agrícola tradicional ligada à sócio-economia de regiões de origem italiana, principalmente do Vale do Rio do Peixe e de Urussanga. Na viticultura Catarinense predomina o cultivo de variedades americanas (*Vitis labrusca*) e híbridas sendo que, 75 % do volume da produção de uvas é destinado à vinificação (ROSIER; LOSSO, 1997). Atualmente, o Estado vem se destacando na produção de uvas viníferas (*Vitis vinifera*) para a produção de vinhos finos. Algumas áreas com condições climáticas diferenciadas, como clima ameno associado à elevada altitude, produzem matéria-prima para a fabricação de vinhos distintos, com intensa coloração, definição aromática e equilíbrio gustativo. Dentre essas áreas podemos citar São Joaquim, Água Doce, Iomerê, Tangará, Bom Retiro e Campos Novos (ROSIER, 2003).

A Região do Planalto Catarinense caracteriza-se pelo clima frio, úmido e por noites frias (TONIETTO; CARBONNEAU, 2004). A temperatura média anual é de 13 °C e a média histórica de precipitação, registrada entre 1956 e 2003, está entre 1300 a 1900 mm (BRIGHENTI; TONIETTO, 2004). A Região Carbonífera, com altitude média de 50 m, apresenta temperatura média anual de 19,4 °C, precipitação pluviométrica anual de 1.619 mm e 1.883 horas anuais de sol (TONIETTO; MANDELLI, 2003). É classificada como região quente/

temperado quente, segundo o Sistema de Classificação Climática Multicritério Geovitícola (BONA-SARTOR, 2009).

Os dados de localização geográfica e índices climáticos geovitícolas das regiões da Serra Gaúcha, Planalto Catarinense e Região Carbonífera são apresentados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 Localização geográfica e índices climáticos geovitícolas das regiões da Serra Gaúcha, Planalto Catarinense e Região Carbonífera.

	Serra Gaúcha	Planalto Catarinense	Região Carbonífera
Latitude	29°09'S	28°17'S	28°28'S
Longitude	51°32'S	49°55'S	49°11'S
Altitude Média	640 m	1415 m	50 m
Índice Heliotérmico	Temperado Quente	Frio	Quente/ Temperado quente
Índice de Frio Noturno	Noites Temperadas	Noites Frias	-
Índice de Seca	Úmido	Úmido	-

Fonte: BRIGHENTI; TONIETTO, 2004; EMBRAPA UVA E VINHO; UFRGS; FEPAGRO, 2004; TONIETTO; CARBONNEAU, 2004; BONA-SARTOR, 2009

No Estado de São Paulo, destacam-se dois pólos vitícolas, sendo um na região noroeste, com destaque para o município de Jales, e outro na região leste, nos municípios de Campinas, Itapetininga e Sorocaba. No Estado de Minas Gerais também se destacam dois pólos produtores, um ao sul, composto pelos municípios de Caldas, Andradas e Santa Rita de Caldas e outro ao norte, no município de Pirapora. A região do Vale do São Francisco, situada no trópico semi-árido brasileiro, é a principal região vitícola tropical do Brasil e possui cerca de 8.000 hectares de vinhedos distribuídos nos Estados de Pernambuco e Bahia (PROTAS; CAMARGO; MELO, 2008).

O Brasil vem desenvolvendo uma capacidade excepcional para a produção de vinhos de qualidade. Atualmente o País é considerado uma das melhores regiões no mundo para o cultivo de uvas destinadas a produção de vinhos espumantes. O Brasil exporta vinhos para vinte e dois países, dos quais se destacam Estados Unidos, Alemanha, Inglaterra

e República Tcheca (IBRAVIN, 2008). A produção de vinhos doces fortificados apresenta maior expressão na Região Sul do Brasil, com destaque para as Regiões vitivinícolas da Serra Gaúcha, Planalto Catarinense e Região Carbonífera.

4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO VINHO

O vinho é um meio aquoso composto por moléculas de açúcares, álcoois, polissacarídeos, elementos minerais, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, compostos nitrogenados, vitaminas, lipídeos e substâncias aromáticas. A composição do vinho torna-se mais complexa devido principalmente a fermentação, que modifica a composição do mosto, pelo consumo dos açúcares e a formação de etanol e outros produtos secundários (FLANZY, 2000).

A composição química é um importante aspecto de qualidade dos vinhos, além de ser um parâmetro utilizado para a caracterização de diferentes vinhos e regiões vitivinícolas (CLIFF; KING; SCHLOSSER, 2007). Os principais componentes químicos que contribuem para a caracterização dos vinhos de diferentes regiões são os compostos fenólicos, açúcares, ácidos orgânicos, elementos minerais e aromas.

4.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários das plantas que se encontram largamente distribuídos na natureza e constituem um grupo muito diversificado de fitoquímicos derivados da fenilalanina e tirosina. Englobam desde moléculas muito simples até moléculas com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares e proteínas e, são essenciais para o crescimento e reprodução das mesmas. Estes compostos se formam em condições de estresse, como infecções, ferimentos, radiações UV, entre outras (BRAVO, 1998; LEIGHTON; URQUIAGA, 1999).

Quimicamente, os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LEE et al., 2005). Estão incluídos na categoria de neutralizadores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação (ANGELO; JORGE, 2007). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende da sua estrutura, particularmente do número e posição dos grupos hidroxila e da natureza das substituições nos anéis aromáticos. Existem cerca de oito mil compostos fenólicos, que de acordo com sua estrutura química

são divididos em classes: ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e taninos. Dentre as classes de compostos fenólicos presentes em plantas e reconhecidos como componentes da dieta estão principalmente os flavonóides e os ácidos fenólicos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Em alimentos, estes compostos são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa (ANGELO; JORGE, 2007).

Os compostos fenólicos são abundantemente produzidos pela videira e são encontrados principalmente nas cascas e sementes da uva, das quais são parcialmente extraídos durante a vinificação. Contribuem diretamente para a evolução da cor e do gosto do vinho e indiretamente na intensidade e qualidade aromáticas. Os vinhos tintos contêm cinco a dez vezes mais compostos fenólicos que os brancos, em função da riqueza fenólica da uva e da maior extração na vinificação em tinto, em consequência de um maior tempo de maceração (PEINADO et al., 2009).

Os vinhos contêm grande quantidade de grupos de compostos fenólicos, que incluem os ácidos fenólicos, estilbenos, flavonóis, flavan-3-ols e polímeros denominados procianidinas e antocianinas. Estes compostos são atributos de qualidade dos vinhos e, também manifestam muitos efeitos benéficos para a saúde incluindo atividade antiinflamatória, antiviral, anticarcinogênica e antioxidante (PEINADO et al., 2009; RASTIJA; SRECNIK; MEDIC-SARIC, 2009).

A quantidade e qualidade de compostos fenólicos da uva dependem principalmente da variedade, do clima, do terreno, do estágio de maturação e das práticas de cultivo (MASA; VILANOVA, 2008). E, a quantidade de compostos fenólicos presentes no vinho depende de diversos fatores relacionados ao processo de vinificação, como temperatura, tempo de maceração, práticas de remontagem, concentração de etanol, pH, procedimentos de prensagem da uva, clarificação, filtração, etc. (LEIGHTON; URQUIAGA, 1999; NAVE; CABRITA; COSTA, 2007; RASTIJA; SRECNIK; MEDIC-SARIC, 2009). Alguns compostos fenólicos podem também ser extraídos da madeira durante a maturação. Um estudo sobre a composição fenólica de vinhos fortificados Moscatel de Setúbal concluiu que ácidos fenólicos, estilbenos e flavonóis apresentam diferentes concentrações de acordo com o tempo de maceração empregado no processo de vinificação (BRAVO et al., 2006).

Nos vinhos, os compostos fenólicos são responsáveis pelas características sensoriais de amargor e adstringência (FISCHER; NOBLE, 1994) e pela estabilidade da cor (PÉREZ-MAGARIÑO;

GONZÁLEZ-SAN JOSÉ, 2004). As práticas empregadas no processo de vinificação modificam a composição dos vinhos e suas propriedades sensoriais (GÓMEZ-MÍGUEZ et al., 2007). Os compostos fenólicos são os maiores substratos para o consumo de oxigênio no vinho, participando de muitas reações de oxidação, que contribuem diretamente ou indiretamente para as modificações na cor, adstringência, amargor e aroma dos vinhos, principalmente aqueles maturados em barris de carvalho (HO; HOGG; SILVA, 1999).

4.1.1 Compostos Não-Flavonóides

Os compostos não-flavonóides, com exemplos ilustrados na Figura 1.2, são encontrados no vinho em teores variáveis entre 1 e 50 mg L⁻¹.

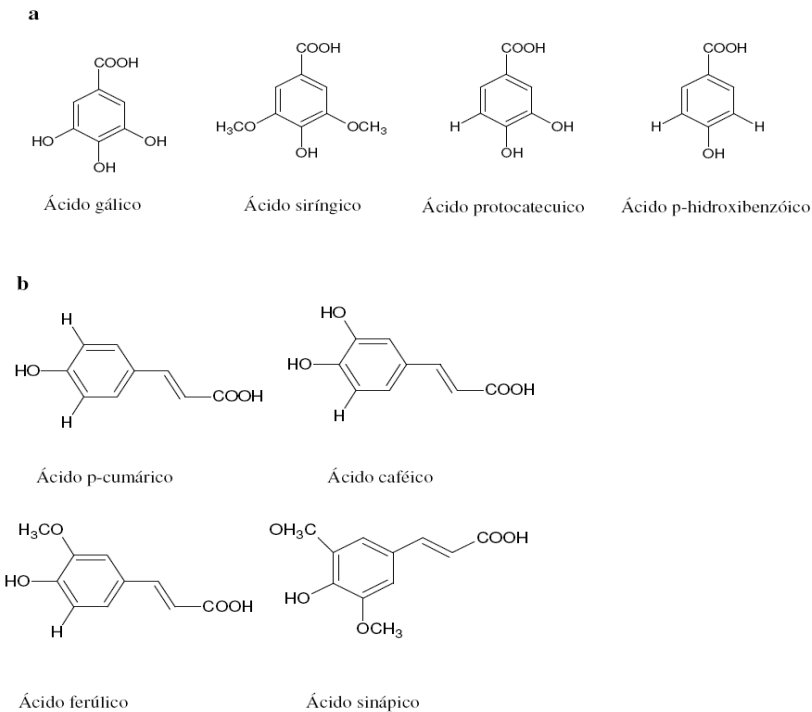


Figura 1.2 Exemplos de ácidos hidroxibenzoicos (a) e hidroxicinâmicos (b). (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006)

Os derivados do ácido cinâmico, que possuem nove átomos de carbono, como o ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e ácido cafeico, são encontrados principalmente na forma de ésteres do ácido tartárico, e sua importância está relacionada à facilidade com que são oxidados. O ácido caftárico é importante na prevenção do escurecimento enzimático, pois o resultado de sua oxidação é um composto incolor. Os derivados do ácido benzóico, que possuem sete átomos de carbono, são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza e incluem os ácidos salicílico, *p*-hidroxibenzóico, vanílico, gentístico, siríngico, gálico e protocatéico. Os ácidos fenólicos, além de se apresentarem sob a forma livre, podem também estar ligados entre si ou com outros compostos (BRAVO, 1998; SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2003).

Os estilbenos, como o resveratrol, piceíde e viniferinas, têm um papel importante na defesa da planta contra agressores externos, são encontrados principalmente na casca da uva, sendo a eles atribuídas importantes propriedades relacionadas à saúde humana. A concentração de estilbenos pode variar dependendo de fatores como a variedade de uva, injúrias mecânicas, infecção por fungos, especialmente *Botrytis cinerea*, processo de vinificação, condições ambientais, como temperatura, umidade, latitude, altitude e características geoquímicas e, estresse abiótico como radiação UV (GÜRBÜZ et al., 2007). Resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é um composto antioxidante encontrado nas uvas e vinhos, responsável por efeitos biológicos benéficos à saúde humana que incluem atividade anticancerígena, cardioproteção, atividade antioxidante, inibição da agregação plaquetária e atividade antiinflamatória (WANG et al., 2002). A estrutura do *trans*-resveratrol é ilustrada na Figura 1.3.

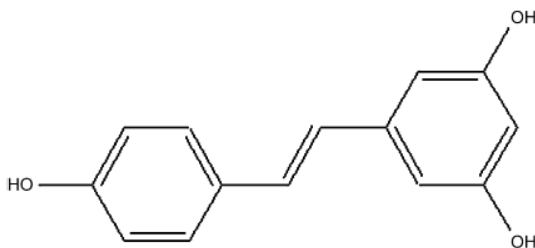


Figura 1.3 Estrutura do *trans*-resveratrol (Fonte: BRAVO et al., 2008)

4.1.2 Flavonóides

Os flavonóides são os grupos de compostos fenólicos com atividade antioxidante, encontrados em frutas, vegetais e outras plantas alimentícias, estando fortemente ligados à redução do risco de doenças crônicas. Protegem o organismo dos danos causados por agentes oxidantes, como os raios ultravioletas, a poluição ambiental, substâncias químicas presentes nos alimentos, etc. (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002). Ocorrem quase que exclusivamente em plantas superiores, onde são responsáveis pela coloração das flores e dos frutos. Existem também relatos de sua presença em algumas algas e fungos (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

São compostos de baixo peso molecular, consistindo de quinze átomos de carbono arranjados em uma configuração C6-C3-C6. Sua estrutura consiste essencialmente de dois anéis aromáticos A e B unidos por uma ligação de três carbonos, usualmente na forma de anel heterocíclico (Figura 1.4). O anel aromático A é derivado da via metabólica do acetato/malonato, enquanto que o anel B é derivado da fenilalanina através da via metabólica do shikimato. Variações nas configurações de substituição do anel C resultam na maioria das subclasses dos flavonóides: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis e antocianinas (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Flavonóides têm demonstrado atividade contra alergias, hipertensão, viroses, inflamações, artrites, mutações e carcinogênese (KATSUBE et al., 2003).

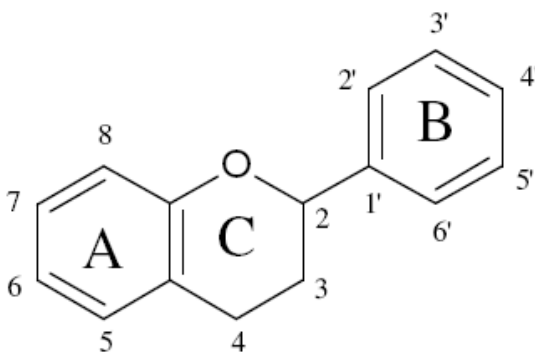


Figura 1.4 Estrutura genérica das moléculas dos flavonóides (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006)

Os flavonóides, particularmente as antocianinas, são efetivos doadores de hidrogênio. Seu potencial antioxidante é dependente do número e da posição dos hidrogênios e suas conjugações e, também, devido à presença de elétrons nos anéis benzênicos (CAO; SOFIC; PRIOR, 1997; MILLER; RICE-EVANS, 1997).

Os flavonóides são os compostos fenólicos de maior importância para o vinho, pois deles depende a qualidade sensorial, bem como a longevidade dos vinhos (GUERRA, 2005).

As antocianinas (Figura 1.5) são flavonóides que se encontram largamente distribuídos na natureza e são responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e quase todas as tonalidades de vermelho que aparecem em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas (VINSON et al., 1999). Nas videiras, as antocianinas se acumulam nas folhas durante a senescência e são responsáveis pela coloração das cascas das uvas tintas, sendo encontradas também na polpa de algumas variedades de uvas (RENAUD; DE LORGERIL, 1992). O conteúdo de antocianinas nas uvas varia de acordo com a espécie, variedade, maturidade e condições climáticas (MAZZA, 1995; COZZOLINO et al., 2004).

Durante a maturação e envelhecimento do vinho, as antocianinas são progressivamente transformadas em pigmentos oligoméricos e poliméricos mais estáveis, que são responsáveis por importantes mudanças na coloração (do vermelho vivo para o vermelho-tijolo) (MONAGAS; GÓMEZ-COROVÉS; BARTOLOMÉ, 2006). A maioria das variedades de uvas *Vitis vinifera* produz glicosídeos não-acilados, acetilglicosídeos, cumarilglicosídeos e cafeoilglicosídeos derivados da delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina (FOURNAND et al., 2006).

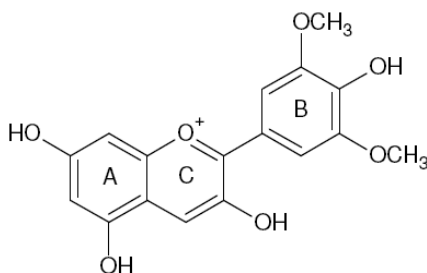


Figura 1.5 Estrutura química das antocianinas (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Em vinhos fortificados as antocianinas apresentam-se na forma polimerizada. Mateus et al. (2002) identificaram os principais grupos de pigmentos do Vinho do Porto: malvidina-3-glicosídeo ligada ao ácido pirúvico, antocianinas ligadas a uma unidade de catequina via ligação etil, antocianinas ligadas a uma catequina ou a um dímero de procianidina via ligação vinil e, antocianinas ligadas a um grupo 4-vinilfenol. Portisinas e o pigmento piranoantociânico-vinilfenol também foram identificados nestes vinhos fortificados; estes pigmentos apresentam alta capacidade corante e maior estabilidade do que as outras formas das antocianinas (MATEUS et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006).

Proantocianidinas são flavan-3-ols poliméricos que compreendem principalmente subunidades de (-) epicatequina, epigallocatequina, (+) catequina e epicatequin-3-*O*-galato (FOURNAND et al., 2006). Estes flavanóis são os principais responsáveis pela adstringência dos vinhos (COZZOLINO et al., 2004) e estão envolvidos nas reações de escurecimento oxidativo e nas interações com proteínas que resultam na formação de precipitados (MONAGAS; GÓMEZ-COROVÉS; BARTOLOMÉ, 2006).

Diferentes flavonóis são encontrados nos vinhos, incluindo quercetina, campferol, miricetina, sendo encontrados principalmente nas cascas de variedades de uvas *Vitis vinifera*. Em uvas brancas são encontrados derivados da quercetina e campferol (MASA; VILANOVA, 2008).

Um estudo de Ho, Hogg e Silva (1999) indica que os compostos fenólicos encontrados em amostras de vinhos fortificados produzidos na Europa incluem principalmente o ácido gálico, ácido protocateico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido elágico, ácido vanílico, ácido sirínico, *p*-hidroxibenzaldeído e miricetina.

A determinação de compostos fenólicos é realizada principalmente por métodos espectrofotométricos e cromatográficos (VERSARI; BOULTON; PARPINELLO, 2008). Estudos recentes utilizaram principalmente a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência para separar os compostos fenólicos dos vinhos. Segundo Nave, Cabrita e Costa (2007), na maioria dos estudos foram utilizadas colunas C₁₈ em fase reversa com sistema de solventes binário, usando água acidificada e um solvente orgânico polar como a acetonitrila ou metanol, com fluxo de 1,0 a 1,5 ml min⁻¹, sendo necessário aproximadamente uma hora para separar os analitos. Os métodos de detecção espectroscópicos como UV-VIS e detector de arranjo de diodos (DAD) foram os mais frequentemente utilizados. Devido a alta

complexidade das amostras de vinhos fortificados, as metodologias de preparo de amostra são essenciais para garantir a identificação e quantificação dos compostos (GUILLÉM; BARROSO; PÉREZ-BUSTAMANTE, 1996). Extração líquido-líquido e extração em fase sólida são as técnicas comumente usadas. Após extração as amostras são concentradas em rotaevaporador e dissolvidas em solventes apropriados para a injeção no cromatógrafo (NAVE; CABRITA; COSTA, 2007; CABRITA et al., 2008).

4.2 AÇÚCARES

Os principais açúcares presentes nas uvas das cultivares de *Vitis vinifera* são glicose e frutose que, geralmente, são responsáveis por 99% dos açúcares do mosto (DAUDT; SIMON, 2001). Estes monossacarídeos apresentam a mesma fórmula empírica ($C_6H_{12}O_6$), mas estruturas distintas, que determinam diferenças consideráveis em suas propriedades físico-químicas (TRONCHONI et al., 2009). O conteúdo de açúcares de um vinho varia dependendo da espécie, variedade, estágio de maturação e sanidade da uva e, do processo de vinificação empregado (JACKSON, 2008). A relação glicose/ frutose dos vinhos varia de acordo com a variedade da uva e o local de produção. Em climas frios, há uma tendência de se desenvolverem cultivares de uvas com maior teor de frutose, enquanto em climas quentes, são obtidos maiores teores de glicose (AMERINE, 1956; DAUDT; SIMON, 2001).

Durante a fermentação do vinho, glicose e frutose são co-fermentadas por leveduras que produzem compostos como dióxido de carbono, etanol, glicerol, etc. No entanto, as leveduras possuem preferência a fermentar glicose, resultando em uma diferença no consumo dos dois açúcares ao longo do processo de fermentação (DAUDT; SIMON, 2001; TRONCHONI et al., 2009). Esta diferença no consumo resulta na predominância de frutose durante as últimas fases da fermentação, que pode ser fermentada por leveduras sob condições de estresse como baixa disponibilidade de nitrogênio e altos níveis de etanol (TRONCHONI et al., 2009).

Durante a maturação e envelhecimento do vinho, ocorrem variações no conteúdo de monossacarídeos, devido às interações entre o líquido e a madeira. O aumento no conteúdo de galactose, frutose, xilose, arabinose e glicose foi constatado em vinhos fortificados (DEL ÁLAMO et al., 2000). Villamiel, Polo e Moreno-Arribas (2008) verificaram que o conteúdo de glicose tende a aumentar durante o envelhecimento biológico de vinhos Xerez. Este efeito é usualmente

atribuído à hidrólise das hemiceluloses da madeira com subsequente liberação de açúcares. O aumento no conteúdo de açúcares pode também estar relacionado com a degradação dos flavonóis glicosilados, cujas ligações *O*-glicosídicas são estabelecidas com monossacarídeos como glicose, galactose, xilose, rarnnose ou arabinose (DEL ÁLAMO et al., 2000).

Sensorialmente, os açúcares contribuem para a doçura, viscosidade e densidade do vinho (NURGEL; PICKERING, 2006). A frutose caracteriza-se por apresentar doçura superior à glicose (TRONCHONI et al., 2009).

A determinação de açúcares em vinhos é usualmente requerida para a produção de vinhos fortificados, seja para a rotina de controle de qualidade, avaliando o processo de fermentação ou, para fornecer informações sobre a composição das amostras, auxiliando na caracterização dos vinhos e na identificação do processo de vinificação empregado (CATALDI; NARDIELLO, 2003). Para determinação de glicose e frutose individualmente, são aplicados, sobretudo, métodos enzimáticos e cromatográficos, com destaque para a cromatografia líquida com detector de índice de refração (VARANDAS et al., 2004). Atualmente, as técnicas cromatográficas estão sendo substituídas pela eletroforese capilar, uma técnica analítica versátil empregada para a determinação de diferentes analitos em uma grande variedade de matrizes, devido às suas características analíticas como baixo consumo de reagentes, alta resolução, alta velocidade e simplicidade (CASTINEIRA et al., 2002; MATO; SUÁREZ-LUQUE; HUIDOBRO, 2007; SANTALAD et al., 2007; PERES et al., 2009).

Eletroforese capilar é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis em uma solução tampão, quando há aplicação de um campo elétrico (TAVARES, 1996; TAGLIARO et al., 1998; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Um equipamento de eletroforese é composto basicamente de uma fonte de alta tensão, dois eletrodos, um capilar e um detector. A fonte de alta tensão pode gerar diferenças de potencial de até 30 kV e correntes de até 100 μ A; está ligada aos dois eletrodos de platina que estabelecem a eletromigração (TAVARES, 1996; ZHANG; LI; HUANG, 2008). O capilar onde ocorrerá a separação dos analitos é geralmente composto de sílica fundida com revestimento externo de poliimida; possui boa condutividade térmica, resistência mecânica e possibilita a retirada do revestimento externo próximo a uma das extremidades, formando uma janela transparente que permite visualizar a passagem dos analitos pelo detector (TAVARES, 1996; SKOOG;

HOLLER; NIEMAN, 2002). O capilar possui grupos silanóis na parede interna que apresentam caráter ácido e se ionizam quando em contato com soluções com pH superior a 3. Os íons H^+ provenientes da parede do capilar são solvatados por moléculas de água e migram para a solução. A partir de determinada distância da parede do capilar, essas moléculas de água não sofrem mais atração e migram em direção ao eletrodo de carga oposta, quando submetidas a um campo elétrico, gerando um fluxo denominado de fluxo eletroosmótico (TAVARES, 1996; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Dentre os modos de detecção mais empregados em eletroforese capilar, destaca-se o espectrofotométrico no UV-VIS com selecionador de comprimento de onda por arranjo de diodos (TAVARES, 1996).

A eletroforese capilar possui vários modos de análise que envolve separações com aplicação de campo elétrico em um capilar preenchido de solução tampão, sendo o modo mais comumente usado a eletroforese capilar de zona. Este modo eletroforético se baseia na migração distinta dos analitos frente à solução tampão em um determinado pH, objetivando maximizar esta diferença, bem como minimizar as causas de alargamento das zonas (TAVARES, 1997). O eletrólito utilizado na separação pode ser acrescido de aditivos que alteram a mobilidade eletroforética dos analitos, modificam o fluxo eletroosmótico, solubilizam compostos presentes na amostra ou reduzem a interação de algumas espécies com a parede do capilar (SILVA et al., 2007).

4.3 ÁCIDOS ORGÂNICOS

O vinho contém uma mistura complexa de ácidos orgânicos, sendo os mais importantes os originários da uva, tartárico, málico e cítrico, produzidos a partir da oxidação de açúcares, o ácido succínico, de origem fermentativa, e o ácido láctico e ácido acético, de origem bacteriana (USSEGLIO-TOMASSET, 1991; MARDONES et al., 2005). O perfil e a concentração dos ácidos orgânicos do vinho estão correlacionados com a variedade da uva, a região de cultivo, processo de vinificação, processo de maturação e envelhecimento (ZHENG et al., 2009).

O ácido tartárico é um dos ácidos mais importantes na uva e no vinho devido às suas características químicas e por suas propriedades organolépticas e resistência à degradação bacteriana (SALES; AMARAL; MATOS, 2001). Por ser um ácido relativamente forte, confere ao vinho um pH entre 2,8 e 4,0; quando presente em grande quantidade pode conferir aspereza e certa adstringência; mas, em

concentrações adequadas, é responsável pela fineza ácida dos bons produtos (RIZZON; MIELE, 2001). A concentração observada em vinhos encontra-se na faixa de 1,5 a 4,0 g L⁻¹ (SALES; AMARAL; MATOS, 2001), porém, deve-se levar em conta a concentração dos íons potássio e cálcio, que participam da salificação do ácido tartárico. O estado de salificação dos ácidos depende da origem geográfica, da variedade, do manejo do vinhedo e dos métodos empregados na vinificação (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003).

O ácido málico é formado da hidrólise dos açúcares nos tecidos vegetais, é pouco estável, sendo catabolizado durante a maturação (CABANIS, in: FLANZY, 2000). Durante a fermentação malolática, que ocorre após a fermentação alcoólica, o ácido málico é transformado em ácido láctico. Por isso, somente pequenas quantidades deste ácido são encontradas nos vinhos. Pode ser oxidado por algumas espécies de *Acetobacter* e *Gluconobacter* e, portanto, sua concentração pode diminuir durante a fermentação acética (ZOTOU; LOUKOU; KARAVA, 2004).

O ácido láctico é produzido principalmente através da fermentação malolática, que é conduzida por bactérias ácido-láticas do gênero *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Lactobacillus* ou *Pediococcus*, que são capazes de se multiplicar apesar do alto conteúdo de etanol (maior que 10 %), baixo pH (3,2 ou menos) e presença de dióxido de enxofre. Durante a fermentação malolática as bactérias ácido-láticas produzem a enzima malicodesidrogenase que catalisa a reação de descarboxilação do ácido málico (ácido dicarboxílico) formando ácido láctico (ácido monocarboxílico) (JACKSON, 2008). O ácido láctico contribui para a complexidade de aromas e sabores do vinho e confere estabilidade microbiológica (VILJAKAINEN; LAAKSO, 2000).

Outros ácidos podem estar presentes em vinhos, em menor concentração, como o cítrico, que pode ser metabolizado por alguns microrganismos, produzindo ácido acético. Às vezes, o ácido cítrico é adicionado aos vinhos para aumentar a acidez. O ácido acético é um componente natural do mosto dos vinhos, presente em pequenas quantidades, mas é formado rapidamente em vinhos expostos ao ar. O ácido succínico é um produto da fermentação e é encontrado em pequenas quantidades nos vinhos, contribuindo para a acidez total. Caracteriza-se pela sua capacidade de produzir ésteres, que melhoram as características sensoriais dos vinhos durante o envelhecimento (ZOTOU; LOUKOU; KARAVA, 2004).

Os ácidos orgânicos desempenham um importante papel nas bebidas, pois contribuem para as propriedades organolépticas como

sabor, aroma e cor, bem como a estabilidade, características nutricionais, aceitabilidade e manutenção da qualidade (CASTIÑEIRA et al., 2002; MATO; SUÁREZ-LUQUE; HUIDOBRO, 2007; PERES et al., 2009). A concentração de ácidos orgânicos em alimentos e bebidas fornece informações relevantes para o acompanhamento do processo de fermentação, além de ser utilizado para a diferenciação, identificação de adulteração e determinação da origem geográfica (SANTALAD et al., 2007).

Muitos métodos analíticos foram desenvolvidos para a determinação de ácidos orgânicos em vinhos. A identificação e quantificação dos ácidos orgânicos é realizada individualmente através de métodos espectrofotométricos enzimáticos e não-enzimáticos. Simultaneamente, os ácidos orgânicos são determinados por técnicas cromatográficas e eletroforéticas (MATO; SUÁREZ-LUQUE; HUIDOBRO, 2007). A cromatografia líquida de alta eficiência é amplamente utilizada, porém apresenta baixa sensibilidade e seletividade e, freqüentemente requer preparo de amostra, aumentando o tempo de análise. A eletroforese capilar é uma técnica analítica confiável para a análise de pequenos íons com vantagens como velocidade, simples preparo de amostra, eficiência de separação, uso de colunas de baixo custo e reduzido consumo de solventes e amostras (PERES et al., 2009; ZHENG et al., 2009). Os métodos de eletroforese capilar para ácidos orgânicos geralmente utilizam a detecção indireta dos analitos (PERES et al., 2009). Nesta técnica, o eletrólito contém um reagente com a mesma carga dos analitos, que absorve na região ultravioleta. Quando os íons passam pela janela do detector, verifica-se um pico negativo (SANTALAD et al., 2007).

4.4 MINERAIS

Os elementos minerais encontrados nas uvas e nos vinhos são absorvidos do solo através do sistema radicular da videira. Encontram-se, principalmente, nas cascas, sementes e parede celular da polpa da uva (RIZZON, 2005).

O teor de minerais do vinho é variável em cada região de cultivo, sendo dependente do solo, do clima, da variedade, do porta-enxerto, das adubações realizadas e dos tratamentos fitossanitários. O processo de vinificação utilizado também interfere no teor dos elementos minerais, através do emprego de produtos que contenham determinados elementos na composição química, de práticas enológicas que favoreçam a extração de compostos da uva ou pelo contato do vinho com materiais e

equipamentos nas fases de elaboração, conservação, estabilização ou engarrafamento. Uma maceração prolongada contribui para aumentar o teor de minerais nos vinhos. A estabilização, por sua vez, participa na redução do teor dos minerais, principalmente potássio e cálcio (RIZZON, 2005; ÁLVAREZ et al., 2007; GALGANO et al., 2008; GRINDLAY et al., 2008). Vinhos brancos e tintos de uma mesma região podem apresentar diferença na composição de minerais, pois na elaboração dos vinhos tintos, o contato com a casca é mais prolongado após o esmagamento do que no processo de fabricação de vinhos brancos (COETZEE et al., 2005).

O vinho contribui significativamente para o suprimento de elementos minerais essenciais ao organismo humano, como cálcio, cromo, cobalto, potássio, selênio e zinco. Alguns elementos minerais como alumínio, cobre, ferro, manganês e zinco podem ter efeitos prejudiciais sobre a estabilidade do vinho e sua aceitabilidade comercial quando encontrados em altas concentrações, pois podem dar origem a fenômenos depreciativos da qualidade tais como turvações, precipitações e oxidações (CATARINO; CURVELO-GARCIA; BRUNO DE SOUZA, 2008). Arsênio, cádmio, chumbo e bromo são elementos importantes a serem considerados devido à sua toxicidade, uma vez que podem ser tóxicos de forma aguda ou crônica, causando efeitos adversos nos rins, fígado, coração, sistema vascular e imunológico. (DUGO et al., 2005; GALGANO et al., 2008).

Os elementos minerais estão presentes no vinho em concentrações que variam de 1,5 a 3 g L⁻¹. Os compostos minerais majoritários, encontrados em concentrações de 10 mg L⁻¹ até 1 g L⁻¹, incluem o sódio, potássio, magnésio e cálcio, principais responsáveis pela estrutura metálica dos vinhos e pela sua capacidade tampão. São exemplos de elementos minoritários o alumínio, manganês, ferro, cobre, zinco, rubídio, geralmente encontrados em concentrações entre 0,1 e 10 mg L⁻¹; em teores normalmente inferiores a 100 µg L⁻¹, são detectados os minerais cromo, cobalto, níquel, selênio, bário, chumbo, bromo, iodo e flúor (CATARINO; CURVELO-GARCIA; BRUNO DE SOUZA, 2008).

A composição mineral do vinho reflete a sua origem e contribui de forma substancial para as características sensoriais, com influência na cor, limpidez, gosto e aroma (CATARINO; CURVELO-GARCIA; BRUNO DE SOUZA, 2008). A concentração de metais em muitas bebidas alcoólicas, como o vinho, pode ser um importante parâmetro que afeta seu consumo e conservação. Isto decorre dos efeitos negativos e positivos causados diretamente ou indiretamente pela presença de

metais. Os efeitos negativos incluem a deterioração da bebida, defeitos sensoriais e conseqüências para a saúde. Os efeitos positivos incluem a remoção de sabores e odores desagradáveis, a participação em processos fermentativos e a oferta de elementos minerais essenciais para a dieta (IBANEZ et al., 2008).

A determinação de minerais é de interesse devido às implicações enológicas e toxicológicas destes elementos e, para a caracterização química dos vinhos e identificação de sua origem geográfica. A identificação da origem geográfica dos vinhos é de grande importância para os consumidores e produtores, uma vez que pode fornecer dados determinantes para a garantia da qualidade (GALGANO et al., 2008; GRINDLAY et al., 2008; GONZÁLVEZ et al., 2009; PANEQUE et al., 2010).

As técnicas utilizadas para obtenção da composição mineral do vinho são aquelas com capacidade de detecção multielementar, como a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), adequada para a determinação precisa e rápida de elementos-traço e oligoelementos em uma mesma amostra (GONZÁLVEZ et al., 2009). A ICP-MS proporciona alta seletividade, sensibilidade e baixos limites de detecção quando comparada a outras técnicas (COETZEE et al., 2005; GALGANO et al., 2008).

Um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado é constituído basicamente de um sistema de introdução de amostras, fonte de ionização, sistema de focalização, analisador de massa e sistema de detecção de íons (ULRICH, 2001). O princípio do plasma é baseado no estado de energia de um gás no qual praticamente todos os átomos e moléculas são ionizados. Para iniciar o plasma, um fluxo de gás é semeado com elétrons livres oriundos de uma faísca de alta tensão e a sua sustentação é alcançada por meio de campos elétrico e magnético flutuantes produzidos pelo gerador de onda de rádio frequência. Devido ao alto estado de energia do plasma, as moléculas injetadas são quebradas em seus elementos químicos constituintes que, então, são ionizados. O feixe de íons formado é extraído desta região por diferença de pressão, sendo direcionado para a região de focalização. O feixe é acelerado, colimado e arremessado em um campo magnético onde os íons são separados de acordo com a razão massa/carga (m/z). O feixe chega ao sistema analisador dotado de um detector simultâneo (ULRICH, 2001; SATO; KAWASHITA, 2002).

A ICP-MS oferece diferentes procedimentos de quantificação dependendo da precisão requerida. O modo de análise de diluição isotópica apresenta a mais alta qualidade de resultados e requer

calibração externa com padrões de cada elemento a ser determinado. A abordagem semi-quantitativa é uma aplicação versátil da ICP-MS, que permite a determinação de 81 elementos, com erros inferiores a 20% para a maioria dos elementos. Na análise semi-quantitativa, um software corrige automaticamente as interferências isotópicas e a interferência de espécies moleculares, listando cada elemento presente na amostra junto com sua concentração. Ao contrário do método de análise quantitativa, a calibração é conseguida usando apenas poucos elementos distribuídos em toda a faixa de massa de interesse. O processo de calibração é usado para atualizar os dados de resposta interna que se correlacionam com as medidas de intensidade dos íons para as concentrações de elementos de uma solução. Durante a calibração, as respostas são ajustadas para explicar as mudanças na sensibilidade do instrumento e as variações na amostra (CATARINO; CURVELO-GARCIA; BRUNO DE SOUSA, 2006).

A técnica de eletroforese capilar também tem se mostrado uma técnica eficiente de separação e quantificação de metais em uma ampla variedade de matrizes. A determinação eletroforética de metais pode ser facilmente alcançada por detecção indireta através da adição de reagentes apropriados com absorção no UV (SANTALAD et al., 2007), tornando-se uma alternativa para a determinação de metais que não podem ser analisados por ICP-MS.

4.5 ÁLCOOIS SUPERIORES

O aroma dos vinhos é constituído por algumas centenas de compostos voláteis, como alcoóis, ésteres, aldeídos, cetonas, ácidos graxos, terpenos, etc., cujos níveis de percepção olfativa são extremamente diversos (GIL et al., 2006). Como consequência, o impacto olfativo dos constituintes voláteis do vinho está ligado à sua concentração e sua natureza (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003).

A complexidade do aroma do vinho deve-se ao metabolismo da uva, que é influenciado pela variedade, solo, clima e práticas de cultivo; aos fenômenos bioquímicos pré-fermentativos, como as oxidações e hidrólises durante a extração do mosto e a maceração; ao metabolismo fermentativo dos microrganismos, nas fermentações alcoólica e malolática; e às reações químicas e enzimáticas após a fermentação, durante a maturação do vinho e seu envelhecimento na garrafa (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003; GIL et al., 2006; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b).

A maioria dos compostos responsáveis pelo aroma dos vinhos é produzida durante a fermentação e, estes compostos são especialmente importantes para o aroma dos vinhos jovens. Ácido acético, aldeído acético e os álcoois superiores acetato de etila, propanol, isobutanol, 2 e 3-metilbutanol representam mais da metade dos compostos voláteis, sendo que a outra metade está distribuída entre 600 a 800 compostos minoritários presentes em quantidades muito baixas, como acetais, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, ésteres, lactonas, terpenos e compostos sulfurados (REGODÓN MATEOS; PÉREZ-NEVADO; RAMÍREZ FERNÁNDEZ, 2006; JACKSON, 2008).

Os álcoois superiores são os compostos voláteis mais abundantemente estudados (GIL et al., 2006). Eles são pertencentes a série de álcoois com peso molecular mais elevado, produzidos anabolicamente a partir da glicose e catabolicamente a partir de aminoácidos. A produção de álcoois superiores é influenciada pelas leveduras e por características físico-químicas do vinho, como pH, conteúdo e fontes de nitrogênio e açúcares, temperatura, quantidade de oxigênio durante a fermentação e tecnologia de vinificação (DÍAZ et al., 2003; JACKSON, 2008). Os álcoois superiores são encontrados no vinho na ordem de 150 mg L^{-1} a 600 mg L^{-1} . Baixos teores destes álcoois são requeridos para a qualidade dos vinhos, enquanto níveis mais elevados mascaram os demais aromas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b). Quantitativamente, os álcoois superiores mais importantes são o 1-propanol, o 2-metil-1-propanol (álcool isobutírico), o 2-metil-1-butanol e o 3-metil-1-butanol (álcoois isoamflicos) (JACKSON, 2008).

A maioria dos álcoois superiores de cadeia aberta tem forte odor pungente. Em baixas concentrações, eles acrescentam notas de complexidade ao aroma. Em níveis mais elevados, eles dominam a fragrância. Em vinhos fortificados, um caráter distinto de álcoois superiores é apreciado, provavelmente em função da adição de álcool vínico durante a produção do vinho. Os álcoois superiores desempenham também um papel indireto no desenvolvimento do aroma de vinhos envelhecidos. Ao reagir com os ácidos orgânicos, eles acrescentam ésteres ao vinho (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; JACKSON, 2008).

Dos compostos voláteis, o metanol é considerado importante devido à sua toxicidade. Pectinas estão associadas às cascas das uvas e sua hidrólise e, mais tarde, a sua solubilização produzem o metanol (DÍAZ et al., 2003).

A técnica analítica mais empregada para a determinação de álcoois superiores é a cromatografia gasosa acoplada a detector de

ionização de chama (GC-FID). O preparo de amostra, indispensável para análise de vinhos fortificados, consiste essencialmente da simultânea destilação/extração (GIL et al., 2006).

A cromatografia é um método físico de separação em que os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma das quais é estacionária e a outra é móvel. Na cromatografia gasosa, a fase móvel é um gás inerte e diferentes detectores podem ser acoplados. O detector de ionização de chama é o mais usado para determinação de compostos orgânicos. Neste método de detecção, o gás de arraste entra no detector, é misturado com o gás de combustão e a mistura dos gases é queimada. Uma tensão de polaridade negativa é aplicada e enquanto os elétrons são formados, são também acelerados através de um campo elétrico e emitidos a um eletrodo. Um potencial de ação de aproximadamente 100 volts é aplicado entre a chama e o eletrodo, assim, quando um soluto que contenha carbono é queimado, os pares de elétrons/ íons que são formados, são coletados pela chama e pelo eletrodo (ROUESSAC; ROUESSAC, 2004).

5 RAZÃO ISOTÓPICA

A maioria dos elementos químicos encontrados na natureza é constituída por uma mistura de isótopos, ou seja, de vários átomos de um elemento químico com o mesmo número atômico, mas com diferentes números de massa. A diferença no número de massa é proporcionada pela variação das quantidades de nêutrons existentes em cada isótopo. Isótopos de um elemento químico apresentam comportamento físico-químico similar, pois as reações químicas processam-se pelas ligações na eletrosfera. Entende-se com isto que as eventuais diferenças nas razões isotópicas serão inferiores àquelas observáveis entre elementos distintos, mesmo quando pertencentes ao mesmo grupo químico. Desta forma, a variação isotópica presente nos átomos dos elementos químicos é mantida quando eles formam as diferentes substâncias existentes na natureza (RUSSEL, 1982).

Alguns isótopos podem emitir radiação através da perda de partículas subatômicas ou de energia, sendo denominados radioativos. Na ausência de qualquer forma de radiação são denominados isótopos estáveis. Alguns isótopos estáveis são de especial interesse para a pesquisa em diversas áreas do conhecimento biológico, geológico, físico, químico, entre outros, tais como o hidrogênio, oxigênio, carbono, nitrogênio e enxofre. Os isótopos “leves”, que possuem massa atômica menor (^1H , ^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , ^{32}S), são os mais abundantes, enquanto que os

isótopos “pesados”, que possuem massa atômica maior (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{34}S), estão presentes no ambiente em quantidades ínfimas (MORRISON; BOYD, 1990).

As proporções isotópicas de um elemento não são constantes devido a variações naturais que ocorrem nos diversos processos físico-químicos, os quais ocasionam o fracionamento isotópico. Destes processos resulta o enriquecimento ou decréscimo da forma isotópica mais pesada (KLEIN; KLEIN, 1982). O fracionamento isotópico biológico proporciona uma distribuição desigual dos isótopos mais leves e mais pesados entre os reagentes e produtos de reação. Na maioria dos casos, os isótopos mais leves são preferencialmente utilizados e os mais pesados são enriquecidos na fração residual do substrato (MORASH et al., 2001). A magnitude do fracionamento isotópico na natureza é afetada pelas diferenças regionais, ou seja, variações nas condições meteorológicas como umidade, temperatura, ventos, entre outras (BRAUSE et al., 1984).

5.1 RAZÃO DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO

Existem basicamente duas vias de fixação do CO_2 pelas plantas durante a fotossíntese. Durante este processo, o carbono sofre uma discriminação isotópica, gerando uma redução na concentração de ^{13}C e em consequência um aumento na concentração de ^{12}C . No ciclo C_3 (Ciclo de Calvin), que utiliza ribose-1,5-difosfato como molécula receptora de CO_2 atmosférico, este gás é absorvido nas plantas por difusão através dos estômatos e passa para o interior das células a fim de produzir carboidratos. Nesta rota bioquímica, o primeiro composto orgânico sintetizado contém três átomos de carbono. Existe um caminho alternativo chamado de ciclo C_4 (Ciclo de Hatch-Slack), que utiliza o oxalacetato como molécula receptora de CO_2 ; os primeiros açúcares formados neste ciclo possuem quatro átomos de carbono. As plantas que possuem ciclo fotossintético C_3 apresentam um maior fracionamento isotópico, enquanto que nas plantas C_4 o fracionamento é menor (MARTINELLI et al., 2003; CABAÑERO; SAN-HIPÓLITO; RUPÉREZ, 2007). A difusão do dióxido de carbono para a carboxilação é afetada principalmente pela variação na extensão da abertura dos estômatos das folhas para controlar a perda de água. Essencialmente, a discriminação isotópica de ^{13}C está positivamente relacionada com a disponibilidade de água, de modo que maior disponibilidade de água leva a menor proporção de ^{13}C (SIMPKINS et al., 2000).

As plantas C_3 incluem a maioria das plantas superiores de folhas largas, cultivadas e encontradas em florestas naturais, adaptadas às condições de disponibilidade hídrica e temperaturas amenas. O ciclo C_4 está presente em uma minoria de plantas, principalmente forrageiras e gramíneas tropicais, como por exemplo, milho e cana-de-açúcar (DUNBAR, 1982). Plantas C_3 são predominantemente cultivadas em altas latitudes e plantas C_4 são mais comuns em regiões que apresentam clima quente, cultivadas nos trópicos, sob forte estresse hídrico. Os valores da razão $^{13}C/^{12}C$ diminuem em plantas cultivadas na região da Linha do Equador em direção aos pólos e, esta informação é utilizada para a determinação da origem geográfica (SIMPKINS et al., 2000).

A uva é uma espécie vegetal do ciclo fotossintético C_3 , que apresenta uma razão isotópica entre -23 e -32 ‰. Os subprodutos da uva (açúcar, álcool, vinhos, entre outros) tendem a apresentar esta mesma variação de valores. A cana-de-açúcar e o milho são espécies vegetais do ciclo fotossintético C_4 , com valor isotópico variando de -9 a -15 ‰ (PISSINATTO et al., 1999; MARTINELLI et al., 2003; CABAÑERO; SAN-HIPÓLITO; RUPÉREZ, 2007). Através da técnica da diluição dos isótopos estáveis do carbono pode-se medir quantitativamente a proporção do álcool ou de açúcar de cana-de-açúcar adicionado ao vinho (MARTINELLI et al., 2003; BAUDLER et al., 2006).

A razão isotópica $^{13}C/^{12}C$ é medida no etanol, que é um importante constituinte orgânico do vinho. As medidas isotópicas de etanol têm sido desenvolvidas para garantia da autenticidade, detecção de adulterações ou substituições e para a distinção da natureza biológica e origem geográfica do vinho (CABAÑERO; RECIO; RUPÉREZ, 2008; ALBERTINO et al., 2009).

As variações na razão isotópica observadas em produtos não adulterados se devem aos efeitos isotópicos cinéticos ou termodinâmicos e, refletem circunstâncias de ocorrência de efeitos físicos, químicos ou bioquímicos. Sendo assim, a razão isotópica dos elementos também fornece informações sobre o clima, distância do mar, altitude, latitude e práticas agrícolas empregadas (RUMMEL et al., 2010).

As razões isotópicas podem ser medidas por espectrometria de massa em espectrômetros de massa para razões isotópicas (IRMS), onde os compostos não são analisados diretamente, mas a partir dos gases produzidos por reações de combustão, pirólise ou de equilíbrio isotópico. O gás empregado nas análises das razões $^{13}C/^{12}C$ é o CO_2 . Os espectrômetros de massa separam as formas isotópicas de um dado elemento por intermédio de um campo elétrico, seguido de outro magnético, após o gás passar por uma fonte de íons de impacto de

elétrons. Pela dificuldade de medida absoluta, as variações isotópicas são normalmente expressas pela notação delta (δ), em partes per mil (‰), mostrando os desvios relativos aos padrões internacionais (BRAND, 1996). O valor isotópico de carbono da amostra ($\delta^{13}\text{C}$) é tomado comparativamente ao padrão internacional PDB, que é um fóssil carbonatado do Cretáceo *Bellefleuria americana* da formação Pee Dee na Carolina do Sul, cujo valor numérico é considerado 0 ‰.

A composição de isótopos estáveis de carbono de uma amostra é definida como a razão de ^{13}C e ^{12}C e é expressa como δ (‰), definida como:

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{std}}} - 1 \right) * 1000$$

Onde R_{sample} e R_{std} são as razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ da amostra e padrão, respectivamente. Valores negativos $\delta^{13}\text{C}$ indicam que a amostra possui menos ^{13}C do que o padrão (PISSINATTO et al., 1999).

6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e radicais livres está relacionada com a respiração celular. O termo radical livre é frequentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados nos orbitais mais externos, o que torna estas moléculas altamente reativas, capazes de reagir com qualquer composto que esteja próximo, passando a assumir uma ação oxidante (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1999).

Assim, a formação de ERO e radicais livres ocorre no metabolismo normal, existindo a necessidade permanente de inativar estas moléculas de alta reatividade. O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes resulta no chamado estresse oxidativo (DÁVALOS; GOMEZ-CORDOVÉS; BARTOLOMÉ, 2003). Os danos induzidos por estas moléculas podem afetar muitas moléculas biológicas, incluindo os lipídeos, as proteínas, os carboidratos e o DNA. Consequentemente, as ERO estão implicadas em várias doenças degenerativas humanas, como doenças cardiovasculares, disfunções cognitivas e câncer (PIETTA, 2000).

Os radicais livres promovem uma oxidação prejudicial que pode danificar membranas e conteúdos celulares. As LDLs (lipoproteínas de baixa densidade) são partículas formadas por lipídeos, colesterol e proteínas em geral, e que podem se oxidar por ação dos radicais livres. Em um fenômeno em série, conseqüentemente, podem afetar as

moléculas do colesterol e dos ácidos graxos que compõem cada LDL (HALLIWELL, 2003). Radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (YU; ANDERSON, 1997).

Para combater os radicais livres e/ou as chamadas espécies reativas de oxigênio (ERO) o corpo humano é equipado com um sistema de defesa efetivo (antioxidantes endógenos), o qual inclui várias enzimas e moléculas antioxidantes de alto e baixo peso molecular (KAUR; KAPOOR, 2001). Além dos antioxidantes endógenos, há aqueles consumidos na dieta (antioxidantes exógenos), que incluem o ácido ascórbico (vitamina C), a vitamina E, a vitamina A, os carotenóides e os compostos fenólicos. Um antioxidante pode ser definido como uma substância que, em baixa concentração em relação a um determinado substrato, retarda ou previne a oxidação do substrato oxidável (CHIDAMBARA-MURPHY; JAYAPRAKASHA; SINGH, 2002). Quando o mecanismo de ação for através de sua reação com o radical livre, o novo radical formado deve ser estável e incapaz de propagar a reação (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992).

Entre os antioxidantes presentes nas frutas e vegetais, os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos, tais como os ácidos fenólicos e flavonóides (SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2003). A capacidade antioxidante destes compostos se deve à sua habilidade de sequestrar radicais livres, pela doação de hidrogênio ou elétrons, ou pela quelação de íons metálicos (AMAROWICZ et al., 2004).

A quantidade e os tipos de polifenóis presentes nos vinhos podem desempenhar um importante papel no controle da oxidação do corpo humano. Os compostos fenólicos presentes no vinho têm propriedades antioxidantes responsáveis por efeitos benéficos à saúde humana. Os vinhos contêm uma ampla quantidade de compostos fenólicos aos quais são reportadas atividade anticâncer, efeitos antiinflamatórios *in vitro*, como também habilidade para bloquear eventos celulares que predisõem a doenças coronárias e aterosclerose (GÜRBÜZ et al., 2007).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTINO, A.; BARGE, A.; CRAVOTTO, G.; GENZINI, L.; GOBETTO, R.; VINCENTI, M. Natural origin of ascorbic acid: validation by ¹³C NMR and IRMS. **Food Chemistry**, v. 112, p. 715-720, 2009.

ÁLVAREZ, M.; MORENO, I. M.; JOS, A. M.; CAMEÁN, A. M.; GONZÁLEZ, A. G. Study of mineral profile of Montilla-Moriles “fino” wines using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 391-395, 2007.

AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J. A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies, **Food Chemistry**, v. 84, p. 551 – 562, 2004.

AMERINE, M. A. The maturation of wine grapes. **Wines and Vines**, v. 37, n.10, p. 27-32, 1956.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

BAILLY, S.; JERKOVIC, V.; MARCHAND-BRYNAERT, J.; COLLIN, S. Aroma extraction dilution analysis of Sauternes wines. Key role of polyfunctional thiols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7227-7234, 2006.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

BAUDLER, R.; ADAM, L.; ROSSMANN, A.; VERSINI, G.; ENGEL, K. H. Influence of the distillation step on the ratios of stable isotopes of ethanol in cherry brandies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 864-869, 2006.

BENÍTEZ, P.; CASTRO, R.; NATERA, R.; GARCÍA-BARROSO, C. Influence of metallic content of fino sherry wine on its susceptibility to browning. **Food Research International**, v. 35, p. 785-791, 2002.

BONA-SARTOR, S. de. **Caracterização química de uvas e vinhos Goethe produzidos na Região de Urussanga, Santa Catarina**. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

BRAND, W. A. High precision isotope ratio monitoring techniques in Mass Spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 31, p. 225-235, 1996.

BRASIL. Lei n. 10.970, de 12 de novembro de 2004. Altera dispositivos da Lei n. 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação, comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, seção 1, p. 1, 16 novembro 2004.

BRAUSE, A. R.; RATERMAN, J. M.; PETRUS, D.; DONER, L. W. Fruits and Fruits Products. Verification of authenticity of orange juice. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 67, p. 535-539, 1984.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRAVO, M. N.; SILVA, S. ; COELHO, A. V.; VILAS BOAS, L.; BRONZE, M. R. Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 84-92, 2006.

BRAVO, M. N.; FELICIANO, R.; SILVA, S.; COELHO, A. V.; VILAS BOAS, L.; BRONZE, M. R. Analysis of trans-resveratrol: Comparison of methods and contents in Muscatel fortified wines from Setúbal region in Portugal. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 634-643, 2008.

BRDE, Banco Regional de Desenvolvimento do Extremo Sul. Agência de Florianópolis. Superintendência de Planejamento. **Vitivinicultura**

em Santa Catarina: Situação atual e perspectivas. Florianópolis: BRDE, 2005. 65 p.

BRIGHENTI, E.; TONIETTO, J. 2004. O clima de São Joaquim para a viticultura de vinhos finos: classificação pelo Sistema CCM Geovítica. In: **Congresso Brasileiro de Fruticultura**, 18, Florianópolis. Florianópolis: SBF, 2004, 4 p. (CD-ROM).

CABAÑERO, A. I.; RECIO, J. L.; RUPÉREZ, M. Isotope ratio mass spectrometry coupled to liquid and gas chromatography for wine ethanol characterization. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, p. 3111-3118, 2008.

CABAÑERO, A. I.; SAN-HIPÓLITO, T.; RUPÉREZ, M. GasBench/ isotope ratio mass spectrometry: a carbon isotope approach to detect exogenous CO₂ in sparkling drinks. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 3323-3328, 2007.

CABRITA, M. J.; TORRES, M.; PALMA, V.; ALVES, E.; PATÃO, R.; COSTA FREITAS, A. M. Impact of malolactic fermentation on low molecular weight phenolic compounds. **Talanta**, v. 74, p. 1281-1286, 2008.

CÂMARA, J. S.; ALVES, M. A.; MARQUES, J. C. Development of headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry methodology for analysis of terpenoids in Madeira wines. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, p. 191-200, 2006a.

CÂMARA, J. S.; ALVES, M. A.; MARQUES, J. C. Changes in volatile composition of Madeira wines during their oxidative ageing. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 188-197, 2006b.

CAMARGO, U. A. Uvas Americanas e Híbridas para Processamento em Clima Temperado. **Sistemas de Produção 2**, Bento Gonçalves, janeiro 2003. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura.html>>. Acesso em 30 abril 2010.

CAMPO, E.; FERREIRA, V.; ESCUDERO, A.; MARQUÉS, J. C.; CACHO, J. Quantitative gás chromatography-olfactometry and

chemical quantitative study of the aroma of four Madeira wines.

Analytica Chimica Acta, v. 563, p. 180-187, 2006.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: Structure activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, p. 749-760, 1997.

CASTIÑEIRA, A.; PEÑA, R. M.; HERRERO, C.; GARCÍA-MARTÍN, S. Analysis of organic acids in wine by capillary electrophoresis with direct UV detection. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 319-331, 2002.

CATALDI, T. I.; NARDIELLO, D. Determination of free proline and monosaccharides in wine samples by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3737-3742, 2003.

CATARINO, S.; CURVELO-GARCIA, A. S.; BRUNO DE SOUSA, R. Measurements of contaminant elements of wines by inductively coupled plasma-mass spectrometry: a comparison of two calibration approaches. **Talanta**, v. 70, p. 1073-1080, 2006.

CATARINO, S.; CURVELO-GARCIA, A. S.; BRUNO DE SOUSA, R. Revisão: Elementos contaminantes nos vinhos. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 23 (1), p. 3-19, 2008.

CHIDAMBARA-MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using *in vivo* models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4791-4795, 2002.

CLIFF, M. A.; KING, M. C.; SCHLOSSER, J. Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. **Food Research Internacional**, v. 40, p. 92-100, 2007.

COETZEE, P. P. ; STEFFENS, F. E.; EISELEN, R. J.; AUGUSTYN, O. P.; BALCAEN, L.; VANHAECKE, F. Multi-element analysis of South African wines by ICP-MS and their classification according to

geographical origin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5060-5066, 2005.

CORDEIRO, W. C.. **A vitivinicultura em São Joaquim – SC: uma nova atividade no município**. 2006. 145 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Curso de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

COZZOLINO, D.; KWIATKOWSKI, M. J.; PARKER, M.; CYNKAR, W. U.; DAMBERGS, R. G.; GISHEN, M.; HERDERICH, M. J. Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 73-80, 2004.

CRISTOVAM, E.; PATERSON, A.; PIGGOTT, J. R. Differentiation of port wines by appearance using a sensory panel: comparing free choice and conventional profiling. **Europe Food Research Technology**, v. 211, p. 65-71, 2000.

DAUDT, C. E.; SIMON, J. A. Um método rápido para análise de glicose em mostos e sua quantificação em algumas cultivares no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 31, p. 697-701, 2001.

DÁVALOS, A.; GOMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Commercial dietary antioxidant supplements assayed for their antioxidant activity by different methodologies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2512 – 2519, 2003.

DEL ÁLAMO, M.; BERNAL, J. L.; DEL NOZAL, M. J.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. Red wine aging in oak barrels: evolution of the monosaccharides content. **Food Chemistry**, v. 71, p. 189-193, 2000.

DIAZ, C.; CONDE, J. E.; MÉNDEZ, J. J.; TRUJILLO, J. P. P. Volatile compounds of bottled wines with Denomination of Origin from the Canary Islands (Spain). **Food Chemistry**, v. 81, p. 447-452, 2003.

DUGO, G.; LA PERA, L.; PELLICANÓ, T. M.; DI BELLA, G.; D'IMPERIO, M. Determination of some inorganic anions and heavy metals in D.O.C. Golden and Amber Marsala wines: statistical study of the influence of ageing period, colour and sugar content. **Food Chemistry**, v. 91, p. 355-363, 2005.

DUNBAR, J. Use of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for studying the origin of CO_2 in sparkling wines. **Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemistry**, v. 311, p. 578-580, 1982.

ESTEVEZ, V. I.; LIMA, S. S. F.; LIMA, D. L. D.; DUARTE, A. C. Using capillary electrophoresis for the determination of organic acids in Port wine. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 163-167, 2004.

FISCHER, U.; NOBLE, A. C. The effect of ethanol, catechin concentration, and pH, on sourness and bitterness of wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 45, p. 6-10, 1994.

FLANZY, C. (coord). **Enología: fundamentos científicos y tecnológicos**. Madrid: Mundi Prensa, 2000.

FOURNAND, D.; VICENS, A.; SIDHOUM, L.; SOUQUET, J. M. ; MOUTOUNET, M. ; CHEYNIER, V. Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7331-7338, 2006.

GALGANO, F.; FAVATI, F.; CARUSO, M.; SCARPA, T.; PALMA, A. Analysis of trace elements in southern Italian wines and their classification according to provenance. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 1808-1815, 2008.

GARCÍA-VIGUERA, C.; BAKKER, J.; BELLWORTHY, S. J.; READER, J. P.; WATKINS, S. J.; BRIDLE, P. The effect of some processing variables on non-coloured phenolic compounds in port wines. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung A**, v. 205, p. 321-324, 1997.

GIL, M.; CABELLOS, J. M.; ARROYO, T.; PRODANOV, M. Characterization of the volatile fraction of young wines from the Denomination of Origin “Vinos de Madrid” (Spain). **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 145-153, 2006.

GÓMEZ-MÍGUEZ, M. J.; GONZÁLEZ-MIRET, M. L.; HERNANZ, D.; FERNÁNDEZ, A. M.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Effects of prefermentative skin contact conditions on colour and phenolic content of white wines. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 238-245, 2007.

GONZÁLVEZ, A.; LLORENS, A.; CERVERA, M. L.; ARMENTA, S.; DE LA GUARDIA, M. Elemental fingerprint of wines from the protected designation of origin Valencia. **Food Chemistry**, v. 112, p. 25-34, 2009.

GRINDLAY, G.; MORA, J.; MAESTRE, S.; GRAS, L. Application of a microwave-based desolvation system for multi-elemental analysis of wine by inductively coupled plasma based techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 629, p. 24-37, 2008.

GÜRBÜZ, O.; GÖÇMEN, D.; DAG DELEN, F.; GÜRSOY, M.; AYDIN, S.; SAHIN, I.; BÜYÜKUYSAL, L.; USTA, M. Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 100, p. 518-525, 2007.

GUERRA, C. C. Compostos fenólicos do vinho. In: Vinho e saúde: vinho como alimento natural. Jairo Monson de Souza Filho e Vitor Monfrói (org). Bento Gonçalves, 2005, Bento Gonçalves. **Simpósio Internacional Vinho e Saúde**. Bento Gonçalves: Ibravin, 2005.

GUILLÉN, D. A.; BARROSO, C. G.; PÉREZ-BUSTAMANTE, J. A. Automation of sample preparation as a preliminary stage in the high-performance liquid chromatography determination of polyphenolic compounds in sherry wines. **Journal of Chromatography A**, v. 730, p. 39-46, 1996.

HALLIWELL, B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? **FEBS Letters**, v. 540, p. 3-6, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. New Yor: Clarendon Press; Oxford: Oxford University Press. 1999.

HERNÁNDEZ, M. J.; GARCÍA-MORENO, M. V.; DURÁN, E.; GUILLÉN, D.; BARROSO, C. G. Validation of two analytical methods for the determination of ochratoxin A by reversed-phased high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection in musts and sweet wines from Andalusia. **Analytica Chimica Acta**, v. 566, p. 117-121, 2006.

HO, P.; HOGG, T. A.; SILVA, M. C. M. Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines. **Food Chemistry**, v. 64, p. 115-122, 1999.

IBANEZ, J. G.; CARREON-ALVAREZ, A.; BARCENA-SOTO, M.; CASILLAS, N. Metals in alcoholic beverages: A review of sources, effects, concentrations, removal, speciation and analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 672-683, 2008.

IBRAVIN. **Instituto Brasileiro do Vinho**. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/cadastroviticola.php>>. Acesso em: 30 abril 2010.

IBRAVIN. **Instituto Brasileiro do Vinho**: A Vitivinicultura Brasileira. 2008. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/brasilvitiwinicola.php>>. Acesso em: 30 abril 2010.

IVDP. **Instituto dos Vinhos do Douro e Porto**. 2010. Disponível em: <<http://www.ivdp.pt>>. Acesso em: 26 abril 2010.

JACKSON, R. S. **Wine Science – Principles, Practice, Perception**. 2ª ed. San Diego: Academic Press, 2000. p. 236-268.

KATSUBE, N.; KEIKO, I.; TSUSHIDA, T.; YAMAKI, K.; KOBORI, M. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 68-75, 2003.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 36, p. 703 – 725, 2001.

KLEIN, P. D.; KLEIN, E. R. Stable isotopes in biomedical research. **Spectra**, v. 8, p. 9-12, 1982.

LA TORRE, G. L.; LA PERA, L.; RANDO, R.; LO TURCO, V.; DI BELLA, G.; SAITTA, M.; DUGO, G. Classification of Marsala wines according to their polyphenol, carbohydrate and heavy metal levels using canonical discriminant analysis. **Food Chemistry**, v. 110, p. 729-734, 2008.

LEE, S. J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum*) and thyme leaves (*Thymes vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.

LEIGHTON, F., URQUIAGA, I. Los componentes del vino y sus efectos beneficiosos para la salud humana. In: **Conferencia pronunciada en el VII Congreso Latinoamericanode Viticultura y Enología**, 28 nov. al 3 dez., 1999. Mendoza. Disponível em < <http://www.fac.org.ar/revista/00v29n2/leighton/leighton.htm> > Acesso em 02 abril 2010.

MARDONES, C.; HITSCHFELD, A.; CONTRERAS, A.; LEPE, K. ; GUTOÉRREZ, L.; VON BAER, D. Comparison of shikimic acid determination by capillary zone electrophoresis with direct and indirect detection with liquid chromatography for varietal differentiation of red wines. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, p. 285-292, 2005.

MÁRQUEZ, R.; CASTRO, R.; NATERA, R.; GARCÍA-BARROSO, C. Characterisation of the volatile fraction of Andalusian sweet wines. **European Food Research Technology**, v. 226, p. 1479-1848, 2008.

MARTINELLI, L. A.; MOREIRA, M. A.; OMETTO, J. P. H. B.; ALCARDE, A. R.; RIZZON, L. A.; STANGE, E.; EHLERINGER, J. R. Stable carbon isotopic composition of the wine and CO₂ bubbles of sparkling wines: detecting C₄ sugar additions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2625-2631, 2003.

MARTÍNEZ-FLORÉZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M.^a J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrição Hospitalar**, v. 17(6). p 271-278, 2002.

MASA, A.; VILANOVA, M. Flavonoid and aromatic characterization of cv. Albarín blanco (*Vitis vinifera* L.). **Food Chemistry**, v. 107, p. 273-281, 2008.

MATEUS, N.; OLIVEIRA, J.; PISSARRA, J.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M.; RIVAS-GONZALO, J. C.; SANTOS-BUELGA, C.; SILVA, A. M. S.; FREITAS, V. A new vinylpyranoanthocyanin pigment occurring in aged red wine. **Food Chemistry**, v. 97, p. 689-695, 2006.

MATEUS, N.; PASCUAL-TERESA, S.; RIVAS-GONZALO, J. C.; SANTOS-BUELGA, C.; FREITAS, V. Structural diversity of anthocyanin-derived pigments in port wines. **Food Chemistry**, v. 76, p. 335-342, 2002.

MATO, I.; SUÁREZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J. F. Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection. **Food Chemistry**, v. 102, p. 104-112, 2007.

MAZZA, G. Anthocyanins in grapes and grape products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 341-371, 1995.

MIKLÓSY, E.; KERÉNYI, Z. Comparison of the volatile aroma components in roble rotted grape berries from two different locations of the Tokaj wine district in Hungary. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 177-181, 2004.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. **Food Chemistry**, v. 60, p. 331-337, 1997.

MONAGAS, M.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. **Food Chemistry**, v. 95, p. 405-412, 2006.

MORASCH, B.; RICHNOW, H. H.; SCHINK, B.; MECKENSTOCK, R.U. Stable hydrogen and carbon isotope fractionation during microbial toluene degradation: mechanistic and environmental aspects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4842-4849, 2001.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. **Química Orgânica**. 9ª Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990. 1639 p.

MUÑOZ, D.; PEINADO, R. A.; MEDINA, M.; MORENO, J. Biological aging of sherry wines under periodic and controlled microaerations with *Saccharomyces cerevisiae* var. *capensis*: effect on odorant series. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1188-1195, 2007.

MURÁNYIU, Z.; KOVÁCS, Z.. Statistical evaluation of aroma and metal content in Tokay wines. **Microchemical Journal**, v. 67, p. 91-96, 2000.

NAVE, F.; CABRITA, M. J.; COSTA, C. T. Use of solid-supported liquid-liquid extraction in the analysis of polyphenols in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1169, p. 23-30, 2007.

NURGEL, C.; PICKERING, G. Modeling of sweet, bitter and irritant sensations and their interactions elicited by model ice wines. **Journal of Sensory Studies**, v. 21, p. 505-519, 2006.

OLIVEIRA, J.; SANTOS-BUELGA, C.; SILVA, A. M. S.; FREITAS, V.; MATEUS, N. Chromatic and structural features of blue anthocyanin-derived pigments present in Port wine. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 2-9, 2006.

PANEQUE, P.; ÁLVAREZ-SOTOMAYOR, M. T.; CLAVIJO, A.; GÓMEZ, I. A. Metal content in southern Spain wines and their classification according to origin and ageing. **Microchemical Journal**, v. 94, p. 175-179, 2010.

PEINADO, J.; LOPEZ DE LERMA, N.; MORENO, J.; PEINADO, R.A. Antioxidant activity of different phenolics fractions isolated in must from Pedro Ximenez grapes at different stages of the off-wine drying process. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1050-1056, 2009.

PERES, R. G.; MORAES, E. P.; MICKE, G. A.; TONIN, F. G.; TAVARES, M. F. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Food Control**, v. 20, p. 548-552, 2009.

PÉREZ-MAGARIÑO, S.; GONZÁLEZ-SAN JOSÉ, M. L. Evolution of flavanols, anthocyanins, and their derivatives during the aging of red wines elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p. 1181-1189, 2004.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035 – 1042, 2000.

PISSINATTO, L.; MARTINELLI, L. A.; VICTORIA, R. L.; CAMARGO, P. B. Stable carbon isotopic analysis and the botanical origin of ethanol in Brazilian brandies. **Food Research International**, v. 32, p. 665-668, 1999.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A.; MELO, L. M. R. A **vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas**. 2008. Disponível em:
<<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura.html>>
Acesso em: 30 abril 2010.

RASTIJA, V.; SRECNIK, G.; MEDIC-SARIC, M. Polyphenolic composition of Croatia wines with different geographical origins. **Food Chemistry**, v. 115, p. 54-60, 2009.

REGODÓN MATEOS; PÉREZ-NEVADO; RAMÍREZ FERNÁNDEZ. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 151-157, 2006.

RENAUD, S.; DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and french paradox for coronary heart disease. **Lancet**, v. 339, p. 1523-1526, 1992.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B. ; LONVAUD, A. **Handbook of Enology**. Vol. 1. The microbiology of wine and vinifications. 2ª Ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltda, 2006a.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Handbook of enology**. Volume 2. 2ª edição. The chemistry of wine: stabilization and treatments. John Wiley & Sons Ltd, 2006b. 450 p.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Tratado de enología: química del vino, estabilización y tratamientos**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 2003.

RIZZON, L. A.; MIELE, A.. Concentração de ácido tartárico dos vinhos da Serra Gaúcha. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.893-895, 2001.

RIZZON, L.A. Teor de cátions dos vinhos da Serra Gaúcha. In: Vinho e Saúde: vinho como alimento natural, 2005, Bento Gonçalves. **Simpósio Internacional Vinho e Saúde**. Bento Gonçalves: Ibravin, 2005. p. 41-42.

ROSA, S. M. Doce Néctar. **Adega**, São Paulo, ano 3, n.º 29, 2008.

ROSIER, J. P. Novas Regiões: Vinhos de Altitude no Sul do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 10, 2005, Bento Gonçalves. **Anais**. Bento Gonçalves: EMBRAPA, 2003.

ROSIER, J. P.; LOSSO, M. **Cadeias produtivas do estado de Santa Catarina: viticultura**. Florianópolis: EPAGRI, 1997, 41p. (CEPAGRI. Boletim técnico, 83).

ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. **Analyse Chimique**. Méthodes et techniques instrumentales modernes, 6ª edição. Dunod : Paris, 2004. 462 p.

RUDNITSKAYA, A.; ROCHA, S. M.; LEGIN, A.; PEREIRA, V.; MARQUES, J. C. Evaluation of the feasibility of the electronic tongue as a rapid analytical tool for wine age prediction and quantification of the organic acids and phenolic compounds. The case-study of Madeira wine. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, p. 82-89, 2010.

RUMMEL, S.; HOELZL, S.; HOM, P.; ROSSMANN, A.; SCHLICHT, C. The combination of stable isotope abundance ratios of H, C, N and S with ⁸⁷S/⁸⁶S for geographical origin assignment of orange juices. **Food Chemistry**, v. 118, p. 890-900, 2010.

RUSSEL, J. B. **Química Geral**. São Paulo: McGraw-Hill, 1982. 879 p.

SALES, M. G. F.; AMARAL, C. E. L.; MATOS, C. M. D. Determination of tartaric acid in wines by FIA with tubular tartrate-selective electrodes. **Fresenius J Anal Chem**, v.369, p.446-450, 2001.

SANTALAD, A.; TEERAPORNCHASIT, P.; BURAKHAM, R.; SRIJARANAI, S. Capillary zone electrophoresis of organic acids in beverages. **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, p. 1741-1746, 2007.

SARRAZIN, E.; DUBOURDIEU, D.; DARRIET, P. Characterization of key-aroma compounds of botrytized wines, influence of grape botrytization. **Food Chemistry**, v. 103, p. 536-545, 2007.

SATO, K.; KAWASHITA, K. Espectrometria de massas em geologia isotópica. **Geologia USP Série Científica**, v. 2, p. 57-77, 2002.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 32, p. 67 – 103, 1992.

SILVA, J. A. F.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F. M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**. v. 30, p. 740-744, 2007.

SIMPKINS, W. A.; PATEL, G.; HARRISON, M.; GOLDBERG, D. Stable carbon isotope ratio analysis of Australian orange juices. **Food Chemistry**, v. 70, p. 385-390, 2000.

SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., NIEMAN, T. **Princípios de análise instrumental**. Tradução de Ignez Caracelli [et al.] 5. Ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Sequestering Ability of Butylated Hydroxytoluene, Propyl Gallate, Resveratrol, and Vitamins C and E against ABTS, DPPH, and Hydroxyl Free Radicals in Chemical and Biological Systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 1077-1080, 2003.

TAGLIARO, F.; MANETTO, G.; CRIVELLENTI, F.; SMITH, F. P. A brief introduction to capillary electrophoresis. **Forensic Science International**, v. 92, p. 75-88, 1998.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. **Química Nova**, v. 19, p.173-180, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em Eletroforese Capilar. **Química Nova**, v. 20, p.493-498, 1997.

TONIETTO, J.; CARBONNEAU, A. A multicriteria climatic classification system for grape-growing regions worldwide. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 124/1-2, p. 81-97, 2004.

TONIETTO, J.; MANDELLI, F. Uvas americanas e híbridas para processamento em clima temperado. **Sistema de Produção**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. Versão Eletrônica.

TRONCHONI, J.; GAMERO, A.; ARROYO-LÓPEZ, F. N.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, p. 237-243, 2009.

ULRICH, J. C. **Determinação de impurezas em compostos de urânio por meio da técnica de espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma indutivo (HR-ICPMS)**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) – IPEN, Universidade de São Paulo, 2001.

USSEGLIO-TOMASSET, L. L'evoluzione dell'acido malico nei vini. **Vini d'Italia**, v. 33, n. 3. p. 21-31, 1991.

VARANDAS, S.; TEIXEIRA, M. J.; MARQUES, J. C.; AGUIAR, A.; ALVES, A.; BASTOS, M. M. S. M. Glucose and fructose levels on grape skin: interference in *Lobesia botrana* behaviour. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 351-355, 2004.

VERSARI, A.; BOULTON, R. B.; PARPINELLO, G. P. A comparison of analytical methods for measuring the color components of red wines. **Food chemistry**, v. 106, p. 397-402, 2008.

VILJAKAINEN, S. K.; LAAKSO, S. V. The use of malolactic *Oenococcus oeni* (ATCC 39401) for deacidification of media containing glucose, malic acid and citric acid. **Europe Food Research Technology**, v.211, p.438-442, 2000.

VILLAMIEL, M.; POLO, M. C.; MORENO-ARRIBAS, M. V. Nitrogen compounds and polysaccharides changes during the biological ageing of sherry wines. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 1842-1846, 2008.

VINSON, J. A.; JANG, J.; YANG, J.; DABBAGH, Y.; LIANG, X.; SERRY, M.; PROCH, J.; CAI, S. Vitamins and especially flavonoids in common beverages are powerful *in vitro* antioxidants which enrich lower density lipoproteins and increase their oxidative resistance after ex vivo spiking in human plasma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 2502-2504, 1999.

WANG, Y.; CATANA, F.; YANG, Y.; RODERICK, R.; VAN BREEMEN, R. B. An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 431-435, 2002.

YU, T-W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, v. 379, n. 2, p. 201-210, 1997.

ZHANG, Q., LI Y. F., HUANG, C. Z. Quality control of piperazine in pharmaceutical formulations by capillary zone electrophoresis. **Talanta**, v. 76, p. 44-48, 2008.

ZHENG, Y. J.; DUAN, Y. T.; ZHANG, Y. F.; PAN, Q. H.; LI, J. M. HUANG, W. D. Determination of organic acids in red wine and must on only one RP-LC-Column directly after sample dilution and filtration. **Chromatographia**, v. 69, p. 1-5, 2009.

ZOTOU, A; LOUKOU, Z; KARAVA, O. Method development for the determination of seven organic acids in wines by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Chromatographia**, v.60, p.39-44, 2004.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O., et al. (Orgs.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5ª ed., Florianópolis: Ed. Universidade Federal de Santa Catarina, p. 577-614, 2003.

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DE COMPOSTOS FENÓLICOS NÃO COLORIDOS DE VINHOS FORTIFICADOS UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DE COMPOSTOS FENÓLICOS NÃO COLORIDOS DE VINHOS FORTIFICADOS UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

RESUMO

Compostos fenólicos não coloridos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de vinhos fortificados e um procedimento de extração em fase sólida foi otimizado para o pré-tratamento de amostra. As variáveis avaliadas foram volume de amostra, volume do solvente de eluição e vazão. A aplicação da metodologia de superfície de resposta revelou que as condições ideais de extração de compostos fenólicos foram 5 mL de amostra, 20 mL do solvente de eluição e vazão de $0,06 \text{ mL s}^{-1}$. Nos testes de verificação foram obtidos percentuais de recuperação no intervalo entre 71,06 a 119,4 %. O método otimizado foi aplicado em amostras de vinhos fortificados brancos e tintos com bons resultados para a determinação de ácido gálico, (+)catequina, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e quercetina, indicando a adequação do modelo utilizado e a aplicabilidade da metodologia de superfície de resposta na otimização das condições de extração.

Palavras-chave: compostos fenólicos não coloridos; vinhos fortificados; metodologia de superfície de resposta; CLAE-UV-VIS

OPTIMIZATION OF SOLID-PHASE EXTRACTION OF NON-COLOURED PHENOLIC COMPOUNDS FROM FORTIFIED WINES USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

ABSTRACT

Non-coloured phenolic compounds were determined to high performance liquid chromatography in samples of fortified wines and a solid-phase extraction procedure was optimized for pretreatment of sample. To the optimization of solid phase extraction was used the surface response methodology. Application of the surface response methodology revealed that the conditions for extraction were 5 mL of sample, 20 mL of elution solvent and flow rate 0.06 mL s^{-1} . Verification tests gave percentage of recovery in the interval between 71.06 and 119.40%. The optimized method was applied in samples of fortified wines white and red with good results for determination of gallic acid, (+)catechin, caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid and quercetin, indicating suitability of the model employed and the applicability of surface response methodology in optimization the extraction conditions.

Keywords: non-coloured phenolic compounds; fortified wines; surface response methodology; HPLC-UV-Vis

1 INTRODUÇÃO

Vinhos apresentam uma ampla gama de polifenóis que incluem os ácidos fenólicos, trihidroxiestilbenos, flavonóis, flavan-3-ols, como também polímeros denominados de procianidinas e antocianinas (NAVE; CABRITA; COSTA, 2007; MASA; VILANOVA, 2008; RASTIJA; SRECNİK; MEDIC-SARIC, 2009). Estes compostos são responsáveis por efeitos benéficos para a saúde incluindo atividade antiinflamatória, antiviral, anticarcinogênica e antioxidante (LÓPEZ et al., 2001; VILLANO et al., 2006; GÜRBÜZ et al., 2007; RASTIJA; SRECNİK; MEDIC-SARIC, 2009).

A importância dos compostos fenólicos no vinho está relacionada à sua influência na cor, aroma, sabor e adstringência (RODRÍGUEZ-DELGADO et al., 2001; VALENTÃO et al., 2007; CABRITA et al., 2008). Os compostos fenólicos não coloridos incluem os ácidos benzóicos, cinâmicos e aldeídos, usualmente denominados de fenóis de baixo peso molecular. Embora estejam presentes em pequenas quantidades nos vinhos, desempenham um importante papel na qualidade sensorial, pois podem contribuir, através de um efeito aditivo, para o amargor e a dureza (CABRITA et al., 2008), assim como, exercem efeito na cor, uma vez que durante o processo de envelhecimento dos vinhos, pigmentos novos e mais estáveis são formados da reação entre antocianinas e flavanóis (DOPICO-GARCÍA et al., 2008).

Dentre as técnicas analíticas mais usadas para a determinação de compostos fenólicos em amostras complexas, como o vinho, destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Considerando a grande variedade de compostos presentes no vinho e as variações em suas concentrações, o preparo da amostra é essencial para garantir a identificação e quantificação destes compostos, mesmo quando a CLAE é usada em associação com métodos de detecção com um elevado poder de discriminação como o detector de arranjo de díodos (GUILLÉM; BARROSO; PÉREZ-BUSTAMANTE, 1996). Em vinhos fortificados, o pré-tratamento da amostra é fundamental, uma vez que o elevado conteúdo de etanol, açúcares e outros compostos normalmente presentes na matriz podem diminuir a sensibilidade da técnica empregada, causar danos nas colunas analíticas, causar variações no fluxo do solvente e na forma dos picos (RODRÍGUEZ-BENCOMO et al., 2003; ALVES, NASCIMENTO, NOGUEIRA, 2005).

Técnicas de extração rápidas e limpas (utilizando menor quantidade de solventes orgânicos), metodologias mais eficientes (maior

recuperação e reprodutibilidade, limite de detecção e de quantificação menores) e de fácil automação são objeto de estudos (OSZMIANSKI; RAMOS; BOURZEIX, 1988; RICARDO DA SILVA et al., 1990; CHILLA et al., 1996; NAVE; CABRITA; COSTA, 2007). Uma alternativa para aprimorar as técnicas mencionadas é a extração em fase sólida (SPE), que oferece muitas vantagens, incluindo melhor seletividade e facilidade de execução (GUILLÉM; BARROSO; PÉREZ-BUSTAMANTE, 1996; GARCÍA-FALCÓN et al., 2007).

O preparo da amostra por extração em fase sólida é necessário em função das dificuldades de interpretação dos cromatogramas e de identificação dos compostos fenólicos a serem analisados. Dependendo da natureza dos compostos, a seletividade e precisão do método são baixas, o que requer a otimização do procedimento de extração para se obter melhores resultados (RODRÍGUEZ-DELGADO et al., 2001).

Em geral, a otimização de um processo de extração pode ser alcançada utilizando métodos estatísticos, como a metodologia de superfície de resposta, que é frequentemente utilizada, pois permite a avaliação das interações entre vários fatores. A metodologia de superfície de resposta é um método estatístico eficaz baseado no modelo multivariado não-linear, sendo amplamente utilizada para a otimização de processos complexos, bem como para estimar simultaneamente os efeitos de muitas variáveis em um processo e suas interações sobre as variáveis respostas (KU; MUN, 2008).

O objetivo deste trabalho foi propor um procedimento otimizado de extração em fase sólida de compostos fenólicos não coloridos, para identificar e quantificar seis compostos fenólicos em vinhos fortificados através da CLAE – UV-Vis.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PADRÕES E REAGENTES

Acetonitrila, metanol e acetato de etila grau HPLC foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). Ácido clorídrico, ácido acético, ácido tartárico, etanol eram reagentes de grau analítico. A água foi tratada em um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, MA). Todos os solventes usados como fase móvel foram previamente filtrados através de membrana 0,45 μm (Millipore) e degaseificados antes do uso. Os cartuchos de SPE usados foram Spe-ed C₁₈ (500 mg de massa de sorvente e 6 mL de volume do reservatório) da *Applied Separations* (Allentown, United States).

Os padrões de ácido cafeico, ácido ferúlico e quercetina foram obtidos da Fluka (Steinheim, Germany) e os padrões de ácido *p*-cumárico, catequina e ácido gálico, da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Todos os padrões foram dissolvidos em uma matriz de vinho sintético preparada com 18 % (v/v) de etanol e 5 g L⁻¹ de ácido tartárico em água Milli-Q.

2.2 AMOSTRAS

Para a otimização do procedimento de extração dos compostos fenólicos não coloridos foi utilizada amostra de vinho tinto fortificado elaborada a partir de uvas Cabernet Sauvignon e Merlot, safra 2005, produzida em São Joaquim, Santa Catarina, Brasil. A metodologia proposta foi testada utilizando amostras de vinhos fortificados brancos e tintos de *Vitis vinifera* L., produzidas em três diferentes regiões vitivinícolas brasileiras.

2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NÃO COLORIDOS DE AMOSTRA DE VINHO FORTIFICADO

Para otimizar as condições de extração dos compostos fenólicos não coloridos de vinhos fortificados foi utilizada a metodologia de Superfície de Resposta (MONTGOMERY, 2001; MEYERS; MONTGOMERY, 2002). Um delineamento central composto (DCC) consistindo de 17 experimentos, incluindo três repetições do ponto central, foi escolhido para avaliar o efeito da combinação de variáveis independentes. Os valores laterais e o ponto central das três variáveis independentes foram baseados em resultados de experimentos preliminares (volume de amostra 5 – 10 mL; volume de solvente 10 – 30 mL; e vazão de solvente 0,03 – 0,09 mL s⁻¹). Três níveis foram adotados e codificados como -1, 0, +1. Os experimentos foram realizados em ordem aleatória para minimizar os efeitos da variabilidade nas respostas observadas (SIN et al., 2006). As variáveis independentes foram volume de amostra (X_1 , mL), volume de solvente (X_2 , mL) e vazão do solvente (X_3 , mL s⁻¹), enquanto a variável resposta foi o conteúdo de compostos fenólicos expresso em área total dos picos cromatográficos (mAU). A função resposta (Y) foi dividida em linear, quadrática e componentes de interação (HENIKA, 1982; GIOVANNI, 1983; MEYERS; MONTGOMERY, 2002; SIN et al., 2006). Os dados experimentais

foram organizados segundo a equação de regressão de segunda-ordem (Equação 1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{23} X_2 X_3 + \varepsilon \quad (1)$$

sendo, Y a resposta predita, β_0 o intercepto; $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ os coeficientes lineares; $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ os coeficientes quadráticos; $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ os coeficientes das interações e, X_i e X_j os valores codificados para os níveis das variáveis X_i e X_j ; ε o resíduo. O programa Statistica versão 7.0 (Statsoft, Inc. Tulsa, OK, USA) foi usado para a análise de variância (ANOVA) e para definir o coeficiente de determinação (R^2) para avaliar o modelo.

2.4 PRÉ-TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras foram aplicadas em cartucho de SPE pré-condicionado com 20 mL de acetato de etila, 20 mL de metanol e 20 mL de 0,01N HCl. O cartucho foi lavado com 3 mL de HCl 0,01N. Os compostos fenólicos não coloridos foram eluídos com acetato de etila e concentrados em rotaevaporador a 30 °C. O resíduo obtido foi dissolvido em 2 mL de metanol, filtrado em membrana Millipore (0,45 μm) e analisado em CLAE - UV-VIS.

2.5 ANÁLISE POR CLAE UV-VIS

A análise dos compostos fenólicos foi realizada em cromatógrafo líquido Shimadzu, equipado com um sistema quaternário de bombas (modelo 10-AT), um degaseificador a vácuo modelo DGU-14A, um detector UV-Vis (SPD-10AV) e um injetor Rheodyne com *loop* de 20 μL . O conjunto era controlado pelo software CLASS VP 6.1, com comunicador modelo SCL-10A. A fase estacionária era composta de uma coluna em fase reversa Hichrom (Berkshire, UK) de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de tamanho 5 μm . Uma coluna de guarda foi utilizada para proteger a coluna analítica. Para a separação dos compostos foi utilizado um gradiente de eluição da fase móvel A (água acidificada com ácido acético a pH 2,65) e fase móvel B (80% acetonitrila, 20% eluente A): 0-35 min, 0-30% B; 35-40 min, 30-50% B; 40-45 min, 50-100% B; 45-50 min, 100-50% B; 50-55 min, 50-30% B; 55-60 min, 30-0% B. Foi utilizado fluxo de 1,2 mL min^{-1} e detecção no comprimento de onda de 280 nm. A identificação dos

compostos fenólicos foi obtida por comparação entre os tempos de retenção dos picos das amostras e dos padrões e a quantificação foi efetuada por padronização externa.

2.6 EFICIÊNCIA DO MÉTODO

A curva de calibração foi construída com os compostos fenólicos ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, (+) catequina, quercetina e ácido ferúlico e, para o ácido gálico a curva foi construída separadamente, a fim de evitar perdas devido à sua reatividade com os demais analitos. Cada curva de calibração foi construída com sete pontos em intervalos de concentração correspondentes a 0,3 -150 mg L⁻¹ com três replicatas de cada ponto. Para todos os pontos da curva de calibração foi realizado o processo de extração dos compostos fenólicos não coloridos em SPE utilizando os valores ótimos obtidos através da Metodologia de Superfície de Resposta. A quantificação foi efetuada por padronização externa, avaliando a área do pico cromatográfico e, para todos os compostos foi obtida correlação linear com valores de R² maiores que 0,99.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados com base no desvio padrão da resposta do branco (n=7) e na inclinação da curva de calibração de cada ponto. Como branco foi utilizada uma solução de vinho sintético.

A exatidão foi determinada através do ensaio de recuperação com a adição dos padrões na concentração de 15 mg L⁻¹ na amostra de vinho fortificado e foi expressa como percentual de recuperação e desvio padrão relativo para as diferentes concentrações.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DE COMPOSTOS FENÓLICOS NÃO COLORIDOS DE AMOSTRA DE VINHO FORTIFICADO

A resposta obtida para as 17 diferentes combinações foi analisada usando o DCC. Os valores das variáveis independentes (X₁, X₂ e X₃) e da variável resposta são apresentados na Tabela 2.1. A avaliação dos dados deste experimento foi realizada através da integração e avaliação das áreas dos picos correspondentes a seis compostos com diferentes tempos de retenção. A variável resposta foi expressa como a soma das

áreas dos picos cromatográficos dos seis compostos fenólicos não coloridos analisados.

Tabela 2.1 Delineamento central composto e resposta para a otimização da extração em fase sólida de compostos fenólicos não coloridos de amostra de vinho fortificado.

Corrida	Fator 1 (X ₁)	Fator 2 (X ₂)	Fator 3 (X ₃)	Compostos fenólicos não coloridos (área total)	
	Volume Amostra (mL)	Volume Solvente (mL)	Fluxo (mL s ⁻¹)	Observado	Predito
1	5	10	0,03	322435	423164,6
2	5	10	0,09	306294	313629,1
3	5	30	0,03	263935	273043,7
4	5	30	0,09	208922	255748,6
5	10	10	0,03	273598	306935,3
6	10	10	0,09	242890	313945,2
7	10	30	0,03	302658	375486,8
8	10	30	0,09	495303	474737,2
9	3,3	20	0,06	462409	403417,6
10	11,7	20	0,06	544355	489735,4
11	7,5	3,2	0,06	494790	406955,1
12	7,5	36,8	0,06	441695	415918,9
13	7,5	20	0,01	313046	221922
14	7,5	20	0,11	237663	213351
15	7,5	20	0,06	541247	586798,5
16	7,5	20	0,06	604600	586798,5
17	7,5	20	0,06	592546	586798,5

Foram medidos os valores reais para cada combinação das variáveis independentes e, os valores preditos foram avaliados a partir do modelo desenvolvido usando funções de aproximação (KÖRBAHTI;

RAUF, 2008; ZHANG et al., 2009). Nota-se que, os valores preditos obtidos foram próximos dos valores observados no experimento, indicando que o modelo foi proposto com êxito para a correlação entre os fatores aplicados no procedimento de extração em fase sólida e a variável resposta. O conteúdo de compostos fenólicos não coloridos, expresso como a soma das áreas dos picos cromatográficos das seis substâncias analisadas, variou de 208922 a 604600 mAU, de acordo com as variações nas condições de extração.

A aplicação da metodologia de superfície de resposta proporciona, com base no parâmetro estimado, uma relação empírica entre a variável resposta (conteúdo de compostos fenólicos não coloridos) e os fatores testados. Ao aplicar a análise de regressão múltipla nos dados experimentais, a variável resposta e as variáveis testadas são relacionadas com a equação polinomial de segunda ordem (Equação 2), na qual os fatores não significativos foram excluídos.

$$Y = 523558 + 2668X_2 - 2571X_3 - 47582X_2^2 - 118243X_3^2 \quad (2)$$

O efeito quadrático do volume de solvente de eluição juntamente com a vazão, foram estatisticamente significativos, enquanto, os efeitos linear e quadrático do volume de amostra e o efeito das interações das três variáveis independentes não foram significativos. Mesmo não sendo estatisticamente significativos, os efeitos lineares do volume de solvente de eluição e da vazão não foram eliminados do modelo com a finalidade de apoio hierárquico (ALIAKBARIAN et al., 2008).

Os coeficientes de regressão do intercepto, linear, quadrático e interações do modelo experimental foram calculados e seus níveis de significância foram determinados usando a Análise de Variância (ANOVA). A Tabela 2.2 mostra um resumo da ANOVA para o modelo quadrático de superfície de resposta usado para estimar a extração em fase sólida de compostos fenólicos não coloridos em vinhos fortificados como uma função de três variáveis independentes.

A verificação da adequação do modelo é uma parte importante do procedimento de análise dos dados, uma vez que, se o ajuste for inadequado, pode fornecer resultados duvidosos (MEYERS; MONTGOMERY, 2002; LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI, 2005; KÖRBAHTI; RAUF, 2009). A qualidade do modelo desenvolvido foi avaliada com base no coeficiente de determinação (R^2), que indica a proporção da variabilidade na variável resposta (SIN et al., 2006). Quando R^2 se aproxima da unidade, o modelo empírico se encaixa mais

perfeitamente nos dados reais e, portanto, maior é a sua precisão. Quanto menor o valor de R^2 , menor relevância as variáveis independentes do modelo têm na explicação do comportamento da variação na resposta (RAVIKUMAR et al., 2006; LEE et al., 2006; SIN et al., 2006; FAN et al., 2008; WANG et al., 2008). Segundo Sin et al., (2006), valores de R^2 superiores a 0,8 indicam que o modelo de regressão explica o comportamento real do sistema em estudo. O coeficiente de determinação (R^2) obtido neste estudo foi de 0,8293. O modelo de regressão apresentou baixa dispersão, explicando 82,93% do total da variação observada na resposta.

Tabela 2.2 Análise de Variância (ANOVA) para o modelo quadrático de superfície de resposta da extração em fase sólida de compostos fenólicos não coloridos de vinhos fortificados.

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor F	Valor p
Modelo	245420275828	9	27268919536,44	3,78	0,046708
X_1	9005106658	1	9005106658	1,25	0,300876
X_2	97111128,2	1	97111128,2	0,01	0,910916
X_3	89623347,2	1	89623347,2	0,01	0,914403
X_1^2	27807638519	1	27807638519	3,85	0,090446
X_2^2	43491099722	1	43491099722	6,03	0,043806
X_3^2	193728739362	1	193728739362	26,84	0,001280
X_1X_2	23908831128	1	23908831128	3,31	0,111567
X_1X_3	6791426785	1	6791426785	0,94	0,364357
X_2X_3	4254154920	1	4254154920	0,59	0,467757
Resíduo	50525336860	7	7217905266		
Ajuste	48262840551	5	9652368110	8,53	0,108263
Erro puro	2263496309	2	1131748154		
Total	295945612688	16			

$R^2_{\text{adj}} = 0,60977$; $R = 0,91064$; $R^2 = 0,82927$

O ajuste não foi significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, o que demonstra que o modelo é adequado para ser aplicado no intervalo das variáveis que determinam a resposta (ZULKALI;

AHMAD; NORULAKMAL, 2006; KU; MUN, 2008). A ANOVA demonstrou que o modelo é significativo, o que é evidenciado para o valor de F calculado (3,78) e o valor de probabilidade de erro reduzido ($p = 0,047$).

Em relação aos fatores do modelo, um maior valor de F e um menor valor de p indicam que aquele fator tem maior efeito significativo na variável resposta (QUANHONG; CAILI, 2005; YUAN et al., 2008). Com base nos valores de F apresentados na Tabela 2.2, observa-se que o maior valor foi de 26,84, indicando que o efeito quadrático da vazão foi o mais significativo para a variável resposta, quando comparado aos demais fatores.

O efeito de duas variáveis independentes (volume do solvente de eluição e vazão da amostra) na variável resposta, fixando a terceira variável independente (volume de amostra) no ponto central do experimento, é mostrado na Figura 2.1.

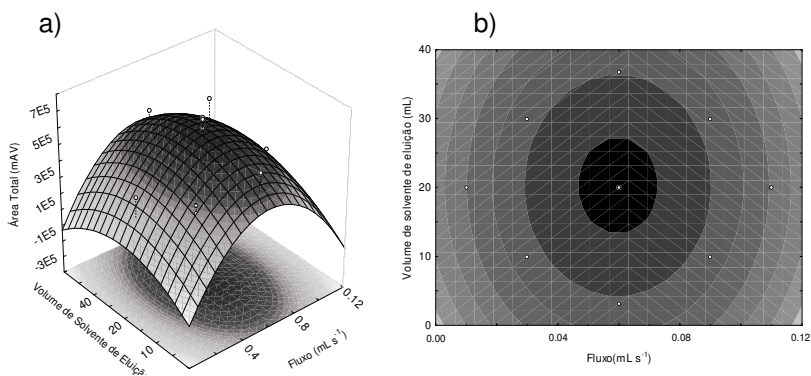


Figura 2.1 Superfície de resposta (a) e curva de contornos (b) para a variação na área dos picos cromatográficos de seis compostos fenólicos não coloridos em função do volume de solvente (mL) e vazão (mL s⁻¹) com volume de amostra fixado em 7,5 mL.

A eficiência na extração em fase sólida dos compostos fenólicos não coloridos foi dependente, principalmente do volume de solvente empregado para a eluição (efeito quadrático) e da vazão (efeito quadrático), resultando em um efeito curvilíneo para a superfície de resposta (Figura 2.1a). O rendimento na extração dos compostos fenólicos não coloridos diminui quando o volume de solvente e a vazão são menores que 15 mL e 0,05 mL s⁻¹, respectivamente, bem como,

quando são superiores a 25 mL e 0,07 mL s⁻¹, respectivamente (Figura 2.1b).

O gráfico tridimensional de superfície de resposta (Figura 2.1) apresenta o formato de parábola indicando que a extração dos compostos fenólicos não coloridos de vinhos fortificados utilizando a técnica de SPE, em cartucho C₁₈ com 500 mg de sorvente, é máxima com 20 mL do solvente de eluição acetato de etila a uma vazão de 0,06 mL s⁻¹. Para o volume de amostra, que não foi significativo no modelo estudado, pode ser atribuída a menor quantidade utilizada no experimento, de 5 mL.

A plotagem da probabilidade normal dos resíduos do conteúdo de compostos fenólicos não coloridos é exibida na Figura 2.2. Observa-se que a distribuição dos dados é aleatória e os resíduos geralmente ficam dispostos sobre uma linha reta, sem apresentar valores discrepantes. As variâncias são homogêneas, o que implica que os erros são normalmente distribuídos e a suposição da normalidade é satisfeita, comprovando que o modelo está adequado para o estudo.

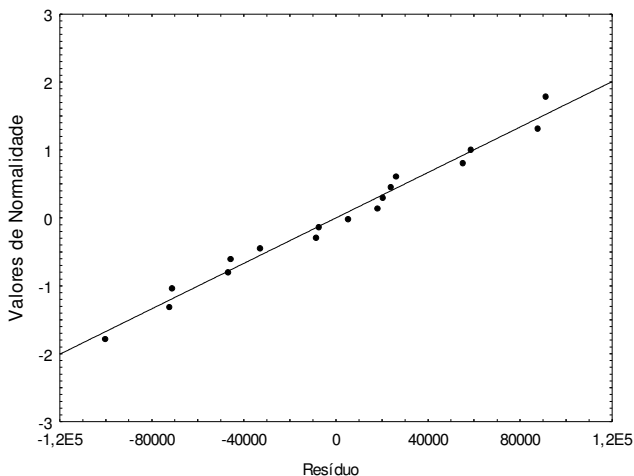


Figura 2.2 Probabilidade normal dos resíduos para a área total dos picos cromatográficos de seis compostos fenólicos não coloridos em amostra de vinho fortificado.

3.2 EFICIÊNCIA ANALÍTICA

As variáveis qualitativas, incluindo linearidade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) e exatidão, foram determinadas para avaliar o desempenho analítico do modelo proposto.

As curvas de calibração se mostraram lineares na faixa de trabalho estudada. Todos os compostos apresentaram coeficiente de determinação (R^2) maiores que 0,99 (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 Linearidade, limites de detecção e quantificação e exatidão do estudo de compostos fenólicos não coloridos em vinhos fortificados, obtidos por CLAE e pré-tratamento de amostra por SPE.

Composto	Linearidade		LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	Recuperação (%) ± DPR
	Equação de regressão	R ²			
Ácido gálico	Y = 30469x - 46040	0,9914	0,05	0,16	119,4 ± 11,97
Catequina	Y = 12036x + 5613,8	0,9979	0,04	0,12	117,3 ± 2,06
Ácido cafeico	Y = 54017x + 27286	0,9980	0,02	0,06	81,83 ± 5,84
Ácido Cumárico	Y = 78779x + 46923	0,9979	0,08	0,24	71,06 ± 0,02
Ácido Ferúlico	Y = 47844x + 25800	0,9980	0,04	0,13	75,73 ± 0,02
Quercetina	Y = 25553x - 1910,9	0,9976	0,05	0,15	99,71 ± 0,03

LOD variou de 0,02 a 0,08 mg L⁻¹, enquanto LOQ variou de 0,06 a 0,24 mg L⁻¹. Estes valores estão de acordo com limites obtidos por outros pesquisadores, para análises de compostos fenólicos em vinhos tintos e vinhos fortificados (HO; HOGG; SILVA, 1999; GARCÍA-FALCÓN, et al., 2007; NAVE; CABRITA; COSTA, 2007; DE QUIRÓS; LANGE-YUSTY; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, 2009).

Para avaliar a exatidão do método, foram realizados procedimentos de extração em fase sólida de uma amostra de vinho fortificado adicionado dos seis compostos fenólicos não coloridos na concentração 15 mg L⁻¹. Para calcular os valores de recuperação, a concentração de cada composto fenólico da amostra pura foi subtraída do valor correspondente obtido em cada amostra enriquecida com o padrão. O intervalo de recuperação foi de 71,06 a 119,4 % e o desvio

padrão relativo (DPR) variou de 0,02 a 11,97 % (Tabela 2.3). Os intervalos de recuperação encontrados estão de acordo com outras pesquisas para quantificação destes compostos (GUILLÉN; BARROSO; PÉREZ-BUSTAMANTE, 1996; SLADKOVSKÝ; SOLICH; URBÁNEK, 2004; GARCÍA-FALCÓN et al., 2007; MUÑOZ et al., 2008).

Estes resultados sugerem que o método proposto é potencial ferramenta para o pré-tratamento de amostras de vinhos fortificados quando se objetiva a determinação de compostos fenólicos não coloridos.

3.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NÃO COLORIDOS EM AMOSTRAS REAIS DE VINHO FORTIFICADO

O método proposto foi aplicado para determinar a concentração de compostos fenólicos não coloridos em amostras de vinhos fortificados brancos e tintos. Onze amostras de vinhos fortificados, elaborados a partir de diferentes variedades de uvas, foram analisadas em triplicata. Todas as amostras foram pré-tratadas pelo método de extração em fase sólida utilizando os pontos ótimos obtidos no processo de otimização e posteriormente foram analisadas por CLAE – UV-VIS. O cromatograma de uma amostra de vinho fortificado após pré-tratamento por SPE é apresentado na Figura 2.3.

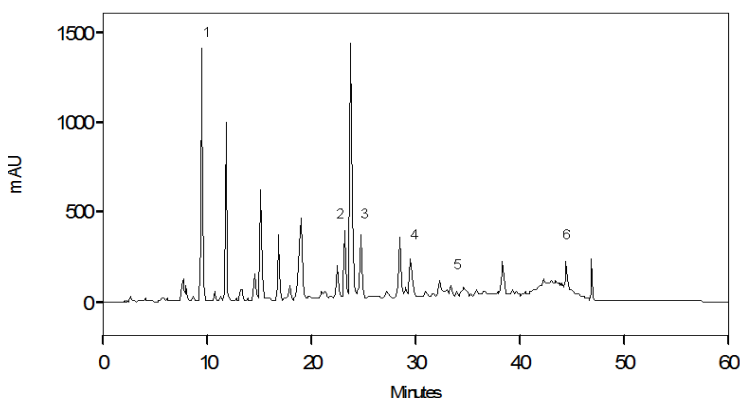


Figura 2.3 Perfil cromatográfico típico de uma amostra de vinho fortificado após pré-tratamento por extração em fase sólida. Os picos correspondem a: 1, ácido gálico; 2, catequina; 3, ácido cafeico; 4, ácido *p*-cumárico; 5, ácido ferúlico e 6, quercetina.

A concentração dos compostos fenólicos das amostras analisadas (Tabela 2.4) está de acordo com os valores descritos na literatura para vinhos brancos e tintos das variedades estudadas (DEL ÁLAMO et al., 2004; CASTILLO-MUÑOZ et al., 2007; DOPICO-GARCÍA et al., 2008). Os vinhos fortificados apresentam uma concentração equivalente ou, muitas vezes superior, de compostos fenólicos não coloridos quando comparados aos vinhos tradicionais. Isto é possível porque, mesmo com o menor tempo de maceração aplicado na elaboração de vinhos fortificados, a extração dos compostos fenólicos é muito eficiente devido à concentração de etanol, encontrada em maior quantidade nos vinhos fortificados do que em outros vinhos (GARCÍA-VIGUERA et al., 1997).

Tabela 2.4 Concentração de compostos fenólicos não coloridos em amostras de vinhos fortificados.

Composto	Goethe (n=3)	Moscato (n=9)	Cabernet Sauvignon/ Merlot (n=12)	Cabernet Sauvignon/ Tannat (n=6)	Touriga Nacional (n=3)
Catequina	3,69±0,07 ^a	4,81±0,89 ^a	23,83±4,74 ^a	27,21±2,30 ^a	22,37±0,34 ^a
Ácido Cafeico	2,94±0,01 ^a	6,33±0,81 ^a	11,10±1,23 ^a	3,60 ±0,75 ^a	21,56±0,15 ^a
Ácido <i>p</i> - cumárico	1,40±0,01 ^a	1,99±0,37 ^a	1,12±0,21 ^a	1,38±0,40 ^a	4,34±0,20 ^b
Ácido Ferúlico	1,28±0,04 ^b	0,99±0,02 ^{ab}	0,81±0,14 ^a	2,47±0,01 ^d	1,93±0,03 ^c
Quercetina	2,61±0,14 ^a	2,33±0,01 ^a	6,74±1,24 ^a	6,10±0,76 ^a	6,30±0,01 ^a
Ácido Gálico	6,76±0,19 ^a	54,11±3,94 ^a	69,58±1,08 ^a	79,53±3,15 ^a	64,28±3,44 ^a

Os valores são expressos como média ± desvio padrão das determinações em triplicata. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade de erro.

O ácido gálico foi o composto mais abundantemente encontrado nos vinhos analisados, conforme foi previamente identificado em vinhos fortificados (GARCÍA-VIGUERA et al., 1997; HO; HOGG; SILVA, 1999; LA TORRE et al., 2008). A principal fonte de ácido gálico, bem como de catequina, são as sementes das uvas e, altas concentrações destes compostos nos vinhos se devem às práticas de maceração,

prensagem e altas temperaturas durante a vinificação (BRAVO et al., 2006), ou ainda da sua extração da madeira ou da degradação dos taninos durante o envelhecimento do vinho (HO; HOGG; SILVA, 1999). Diferenças estatísticas relativas à concentração de ácido cumárico e ácido ferúlico foram observadas nos vinhos em função da variedade de uva empregada na elaboração, conforme foi descrito em trabalhos anteriores (CANTOS; ESPÍN; TOMÁS-BARBERÁN, 2002; DOPICO-GARCÍA et al., 2008). As diferenças observadas entre os vinhos se devem também ao pH, conteúdo de etanol, temperatura e tempo de fermentação e processo de maceração (BRAVO et al., 2006).

4 CONCLUSÕES

A extração de compostos fenólicos não coloridos de vinhos fortificados utilizando a técnica de extração em fase sólida foi otimizada com eficiência utilizando a metodologia de superfície de resposta. Os resultados mostraram que o procedimento de extração em fase sólida (SPE) pode ser feito em uma única etapa utilizando quantidades menores de amostra (5 mL) e menor consumo de solventes orgânicos (20 mL) do que em outras técnicas tradicionais de pré-tratamento de amostra, o que torna o procedimento uma alternativa vantajosa para análise de rotina de vinhos fortificados por CLAE. O método otimizado mostrou-se reprodutível, com bons percentuais de recuperação e baixos limites de detecção e quantificação. Nas amostras de vinhos fortificados analisadas verificou-se maior conteúdo de ácido gálico e observaram-se diferenças estatísticas relativas à concentração de ácido cumárico e ácido ferúlico, devidas às variedades de uva empregadas na elaboração dos vinhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIAKBARIAN, B.; DE FAVERI, D.; CONVERTI, A.; PEREGO, P. Optimisation of olive oil extraction by means of enzyme processing aids using response surface methodology. **Biochemical Engineering**, v. 42, p. 34-40, 2008.

ALVES, R. F.; NASCIMENTO, A. M. D.; NOGUEIRA, J. M. F. Characterization of the aroma profile of Madeira wine by sorptive extraction techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 546, p. 11-21, 2005.

BRAVO, M. N.; SILVA, S.; COELHO, A. V.; VILAS BOAS, L.; BRONZE, M. R. Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 84-92, 2006.

CABRITA, M. J.; TORRES, M.; PALMA, V.; ALVES, E.; PATÃO, R.; COSTA FREITAS, A. M. Impact of malolactic fermentation on low molecular weight phenolic compounds. **Talanta**, v. 74, p. 1281-1286, 2008.

CANTOS, E.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Varietal Differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5691-5696, 2002.

CASTILLO-MUÑOZ, N.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 992-1002, 2007.

CHILLA, C.; GUILLÉN, D. A.; BARROSO, C. G.; PÉREZ-BUSTAMANTE, J. A. Automated on-line solid-phase extraction high performance liquid chromatography diode array detection of phenolic compounds in sherry wine. **Journal of Chromatography A**, v. 750, p. 209-214, 1996.

DE QUIRÓS, A.R.B.; LANGE-YUSTY, M.A.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J. HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay. **Food Research International**, v.42, p.1018-1022, 2009.

DEL ÁLAMO, M.; CASADO, L.; HERNÁNDEZ, V.; JIMÉNEZ, J. J. Determination of free molecular phenolics and catechins in wine by solid phase extraction on polymeric cartridges and liquid chromatography with diode array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1049, p. 97-105, 2004.

DOPICO-GARCÍA, M. S.; FIQUE, A.; GUERRA, L.; AFONSO, J. M.; PEREIRA, O.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M. Principal components of phenolics to characterize red *Vinho Verde* grapes: Anthocyanins or non- coloured compounds? **Talanta**, v. 75, p. 1190-1202, 2008.

FAN, G.; HAN, Y.; GU, Z.; CHEN, D. Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). **LWT**, v. 41, p. 155 – 160, 2008.

GARCÍA-FALCÓN, M. S.; PÉREZ-LAMELA, C.; MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; SIMAL-GÁNDARA, J. Determination of phenolic compounds in wines: influence of bottle storage of young red wines on their evolution. **Food Chemistry**, v. 105, p. 248-259, 2007.

GARCÍA-VIGUERA, C.; BAKKER, J.; BELLWORTHY, S. J.; READER, H. P.; WATKINS, S. J.; BRIDLE, P. The effects of some processing variables on non-coloured phenolic compounds in port-wines. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung A**, v. 205, p. 321-324, 1997.

GIOVANNI, M. Response surface methodology and product optimization. **Food Technology**, v. 37, p. 41-45, 1983.

GÜRBÜZ, O.; GÖCMEN, D.; DAGDELEN, F.; GÜRSOY, M.; AYDIN, S.; SAHIN, I.; BÜYÜKUYSAL, L.; USTA, M. Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 100, p. 518-525, 2007.

GUILLÉN, D. A.; BARROSO, C. G.; PÉREZ-BUSTAMANTE, J. A. Automation of sample preparation as a preliminary stage in the high-performance liquid chromatography determination of polyphenolic compounds in sherry wines. **Journal of Chromatography A**, v. 730, p. 39-46, 1996.

HENIKA, R. G. Use of response surface methodology in sensory evaluation. **Food Technology**, v. 36, p. 96-101, 1982.

HO, P.; HOGG, T. A.; SILVA, M. C. M. Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines. **Food Chemistry**, v. 64, p. 115-122, 1999.

KÖRBAHTI, B. K.; RAUF, M. A. Determination of optimum operating conditions of camine decoloration by UV/H₂O₂ using response surface methodology. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 281, 2009.

KÖRBAHTI, B. K.; RAUF, M. A. Response surface methodology (RSM) analysis of photoinduced decoloration of toluidine blue. **Chemical Engineering Journal**, v. 136, p. 25-30, 2008.

KU, C. S.; MUN, S. P. Optimization of the extraction of anthocyanin from Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) marc produced during traditional wine processing and characterization of the extracts. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8325-8330, 2008.

LA TORRE, G. L.; LA PERA, L.; RANDO, R.; LO TURCO, V.; DE BELLA, G.; SAITTA, M; DUGO, G. Classification of Marsala wines according to their polyphenol, carbohydrate and heavy metal levels using canonical discriminant analysis. **Food Chemistry**, v. 110, p. 729-734, 2008.

LEE, W. C.; YUSOF, S.; HAMID, N. S. A.; BAHARIN, B. S. Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). **Journal of Food Engineering**, v. 73, p. 55-63, 2006.

LÓPEZ, M.; MARTÍNEZ, F.; DEL VALLE, C.; ORTE C.; MIRÓ, M. Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 922, p. 359-363, 2001.

LYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 93, p. 47-56, 2005.

MASA, A.; VILANOVA, M. Flavonoid and aromatic characterization of cv. Albarín blanco (*Vitis vinifera* L.). **Food Chemistry**, v. 107, p. 273-281, 2008.

MEYERS, R.; MONTGOMERY, D. C. **Response Surface Methodology**. Wiley, New York, 2002.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 5^a ed. Wiley: New York, 2001.

MUÑOZ, S.; MESTRES, M.; BUSTO, O.; GUASH, J. Determination of some flavan-3-ols and anthocyanins in red grape seed and skin extracts

by HPLC-DAD: Validation study and response comparison of different standards. **Analytica Chimica Acta**, v.628, p.104-110, 2008.

NAVE, F.; CABRITA, M. J.; COSTA, C. T. Use of solid-supported liquid-liquid extraction in the analysis of polyphenols in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1169, p. 23-30, 2007.

OSZMIANSKI, J., RAMOS, T., & BOURZEIX, M. Fractionation of phenolic compounds in red wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, 39, p. 259-262, 1988.

QUANHONG, L.; CAILI, F. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. **Food Chemistry**, v. 92, p. 701-706, 2005.

RASTIJA, V.; SRECNIK, G.; MEDIC-SARIC, M. Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins. **Food Chemistry**, v. 115, p. 54-60, 2009.

RAVIKUMAR, K. ; RAMALINGAM, S. ; KRISHNAN, S. ; BALU, K. Application of response surface methodology to optimize the process variables for reactive red and acid brown dye removal using a novel adsorbent. **Dyes and Pigments**, v. 70, p. 18-26, 2006.

RICARDO DA SILVA, J. M., ROSEC, J. PH., BOURZEIX, M., & HEREDIA, N. (1990). Separation and quantitative determination of grape and wine procyanidins by high performance reversed phase liquid chromatography. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 53, p. 85-92, 1990.

RODRÍGUEZ-BENCOMO, J. J.; CONDE, J. E.; GARCÍA-MONTELONGO, F.; PÉREZ-TRUJILLO, J. P. Determination of major compounds in sweet wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 991, p. 13-22, 2003.

RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A.; MALOVANÁ, S.; PÉREZ, J. P.; BORGES, T.; GARCÍA MONTELONGO, F. J. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 912, p. 249-257, 2001.

SIN, H. N. ; YUSOF, S. ; SHEIKH ABDUL HAMID, N.; ABDUL RAHMAN, R. Optimization of hot water extraction for sapodilla juice using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 74, p. 352-358, 2006.

SLADKOVSKÝ, R.; SOLICH, P.; URBÁNEK, M. High-performance liquid chromatography determination of phenolic components in wine off-line isotachophoretic pretreatment. **Journal of chromatography A**, v.1040, p.179-184, 2004.

VALENTÃO, P.; SEABRA, R. M.; LOPES, G.; SILVA, L.; MARTINS, V.; TRUJILLO, M. E.; VELÁZQUEZ, E.; ANDRADE, P. B. Influence of *Dekkera bruxellensis* on the contents of anthocyanins, organic acids and volatile phenols of Dão red wine. **Food Chemistry**, v. 100, p. 64-70, 2007.

VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; TRONCOSO, A. M.; GARCÍA-PARRILLA, M. C. Influence of enological practices on the antioxidante activity of wines. **Food Chemistry**, v. 95, p. 394-404, 2006.

WANG, L.; YANG, B.; DU, X.; YANG, Y. ; LIU, J. Optimization of conditions for extraction of acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by response surface methodology. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 604-607, 2008.

YUAN, Y.; GAO, Y.; MAO, L.; ZHAO, J. Optimisation of conditions for the preparation of β -carotene nanoemulsions using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1300 – 1306, 2008.

ZHANG, A.; PENG, J.; QU, W.; ZHANG, L.; ZHANG, Z.; LI, W. ; WAN, R. Regeneration of high-performance activated carbon from spent catalyst: optimization using response surface methodology. **Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, p. 542-548, 2009.

ZULKALI, M. M. D. ; AHMAD, A. L.; NORULAKMAL, N. H. Oryza sativa L. husk as heavy metal adsorbent: optimization with lead as model solution. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 21-25, 2006.

CAPÍTULO 3

COMPOSIÇÃO FENÓLICA, COR E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE VINHOS FORTIFICADOS PRODUZIDOS EM DIFERENTES REGIÕES BRASILEIRAS

COMPOSIÇÃO FENÓLICA, COR E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE VINHOS FORTIFICADOS PRODUZIDOS EM DIFERENTES REGIÕES BRASILEIRAS

RESUMO

Composição fenólica, cor e atividade antioxidante foram determinadas em amostras de vinhos fortificados brancos e tintos produzidos em diferentes regiões do Brasil. As determinações analíticas foram realizadas por espectrofotometria, colorimetria e cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados mostraram que os vinhos fortificados brancos e tintos produzidos em diferentes regiões do Brasil são ativos no seqüestro dos radicais DPPH e ABTS e na redução do ferro. Os vinhos fortificados produzidos na região da Serra Gaúcha apresentaram maior tonalidade, maior atividade antioxidante, maiores conteúdos de catequina, quercetina, *trans*-resveratrol, *orto*-difenois, flavonois, ésteres tartáricos e polifenóis totais. Os vinhos fortificados produzidos no Planalto Catarinense apresentaram maior intensidade e densidade de cor, destacando-se quanto ao maior percentual de vermelho e de azul e maior conteúdo de ácido cafeico, antocianinas monoméricas totais e taninos totais. A amostra produzida na Região Carbonífera destacou-se quanto a maior luminosidade ($> L^*$) e a amostra de referência, produzida na região do Douro, Portugal, apresentou menor luminosidade, maior conteúdo de ácido ferúlico, ácido cumárico e compostos fenólicos não polimerizados. Ademais, a atividade antioxidante *in vitro* dos vinhos fortificados apresentou forte correlação positiva com o conteúdo de polifenóis totais, *orto*-difenois, ésteres tartáricos, flavonois, taninos totais, ácido gálico e *trans*-resveratrol.

Palavras-chave: vinhos fortificados; compostos fenólicos; cor; atividade antioxidante.

PHENOLIC COMPOSITION, COLOUR AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE FORTIFIED WINES PRODUCED IN DIFFERENT BRAZILIAN REGIONS

ABSTRACT

Phenolic composition, colour and antioxidant activity were determined in samples to white and red fortified wines produced in different regions of Brazil. The analytical determinations were performed by spectrophotometry, colorimetry and high performance liquid chromatography. The results showed that to white and red fortified wines produced in different regions of Brazil are active in the scavenging of radicals DPPH and ABTS and the reduction of iron. Fortified wines produced in the Serra Gaucha showed greater tonality colour, higher antioxidant activity and contents of catechin, quercetion, *trans*-resveratrol, *ortho*-diphenols, flavonols, tartaric esters, phenolic compounds. Fortified wines produced in the Planalto Catarinense showed higher intensity and density of colour, standing out as the largest percentage of red and blue and the higher content of caffeic acid, total monomeric anthocyanins and tannins. The wines of the Carbonifera region had higher lightness (> L) and the reference sample, produced in Douro, Portugal, showed a lower lightness, higher content of ferulic acid, coumaric acid and non-polymerized phenolic compounds. Moreover, in vitro antioxidant activity of fortified wines showed a strong positive correlation with the total polyphenol content, *ortho*-diphenols, tartaric esters, flavonols, tannins, gallic acid and *trans*-resveratrol.

Keywords: fortified wines; phenolic compounds; colour; antioxidant activity.

1 INTRODUÇÃO

Vinhos fortificados são vinhos parcialmente fermentados em que foi adicionada aguardente vínica com o objetivo de parar a fermentação (HO; HOGG; SILVA, 1999; BRAVO et al., 2006). Para obter vinhos fortificados de qualidade, diferentes práticas enológicas são aplicadas; estas práticas modificam a composição dos vinhos e suas propriedades sensoriais, como aroma, sabor e cor (GÓMEZ-MÍGUEZ et al., 2007).

Os compostos fenólicos são responsáveis por grande parte das características organolépticas dos vinhos, particularmente cor, aroma, sabor e adstringência (COZZOLINO et al., 2004; GÓMEZ-MÍGUEZ et al., 2007). Alguns compostos fenólicos encontrados nos vinhos são antioxidantes e contribuem para a redução do risco de doenças cardiovasculares, enquanto outros foram reconhecidos por sua atividade antialérgica, antiinflamatória, contra a hipertensão, artrite e câncer. Vinhos brancos, mesmo apresentando conteúdo fenólico e atividade antioxidante menores do que os tintos, são efetivos na inibição do processo de oxidação de LDL *in vitro* (FERNÁNDEZ-PACHÓN et al., 2004; BRAVO et al., 2006).

As características e a concentração de compostos fenólicos dos vinhos são influenciadas pela composição química da matéria-prima (uvas), determinadas pela variedade, estágio de maturação, condições atmosféricas durante a maturação e colheita e tipo de solo. As técnicas utilizadas durante o processo de vinificação do vinho fortificado e as condições de maturação e envelhecimento também são importantes (PÉREZ-MAGARIÑO; ORTEGA-HERAS; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, 2002; ROUSSIS et al., 2008). Aldeídos fenólicos, ácidos benzóicos, ácidos hidroxinâmicos e seus ésteres obtidos da condensação com o ácido tartárico, flavanóis, flavonóis e antocianinas são extraídos das uvas durante o processo de vinificação. Alguns compostos fenólicos podem ser extraídos da madeira durante a maturação e, reações de oxidação podem também ocorrer aumentando a estabilidade do vinho e modificando as características sensoriais (BRAVO et al., 2006).

Os compostos fenólicos dos vinhos dividem-se em dois grupos: não flavonóides (ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados e, estilbenos e álcoois fenólicos) e flavonóides (antocianinas, flavanóis, flavonóis e dihidroflavonóis). As antocianinas são os principais compostos responsáveis pela cor do vinho, um dos atributos primeiramente percebidos pelos consumidores (PÉREZ-MAGARIÑO; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, 2003; BOIDO et al., 2006;

MONAGAS; GÓMEZ-CORDOVÉS; BARTOLOMÉ, 2006). A adstringência e amargor de vinhos jovens devem-se principalmente aos ácidos fenólicos e flavanóis (MONAGAS; GÓMEZ-CORDOVÉS; BARTOLOMÉ, 2006). Resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno), principal representante do grupo dos estilbenos, é um composto antioxidante encontrado nas uvas e produtos derivados como o vinho. Pesquisas sobre o resveratrol têm evidenciado efeitos biológicos benéficos deste composto para a saúde humana, incluindo atividade anti-câncer, cardioproteção, atividade antioxidante, inibição da agregação plaquetária e atividade antiinflamatória (WANG et al., 2002; BRAVO et al., 2008).

A atividade antioxidante e as características de cor dos vinhos estão frequentemente associadas ao conteúdo de polifenóis totais e à composição de compostos fenólicos individuais, sendo de interesse em diversas pesquisas. No entanto, há poucos estudos acerca da composição fenólica, cor e atividade antioxidante de vinhos fortificados. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de determinar a composição fenólica e os parâmetros de cor e, avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de vinhos fortificados brancos e tintos produzidos em diferentes regiões do Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

Doze amostras comerciais de vinhos fortificados brancos e tintos foram analisadas. As amostras foram produzidas em três diferentes regiões vitivinícolas do Brasil, a partir de variedades de uvas distintas: uvas tintas (amostras 1, 2 e 3) Cabernet Sauvignon/ Merlot, Serra Gaúcha; (amostra 4) Cabernet Sauvignon/ Merlot, Planalto Catarinense; (amostras 5 e 6) Cabernet Sauvignon/ Tannat, Serra Gaúcha; (amostra 7) Touriga Nacional, Planalto Catarinense; e uvas brancas (amostra 8) Goethe, Região Carbonífera; (amostras 9 e 10) Moscato Giallo, Serra Gaúcha; (amostra 11) Moscato Giallo, Planalto Catarinense. Vinho tinto do Porto categoria Vintage, proveniente da Região Demarcada do Douro, foi utilizado como amostra de referência (amostra 12), por recomendação da Confraria do Vinho do Porto.

2.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

A densidade de cada amostra foi medida em balança hidrostática Densimat (Gibertini, Itália). O teor alcoólico foi obtido através de destilação das amostras de vinho fortificado em destilador enoquímico eletrônico modelo Vade 3 (Gibertini, Itália) e leitura da densidade do destilado em balança hidrostática. Os açúcares redutores totais foram determinados utilizando metodologia em que a amostra reage com uma solução cupro-alcálico e os íons cúpricos em excesso são determinados por iodometria. O extrato seco foi determinado por medida indireta, subtraindo o valor de densidade do álcool, do valor de densidade do vinho fortificado. O extrato seco reduzido foi obtido do valor de extrato seco menos os açúcares totais. O anidrido sulfuroso total (SO₂ total) foi analisado por titulação; as determinações de acidez total, expressas em equivalentes de ácido tartárico (g L⁻¹), foram realizadas por titulação das amostras de vinho fortificado com NaOH 0,1N até pH 7,0. As medidas da acidez volátil, expressas em g L⁻¹ de ácido acético, foram realizadas através de destilação das amostras em destilador enoquímico eletrônico e posterior titulação com solução de NaOH 0,1N até pH 7,0. O pH foi medido em pHmetro Adwa modelo AD 1030 (Adwa Hungary, Szeged, Hungary). Todas as metodologias empregadas constam dos métodos oficiais de análise estabelecidos pela Instrução Normativa n.º 24 de 8 de setembro de 2005 (BRASIL, 2005).

2.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

2.3.1 Análises Espectrofotométricas

Todas as medidas espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro Hitachi modelo U2010, Tokyo, Japão.

O conteúdo de polifenóis totais foi determinado através do método Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965) usando ácido gálico como padrão.

As absorvâncias a 340 e 360 nm foram utilizadas para estimar o conteúdo de ésteres tartáricos e flavonóis, respectivamente. O método de Glories (1978) adaptado por Mazza et al. (1999), consistia da adição de 0,25 mL de amostra, 0,25 mL 0,1% HCl em 95% etanol e 4,55 mL 2% HCl em tubo de ensaio e posterior agitação. A leitura das absorvâncias foi efetuada após 15 minutos de reação. Cada comprimento de onda utilizado nas leituras correspondia ao conteúdo total de ésteres tartáricos (A320) e flavonóis (A360), que foram determinados utilizando curvas

de calibração com padrões de ácido cafeico e quercetina, respectivamente.

Os polifenóis não polimerizados foram determinados através do Índice de Vanilina e, os *orto*-difenóis por Reação de Arnow, segundo metodologias de Paronetto (1977).

O conteúdo de antocianinas monoméricas totais foi determinado através do método de pH diferencial empregando metodologia de Giusti e Wrolstad (2001).

Para determinação de taninos totais e das frações monoméricas, oligoméricas e poliméricas, foram utilizadas as metodologias de Sun et al. (1998) e Sun et al. (2001). Os vinhos foram fracionados em três grupos contendo respectivamente, catequinas, proantocianidinas oligoméricas (grau de polimerização de 2 a 12-15) e proantocianidinas poliméricas (grau de polimerização > 12-15), usando cartuchos Sep-Pak C₁₈. Cada fração foi evaporada a temperatura < 30 °C e dissolvida em metanol para quantificação por reação de vanilina, com leitura a 500 nm.

2.3.2 Análises Cromatográficas

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos (ácido gálico, catequina, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico e quercetina) foram realizadas em cromatógrafo líquido Shimadzu, equipado com um sistema quaternário de bombas (modelo 10-AT), um degaseificador a vácuo modelo DGU-14A, um detector UV-Vis (SPD-10AV) e um injetor Rheodyne com *loop* de 20 µL. O conjunto era controlado pelo software CLASS VP 6.1, com comunicador modelo SCL-10A. A fase estacionária era composta de uma coluna em fase reversa Hichrom (Berkshire, UK) de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de tamanho 5 µ. Uma coluna de guarda foi utilizada para proteger a coluna analítica.

Todas as amostras foram tratadas antes da injeção no cromatógrafo. O pré-tratamento de amostra para determinação de ácido gálico, catequina, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico e quercetina foi realizado por extração em fase sólida, conforme metodologia otimizada e descrita no Capítulo 2: 5 mL de amostra foram aplicados em cartucho de SPE C₁₈ com 500 mg de massa de sorvente e 6 mL de volume do reservatório da marca *Applied Separations* (Allentown, United States) pré-condicionado com 20 mL de acetato de etila, 20 mL de metanol e 20 mL de 0,01N HCl. O cartucho foi lavado com 3 mL de HCl 0,01N. Os compostos fenólicos não coloridos foram

eluídos com 20 mL de acetato de etila a vazão de $0,06 \text{ mL s}^{-1}$ e concentrados em rotaevaporador a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. O resíduo obtido foi dissolvido em 2 mL de metanol, filtrado em membrana Millipore ($0,45 \text{ }\mu\text{m}$) e analisado em CLAE – UV-VIS.

Para a separação dos compostos foi utilizado um gradiente de eluição da fase móvel A (água acidificada com ácido acético a pH 2,65) e fase móvel B (80% acetonitrila, 20% eluente A): 0-35 min, 0-30% B; 35-40 min, 30-50% B; 40-45 min, 50-100% B; 45-50 min, 100-50% B; 50-55 min, 50-30% B; 55-60 min, 30-0% B. A água foi tratada em um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, MA). Todos os solventes usados como fase móvel foram previamente filtrados através de membrana $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore) e degaseificados antes do uso. Foi utilizado fluxo de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ e detecção no comprimento de onda de 280 nm. A identificação dos compostos fenólicos foi obtida por comparação entre os tempos de retenção dos picos das amostras e dos padrões e a quantificação foi efetuada por padronização externa.

Para determinação de *trans*-resveratrol, todas as amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu modelo LC-20A Proeminence equipado com um sistema quaternário de bombas modelo LC-20AT, injetor manual Rheodyne com *loop* de $20 \text{ }\mu\text{L}$, forno de colunas modelo CTO-20A, degaseificador *on-line* modelo DGU-20A5, controlador do sistema CBM-20A e detector de arranjo de diodos modelo SPD-M20A. A aquisição e tratamento dos dados foram realizados através do software LC Solution (Tokyo, Japão). Foi utilizada uma coluna C_{18} em fase reversa Shimadzu (Tokyo, Japão) com 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de tamanho 5μ , com uma coluna de guarda C_{18} . A determinação de *trans*-resveratrol foi efetuada segundo metodologia de Souto et al. (2001) com modificações de alguns parâmetros: como fase móvel foi utilizada uma solução de água e acetonitrila (75:25), com pH ajustado em 2,4 com H_3PO_4 concentrado (Merck, Darmstadt, Alemanha), eluição ao fluxo de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ e monitoramento do sinal a 306 nm.

Todas as amostras de vinhos fortificados foram pré-tratadas antes da injeção no cromatógrafo utilizando metodologia de extração líquido-líquido descrita por Bravo et al. (2008): 10 mL de amostra foram extraídos quatro vezes consecutivas com 7 mL de acetato de etila, posteriormente os extratos foram combinados e evaporados sob vácuo, dissolvidos em 250 mL de metanol:água (6:4 v/v) e filtrados através de membrana $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore). A identificação do *trans*-resveratrol foi realizada por comparação entre os tempos de retenção dos picos das

amostras e dos padrões e através do espectro dos picos correspondentes. A quantificação foi efetuada por padronização externa.

Os padrões de ácido cafeico, ácido ferúlico e quercetina foram obtidos da Fluka (Steinheim, Germany) e os padrões de ácido *p*-cumárico, (+) catequina, ácido gálico e *trans*-resveratrol da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Todos os padrões foram dissolvidos em uma matriz de vinho sintético preparada com 18 % (v/v) de etanol e 5 g L⁻¹ de ácido tartárico em água Milli-Q.

2.4 DETERMINAÇÕES DE COR

Dois métodos foram utilizados para a determinação da cor das amostras de vinhos fortificados. No primeiro, as absorvâncias das amostras de vinho a 420, 520 e 620 nm foram determinadas em espectrofotômetro Hitachi modelo U2010 (Tokyo, Japão) usando uma cubeta de 1 mm de percurso óptico, conforme descrito por Glories (1984). Intensidade de cor (IC), tonalidade (T), densidade (D), % de amarelo, % de azul e % de vermelho foram calculados segundo as equações (Equações 1 a 6):

$$IC = Abs420 + Abs520 + Abs620 \quad \text{Equação 1}$$

$$T = \frac{Abs420}{Abs520} \quad \text{Equação 2}$$

$$D = Abs420 + Abs520 \quad \text{Equação 3}$$

$$\%amarelo = \frac{Abs420 * 100}{IC} \quad \text{Equação 4}$$

$$\%vermelho = \frac{Abs520 * 100}{IC} \quad \text{Equação 5}$$

$$\%azul = \frac{Abs620 * 100}{IC} \quad \text{Equação 6}$$

O segundo método para determinação da cor utilizou um colorímetro Konica Minolta modelo Chroma Meter CR 400 (Mettler

Toledo, Ohio, USA), para determinar os valores das coordenadas L^* , a^* e b^* . Estes valores correspondem ao grau de luminosidade (L^*), tonalidade do verde ao vermelho ($a^* < 0$ e $a^* > 0$, respectivamente), tonalidade do azul ao amarelo ($b^* < 0$ e $b^* > 0$, respectivamente). C^* indica o grau de saturação, sendo calculado pela comparação da cor cinza em relação ao matiz da amostra. O parâmetro h , que indica o ângulo do matiz, é um atributo qualitativo de cor e, relata as diferenças na absorvância da amostra em diferentes comprimentos de onda. C^* e h são calculados de acordo com a Equações 7 e 8.

$$C^* = \left[(a^*)^2 + (b^*)^2 \right]^{1/2} \quad \text{Equação 7}$$

$$h = \arctan\left(b^*/a^*\right) \quad \text{Equação 8}$$

2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Atividade antioxidante das amostras de vinhos fortificados foi determinada através dos métodos ABTS (ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e FRAP (poder de redução do ferro).

O método ABTS foi executado conforme metodologia descrita por Re et al. (1999), na qual o radical $ABTS^{*+}$ é formado por uma reação química com persulfato de potássio que pode chegar a formar mais de 60 % de radicais livres depois de 16 horas de incubação. A absorvância foi medida a 734 nm no tempo inicial e após 7 minutos da adição de cada amostra, sendo os resultados expressos em $mMol L^{-1}$ de TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox - 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico).

A habilidade das amostras em sequestrar os radicais livres DPPH foi avaliada conforme metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), modificada por Kim et al. (2002). Avaliou-se a redução da absorvância do radical DPPH' 100 μM dissolvido em etanol, com leitura no comprimento de onda de 515 nm (espectrofotômetro Hitachi modelo U2010) no tempo inicial e 30 minutos após a adição de cada amostra. A atividade antioxidante foi determinada em $mMol L^{-1}$ de TEAC.

Os ensaios para determinação da atividade antioxidante através do método FRAP foram realizados de acordo com o método descrito por Benzie e Strain (1996), com modificações de Arnous et al. (2002). O método FRAP mede a habilidade de antioxidantes reduzirem o complexo férrico $\text{Fe}^{+3} - 2,4,6\text{-tripiridil-s-triazina} [(\text{Fe}^{+3} - (\text{TPTZ})_2)]^{+3}$ para um complexo ferroso $[(\text{Fe}^{+2} - (\text{TPTZ})_2)]^{+2}$ intensamente azul em meio ácido. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 620 nm e o valor do poder redutor foi expresso em mMol L^{-1} de TEAC.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as amostras de vinhos fortificados foram analisadas em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão das três determinações. Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey ao nível de significância $p < 0,05$ foram utilizados para determinar as diferenças estatísticas entre as amostras analisadas. Posteriormente, os dados analíticos foram processados através da técnica multivariada de Análise de Componentes Principais. Todas as análises estatísticas foram realizadas no Software Statistica 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

A densidade dos vinhos está relacionada com o teor alcoólico e os açúcares redutores (RIZZON; MIELE, 2004). Nos vinhos fortificados analisados, a densidade variou de 1,0116 a 1,0429 (Tabela 3.1).

O teor alcoólico das amostras analisadas variou de 15,3 a 20 % em volume (Tabela 3.1), sendo o maior valor encontrado na amostra de vinho do Porto categoria Vintage (amostra de referência) e o menor conteúdo correspondente à amostra de vinho branco fortificado produzido na Serra Gaúcha a partir de uvas Moscatto Giallo (amostra 9), estatisticamente igual à amostra de Cabernet Sauvignon/ Merlot produzida na Serra Gaúcha (amostra 2). As amostras de vinhos fortificados produzidas no Brasil encontram-se em conformidade com a legislação brasileira vigente (BRASIL, 2004), que determina teor alcoólico de 14 a 18% em volume para estes vinhos.

Os açúcares residuais foram detectados em concentrações variáveis de 74,56 a 149, 28 g L^{-1} (Tabela 3.1). Estes valores estão em

concordância com os limites fixados na legislação brasileira para vinhos licorosos fortificados doces (BRASIL, 1988).

Extrato seco e extrato seco reduzido foram quantificados na faixa de 88,90 a 163,10 g L⁻¹ e 19,55 a 50,37 g L⁻¹, respectivamente (Tabela 3.1). A legislação brasileira determina limites mínimos de extrato seco reduzido de 12 g L⁻¹ para vinhos brancos e rosados e, 14 g L⁻¹ para vinhos tintos (BRASIL, 1988). O extrato seco consiste de todas as substâncias que não são voláteis sob condições físicas que alteram a natureza do vinho e, inclui substâncias orgânicas não voláteis e compostos minerais. O extrato seco reduzido corresponde ao extrato seco total menos os açúcares totais excedentes de 1 g L⁻¹ (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

A concentração de dióxido de enxofre total variou de 16,0 a 108,8 mg L⁻¹ nas amostras de vinhos fortificados analisadas (Tabela 3.1). As doses de dióxido de enxofre empregadas variam de acordo com o grau de maturação da uva, sanidade, temperatura, teor de açúcar e, sobretudo, pH (MANFROI et al., 2006). A legislação brasileira (BRASIL, 1988) fixa limite máximo de dióxido de enxofre de 350 mg L⁻¹ para estes vinhos. A menor concentração de SO₂ total foi observada na amostra de vinho fortificado Goethe, da Região Carbonífera (amostra 8), com 16 mg L⁻¹. Este valor provavelmente limita o envelhecimento do vinho.

A acidez condiciona a estabilidade microbiológica, cor e características gustativas dos vinhos e, pode ser avaliada pela determinação da acidez total e pH (RIZZON; ZANUS; MIELE, 1998). Os limites de acidez total fixados para vinhos licorosos fortificados são de 50 a 120 meq L⁻¹, o que corresponde a 3,75 a 9,00 g L⁻¹, expressos em ácido tartárico (BRASIL, 1988). As amostras analisadas apresentaram acidez total variável de 4,80 a 6,60 g L⁻¹ (Tabela 3.1). O pH é importante principalmente devido seu efeito na cor, no sabor e na proporção entre SO₂ livre e combinado. Para que o vinho atinja níveis satisfatórios destas características os valores de pH deverão estar na faixa de 3,1 e 3,6 (AMERINE; OUGH, 1976). As amostras analisadas apresentaram valores de pH na faixa de 3,13 a 3,80 (Tabela 3.1). As amostras 1, 6 e 7 apresentaram os maiores valores de pH, que podem comprometer a qualidade dos vinhos durante o envelhecimento. Calculando a relação das concentrações de açúcares redutores totais e acidez total, verificamos os maiores valores relativos às amostras de vinhos brancos produzidas nas regiões da Serra Gaúcha e Planalto Catarinense e, o menor valor relativo à amostra de vinho fortificado Goethe da Região Carbonífera.

Foram observados valores de acidez volátil, expressos em g L^{-1} de ácido acético, na faixa de 0,180 a 0,750 para as amostras analisadas (Tabela 3.1). A legislação brasileira prevê o limite de 20 meq L^{-1} , equivalente a $1,2 \text{ g L}^{-1}$ de ácido acético (BRASIL, 1988). Os menores valores de acidez volátil foram observados nas amostras 4, 8, 11 e 12, provenientes de Santa Catarina e Douro – Portugal. Os resultados obtidos indicam uma correta condução do processo de vinificação dos vinhos fortificados analisados (MANFROI et al., 2006).

3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS, COR E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os resultados relativos ao conteúdo de compostos fenólicos, cor e atividade antioxidante de vinhos fortificados brancos e tintos produzidos em diferentes regiões do Brasil são apresentados nas Tabelas 3.2, 3.3 e 3.4, respectivamente.

Os compostos fenólicos contribuem para a cor, gosto, aroma e propriedades antioxidantes dos vinhos (KALLITHRAKA et al., 2001). Devido a heterogeneidade de compostos fenólicos presentes nos vinhos, eles são comumente expressos como equivalentes de ácido gálico. O conteúdo de polifenóis totais das amostras analisadas foi maior nos vinhos tintos do que nos vinhos brancos, sendo observadas variações de 894,09 a 3241,82 mg L^{-1} e 277,00 a 501,54 mg L^{-1} para os vinhos fortificados tintos e brancos, respectivamente (Tabela 3.2). Villaño et al. (2004) detectaram valores de 201 a 446 mg L^{-1} de polifenóis totais em vinhos brancos fortificados produzidos no Sul da Espanha.

A concentração de flavonóis variou de 67,33 a 240,97 mg L^{-1} para os vinhos tintos fortificados e, de 25,74 a 55,85 mg L^{-1} para os vinhos brancos fortificados. Ésteres tartáricos foram quantificados na faixa de 43,22 a 114,10 mg L^{-1} e 108,86 a 360,83 mg L^{-1} , nas amostras de vinhos fortificados brancos e tintos, respectivamente (Tabela 3.2). Apresentou maior conteúdo de flavonóis e ésteres tartáricos a amostra de vinho tinto Cabernet Sauvignon/ Merlot da Serra Gaúcha (2) e, dentre os vinhos brancos, destacou-se a amostra Moscato Giallo do Planalto Catarinense (11). Estas variações na composição fenólica podem refletir o grau de maturação das uvas, relação sólido-líquido durante a maceração dos vinhos tintos, condições climáticas durante a maturação e diferentes técnicas de vinificação utilizadas na produção dos vinhos fortificados (CLIFF; KING; SCHLOSSER, 2007).

Foram observadas concentrações de compostos fenólicos não polimerizados da ordem de 737,66 a 1728,10 mg L⁻¹ nos vinhos tintos fortificados e, 40,11 a 63,94 mg L⁻¹ nos vinhos brancos fortificados (Tabela 3.2). Durante a maturação e o envelhecimento dos vinhos, modificações estruturais dos compostos fenólicos ocorrem transformando estes compostos em formas condensadas que apresentam propriedades químicas diferenciadas das formas não polimerizadas. Em geral, durante a maturação e o envelhecimento, o conteúdo de compostos fenólicos não polimerizados tende a diminuir (MONAGAS; GÓMEZ-CORDOVÉS; BARTOLOMÉ, 2006).

Segundo Monagas, Gómez-Cordovés e Bartolomé (2006), os principais *orto*-difenóis presentes em vinhos produzidos a partir de variedades *Vitis vinifera* L. incluem ácidos hidroxicinâmicos (ácido gálico e protocatecuico), ácidos hidroxibenzóicos e seus derivados (derivados do ácido cafeico), flavonóis (derivados da quercetina e miricetina), dihidroflavonóis (derivados da dihidroquercetina e dihidromiricetina), flavanóis monoméricos, oligoméricos e poliméricos (procianidinas e prodelfinidinas) e antocianinas (derivados da cianidina, delfinidina e petunidina). Os *orto*-difenóis são os principais compostos fenólicos responsáveis pelo escurecimento oxidativo dos vinhos (LI; GUO; WANG, 2008). Nos vinhos fortificados analisados foram observados valores de *orto*-difenóis variáveis de 67,10 a 525,39 mg L⁻¹ para os vinhos tintos e, 3,84 a 40,28 mg L⁻¹ para os vinhos brancos (Tabela 3.2).

Antocianinas monoméricas totais foram encontradas em concentrações de 2,24 a 50,46 mg L⁻¹ nas amostras de vinhos tintos fortificados. Os valores observados para antocianinas monoméricas totais possivelmente são resultantes das reações ocorridas durante o período de maturação e envelhecimento dos vinhos tintos fortificados, que colaboram para o decréscimo na concentração de monômeros devido à sua reatividade com outros constituintes do vinho e, o aumento na concentração das formas polimerizadas (VALENTÃO et al., 2007).

Para as amostras analisadas, a fração polimérica dos taninos foi predominante, seguida pela fração oligomérica e, monomérica, que apresentou a menor proporção do total de taninos, com exceção das amostras Cabernet Sauvignon/ Merlot e Touriga Nacional, produzidas no Planalto Catarinense, que apresentaram maior concentração de monômeros em relação a oligômeros. Apresentou maior conteúdo de taninos totais a amostra Cabernet Sauvignon/ Merlot do Planalto Catarinense (665,45 mg L⁻¹) e menor, a amostra Cabernet Sauvignon/ Merlot da Serra Gaúcha (amostra 3), com 52,86 mg L⁻¹ (Tabela 3.2). A

menor fração monomérica foi observada na amostra de Vinho do Porto (amostra de referência), com $2,78 \text{ mg L}^{-1}$, equivalente a 2 % do total de taninos. A maior concentração de monômeros foi encontrada na amostra Touriga Nacional do Planalto Catarinense ($26,81 \text{ mg L}^{-1}$), equivalente a 7 % dos taninos totais. A maior proporção de oligômeros foi detectada na amostra Cabernet Sauvignon/ Merlot da Serra Gaúcha (amostra 1) com $72,39 \text{ mg L}^{-1}$, correspondente a 19,6 % do total de taninos, enquanto a menor concentração de oligômeros foi verificada nas amostras Cabernet Sauvignon/ Merlot do Planalto Catarinense ($6,93 \text{ mg L}^{-1}$) e Porto Vintage da Região do Douro ($7,24 \text{ mg L}^{-1}$). Os polímeros foram predominantes em todas as amostras analisadas, destacando-se a amostra Cabernet Sauvignon/ Merlot do Planalto Catarinense (4), com maior proporção de polímeros (96 %) e, Cabernet Sauvignon/ Merlot da Serra Gaúcha(3), com o menor percentual (47 %). Sun, Ricardo-da-Silva e Spranger (2001) encontraram concentrações de monômeros variáveis de $18,6$ a $76,2 \text{ mg L}^{-1}$, oligômeros de $65,2$ a $279,6 \text{ mg L}^{-1}$ e polímeros de $334,8$ a $611,2 \text{ mg L}^{-1}$ em vinhos tintos portugueses.

Os principais grupos de compostos responsáveis pela adstringência dos vinhos são as procianidinas poliméricas, procianidinas oligoméricas e monoméricas. As concentrações relacionadas às propriedades de adstringência destes compostos variam de 75 mg L^{-1} a 500 mg L^{-1} . No entanto, o amargor proporcionado pela (+) catequina mostrou-se significativamente acentuado com o aumento na concentração alcoólica de 8 para 14 %. Como o conteúdo de álcool das amostras de vinhos fortificados alcança valores próximos a 18 % ou mais, se pode afirmar que a catequina tem maior contribuição para o amargor do que para a adstringência (GARCÍA-VIGUERA et al., 1997).

O composto fenólico mais abundante nas amostras analisadas foi o ácido gálico (conteúdo médio de $64,65 \text{ mg L}^{-1}$), destacando-se quanto ao maior conteúdo deste ácido a amostra de vinho fortificado Cabernet Sauvignon/ Merlot da Serra Gaúcha (amostra 2) com $137,98 \text{ mg L}^{-1}$. As menores concentrações de ácido gálico foram observadas nas amostras de vinhos brancos fortificados, com valores de $5,54$ a $16,36 \text{ mg L}^{-1}$. Em vinhos brancos fortificados produzidos na região sul da Espanha, foram quantificados valores médios de $7,73 \text{ mg L}^{-1}$ (BENÍTEZ et al., 2006), $7,80 \text{ mg L}^{-1}$ (FERNÁNDEZ-PACHÓN et al., 2006) e $6,49 \text{ mg L}^{-1}$ (ORTEGA; MAYEN, MEDINA, 2008). Ho, Hogg e Silva (1999) detectaram valores de $5,2$ a $32,8 \text{ mg L}^{-1}$ em vinhos fortificados brancos e tintos europeus. La Torre et al. (2008) observaram valores de $10,9$ a $29,1 \text{ mg L}^{-1}$ em vinhos tintos fortificados produzidos na Itália. As principais fontes de ácido gálico são as sementes das uvas. Altas concentrações

deste composto nos vinhos indicam o uso de práticas que aumentam sua extração das uvas, como extensas macerações, altas temperaturas de fermentação e prensagens agressivas (BRAVO et al., 2006), podem ser resultado da sua extração da madeira durante o envelhecimento, ou derivam da degradação dos taninos (HO; HOGG; SILVA, 1999).

Ácido cafeico foi encontrado em concentrações variáveis de 2,62 a 8,12 mg L⁻¹ nas amostras de vinhos brancos fortificados e 0,66 a 27,07 mg L⁻¹ em vinhos tintos fortificados. Este ácido aparece no vinho como consequência da hidrólise do ácido caftárico presente nas uvas (GUTIÉRREZ; LORENZO; ESPINOSA, 2005). Ácido cafeico foi detectado em concentrações médias de 0,85 mg L⁻¹ (BENÍTEZ et al., 2006), 3,31 mg L⁻¹ (FERNÁNDEZ-PACHÓN et al., 2006) e 3,99 mg L⁻¹ (ORTEGA; MAYEN, MEDINA, 2008) em vinhos brancos fortificados produzidos no sul da Espanha. Concentrações na faixa de 0,9 a 4,6 mg L⁻¹ foram quantificadas em vinhos fortificados brancos e tintos, tradicionalmente produzidos na Europa (HO; HOGG; SILVA, 1999). Em vinhos tintos fortificados produzidos na Itália foram encontradas concentrações de 0,46 a 3,73 mg L⁻¹ (LA TORRE et al., 2008). Nas amostras analisadas observam-se concentrações semelhantes de ácido cafeico nos vinhos fortificados produzidos a partir da variedade Touriga Nacional e Vinho do Porto Vintage.

O ácido *p*-cumárico é um ácido fenólico naturalmente presente no vinho, atua como substrato para enzimas que sintetizam o resveratrol e, é liberado durante a fermentação por ação da atividade de enzimas esterase (SALAMEH et al., 2008). Concentrações na faixa de 0,64 a 8,62 mg L⁻¹ de ácido *p*-cumárico foram quantificadas nas amostras analisadas. Ácido *p*-cumárico foi detectado em conteúdo médio de 0,77 mg L⁻¹ (BENÍTEZ et al., 2006); 3,71 mg L⁻¹ (FERNÁNDEZ-PACHÓN et al., 2006) e 1,79 mg L⁻¹ (ORTEGA; MAYEN, MEDINA, 2008) em vinhos brancos fortificados produzidos no sul da Espanha. Conteúdo de 2,4 a 3,7 mg L⁻¹ foi observado em vinhos fortificados brancos e tintos produzidos na Europa (HO; HOGG; SILVA, 1999). La Torre et al. (2008) obtiveram valores máximos de ácido *p*-cumárico de 1,05 mg L⁻¹ em vinhos tintos fortificados produzidos na Itália.

Foram detectados valores de ácido ferúlico na faixa de 0,63 a 2,78 mg L⁻¹ nas amostras de vinhos fortificados analisadas. Em vinhos brancos fortificados produzidos no sul da Espanha, foram quantificadas concentrações médias de 0,53 mg L⁻¹ (BENÍTEZ et al., 2006) e 1,05 mg L⁻¹ (ORTEGA; MAYEN, MEDINA, 2008) de ácido ferúlico. La Torre et al. (2008) detectaram concentrações de 0,08 a 0,66 mg L⁻¹ em vinhos tintos fortificados italianos. Este ácido hidroxicinâmico pode ser

convertido a 4-vinilguaiacol quando o vinho fortificado é maturado em barris de carvalho, o que justifica a baixa concentração deste composto em vinhos envelhecidos (HO; HOGG; SILVA, 1999).

A catequina é o flavan-3-ol majoritário do vinho, proveniente das cascas e sementes das uvas (GARCÍA-MARINO et al., 2006; YANG; MARTINSON; LIU, 2009) e principal composto responsável pelo amargor dos vinhos. Catequina foi um dos compostos fenólicos majoritários detectados nas amostras de vinhos fortificados, com conteúdo médio de 15,05 mg L⁻¹. Em vinhos brancos fortificados produzidos na região sul da Espanha, foram detectados valores de 21,8 mg L⁻¹ (BENÍTEZ et al., 2006), 3,55 mg L⁻¹ (FERNÁNDEZ-PACHÓN et al., 2006) e 25,7 mg L⁻¹ (ORTEGA; MAYEN, MEDINA, 2008). Concentrações da ordem de 2,20 a 7,50 mg L⁻¹ foram encontradas em vinhos tintos fortificados produzidos na Itália (LA TORRE et al., 2008). O menor conteúdo de catequina foi observado na amostra de Vinho do Porto Vintage, proveniente da Região do Douro – Portugal e, o maior conteúdo de catequina foi observado na amostra Touriga Nacional do Planalto Catarinense. Observaram-se valores semelhantes para catequina em função da variedade de uva empregada na elaboração dos vinhos fortificados. Os vinhos produzidos a partir das variedades Cabernet Sauvignon/ Merlot apresentaram valores na faixa de 10,22 a 16,39 mg L⁻¹; nos vinhos produzidos a partir da variedades Cabernet Sauvignon/ Tannat foram observados valores de 21,83 e 21,69 mg L⁻¹. A menor concentração de catequina em vinhos brancos fortificados foi observada na amostra Goethe da Região Carbonífera.

Nas amostras de vinhos brancos fortificados foram detectadas concentrações de quercetina de 1,64 a 8,71 mg L⁻¹. Baixas concentrações de flavonóis nos vinhos brancos devem-se ao fato de que na produção de vinhos brancos fortificados a etapa de maceração é desenvolvida por períodos muito curtos ou é inexistente e, estes compostos estão presentes principalmente nas cascas das uvas (MAKRIS; KALLITHRAKA; KEFALAS, 2006). O aumento na biossíntese de compostos fenólicos, especialmente flavonóis, é amplamente influenciado pela exposição ao sol e altas temperaturas e, por isso, maior conteúdo de flavonóis, como a quercetina, é geralmente encontrado em vinhos produzidos a partir de uvas cultivadas em regiões mais quentes (RASTIJA; SRECNICK; MARICA-MÉDIC-SARIC, 2009). Das amostras de vinhos tintos analisadas, apresentou maior conteúdo de quercetina a Cabernet Sauvignon/ Tannat da Serra Gaúcha (amostra 5), com 26,42 mg L⁻¹, enquanto as menores concentrações deste composto foram observadas nas amostras produzidas na região do

Planalto Catarinense, conhecida como a região mais fria do Brasil. Observaram-se concentrações semelhantes de quercetina em vinhos fortificados em função da variedade de uva empregada na elaboração, com destaque para os maiores valores no vinhos produzidos a partir das variedades Cabernet Sauvignon/ Tannat. La Torre et al. (2008) quantificou concentrações máximas de quercetina da ordem de $2,19 \text{ mg L}^{-1}$ em vinhos tintos fortificados produzidos na Itália.

O estilbeno *trans*-resveratrol, um composto com múltiplos efeitos benéficos à saúde, incluindo efeito protetor contra certos tipos de câncer e às patologias caracterizadas pelo estresse oxidativo celular (LA TORRE et al., 2008), foi detectado em todas as amostras analisadas, porém, nos vinhos brancos, foram encontrados níveis abaixo do limite de quantificação estabelecido pelo método de análise ($0,19 \text{ mg L}^{-1}$). O resveratrol é sintetizado quase que totalmente na casca da uva e sua concentração no vinho varia consideravelmente em função da variedade da uva (GÜRBÜZ et al., 2007) e de fatores abióticos como estresse hídrico (ABRIL et al., 2005) e radiação UV (SUN et al., 2006). Concentrações de $2,33$ a $10,94 \text{ mg L}^{-1}$ de *trans*-resveratrol foram detectadas nas amostras de vinhos tintos fortificados. La Torre et al. (2008) quantificou *trans*-resveratrol em vinhos tintos fortificados produzidos na Itália em concentrações máximas de $0,28 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto Bravo et al. (2008) detectou concentrações variáveis de $0,13$ a $0,38 \text{ mg L}^{-1}$ em vinhos brancos fortificados produzidos em Portugal. Souto et al. (2001) e Vitrac et al. (2005) encontraram concentrações da ordem de $0,82$ a $5,75 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,77$ a $5,34 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, de *trans*-resveratrol em vinhos tintos brasileiros. Maior conteúdo de *trans*-resveratrol pode ser observado nos vinhos fortificados brasileiros principalmente em função das variedades de uva utilizadas, a exemplo da Merlot, Tannat e Cabernet Sauvignon, comumente citadas entre as variedades com maior conteúdo de *trans*-resveratrol. Rosier et al. (2003) quantificaram o teor de resveratrol em vinhos tintos e brancos produzidos no Brasil, Argentina e Chile e observaram os maiores teores deste composto nos vinhos da variedade Merlot, com uma média de $3,58 \text{ mg L}^{-1}$.

Tabela 3.1 Análises físico-químicas de vinhos fortificados brancos e tintos produzidos em diferentes regiões do Brasil.

Amostra	Densidade	Teor alcoólico (%)	Açúcar (g L ⁻¹)	Extrato Seco (g L ⁻¹)	Extrato Seco Reduzido (g L ⁻¹)	SO ₂ Total (mg L ⁻¹)	Acidez Total (g L ⁻¹)*	Acidez Volátil (g L ⁻¹ **)	pH
1	1,0322 ^a	17,3 ^b	107,00 ^b	140,3 ^h	41,30 ^h	41,6 ^g	6,52 ^e	0,540 ^a	3,72 ^c
2	1,0258 ^a	15,4 ^a	90,92 ^a	118,1 ^g	48,18 ^g	80 ^f	6,60 ^e	0,750 ^g	3,62 ^a
3	1,0271 ^a	17,5 ^b	105,23 ^b	127,8 ^c	33,57 ^c	32 ^a	4,80 ^a	0,690 ^f	3,67 ^g
4	1,0230 ^a	17,9 ^d	106,33 ^b	125,7 ^a	50,37 ^a	32 ^a	4,87 ^a	0,294 ^c	3,62 ^a
5	1,0192 ^a	16,5 ^e	84,36 ^d	103,9 ^e	25,54 ^e	108,8 ^d	5,77 ^c	0,600 ^d	3,57 ^f
6	1,0235 ^a	17,8 ^d	90,09 ^a	121,0 ^d	31,91 ^d	38,4 ^c	6,07 ^d	0,540 ^a	3,71 ^c
7	1,0249 ^a	17,8 ^d	113,03 ^e	124,5 ^f	27,47 ^f	48 ^e	5,70 ^c	0,420 ^e	3,80 ^h
8	1,0116 ^a	17,6 ^c	74,56 ^c	88,9 ⁱ	21,34 ^j	16 ^b	5,40 ^f	0,180 ^b	3,46 ^b
9	1,0429 ^a	15,3 ^a	162,85 ^h	162,4 ⁱ	19,55 ⁱ	89,6 ^h	5,10 ^b	0,570 ^{ad}	3,34 ^e
10	1,0423 ^a	16,1 ^g	149,28 ^g	163,1 ^k	23,82 ^k	105,6 ⁱ	6,00 ^d	0,540 ^a	3,13 ^d
11	1,0250 ^a	17,7 ^{cd}	127,01 ^f	128,77 ^b	32,76 ^b	32 ^a	4,95 ^{ab}	0,180 ^b	3,45 ^b
12	1,0252 ^a	20,0 ^f	91,74 ^a	129,3 ^l	37,56 ^l	51,20 ^j	5,32 ^g	0,300 ^c	3,63 ^a

*Expresso em g L⁻¹ de ácido tartárico. **Expresso em g L⁻¹ de ácido acético. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao nível $p < 0,05$ entre as amostras. Amostras: 1, 2, 3 – Cabernet Sauvignon/ Merlot Serra Gaúcha; 4 - Cabernet Sauvignon/ Merlot Planalto Catarinense; 5, 6 - Cabernet Sauvignon/ Tannat Serra Gaúcha; 7 – Touriga Nacional Planalto Catarinense; 8 – Goethe Região Carbonífera; 9, 10 – Moscato Giallo Serra Gaúcha; 11 – Moscato Giallo Planalto Catarinense; 12 – Vinho do Porto Vintage Região do Douro – Portugal (amostra de referência)

Tabela 3.2 Compostos fenólicos em vinhos fortificados brancos e tintos produzidos em diferentes regiões do Brasil.

Amostras	Analitos					
	Polifenóis totais (mg ac. gálico L ⁻¹)	Ésteres tartáricos (mg ac. cafeico L ⁻¹)	Flavonóis (mg quercetina L ⁻¹)	Compostos fenólicos não polimerizados (mg catequina L ⁻¹)	Orto-difenóis (mg catequina L ⁻¹)	Antocianinas monoméricas totais (mg malvidina-3- glicosídeo L ⁻¹)
1	2512,27±80,35 ^c	282,24 ± 4,53 ^f	159,04 ± 1,98 ^f	927,23±94,31 ^{ab}	244,95± 39,77 ^d	38,62 ± 2,23 ^a
2	3241,82±83,57 ^f	360,83 ± 5,94 ^h	240,97 ± 0,79 ⁱ	1063,10±120,72 ^a	525,39 ± 1,68 ^g	44,35±19,07 ^{ab}
3	894,09± 6,07 ^d	108,86±6,50 ^d	67,33 ±4,35 ^e	737,66±12,57 ^{abc}	67,10 ± 2,24 ^b	2,24 ± 0,27 ^b
4	1900,91±12,86 ^b	240,04 ± 3,11 ^{ab}	181,13± 3,16 ^g	890,77±60,36 ^{abc}	190,29 ± 15,12 ^c	33,20 ± 6,50 ^{ab}
5	2473,64±38,57 ^c	221,24 ± 0,28 ^a	125,21± 0,79 ^b	1034,64±110,66 ^a	341,20±3,36 ^f	31,45 ± 0,26 ^{ab}
6	916,82± 28,93 ^b	319,03±16,97 ^g	192,31±7,12 ^b	940,39±73,53 ^{ab}	215,64±1,68 ^{cd}	22,55±5,52 ^{ab}
7	1316,82 ± 41,06 ^e	249,04 ± 1,13 ^b	137,23 ± 1,19 ^c	804,52 ± 56,59 ^{abc}	132,85 ± 16,80 ^e	50,46 ± 3,48 ^a
8	277,00 ± 7,07 ^a	43,22 ± 0,42 ^c	25,74 ± 0,12 ^a	40,11 ± 10,06 ^e	3,84 ± 0,21 ^a	-
9	305,64 ± 3,86 ^a	45,50 ± 1,10 ^c	26,16 ± 0,47 ^a	63,94 ± 35,21 ^e	4,04 ± 1,40 ^a	-
10	501,54 ± 9,64 ^a	77,12 ± 0,17 ^e	36,48 ± 0,12 ^a	34,42 ± 11,66 ^d	37,11 ± 0,56 ^{ab}	-
11	427,45 ± 1,29 ^a	114,10 ± 1,87 ^d	55,85 ± 1,19 ^d	55,58 ± 8,19 ^{de}	40,28 ± 7,28 ^{ab}	-
12	2020,36 ± 46,28 ^b	237,04 ± 5,09 ^{ab}	128,56 ± 2,37 ^{bc}	1728,10 ± 30,18 ^f	239,40 ± 0,56 ^{cd}	25,73 ± 4,12 ^{ab}

Tabela 3.2 (Continuada).

Amostras	Analitos					
	Fração monomérica de taninos (mg L ⁻¹ catequina)	Fração oligomérica de taninos (mg L ⁻¹ procianidina B1)	Fração polimérica de taninos (mg L ⁻¹ proantocianidinas)	Taninos totais (mg L ⁻¹)	Ácido gálico (mg L ⁻¹)	Ácido cafeico (mg L ⁻¹)
1	23,46 ± 2,91 ^{ac}	72,39 ± 0,10 ^e	306,31 ± 50,96 ^b	402,15 ± 47,95 ^{bc}	102,30 ± 0,50 ^{cd}	19,71 ± 1,85 ^e
2	11,43 ± 0,12 ^b	45,29 ± 2,56 ^c	441,44 ± 12,74 ^{cd}	498,16 ± 15,43 ^{cd}	137,98 ± 5,48 ^e	0,79 ± 0,02 ^a
3	12,96 ± 2,04 ^b	13,77 ± 0,002 ^{ab}	26,1263 ± 1,27 ^a	52,86 ± 0,76 ^a	94,55 ± 2,73 ^c	0,66 ± 0,01 ^a
4	18,52 ± 2,97 ^{bc}	6,93 ± 0,44 ^a	641,44 ± 61,15 ^c	665,45 ± 59,56 ^c	58,50 ± 3,74 ^b	27,07 ± 2,00 ^f
5	25,78 ± 0,96 ^a	53,26 ± 0,51 ^c	530,18 ± 13,38 ^{de}	609,22 ± 13,83 ^{de}	106,31 ± 4,02 ^{cd}	5,60 ± 0,06 ^{bcd}
6	24,07 ± 1,45 ^a	33,70 ± 1,54 ^d	96,49 ± 1,15 ^a	154,26 ± 1,23 ^a	55,24 ± 2,54 ^b	1,64 ± 0,02 ^{ab}
7	26,81 ± 0,49 ^a	21,81 ± 0,10 ^b	326,13 ± 5,10 ^{bc}	374,75 ± 5,49 ^b	67,68 ± 0,97 ^b	20,88 ± 0,58 ^e
8	-	-	-	-	6,65 ± 0,24 ^a	2,62 ± 0,31 ^{abc}
9	-	-	-	-	14,99 ± 0,90 ^a	5,98 ± 0,21 ^{bcd}
10	-	-	-	-	5,54 ± 0,22 ^a	6,93 ± 0,03 ^{cd}
11	-	-	-	-	16,36 ± 0,55 ^a	8,12 ± 0,06 ^d
12	2,78 ± 0,12 ^d	7,24 ± 0,51 ^a	126,12 ± 12,93 ^a	136,15 ± 10,79 ^a	109,65 ± 0,09 ^d	20,07 ± 0,06 ^c

Tabela 3.2 (Continuada).

Amostras	Análitos				
	Ácido <i>p</i> -cumárico (mg L ⁻¹)	Ácido ferúlico (mg L ⁻¹)	(+) Catequina (mg L ⁻¹)	Quercetina (mg L ⁻¹)	<i>Trans</i> -resveratrol (mg L ⁻¹)
1	8,62 ± 0,54 ^d	0,95 ± 0,02 ^a	10,22 ± 0,21 ^e	10,67 ± 0,10 ^d	9,11 ± 1,85 ^{cd}
2	0,64 ± 0,02 ^a	0,63 ± 0,02 ^b	16,39 ± 1,46 ^a	14,34 ± 0,06 ^d	8,08 ± 0,05 ^{cd}
3	0,72 ± 0,03 ^a	0,78 ± 0,02 ^{ab}	11,98 ± 0,71 ^a	11,57 ± 0,31 ^d	6,78 ± 0,005 ^{cd}
4	2,69 ± 0,09 ^{ab}	0,85 ± 0,02 ^a	12,01 ± 0,13 ^f	10,73 ± 1,18 ^{bd}	7,94 ± 0,03 ^{cd}
5	1,68 ± 0,02 ^a	2,44 ± 0,04 ^c	21,83 ± 0,24 ^{bcd}	26,42 ± 0,23 ^f	9,97 ± 0,56 ^{cd}
6	1,09±0,007 ^a	2,40±0,05 ^c	21,69±0,71 ^{ab}	22,62±0,06 ^e	10,94±1,64 ^d
7	5,08 ± 0,88 ^c	1,99 ± 0,04 ^e	22,34 ± 0,20 ^e	9,06 ± 0,14 ^b	5,90 ± 0,15 ^{bc}
8	1,51 ± 0,11 ^a	1,24 ± 0,008 ^d	3,86 ± 0,12 ^{abc}	1,64 ± 0,20 ^a	< 0,19 ^a
9	1,60 ± 0,13 ^a	0,85 ± 0,004 ^a	5,39 ± 0,05 ^{bcd}	3,01 ± 0,09 ^{ac}	< 0,19 ^a
10	2,56 ± 0,30 ^{ab}	0,96 ± 0,02 ^a	9,31 ± 0,21 ^{cd}	8,38 ± 0,07 ^b	< 0,19 ^a
11	4,24 ± 0,05 ^{bc}	0,96 ± 0,05 ^a	5,01 ± 0,83 ^d	8,71 ± 0,73 ^b	< 0,19 ^a
12	7,81 ± 0,98 ^d	2,78 ± 0,06 ^f	1,57 ± 0,002 ^e	2,71 ± 0,07 ^{ac}	2,33 ± 0,44 ^{ab}

Valores expressos como média ± desvio padrão para determinações realizadas em triplicata. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao nível $p < 0,05$ entre as amostras. Amostras: 1, 2, 3 – Cabernet Sauvignon/ Merlot Serra Gaúcha; 4 - Cabernet Sauvignon/ Merlot Planalto Catarinense; 5, 6 - Cabernet Sauvignon/ Tannat Serra Gaúcha; 7 – Touriga Nacional Planalto Catarinense; 8 – Goethe Região Carbonífera; 9, 10 – Moscato Giallo Serra Gaúcha; 11 – Moscato Giallo Planalto Catarinense; 12 – Vinho do Porto Vintage Região do Douro – Portugal (amostra de referência).

As análises relativas às características de cor das amostras analisadas são apresentadas na Tabela 3.3. Maior intensidade de cor foi detectada na amostra de vinho tinto fortificado produzida no Planalto Catarinense a partir de uvas Cabernet Sauvignon/ Merlot, enquanto a menor intensidade de cor dos vinhos tintos foi verificada na amostra Cabernet Sauvignon/ Merlot da Serra Gaúcha (amostra 3). Foram observados valores de densidade na faixa de 2,60 a 12,33, para as amostras de vinhos tintos fortificados. Nos vinhos brancos fortificados, foram verificados valores de intensidade de cor de 0,17 a 0,37 e de densidade de cor de 0,23 a 0,44. Os valores de tonalidade variaram de 0,76 a 1,41 para os vinhos tintos fortificados e, de 0,01 a 6,27 para os vinhos brancos. Observaram-se valores semelhantes de tonalidade nas amostras de vinhos tintos produzidos no Planalto Catarinense e amostra de referência, produzida na Região do Douro – Portugal.

As coordenadas cilíndricas (L^* , C^* , h) representam os componentes psicofísicos qualitativos e quantitativos da cor. O eixo vertical do espaço tridimensional CIELAB é a medida de luminosidade (L^*); $L^*=0$ corresponde ao preto e, $L^* = 100$ ao branco (RECAMALES et al., 2007). Os vinhos brancos fortificados eram mais transparentes, com valores de L^* variáveis de 36,12 a 38,11 unidades. Os vinhos tintos fortificados apresentaram valores de L^* na faixa de 9,99 a 19,40 unidades (Tabela 3.3), respectivamente correspondentes às amostras de Vinho do Porto (amostra de referência) e Cabernet Sauvignon/ Merlot produzido na Serra Gaúcha (amostra 3).

Outros parâmetros CIELAB estão relacionados com a coloração vermelha (+ a^*) ou verde (- a^*) e amarela (+ b^*) ou azul (- b^*). De acordo com os resultados da Tabela 3.3, diferenças significativas foram observadas para os parâmetros a^* e b^* nas amostras analisadas. A amostra Moscato Giallo da Serra Gaúcha (amostra 10) apresentou coloração verde, dada pelo valor de a^* negativo (-0,56), ao contrário das demais amostras, que apresentaram valores positivos de a^* . Os valores negativos de a^* estão associados aos reflexos esverdeados descritos por alguns degustadores (ORTEGA-HERAS; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, 2009). Relativo aos valores de b^* , na amostra Cabernet Sauvignon/ Merlot produzida no Planalto Catarinense observou-se valor negativo (-0,99) correspondente à coloração azul, enquanto nas demais amostras verificaram-se valores positivos, indicativos da coloração amarela. O maior % de azul foi observado na amostra Cabernet Sauvignon/ Merlot do Planalto Catarinense, apontando coerência entre os métodos para determinação de cor e indicando maior potencial de envelhecimento no que se refere à coloração desta amostra de vinho. Ainda, os maiores

valores de a^* e b^* foram detectados na amostra Cabernet Sauvignon/Merlot da Serra Gaúcha (amostra 3), que correspondem à intensa coloração laranja-marrom.

O grau de saturação é um componente quantitativo da coloração determinado pela cromaticidade (C^*), que indica a intensidade de um tom. Maiores valores de C^* indicam a predominância de uma cor mais pura ou forte (RECAMALES et al., 2007). Nas amostras analisadas foram observados valores de C^* na faixa de 1,23 a 9,91 unidades para os vinhos tintos fortificados e, 12,39 a 14,84 unidades para os vinhos brancos fortificados. Estes valores indicam maior absorção da luz branca, localizada na porção central do diagrama de cores e a predominância de cores pouco saturadas.

A expressão qualitativa da cor é o matiz (h), expressa como o ângulo do matiz e definido por h. Nesta convenção, a coloração vermelha é denotada por um ângulo de matiz próximo a 0° e, 90° representa o matiz amarelo (RECAMALES et al., 2007). A respeito do ângulo do matiz, foi observada grande dispersão dos resultados para as amostras analisadas. Para os vinhos brancos fortificados foram observados valores de $85,25$ a $92,69^\circ$, indicando predominância do matiz amarelo. Para os vinhos tintos fortificados, prevaleceu o matiz vermelho, com resultados na faixa de $12,32$ a $45,85^\circ$. Estes valores são confirmados pelos resultados das análises de % de vermelho e % de amarelo, que indicam a ascendência da coloração vermelha nos vinhos tintos fortificados e, da coloração amarela nos vinhos brancos fortificados (Tabela 3.3).

As diferenças observadas nos dados relativos à cor das amostras de vinhos fortificados produzidos em diferentes regiões brasileiras (Tabela 3.3) foram superiores a cinco unidades CIELAB, o que implica que a maioria destas diferenças pode ser detectada pelo olho humano (ORTEGA-HERAS; GONZÁLEZ-SANJOSE, 2009).

Tabela 3.3 Cor de vinhos fortificados brancos e tintos produzidos em diferentes regiões do Brasil.

Amostras	Intensidade de Cor	Tonalidade	Densidade	% Amarelo	% Vermelho	% Azul
1	12,49 ± 0,02 ^c	1,04 ± 0,02 ^{abc}	11,24 ± 0,07 ^c	45,83 ± 0,19 ^a	43,66 ± 0,25 ^a	10,53 ± 0,03 ^f
2	13,96 ± 0,02 ^d	1,17 ± 0,03 ^{ce}	12,33 ± 0,13 ^d	48,55 ± 0,38 ^f	40,57 ± 0,02 ^h	11,37 ± 0,30 ^c
3	2,76 ± 0,02 ^e	1,41 ± 0,04 ^e	2,60 ± 0,06 ^e	54,22 ± 0,13 ^g	37,72 ± 0,07 ^g	7,55 ± 0,51 ^b
4	14,05 ± 0,03 ^d	0,87 ± 0,01 ^{abd}	12,33 ± 0,25 ^d	41,44 ± 0,51 ^d	47,61 ± 0,32 ⁱ	11,48 ± 0,55 ^c
5	7,17 ± 0,03 ^b	1,18 ± 0,07 ^{bc}	6,47 ± 0,07 ^b	47,94 ± 0,06 ^e	42,84 ± 0,20 ^l	9,22 ± 0,13 ^d
6	12,59 ± 0,02 ^c	1,19 ± 0,22 ^{abc}	11,49 ± 0,19 ^c	45,61 ± 0,32 ^a	44,38 ± 0,19 ^b	9,52 ± 0,56 ^e
7	10,88 ± 0,01 ^f	0,76 ± 0,01 ^d	9,33 ± 0,13 ^f	40,30 ± 0,42 ^b	49,72 ± 0,31 ^j	10,74 ± 0,34 ^g
8	0,25 ± 0,01 ^a	5,27 ± 0,32 ^h	0,31 ± 0,07 ^a	84,39 ± 0,32 ⁱ	15,61 ± 0,31 ^e	0 ^a
9	0,28 ± 0,02 ^a	6,27 ± 0,32 ⁱ	0,32 ± 0,03 ^a	86,67 ± 0,01 ^j	13,23 ± 0,14 ^d	0 ^a
10	0,17 ± 0,01 ^a	0,01 ^f	0,23 ± 0,07 ^a	100 ± 0,00 ^k	0 ^c	0 ^a
11	0,37 ± 0,03 ^a	3,86 ± 0,02 ^g	0,44 ± 0,07 ^a	79,68 ± 0,27 ^h	20,33 ± 0,26 ^f	0 ^a
12	7,04 ± 0,01 ^b	0,79 ± 0,02 ^{ad}	6,48 ± 0,03 ^b	40,62 ± 0,21 ^c	51,42 ± 0,31 ^k	7,95 ± 0,14 ^b

Tabela 3.3 (Continuada).

Amostras	L*	a*	b*	C*	h
1	17,62 ± 0,10 ^{ac}	1,18 ± 0,05 ^{ab}	0,30 ± 0,05 ^b	1,23 ± 0,05 ^a	15,88 ± 0,10 ^c
2	13,50 ± 0,10 ^b	1,26 ± 0,05 ^a	1,31 ± 0,05 ^e	1,84 ± 0,05 ^{bc}	45,85 ± 0,10 ^g
3	19,40 ± 0,60 ^d	9,07 ± 0,05 ⁱ	4,08 ± 0,05 ^g	9,91 ± 0,10 ^h	24,31 ± 0,05 ^f
4	13,11 ± 0,10 ^b	1,27 ± 0,05 ^a	-0,99 ± 0,05 ^d	1,63 ± 0,05 ^{ab}	32,54 ± 0,10 ^j
5	18,71 ± 0,10 ^{ad}	4,28 ± 0,05 ^g	0,90 ± 0,05 ^a	4,38 ± 0,05 ^f	12,32 ± 0,10 ^a
6	18,11 ± 0,05 ^a	3,09 ± 0,05 ^f	0,62 ± 0,05 ^{ab}	3,06 ± 0,05 ^e	12,33 ± 0,10 ^a
7	16,80 ± 0,10 ^c	2,05 ± 0,05 ^e	0,82 ± 0,05 ^a	2,18 ± 0,10 ^c	22,37 ± 0,10 ^e
8	38,11 ± 0,10 ^{ef}	0,84 ± 0,05 ^b	12,36 ± 0,10 ^c	12,39 ± 0,10 ^d	85,80 ± 0,10 ^b
9	37,50 ± 0,10 ^e	0,41 ± 0,05 ^d	13,79 ± 0,10 ^h	13,79 ± 0,10 ⁱ	88,07 ± 0,05 ^h
10	38,69 ± 0,10 ^f	-0,56 ± 0,05 ^c	12,52 ± 0,10 ^c	12,54 ± 0,10 ^d	92,69 ± 0,10 ⁱ
11	36,12 ± 0,05 ^h	1,16 ± 0,05 ^{ab}	14,79 ± 0,10 ⁱ	14,84 ± 0,10 ^j	85,25 ± 0,10 ^b
12	9,99 ± 0,11 ^g	5,87 ± 0,18 ^h	1,84 ± 0,01 ^f	6,15 ± 0,17 ^g	17,42 ± 0,38 ^d

Valores expressos como média ± desvio padrão para determinações realizadas em triplicata. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao nível $p < 0,05$ entre as amostras. Amostras: 1, 2, 3 – Cabernet Sauvignon/ Merlot Serra Gaúcha; 4 - Cabernet Sauvignon/ Merlot Planalto Catarinense; 5, 6 - Cabernet Sauvignon/ Tannat Serra Gaúcha; 7 – Touriga Nacional Planalto Catarinense; 8 – Goethe Região Carbonífera; 9, 10 – Moscato Giallo Serra Gaúcha; 11 – Moscato Giallo Planalto Catarinense; 12 – Vinho do Porto Vintage Região do Douro – Portugal (amostra de referência).

As amostras de vinhos tintos fortificados apresentaram maior atividade antioxidante do que as amostras de vinhos brancos fortificados. A maior atividade antioxidante obtida através do método DPPH foi observada na amostra Cabernet Sauvignon/Merlot da Serra Gaúcha (amostra 1) com $20,11 \text{ mg L}^{-1}$ de TEAC. Nas amostras de vinhos brancos fortificados não foram verificadas diferenças significativas ao nível $p < 0,05$, com exceção do método FRAP, em que foram observados valores na faixa de $0,68$ a $1,62 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 3.4). Stasko et al. (2006) observaram valores de atividade antioxidante de $0,43 \text{ mg L}^{-1}$ de TEAC e $0,55 \text{ mg L}^{-1}$ de TEAC através dos métodos DPPH e ABTS, respectivamente, em vinhos brancos fortificados Tokay, produzidos na Hungria. Fernández-Pachón et al. (2006) encontraram valores de atividade antioxidante de $0,26 \text{ mg L}^{-1}$ de TEAC através do método ABTS e $0,78 \text{ mg L}^{-1}$ de TEAC pelo método DPPH, em vinhos brancos fortificados produzidos no Sul da Espanha.

Tabela 3.4 Atividade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP) de vinhos fortificados brancos e tintos produzidos em diferentes regiões do Brasil.

Amostras	DPPH (mMol L ⁻¹ TEAC)	ABTS (mMol L ⁻¹ TEAC)	FRAP (mMol L ⁻¹ TEAC)
1	$20,11 \pm 2,04^e$	$18,32 \pm 1,03^c$	$9,67 \pm 0,28^h$
2	$11,14 \pm 0,52^b$	$17,69 \pm 0,04^c$	$11,55 \pm 0,15^d$
3	$2,77 \pm 0,11^a$	$5,68 \pm 0,38^e$	$2,46 \pm 0,02^e$
4	$14,84 \pm 0,58^c$	$13,92 \pm 0,90^b$	$7,15 \pm 0,15^f$
5	$13,68 \pm 0,60^{bc}$	$19,44 \pm 0,29^c$	$10,81 \pm 0,20^d$
6	$5,95 \pm 0,70^d$	$12,41 \pm 0,02^{bd}$	$6,21 \pm 0,58^c$
7	$11,41 \pm 1,03^b$	$10,64 \pm 0,91^d$	$5,51 \pm 0,02^c$
8	$0,30 \pm 0,005^a$	$1,31 \pm 0,30^a$	$0,68 \pm 0,004^a$
9	$0,48 \pm 0,03^a$	$1,57 \pm 0,16^a$	$0,81 \pm 0,04^{ab}$
10	$1,45 \pm 0,12^a$	$2,36 \pm 0,23^a$	$1,62 \pm 0,03^b$
11	$1,06 \pm 0,01^a$	$2,12 \pm 0,33^a$	$1,08 \pm 0,03^{ab}$
12	$10,85 \pm 0,23^b$	$12,73 \pm 0,01^b$	$8,24 \pm 0,09^g$

Valores expressos como média \pm desvio padrão para determinações realizadas em triplicata. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao nível $p < 0,05$ entre as amostras. Amostras: 1, 2, 3 – Cabernet Sauvignon/ Merlot Serra Gaúcha; 4 - Cabernet Sauvignon/ Merlot Planalto Catarinense; 5, 6 - Cabernet Sauvignon/ Tannat Serra Gaúcha; 7 – Touriga Nacional Planalto Catarinense; 8 – Goethe Região Carbonífera; 9, 10 – Moscato Giallo Serra Gaúcha; 11 – Moscato Giallo Planalto Catarinense; 12 – Vinho do Porto Vintage Região do Douro – Portugal (amostra de referência).

No método ABTS, os maiores valores de atividade antioxidante foram encontrados nas amostras de vinhos fortificados Cabernet Sauvignon/ Tannat da Serra Gaúcha (amostra 5), com 19,44 mg L⁻¹ de TEAC e, Cabernet Sauvignon/ Merlot da Serra Gaúcha (amostra 2), com 17,69 mg L⁻¹ de TEAC. No método FRAP foram verificados valores de atividade antioxidante de 2,46 a 11,55 mg L⁻¹ de TEAC nos vinhos tintos fortificados, com destaque para as amostras Cabernet Sauvignon/ Merlot da Serra Gaúcha (amostra 2) e Cabernet Sauvignon/ Tannat da Serra Gaúcha (amostra 5), conforme é apresentado na Tabela 3.4. As discrepâncias observadas nos três métodos empregados podem ser atribuídas a diferenças nos elétrons e na habilidade de transferência de hidrogênios dos compostos fenólicos (ROUSSIS et al., 2008).

O conteúdo de polifenóis totais exibiu alta correlação positiva com a atividade antioxidante medida através dos métodos ABTS (0,96), DPPH (0,82) e FRAP (0,98). Foi verificada também, a contribuição que as classes de compostos fenólicos com estruturas químicas similares exercem na atividade antioxidante, com alta correlação positiva entre o conteúdo de *orto*-difenóis e a atividade antioxidante medida pelo método ABTS (0,89) e FRAP (0,94); entre o conteúdo de ésteres tartáricos, com coeficiente de correlação de 0,88 para os métodos ABTS e FRAP e, de flavonóis, com coeficiente de correlação de 0,86 para os mesmos métodos. Para o método DPPH foram obtidas correlações positivas moderadas para as classes de compostos fenólicos citadas. Coeficientes de correlação de 0,86 (ABTS), 0,85 (DPPH) e 0,83 (FRAP) foram obtidos para taninos totais. Ainda, alta correlação positiva foi observada entre atividade antioxidante e conteúdo de ácido gálico e *trans*-resveratrol, com coeficientes de correlação de 0,84 (ABTS), 0,71 (DPPH), 0,87 (FRAP) e, 0,83 (ABTS), 0,70 (DPPH), 0,75 (FRAP), respectivamente.

3.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

A análise de componentes principais (ACP) foi aplicada para os vinhos brancos e vinhos tintos fortificados, empregando as variáveis relativas ao conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante. As variáveis correspondentes às frações monomérica, oligomérica e polimérica de taninos não foram computadas nesta análise por não serem significativas para esta classificação. A ACP explicou 75,70 % da variação total dos dados nas duas primeiras dimensões, com 60,23 % e 15,47 % explicados pelo fator I e fator II, respectivamente (Figura 3.1).

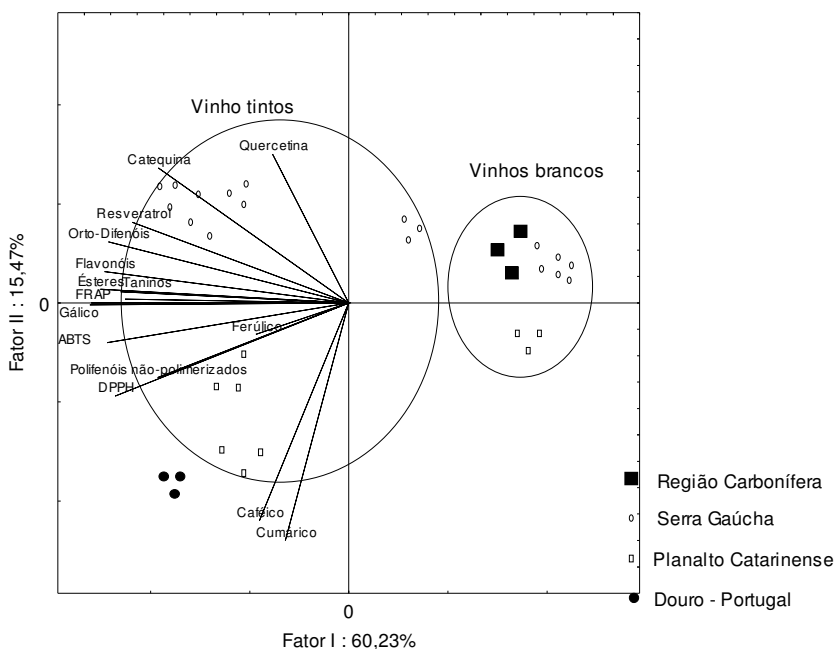


Figura 3.1 Análise de componentes principais das determinações de compostos fenólicos e atividade antioxidante para amostras de vinhos fortificados brancos e tintos produzidos em diferentes regiões do Brasil.

A maior separação ocorreu ao longo do fator I, em que estavam negativamente localizadas as variáveis relacionadas ao conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante. As variáveis com maior contribuição para a separação das amostras ao longo do fator I foram polifenóis totais, ácido gálico, ácido ferúlico, *trans*-resveratrol, atividade antioxidante (ABTS, DPPH e FRAP), ésteres tartáricos, flavonóis, compostos fenólicos não polimerizados e orto-difenóis. Para o fator II, as variáveis de maior contribuição foram catequina, ácido cafeico, ácido cumárico e quercetina. As amostras de vinhos brancos fortificados estavam localizadas positivamente no fator I e positivamente e negativamente no fator II caracterizando-se por menor conteúdo de compostos fenólicos e menor atividade antioxidante. As amostras de vinhos tintos fortificados provenientes da região da Serra Gaúcha apresentaram-se dispostas, em sua maioria, positivamente ao longo do Fator II e negativamente no Fator I, destacando-se quanto ao maior conteúdo de catequina, quercetina, *trans*-resveratrol, orto-difenóis,

flavonóis, ésteres tartáricos e polifenóis totais. As amostras de vinhos tintos provenientes do Planalto Catarinense encontraram-se dispostas negativamente nos Fatores I e II, apresentando maior conteúdo de ácido cafeico, antocianinas monoméricas totais e taninos totais. A amostra de referência (Vinho do Porto Vintage) proveniente da Região do Douro – Portugal estava disposta negativamente nos Fatores I e II, caracterizando-se por maior conteúdo de ácido ferúlico, ácido cumárico e compostos fenólicos não polimerizados. Observa-se grande semelhança entre as amostras produzidas na Região do Douro – Portugal e Planalto Catarinense, o que é evidenciado pela disposição das amostras nos mesmos quadrantes do gráfico de ACP.

4 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo mostraram que os vinhos fortificados brancos e tintos produzidos em diferentes regiões do Brasil são ativos no sequestro dos radicais DPPH e ABTS e na redução do ferro (FRAP). Os vinhos tintos fortificados exibiram maior atividade antioxidante e maior conteúdo de compostos fenólicos do que os vinhos brancos fortificados. Observou-se que a atividade antioxidante *in vitro* dos vinhos fortificados está correlacionada positivamente com o conteúdo de polifenóis totais, orto-difenóis, ésteres tartáricos, flavonóis, antocianinas monoméricas totais, taninos totais, ácido gálico e *trans*-resveratrol. Os resultados indicaram que os vinhos tintos fortificados produzidos na região da Serra Gaúcha apresentaram maior tonalidade de cor, maior atividade antioxidante, maiores conteúdos de catequina, quercetina, *trans*-resveratrol, orto-difenóis, flavonóis, ésteres tartáricos e polifenóis totais. Os vinhos brancos fortificados produzidos nesta mesma região destacaram-se quanto ao maior percentual de amarelo. Os vinhos fortificados produzidos no Planalto Catarinense apresentaram maior intensidade e densidade de cor, com destaque para os vinhos tintos fortificados quanto ao maior percentual de vermelho e de azul e maior conteúdo de ácido cafeico, antocianinas monoméricas totais e taninos totais. A amostra de vinho branco fortificado produzida na Região Carbonífera destacou-se quanto a maior luminosidade (> L*). A amostra de referência, produzida na região do Douro, Portugal, apresentou menor luminosidade, maior conteúdo de ácido ferúlico, ácido cumárico e compostos fenólicos não polimerizados. Ademais, observou-se que as amostras de vinhos tintos fortificados produzidas no Planalto Catarinense são as que mais de assemelham a amostra de

referência, Vinho do Porto Vintage, quanto à composição fenólica, cor e atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRIL, M.; NEGUERELA, A. I.; PÉREZ, C.; JUAN, T.; ESTOPAÑÁN, G. Preliminary study of resveratrol content in Aragón red and rosé wines. **Food Chemistry**, v. 92, p. 729-736, 2005.
- AMERINE, M. A.; OUGH, C. S. **Análisis de Vinos y Mostos**. Zaragoza: Acribia, 1976. 158 p.
- ARNOUS, A.; MAKRIS, D.; KEFALAS, P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 655 – 665, 2002.
- BENÍTEZ, P.; CASTRO, R.; NATERA, R.; BARROSO, C. G. Changes in the polyphenolic and volatile content of “Fino” Sherry wine exposed to high temperature and ultraviolet and visible radiation. **European Food Research Technology**, v. 222, p. 302-309, 2006.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70 – 76, 1996.
- BOIDO, E.; ALCALDE-EON, C.; CARRAU, F.; DELLACASSA, E.; RIVAS-GONZALO, J. C. Aging effect on the pigment composition and color of *Vitis vinifera* L. cv. Tannat wines. Contribution of the main pigment families to wine color. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6692-6704, 2006.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie - LWT**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria n. 229 de 25 de outubro de 1988. Aprova as Normas referentes à Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho. **D.O.U.**, Brasília, 31 out. 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei n. 10.970 de 12 de novembro de 2004. Altera dispositivos da Lei n. 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. **D.O.U.**, Brasília, 16 nov. 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 24, de 8 de setembro de 2005. Aprova Manual Operacional de Bebidas e Vinagres, onde constam o Modelo de Manual da Qualidade, o Protocolo de Validação de Métodos Físico-químicos, o Protocolo do de Cálculo da incerteza associada às medições e os métodos de análise de bebidas fermentadas, destiladas, não-alcoólicas, de vinagre, que passam a constituir padrões oficiais para análise físico-química de bebidas e vinagre. Brasília, **D.O.U.** 20 set. 2005.

BRAVO, M. N.; SILVA, S.; COELHO, A. V.; VILAS BOAS, L.; BRONZE, M. R. Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 84-92, 2006

BRAVO, M. N.; FELICIANO, R.; SILVA, S.; COELHO, A. V.; VILAS BOAS, L.; BRONZE, M. R. Analysis of *trans*-resveratrol: comparison of methods and contents in Muscatel fortified wines from Setúbal region in Portugal. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 634-643, 2008.

CLIFF, M. A.; KING, M. C.; SCHLOSSER, J. Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. **Food Research International**, v. 40, p. 92-100, 2007.

COZZOLINO, D.; KWIATKOWSKI, M. J.; PARKER, M.; CYNKAR, W. U.; DAMBERGS, R. G.; GISHEN, M.; HERDERICH, M. J. Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 73-80, 2004.

FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; VILLAÑO, D.; GARCÍA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 113-118, 2004.

FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; VILLAÑO, D.; TRONCOSO, A. M.; GARCÍA-PARRILA, M. C. Determination of the phenolic composition of Sherry and table White wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 101-108, 2006.

GARCÍA-MARINO, M.; RIVAS-GONZALO, J. C.; IBÁÑEZ, E.; GARCÍA-MORENO, C. Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 44-50, 2006.

GARCÍA-VIGUERA, C.; BAKKER, J.; BELLWORTHY, S. J.; READER, H. P.; WATKINS, S. J.; BRIDLE, P. The effect of some processing variables on non-coloured phenolic compounds in port wines. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung A**, v. 205, p. 321-324, 1997.

GIUSTI, T.; WROLSTAD, R. E. **Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy**. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, John Wiley & Sons, Inc. Unit F1.2, 2001.

GLORIES, Y. **Connaissance Vigne Vin**, v. 18, n. 4, 1978. P. 253-271.

GLORIES, Y. La couleur des vins rouges 2ème partie-Mesure origine et interpretation, **Conn Vigne Vin**, v. 18, p. 253-271, 1984.

GÓMEZ-MÍGUEZ, M. J.; GONZÁLEZ-MIRET, M. L.; HERNANZ, D.; FERNÁNDEZ, A. M.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Effects of fermentative skin contact conditions on colour and phenolic content of white wines. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 238-245, 2007.

GÜRBÜZ, P.; GOCMEN, D.; DAGDELEN, F.; GURSOV, M.; AYDIN, S.; SAHIN, I.; BUYUKUYSAL, L.; USTA, M. Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 100, p. 518-525, 2007.

GUTIÉRREZ, I. H.; LORENZO, E. S. P.; ESPINOSA, A. V. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. **Food Chemistry**, v. 92, p. 269-283, 2005.

HO, P.; HOGG, T. A.; SILVA, M. C. M. Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines. **Food Chemistry**, v. 64, p. 115-122, 1999.

KALLITHRAKA, S.; ARVANITTOYANNIS, I.S.; KEFALAS, P.; EL-ZAJOULI, A.; SOUFLEROS, E.; PSARRA, E. Instrumental and sensory analysis of Greek wines; implementation of principal component analysis (PCA) for classification according to geographical origin. **Food Chemistry**, v. 73, p. 501-514, 2001.

KIM, D.-O.; LEE, K. W.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, 3713 – 3717, 2002.

LA TORRE, G. L.; LA PERA, L.; RANDO, R.; LO TURCO, V.; DI BELLA, G.; SAITTA, M.; DUGO, G. Classification of Marsala wines according to their polyphenol, carbohydrate and heavy metal levels using canonical discriminant analysis. **Food Chemistry**, v. 110, p. 729-734, 2008.

LI, H.; GUO, A.; WANG, H. Mechanisms of oxidative browning of wine. **Food Chemistry**, v. 108, p. 1-13, 2008.

MAKRIS, D. P.; KALLITHRAKA, S.; KEFALAS, P. Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 396-404, 2006.

MANFROI, L.; MIELE, A.; RIZZON, L. A.; BARRADAS, C. I. N. Composição físico-química do vinho Cabernet Franc proveniente de videira conduzidas no sistema lira aberta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26 (2), p. 290-296, 2006.

MAZZA, G.; FUKUMOTO, L. ; DELAQUIS, P. ; GIRARD, B. ; EWERT, B. Anthocyanins, phenolic, and colour of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4009-4017, 1999

MONAGAS, M.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. **Food Chemistry**, v. 95, p. 405-412, 2006.

ORTEGA, A. F.; MAYEN, M.; MEDINA, M. Study of colour and phenolic compounds in two models of oxidative ageing for Sherry type white wines. **Food Chemistry**, v. 19, p. 949-956, 2008.

ORTEGA-HERAS, M.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L. Binding capacity of brown pigments present in special Spanish sweet wines. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, p. 1729-1737, 2009.

PARONETTO, L. **Polifenoli e Tecnica Enologica**. Selepress: Milan, 1977. P. 101-132.

PÉREZ-MAGARIÑO, S.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L. Application of absorbance values used in wineries for estimating CIELAB parameters in red wines. **Food Chemistry**, v. 81, p. 301-306, 2003.

PÉREZ-MAGARIÑO, S.; ORTEGA-HERAS, M.; GONZÁLEZ-SAN JOSÉ, M. L. Multivariate classification of rosé wines from different Spanish protected designations of origin. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, p. 187-190, 2002.

RASTIJA; V.; SRECNIK, G.; MARICA-MEDIC-SARIC. Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins. **Food Chemistry**, v. 115, p. 54-60, 2009.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231 – 1237, 1999.

RECAMALES, A. F.; HERNANZ, D.; ÁLVAREZ, C.; GONZÁLEZ-MIRET, M. L.; HEREDIA, F. J. Colour of Amontillado wines aged in two oak barrel types. **Europe Food Research and Technology**, v. 224, p. 321-327, 2007.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Handbook of Enology**. Volume 2. 2ª edição. The chemistry of wine: stabilization and treatments. John Wiley & Sons Ltd, 2006. 450 p.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Tannat para elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24 (2), p. 223-229, 2004.

RIZZON, L.A.; ZANUS, M. C.; MIELE, A. Evolução da acidez durante a vinificação de uvas tintas de três regiões vitícolas do Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p. 179-183, 1998.

ROSIER, J.P.; CARNEIRO, M.; MIOTTO, R. Teores de resveratrol em vinhos sul americanos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 10, 2003, Bento Gonçalves. **Anais Eletrônicos...**Bento Gonçalves, 2003. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/anais/cbve10/cbve10-resumos2pdf>

ROUSSIS, I. G.; LAMBROPOULOS, I.; TZIMAS, P.; GKOULIOTI, A. ; MARIONS, V. ; TSOUPEIS, D. ; BOUTARIS, I. Antioxidant activities of some Greek wines and wine phenolic extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 614-621, 2008.

SALAMEH, D.; BRANDAM, C.; MEDAWAR, W.; LTEIF, R.; STREHAIANO, P. Highlight on the problems generated by *p*-coumaric acid analysis in wine fermentations. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1661-1667, 2008.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144 – 158, 1965.

SOUTO, A. A.; CARNEIRO, M. C.; SEFERIN, M.; SENNA, M. J. H.; CONZ, A.; GOBBI, K. Determination of trans-resveratrol concentrations in brazilian red wines by HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 441-445, 2001.

STASKO, A.; POLOVKA, M.; BREZOVÁ, V.; BISKUPIC, S.; MALIK, F. Tokay wines as scavengers of free radicals (an EPR study). **Food Chemistry**, v. 96, p. 185-196, 2006.

SUN, B.; LEANDRO, C.; RICARDO DA SILVA, J. M.; SPRANGER, I. Separation of Grape and Wine Proanthocyanidins According to their Degree of Polymerization. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 46, p. 1390-1396, 1998.

SUN, B.; RIBES, A. M.; LEANDRO, M. C.; BELCHIOR, A. P.; SPRANGER, M. I. Stilbenes: quantitative extraction grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 382-390, 2006.

SUN, B.; RICARDO-DA-SILVA, J. M.; SPRANGER, M. I. Quantification of catechins and proanthocyanidins in several portuguese grapevine varieties and red wines. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 16 (1), p. 23-34, 2001.

SUN, B.; SPRANGER, I.; ROQUE-DO-VALE, F.; LEANDRO, C.; BELCHIOR, P. Effect of different winemaking technologies on phenolic composition in Tinta Miúda red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5809-5816, 2001.

VALENTÃO, P.; SEABRA, R. M.; LOPES, G.; SILVA, S. R.; MARTINS, V.; TRUJILLO, M. E.; VELÁZQUEZ, E.; ANDRADE, P. B. Influence of *Dekkera bruxellensis* on the contents of anthocyanins, organic acids and volatile phenols of Dão red wine. **Food Chemistry**, v. 100, p. 64-70, 2007.

VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; TRONCOSO, A. M.; GARCÍA-PARRILLA, M. C. The antioxidant activity of wines determined by the ABTS^{•+} method: influence of sample dilution and time. **Talanta**, v. 64, p. 501-509, 2004.

VITRAC, X.; BORNET, A.; VANDERLINDE, R.; VALLS, J.; RICHARD, T.; DELAUNAY, J. C.; MÉRILLON, J. M.; TEISSÉDRE, P. L. Determination of stilbenes (δ -viniferin, *trans*-astringin, *trans*-piceid, *cis*- and *trans*-resveratrol, ϵ -viniferin) in brazilian wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5664-5669, 2005.

WANG, Y.; CATANA, F.; YANG, Y.; RODERICK, R.; VAN BREEMEN, R. B. An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 431-435, 2002.

YANG, J.; MARTINSON, T. E.; LIU, R. H. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. **Food Chemistry**, v. 116, p. 332-339, 2009.

CAPÍTULO 4

DETERMINAÇÃO DE CÁTIOS INORGÂNICOS, ÁCIDOS ORGÂNICOS E AÇÚCARES EM VINHOS FORTIFICADOS POR ELETROFORESE CAPILAR

DETERMINAÇÃO DE CÁTIOS INORGÂNICOS, ÁCIDOS ORGÂNICOS E AÇÚCARES EM VINHOS FORTIFICADOS POR ELETROFORESE CAPILAR

RESUMO

Três metodologias analíticas utilizando a técnica de eletroforese capilar foram empregadas para determinação de cátions inorgânicos, ácidos orgânicos e açúcares em vinhos fortificados brancos e tintos produzidos em diferentes regiões do Brasil. As metodologias aplicadas proporcionaram análises rápidas, simples, com boa resolução e baixos limites de detecção e quantificação, aplicadas a uma matriz complexa, sem a necessidade de pré-tratamento das amostras. Os resultados mostraram variações nas concentrações de sódio, potássio, cálcio, magnésio, ácido tartárico, ácido málico, ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico, ácido succínico, glicose e frutose. As diferenças observadas quanto à composição das amostras estão associadas à região de produção e às práticas vitivinícolas empregadas.

Palavras-chave: vinhos fortificados; eletroforese capilar; cátions inorgânicos; ácidos orgânicos; açúcares.

DETERMINATION OF INORGANIC CATIONS, ORGANIC ACIDS AND SUGARS IN FORTIFIED WINES BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

ABSTRACT

Three analytical methodologies using capillary electrophoresis were used for determination of inorganic cations, organic acids and sugars in white and red fortified wines produced in different regions of Brazil. The methodologies applied provided analysis fast, simple, with good resolution and low limits of detection and quantification, as applied to a complex matrix without the need for the samples pretreatment. The results showed variations in the concentrations of sodium, potassium, calcium, magnesium, tartaric acid, malic acid, lactic acid, acetic acid, citric acid, succinic acid, glucose and fructose. The observed differences in the composition of the samples are linked to the region of wine production and practices employed.

Keywords: fortified wines; capillary electrophoresis; inorganic cations; organic acids; sugars.

1 INTRODUÇÃO

Vinhos fortificados são vinhos parcialmente fermentados em que o mosto é fortificado com aguardente proveniente da uva, quando aproximadamente metade dos açúcares originais foram convertidos em álcool (GARCÍA-VIGUERA et al., 1997; ESTEVES et al., 2004). Muitos vinhos fortificados são maturados em barris de carvalho e envelhecidos na garrafa, desenvolvendo características próprias em sabores e aromas (HO; HOGG; SILVA, 1999).

Vinho fortificado é uma matriz complexa, constituída por água, açúcares, álcoois e uma grande variedade de componentes orgânicos e inorgânicos. Cada região produz diferentes vinhos, cuja composição é influenciada por fatores históricos e ambientais; práticas vitícolas; processo de vinificação e estocagem das uvas, dos mostos e dos vinhos (ÁLVAREZ et al., 2007; ZHENG et al., 2009; FABANI et al., 2010).

Sódio, potássio, magnésio e cálcio são os compostos minerais majoritários do vinho, responsáveis pela sua estrutura metálica e capacidade tampão (RIBÉREAU-GAYON et al., 1982). Sua determinação é de fundamental importância, pois comprova a origem e autenticidade do vinho, uma vez que a concentração destes compostos é influenciada pelo solo e práticas vitivinícolas e contribui para as características sensoriais (ÁLVAREZ et al., 2007; GONZÁLVEZ et al., 2009).

Moléculas de baixo peso molecular como os ácidos orgânicos desempenham um importante papel nos vinhos fortificados, pois contribuem para as propriedades sensoriais como sabor, aroma e cor, bem como sua estabilidade, nutrição, aceitabilidade e manutenção da qualidade. A determinação da concentração dos ácidos orgânicos fornece informações importantes para o monitoramento do processo de fermentação, controle microbiológico, identificação da origem e estudo das propriedades sensoriais dos vinhos. (CASTIÑEIRA et al., 2002; MATO; SUÁREZ-LUQUE; HUIDOBRO, 2007; SANTALAD et al., 2007; PERES et al., 2009).

Dentre os ácidos orgânicos de importância no vinho destacam-se os ácidos tartárico, málico e cítrico, originários da uva; e láctico, succínico e acético, subprodutos do processo de vinificação como a fermentação alcoólica, malolática, oxidação do etanol, processo de envelhecimento, etc (MARDONES et al., 2005; MATO; SUAREZ-LUQUE; HUIDOBRO, 2005; KRITSUNANKUL; PRAMOTE; JAKMUNEE, 2009). O perfil e os níveis de concentração dos ácidos orgânicos estão correlacionados com a variedade da uva, a região de

cultivo, processo de vinificação e processo de maturação e envelhecimento (ZHENG et al., 2009).

Os principais açúcares presentes nas uvas das cultivares de *Vitis vinifera* são glicose e frutose que, geralmente, são responsáveis por 99% dos açúcares do mosto (DAUDT; SIMON, 2001; VARANDAS et al., 2004). Na fermentação alcoólica do vinho, as leveduras convertem os açúcares em etanol e dióxido de carbono, e ao final da fermentação, permanecem os açúcares residuais, que contribuem para a doçura e qualidade dos vinhos e cuja quantificação é necessária durante todo o processo de vinificação (GORIUSHKINA; SOLDATKIN; DZYADEVYCH, 2009), pois são uma fonte de energia para leveduras e bactérias, além de estarem relacionados com o sabor e aroma (DEL ÁLAMO et al., 2000). A determinação dos açúcares majoritários também fornece informações sobre a composição do vinho e auxilia na identificação da origem das uvas e do processo de vinificação empregado (BERNAL et al., 1996; CATALDI; NARDIELLO, 2003).

A necessidade em conhecer a composição dos principais ácidos orgânicos, açúcares redutores e cátions dos vinhos motivou o desenvolvimento de muitos métodos para a quantificação destes compostos utilizando diversas técnicas para a identificação e quantificação, como espectrofotometria, métodos enzimáticos e cromatografia (KRITSUNANKUL; PRAMOTE; JAKMUNEE, 2009). Atualmente, a eletroforese capilar revela-se como uma técnica analítica confiável e versátil, empregada na determinação de diferentes analitos em uma grande variedade de matrizes, com vantagens como velocidade, simplicidade no preparo de amostra, alta resolução, emprego de capilares de baixo custo e reduzido consumo de solventes e amostras (CASTIÑEIRA et al., 2002; MATO; SUÁREZ-LUQUE; HUIDOBRO, 2007; TANG; WU, 2007; PERES et al., 2009). Muitas metodologias utilizando a técnica de eletroforese capilar foram desenvolvidas para identificação e quantificação de ácidos orgânicos (KELLY; NELSON, 1993; LEVI et al., 1993; STATHAKIS; CASSIDY, 1995; KLAMPFL; KATZMAYR; BUCHBERGER, 1998; CASTIÑEIRA et al., 2000; CASTIÑEIRA et al., 2002; DE VILLIERS et al., 2003; SAAVEDRA; BARBAS, 2003; SING FUNG; MAN LAU, 2003; ESTEVES et al., 2004; BIANCHI; CARERI; CORRADINI, 2005; MATO; SUAREZ-LUQUE; HUIDOBRO, 2007; PERES et al., 2009), íons metálicos (NUÑEZ et al., 2000; TANG; JIANG; YAN, 2004; SUAREZ-LUQUE et al., 2006; SANTALAD et al., 2007) e açúcares (O'FLAHERTY et al., 2001) em amostras de vinhos.

Este trabalho teve por objetivo determinar os principais ácidos orgânicos, açúcares e cátions inorgânicos em vinhos fortificados brancos e tintos produzidos na região Sul do Brasil empregando a técnica de eletroforese capilar.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os procedimentos analíticos para determinação de potássio, sódio, cálcio e magnésio foram desenvolvidos no equipamento de Eletroforese Capilar da marca Agilent Technologies modelo HP^{3D}CE (Palo Alto, CA, USA), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD). A separação eletroforética foi efetuada em capilar de sílica fundida com revestimento externo com poliimida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) com dimensões de 32,5 cm (24 cm até o detector) x 50 µm diâmetro interno x 375 µm diâmetro externo. Para aquisição e tratamento dos dados foi usado o software HP Chemstation.

As análises de ácidos orgânicos e açúcares foram conduzidas em equipamento de Eletroforese Capilar da marca Beckman modelo P/ACETM MDQ 5010 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA), equipado com DAD. Para a separação eletroforética foi utilizado capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliimida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) com comprimento de 40 cm (30 cm até o detector), 50 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados com o software Karat 8.0.

2.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico. Para análise dos cátions inorgânicos os padrões sódio (NaNO₃, Riedel – de Haën), potássio (KIO₃), cálcio (CaCl₂), magnésio (MgCl₂ . 6H₂O) e bário (BaCl₂ . 2H₂O) adquiridos da Synth (SP, Brasil) foram previamente secos em estufa à 200 °C por 2 horas. Soluções estoque 50 mmol L⁻¹ de imidazol (Merck, Darmstadt, Germany) e 100 mmol L⁻¹ de ácido acético (98 %) (Synth, SP, Brasil) foram estocadas sob refrigeração a 4 °C. Ácido D-L-tartárico (> 99 %), ácido cítrico (> 99 %), ácido málico (> 99 %), ácido láctico (> 98 %), ácido succínico (> 99 %), ácido aspártico (99%), D-frutose (98 %) obtidos da Aldrich

(Milwaukee, WI, USA). D-(+)-glicose (99,5 %) e fucose (≥ 98 %) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). As soluções estoque foram preparadas com água purificada (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA) e estocadas sob refrigeração. Os eletrólitos foram preparados diariamente.

2.3 AMOSTRAS

Amostras comerciais de vinhos fortificados brancos e tintos de *Vitis vinifera* L. e *Vitis* sp., produzidas em três regiões vitivinícolas do Sul do Brasil foram analisadas. As amostras, produzidas a partir das variedades tintas Cabernet Sauvignon/ Merlot, Cabernet Sauvignon/ Tannat e Touriga Nacional e das variedades brancas Goethe e Moscato Giallo, foram codificadas de acordo com a região de produção: SG corresponde a amostras produzidas na Região da Serra Gaúcha; PC refere-se a vinhos produzidos no Planalto Catarinense; RC corresponde a vinhos produzidos na Região Carbonífera. Todas as amostras foram diluídas com água deionizada e injetadas diretamente no equipamento de eletroforese capilar sem qualquer outro tratamento de amostra.

2.4 CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA

Na primeira análise dos três grupos de compostos estudados foi realizado um condicionamento nos capilares que consistiu de 1 mol L⁻¹ NaOH (30 minutos), água deionizada (30 minutos) e eletrólito de corrida (20 minutos).

2.4.1 Determinação de Cátions Inorgânicos

Para a determinação de sódio, potássio, cálcio e magnésio, as medidas eletroforéticas foram realizadas com voltagem positiva de 30 kV, com detecção indireta em 214 nm e temperatura controlada a 25 °C. As soluções padrão e as amostras foram injetadas hidrodinamicamente a pressão de 0,5 psi por 5 segundos. Entre as corridas, o capilar foi condicionado com solução eletrolítica a pressão de 50 mbar por 48 segundos. O eletrólito de corrida era composto de 10 mmol L⁻¹ de imidazol e 40 mmol L⁻¹ de ácido acético em pH de separação de 4,2. Para a determinação de sódio, cálcio e magnésio as amostras de vinho fortificado foram diluídas 1:10 (v/v) e, para a análise de potássio, a diluição foi de 1:100 (v/v) em água deionizada. Bário foi adicionado às amostras como padrão interno na concentração de 5 mg L⁻¹.

2.4.2 Determinação de Ácidos Orgânicos

Nas análises de ácidos orgânicos, para obter uma linha de base estável, o capilar foi condicionado com o seguinte ciclo de lavagem: 1 mol L⁻¹ NaOH por 5 minutos, água deionizada por 5 minutos e solução eletrolítica por 10 minutos. Entre as corridas, o capilar foi reconicionado com lavagem pressurizada com solução eletrolítica por 2 minutos. A separação eletroforética foi realizada a temperatura de 30 °C, com voltagem de -15 kV. Foi utilizada injeção hidrodinâmica a 0,5 psi de pressão por 4 segundos e detecção indireta em 254 nm. O eletrólito de corrida era composto de 8,5 mmol L⁻¹ de trishidroxiaminometano (TRIS) e 10 mmol L⁻¹ de ácido 3,5-dinitrobenzóico, com pH 3,6. Em pH próximo a 7 foi possível obter os compostos ionizados, porém, a separação dos analitos era inviável devido a co-migração dos ácidos tartárico e succínico. Em pH mais baixo (3,6), melhor separação pode ser alcançada, conforme foi previamente estudado por Peres et al. (2009), porém, a mobilidade efetiva dos ácidos orgânicos era relativamente baixa. Para inverter o fluxo electrosmótico e diminuir o tempo de análise, foi adicionado 0,2 mmol L⁻¹ de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) ao eletrólito de corrida. Para análise de ácidos orgânicos, foi utilizada diluição 1:12 (v/v) com água deionizada e ácido aspártico na concentração de 63 mg L⁻¹ como padrão interno.

2.4.3 Determinação de Açúcares

Para determinar açúcares, diariamente o capilar foi condicionado com 1 mol L⁻¹ NaOH (5 min), água deionizada (5 min) e solução eletrolítica (10 min). Após cada injeção, o capilar foi reconicionado com lavagem pressurizada com solução eletrolítica por 2 minutos. Os padrões e amostras foram injetados usando 0,5 psi de pressão por 3,0 segundos. A separação eletroforética foi realizada a -30 kV (polaridade reversa) mantendo a temperatura do capilar constante em 20 °C. Foi empregada detecção indireta a 254 nm. Para determinar a composição do eletrólito, partiu-se dos valores de pK_a dos açúcares, encontrados na literatura (SOGA; SERWE, 2000), que variam de 12,03 a 12,51 e fixou-se o pH do eletrólito em 12,62, para obter os açúcares ionizados negativamente. Ácido sórbico foi escolhido como co-íon cromóforo, possibilitando a detecção indireta dos analitos e hidróxido de sódio (NaOH) foi selecionado como contra-íon. A concentração dos componentes do eletrólito de corrida foi definida em 35 mmol L⁻¹ de NaOH, 10 mmol L⁻¹ de ácido sórbico e 0,2 mmol L⁻¹ de CTAB. Os

açúcares foram determinados após diluição das amostras e adição de fucose na concentração de 200 mg L⁻¹ como padrão interno.

2.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS MÉTODOS

As curvas de calibração para os cátions sódio, potássio, cálcio e magnésio foram construídas com onze níveis de concentração no intervalo de 0,5 a 32 mg L⁻¹. Para os ácidos orgânicos, as curvas de calibração foram construídas simultaneamente com as soluções padrão dos ácidos tartárico, cítrico, málico, láctico, succínico e acético em concentrações que variaram de 20 a 450 mg L⁻¹. Para glicose e frutose as curvas compreenderam concentrações de 100 a 600 mg L⁻¹.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados como a concentração da solução que apresentou razão sinal-ruído de 3 e 10, respectivamente.

Todas as amostras e padrões foram injetados em triplicata e os resultados expressos como a média ± desvio padrão. Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey foram aplicados para verificar as diferenças estatísticas entre as amostras, utilizando o Software Statistica 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, Okla., USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DESEMPENHO DOS MÉTODOS

Para as faixas de concentração testadas (cátions 0,5 – 32 mg L⁻¹; ácidos orgânicos 20 – 450 mg L⁻¹; açúcares 100-600 mg L⁻¹) os métodos apresentaram valores de R² entre 0,997 - 0,999 para os cátions; 0,992 – 0,999 para os ácidos orgânicos; 0,996 – 0,997 para os açúcares. No método para determinação de cátions inorgânicos, o LOD variou de 0,19 a 1,28 mg L⁻¹ e, o LOQ de 0,63 a 4,28 mg L⁻¹, sendo o mais baixo para cálcio e o mais alto para sódio em ambos os casos (Tabela 4.1). Para os ácidos orgânicos, o LOD variou de 12,84 a 33,51 mg L⁻¹ e o LOQ, de 42,81 a 111,71 mg L⁻¹, sendo os menores valores correspondentes ao ácido láctico e os maiores, ao ácido málico (Tabela 4.1). Esteves et al. (2004), ao desenvolverem metodologia usando a técnica de eletroforese capilar para análise de ácidos orgânicos em vinhos fortificados, obtiveram valores maiores do que os obtidos neste estudo para o ácido láctico, com LOD de 36,74 mg L⁻¹ e LOQ de 122,48 mg L⁻¹. Mato, Suarez-Luque e Huidobro (2007), ao compararem os resultados de validação de métodos de eletroforese capilar aplicados por diversos

autores para análise de vinhos, relataram valores de LOD variando de 0,006 a 46,4 mg L⁻¹ e, LOQ de 0,02 a 122 mg L⁻¹, para os ácidos tartárico, málico, láctico, succínico, cítrico e acético. Para os açúcares, foram observados valores de LOD de 35, 94 mg L⁻¹ para frutose e 29,59 mg L⁻¹ para glicose e, valores de LOQ de 119,81 mg L⁻¹ e 98,65 mg L⁻¹, respectivamente (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 Características de desempenho dos métodos de eletroforese capilar.

Analito	Equação de Regressão	R ²	LOD* (mg L ⁻¹)	LOQ** (mg L ⁻¹)
<i>Cátions inorgânicos</i>				
K ⁺	y = 0,298x + 0,179	0,999	0,37	1,31
Ca ²⁺	y = 0,777x + 0,548	0,998	0,19	0,63
Na ⁺	y = 0,894x + 1,178	0,998	1,28	4,28
Mg ²⁺	y = 1,050x - 0,036	0,997	0,69	2,29
<i>Ácidos Orgânicos</i>				
Ácido Tartárico	y = 0,016x - 0,233	0,994	27,86	92,85
Ácido Cítrico	y = 0,020x - 0,381	0,992	31,84	106,14
Ácido Málico	y = 0,010x - 0,112	0,992	33,51	111,71
Ácido Láctico	y = 0,005x - 0,017	0,999	12,84	42,81
Ácido Succínico	y = 0,012x - 0,076	0,994	27,45	91,51
Ácido Acético	y = 0,006x - 0,036	0,997	16,88	56,26
<i>Açúcares</i>				
Frutose	y = 0,0052x - 0,042	0,996	35,94	119,81
Glicose	y = 0,0043x + 0,0087	0,997	29,59	98,65

* LOD – Limite de detecção, ** LOQ – Limite de quantificação.

3.2 ANÁLISES DE AMOSTRAS DE VINHOS FORTIFICADOS

Os resultados das análises de cátions, ácidos orgânicos e açúcares de amostras de vinhos fortificados produzidos no Sul do Brasil são apresentados na Tabela 4.2.

O potássio é o cátion encontrado em maior concentração em vinhos, com valores na faixa de 0,5 a 2 g L⁻¹ (RIBÉREAU-GAYON et al., 1998). Nos vinhos analisados a concentração de potássio variou de 0,76 a 1,66 g L⁻¹ (Tabela 4.2), sendo a menor concentração observada em vinho branco e, a maior em vinho tinto. O teor de potássio mais elevado nos vinhos tintos deve-se à maior participação da casca na elaboração desses vinhos (RIZZON; SALVADOR; MIELE, 2008) e à capacidade dos fenóis de inibir a precipitação do bitartarato de potássio (RIBÉREAU-GAYON et al., 1998). O potássio interfere no valor de pH do vinho e, conseqüentemente no seu tempo de conservação e sabor, além de sua importante participação na salificação do ácido tartárico (RIZZON; SALVADOR; MIELE, 2008). Álvarez et al. (2007) ao estudarem a composição mineral de vinhos brancos fortificados da região sul da Espanha, utilizando a técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, encontraram teores de potássio variando de 0,4748 a 0,8883 g L⁻¹. Paneque, Álvarez-Sotomayor e Gómez (2009) e Paneque et al. (2010) em estudos sobre vinhos da mesma região, determinaram concentrações na faixa de 1,011 a 1,285 g L⁻¹ e 0,654 a 1,112 g L⁻¹, respectivamente, através da técnica de espectrometria de emissão atômica. Rizzon, Salvador e Miele (2008), em estudo sobre vinhos brasileiros, utilizando a espectrometria de emissão atômica, detectaram concentrações de potássio de 1,130 g L⁻¹ em vinho tinto fino e 0,758 g L⁻¹ em vinho branco fino.

O sódio é encontrado nos vinhos em pequenas quantidades e, sua concentração está relacionada com a origem geográfica e com a adição de produtos enológicos, como o metabissulfito de sódio e bentonitas (RIBÉREAU-GAYON et al., 1998; RIZZON; SALVADOR; MIELE, 2008). Nos vinhos analisados foram detectadas concentrações de sódio na faixa de 4,8 mg L⁻¹ a 97,9 mg L⁻¹ (Tabela 4.2), observando-se os menores valores nas amostras de vinhos tintos produzidos na Região do Planalto Catarinense. Rizzon, Salvador e Miele (2008) encontraram concentrações de 17,2 mg L⁻¹ em vinho tinto e 32,1 mg L⁻¹ em vinho branco, através da técnica de espectrometria de emissão atômica; Álvarez et al. (2007), obtiveram concentrações de sódio variando de 29,7 a 33,2 mg L⁻¹ em vinhos brancos fortificados produzidos no sul da Espanha, utilizando espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, enquanto Paneque, Álvarez-Sotomayor e Gómez (2009) encontram valores de 48,9 a 90,6 mg L⁻¹ e Paneque et al. (2010) obtiveram teores de 13,5 a 42,4 mg L⁻¹ em vinhos da mesma região, por meio da espectrometria de emissão atômica.

A concentração de cálcio dos vinhos brancos varia de 80 a 140 mg L⁻¹, enquanto para os vinhos tintos são observadas concentrações ligeiramente inferiores (RIBÉREAU-GAYON et al., 1998). Nos vinhos analisados foram determinados valores de 43,0 a 316,7 mg L⁻¹ (Tabela 4.2), sendo que as menores concentrações de cálcio foram observadas em vinhos tintos. Geralmente, os vinhos mais ácidos apresentam maior concentração de cálcio, pois os ácidos orgânicos aumentam a solubilidade do tartarato de cálcio, que é limitada pelo pH e grau alcoólico. Outros fatores que interferem na concentração de cálcio dos vinhos são a conservação do vinho em recipiente de concreto e a utilização de carbonato de cálcio para a correção da acidez. Concentrações elevadas de cálcio são responsáveis pela turvação e precipitação do tartarato de cálcio no vinho (RIZZON; SALVADOR; MIELE, 2008). Em estudo sobre a composição mineral de vinhos brasileiros Rizzon, Salvador e Miele (2008) encontraram níveis de cálcio de 79,2 mg L⁻¹ em vinho tinto e 85,5 mg L⁻¹ em vinho branco, empregando a técnica de espectrometria de absorção atômica; Álvarez et al. (2007) detectaram concentrações de cálcio na faixa de 48,3 a 85,3 mg L⁻¹, utilizando espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado; Paneque, Álvarez-Sotomayor e Gómez (2009) obtiveram valores de 83,9 a 90,7 mg L⁻¹ e Paneque et al. (2010), valores de 21,8 a 90,9 mg L⁻¹, ao estudarem a composição mineral de vinhos brancos fortificados do sul da Espanha por espectrometria de absorção atômica.

Nos vinhos analisados foram encontrados níveis de magnésio de 78,0 a 370,2 mg L⁻¹ (Tabela 4.2). A concentração de magnésio do vinho não diminui durante a fermentação ou envelhecimento, pois todos os sais de magnésio são solúveis (RIBÉREAU-GAYON et al., 1998). A utilização de agentes filtrantes, o armazenamento em recipientes de concreto, o grau alcoólico do vinho, a concentração de outros constituintes, como os tartaratos e os sulfatos, o pH, o tempo e a temperatura de conservação também interferem na sua concentração. O magnésio contribui para a caracterização da tipicidade, participa da estabilidade, dos aspectos sensoriais e até mesmo de determinadas alterações do vinho. É um elemento importante para a multiplicação e metabolismo das leveduras (RIZZON; SALVADOR; MIELE, 2008). Magnésio foi encontrado na faixa de concentração de 58,5 a 68,0 mg L⁻¹ (ÁLVAREZ et al., 2007), 96,7 a 127,0 mg L⁻¹ (PANEQUE; ÁLVAREZ-SOTOMAYOR; GÓMEZ, 2009) e 65,9 a 124,7 mg L⁻¹ (PANEQUE et al., 2010) em vinhos brancos fortificados do sul da Espanha. Concentrações de 77,0 mg L⁻¹ e 63,2 mg L⁻¹, foram

observadas, respectivamente, em vinhos brasileiros tintos e brancos, determinados por espectrometria de absorção atômica (RIZZON; SALVADOR; MIELE, 2008).

A Figura 4.1 apresenta os perfis eletroforéticos dos padrões de sódio, potássio, cálcio e magnésio e de uma amostra de vinho fortificado, determinados em 0,7 minutos.

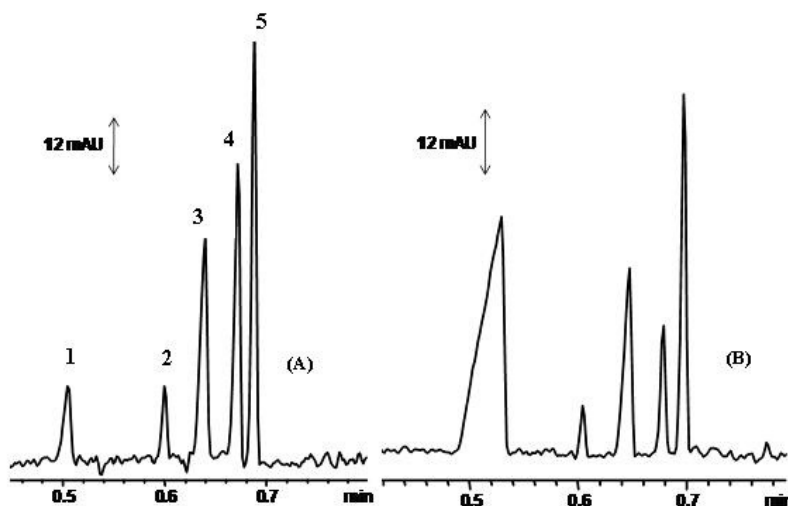


Figura 4.1 Perfil eletroforético dos padrões de cátions 5 mg L^{-1} (A) e de uma amostra de vinho fortificado com diluição 1:10 (v/v) (B). Identificação dos picos: 1 – potássio; 2 – bário (PI); 3 – cálcio; 4 – sódio; 5 – magnésio. Condições eletroforéticas: capilar com $50 \mu\text{m}$ D.I. e comprimento de 32,5 cm (24 cm até o detector); eletrólito: 10 mmol L^{-1} de imidazol e 40 mmol L^{-1} de ácido acético; detecção indireta 214 nm; voltagem + 30 kV.

O ácido tartárico é um dos ácidos majoritários do vinho; é um ácido forte que interfere diretamente no pH do vinho, é relativamente resistente à respiração oxidativa e é metabolizado por poucos microrganismos (RIZZON; SGANZERLA, 2007; JACKSON, 2008). O teor de ácido tartárico no mosto e no vinho é dependente da variedade e das condições de produção da uva, especialmente da disponibilidade de água (RIZZON; SGANZERLA, 2007). O ácido tartárico foi detectado em concentrações de $0,85$ a $2,27 \text{ g L}^{-1}$ nas amostras analisadas (Tabela

4.2). Concentrações da ordem de 0,82 a 2,75 g L⁻¹ deste ácido foram encontradas em vinhos fortificados do Porto analisados por eletroforese capilar (ESTEVES et al., 2004) e variações de 1,02 a 2,21 g L⁻¹ foram observadas em vinhos brasileiros, utilizando a mesma técnica (PERES et al., 2009).

O ácido málico é responsável por aproximadamente metade da acidez total das uvas e dos vinhos. Sua concentração nas uvas diminui ao decorrer da maturação, por isso, seu conteúdo pode ser usado como indicador da época de colheita em uma determinada região (MATO; SUAREZ-LUQUE; HUIDOBRO, 2005; JACKSON, 2008). A predominância de ácido málico em mostos e vinhos produzidos em regiões de climas frios está diretamente relacionada com a temperatura, pois durante a maturação, a temperatura determina a eliminação do ácido málico das uvas por combustão (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Nos vinhos, a concentração dos ácidos málico e láctico é muito usada para monitorar o processo de fermentação malolática (CASTIÑEIRA et al., 2002). O ácido láctico encontrado no vinho é proveniente do metabolismo bacteriano. Durante a fermentação malolática as bactérias ácido lácticas produzem a enzima malicodesidrogenase que catalisa a reação de descarboxilação do ácido málico (ácido dicarboxílico) formando ácido láctico (ácido monocarboxílico). Esta reação contribui significativamente para as características sensoriais, pois o ácido láctico possui sabor ácido menos intenso do que o málico (JACKSON, 2008). Nas amostras analisadas foram obtidos valores de ácido málico de 0,29 a 3,13 g L⁻¹ e, valores de ácido láctico de 0,27 a 3,59 g L⁻¹ (Tabela 4.2). Analisando as concentrações destes ácidos (Tabela 4.2) observa-se que, provavelmente, em cinco amostras analisadas não foi realizada a fermentação malolática, em três amostras a fermentação malolática foi concluída e, nas demais, o processo ocorreu de forma parcial, o que é constatado em função das concentrações equivalentes dos dois ácidos.

O ácido succínico é um dos mais comuns subprodutos do metabolismo das leveduras, encontrado em vinhos em concentração de até 1 g L⁻¹. É resistente ao ataque microbiológico sob condições anaeróbias e é particularmente estável no vinho (JACKSON, 2008). Este ácido apresenta intenso amargor, gosto salgado e acentua o aroma do vinho (RIBÉREAU-GAYON et al., 1998; KRITSUNANKUL; PRAMOTE; JAKMUNEE, 2009). O ácido succínico foi detectado em todas as amostras analisadas em concentrações que variaram de 0,29 a 1,06 g L⁻¹ (Tabela 4.2). Esteves et al. (2004) encontraram concentrações

de 0,188 a 0,709 g L⁻¹ de ácido succínico em vinhos fortificados do Porto utilizando a técnica de eletroforese capilar e Peres et al. (2009), empregando a mesma técnica analítica, obtiveram valores da ordem de 66 a 700 mg L⁻¹ do mesmo ácido em vinhos brasileiros.

O ácido cítrico é encontrado em pequenas quantidades nas uvas e no mosto (0,5 a 1,0 g L⁻¹) e, geralmente não é detectado no vinho, pois é metabolizado durante a fermentação malolática (RIBÉREAU-GAYON et al., 1998; MATO; SUÁREZ-LUQUE; HUIDOBRO, 2007). Este ácido foi detectado em apenas três amostras de vinho branco fortificado em que há indicativo de não ter ocorrido a fermentação malolática. Foram encontrados valores de 0,27 a 0,39 g L⁻¹ (Tabela 4.2).

O ácido acético é produzido pelas leveduras em pequenas quantidades durante a fermentação. Em concentrações da ordem de 300 mg L⁻¹, o ácido acético contribui para a complexidade de aroma e sabor do vinho (JACKSON, 2008). Em quantidades acima de 1 g L⁻¹, no entanto, pode causar alterações no vinho, diminuindo sua qualidade (MATO; SUÁREZ-LUQUE; HUIDOBRO, 2007). Normalmente, alta acidez volátil se deve à hidrólise dos açúcares residuais, ácido tartárico e glicerol por bactérias lácticas anaeróbias. Bactérias acéticas aeróbias também produzem ácido acético por oxidação do etanol (RIBÉREAU-GAYON et al., 1998). Nos vinhos analisados foram encontradas concentrações de ácido acético da ordem de 0,14 a 0,49 g L⁻¹, observando-se as menores concentrações nas amostras Cabernet Sauvignon/ Merlot e Moscato Giallo produzidas no Planalto Catarinense e, Goethe, proveniente da Região Carbonífera (Tabela 4.2). Mato, Suárez-Luque e Huidobro (2007) encontraram valores na faixa de 0,18 a 0,71 g L⁻¹ de ácido acético em vinhos brancos, rosados e tintos, empregando a técnica de eletroforese capilar de zona; Esteves et al. (2004), observaram valores de 0,099 a 0,460 g L⁻¹ de ácido acético em vinhos fortificados (Porto) brancos e tintos analisados por eletroforese capilar; Peres et al. (2009), ao estudarem o conteúdo de ácidos orgânicos em vinhos brasileiros, por eletroforese capilar, encontraram concentrações de ácido acético de 0,118 a 1,003 g L⁻¹.

A Figura 4.2 ilustra o perfil eletroforético dos padrões de seis ácidos orgânicos e de uma amostra de vinho fortificado, analisados em tempo inferior a 5 minutos. Os eletroferogramas dos padrões dos açúcares estudados (glicose e frutose) e do perfil de duas amostras de vinhos fortificados, um branco e outro tinto são visualizados na Figura 4.3. Os métodos de separação mostram boa resolução dos picos.

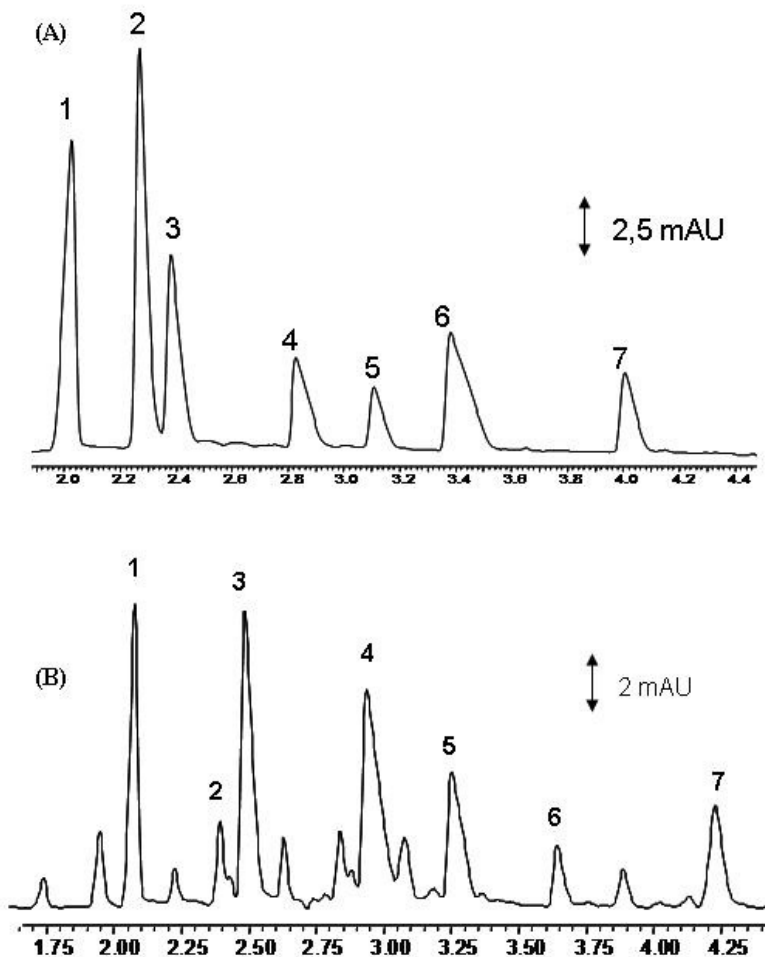


Figura 4.2 Perfil eletroforético dos padrões de ácidos orgânicos (A) e de uma amostra de vinho branco fortificado (B). Identificação dos picos: 1 – ácido tartárico, 2 – ácido cítrico, 3 – ácido málico, 4 – ácido láctico, 5 – ácido aspártico (PI), 6 – ácido succínico, 7 – ácido acético. Condições eletroforéticas: capilar com 50 μm D.I. e comprimento de 40 cm (30 cm até o detector); eletrólito consistindo de 8,5 mmol L^{-1} TRIS, 10 mmol L^{-1} ácido 3,5-dinitrobenzôico e 0,2 mmol L^{-1} CTAB; detecção indireta em 254 nm; voltagem de -15 kV.

Tabela 4.2 Composição de cátions inorgânicos, ácidos orgânicos e açúcares em vinhos fortificados brancos e tintos por eletroforese capilar.

Analito	Amostras					
	Cabernet Sauvignon/ Merlot (SG)	Cabernet Sauvignon/ Merlot (SG)	Cabernet Sauvignon/ Merlot (SG)	Cabernet Sauvignon/ Merlot (PC)	Cabernet Sauvignon/ Tannat (SG)	Cabernet Sauvignon/ Tannat (SG)
<i>Cátions</i>						
Na ⁺ (mg L ⁻¹)	19,8 ± 0,4 ^{ab}	70,4 ± 7,7 ^c	47,8 ± 16,7 ^{bc}	4,8 ± 2,4 ^a	41,2 ± 10,1 ^{bc}	29,5 ± 7,0 ^{ab}
K ⁺ (g L ⁻¹)	1,53 ± 0,19 ^c	1,48 ± 0,12 ^{ac}	1,12 ± 0,14 ^{ab}	1,10 ± 0,10 ^{ab}	1,66 ± 0,10 ^c	1,36 ± 0,10 ^{ac}
Ca ²⁺ (mg L ⁻¹)	102,4 ± 4,3 ^a	230,2 ± 7,9 ^a	145,3 ± 35,4 ^a	50,8 ± 7,1 ^a	98,5 ± 15,1 ^a	57,4 ± 1,4 ^a
Mg ²⁺ (mg L ⁻¹)	158,2 ± 1,2 ^{bc}	304,6 ± 26,0 ^d	179,3 ± 40,6 ^c	100,4 ± 2,6 ^{ab}	186,3 ± 20,5 ^c	115,8 ± 3,4 ^{ab}
<i>Ácidos Orgânicos</i>						
Ácido Tartárico (g L ⁻¹)	0,99 ± 0,12 ^{abc}	1,24 ± 0,02 ^a	1,09 ± 0,01 ^a	0,85 ± 0,03 ^b	1,21 ± 0,01 ^a	1,14 ± 0,06 ^a
Ácido Málico (g L ⁻¹)	2,54 ± 0,24 ^e	0,29±0,0005 ^a	0,31±0,0004 ^a	2,44 ± 0,01 ^{de}	1,14 ± 0,03 ^b	2,06 ± 0,06 ^c
Ácido Lático (g L ⁻¹)	1,06 ± 0,08 ^c	3,59 ± 0,44 ^g	1,71 ± 0,24 ^d	0,60 ± 0,22 ^a	2,21 ± 0,15 ^f	1,36 ± 0,58 ^c
Ácido Succínico (g L ⁻¹)	1,03 ± 0,06 ^{de}	0,94 ± 0,01 ^{ade}	0,96 ± 0,02 ^{ade}	0,76±0,004 ^{abc}	0,76 ± 0,02 ^{ab}	1,06 ± 0,06 ^e
Ácido Cítrico (g L ⁻¹)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido Acético (g L ⁻¹)	0,36 ± 0,06 ^{ab}	0,49 ± 0,02 ^c	0,40 ± 0,02 ^c	0,15 ± 0,06 ^d	0,41 ± 0,06 ^{ac}	0,35 ± 0,06 ^{ac}
<i>Açúcares</i>						
Frutose (g L ⁻¹)	57,19 ± 6,20 ^{bde}	41,09 ± 1,35 ^a	46,53 ± 8,79 ^{ab}	63,50± 2,24 ^{cde}	44,26± 2,28 ^{ab}	54,79 ± 2,36 ^{abd}
Glicose (g L ⁻¹)	48,43 ± 2,32 ^a	49,65 ± 0,55 ^a	53,96± 15,60 ^a	39,94 ± 1,38 ^{ab}	39,83± 2,18 ^{ab}	47,23 ± 3,20 ^a
Relação G/F	0,85	1,21	1,16	0,63	0,90	0,86

Tabela 4.2 (Continuada).

Analito	Amostras				
	Touriga Nacional (PC)	Goethe (RC)	Moscato Giallo (SG)	Moscato Giallo (SG)	Moscato Giallo (PC)
<i>Cátions</i>					
Na ⁺ (mg L ⁻¹)	6,7 ± 0,8 ^a	6,5 ± 3,6 ^a	82,8 ± 0,6 ^d	97,9 ± 35,6 ^e	24,1 ± 3,9 ^{ab}
K ⁺ (g L ⁻¹)	1,46 ± 0,14 ^{ac}	1,12 ± 0,07 ^{ab}	0,76 ± 0,10 ^b	1,11 ± 0,02 ^{ab}	0,84 ± 0,04 ^b
Ca ²⁺ (mg L ⁻¹)	43,0 ± 1,9 ^a	56,1 ± 3,7 ^a	277,6 ± 6,1 ^a	316,7 ± 43,0 ^a	52,4 ± 1,1 ^a
Mg ²⁺ (mg L ⁻¹)	80,8 ± 3,7 ^a	78,0 ± 1,0 ^a	316,1 ± 4,7 ^{de}	370,2 ± 20,2 ^e	90,7 ± 0,9 ^a
<i>Ácidos Orgânicos</i>					
Ácido Tartárico (g L ⁻¹)	0,89 ± 0,0001 ^{bc}	1,02 ± 0,03 ^{abc}	1,13 ± 0,07 ^{ac}	2,27 ± 0,13 ^d	1,21 ± 0,07 ^a
Ácido Málico (g L ⁻¹)	3,10 ± 0,02 ^f	3,13 ± 0,05 ^f	2,21 ± 0,05 ^{cd}	0,87 ± 0,02 ^b	1,83 ± 0,14 ^g
Ácido Lático (g L ⁻¹)	0,45 ± 0,09 ^{ab}	0,27 ± 0,04 ^b	0,54 ± 0,04 ^a	1,84 ± 0,33	0,86 ± 0,18 ^e
Ácido Succínico (g L ⁻¹)	0,84 ± 0,05 ^{abd}	0,29 ± 0,03 ^f	0,40 ± 0,01 ^{cf}	0,67 ± 0,03 ^{abc}	0,57 ± 0,07 ^{bc}
Ácido Cítrico (g L ⁻¹)	n.d.	0,30 ± 0,01 ^b	0,39 ± 0,03 ^c	n.d.	0,27 ± 0,01 ^a
Ácido Acético (g L ⁻¹)	0,29 ± 0,08 ^b	0,14 ± 0,03 ^d	0,36 ± 0,13 ^{ab}	0,32 ± 0,09 ^{ab}	0,14 ± 0,02 ^d
<i>Açúcares</i>					
Frutose (g L ⁻¹)	63,66 ± 1,39 ^{cde}	43,25 ± 1,96 ^{ab}	75,37 ± 2,71 ^c	70,67 ± 1,84 ^{ce}	74,02 ± 3,88 ^c
Glicose (g L ⁻¹)	49,31 ± 1,03 ^a	29,39 ± 1,07 ^b	84,58 ± 3,52 ^c	77,53 ± 1,00 ^c	52,64 ± 3,38 ^a
Relação G/F	0,77	0,68	1,12	1,10	0,71

Média ± desvio padrão das determinações realizadas em triplicata. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade de erro. SG = Serra Gaúcha; PC = Planalto Catarinense; RC = Região Carbonífera.

Glicose e frutose apresentam a mesma fórmula empírica ($C_6H_{12}O_6$), mas estruturas distintas, que determinam diferenças consideráveis em suas propriedades físico-químicas. Durante a fermentação do vinho, ambos os monossacarídeos são fermentados, no entanto, as leveduras possuem preferência pela glicose em relação à frutose, resultando em uma diferença no consumo de ambos os açúcares ao longo do processo de fermentação. Esta diferença no consumo resulta na predominância de frutose durante as últimas fases da fermentação. Como a frutose é aproximadamente duas vezes mais doce do que a glicose, implica em um aumento na sensação de doçura (TRONCHONI et al., 2009).

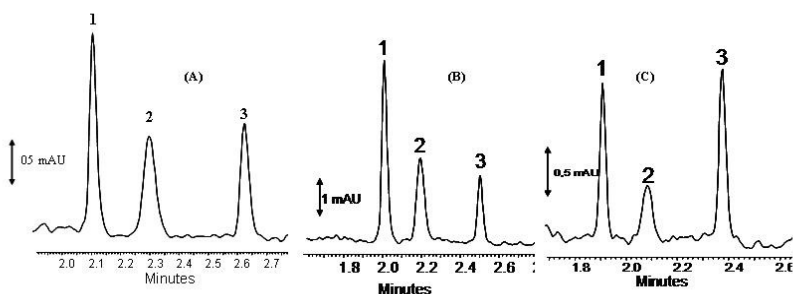


Figura 4.3 Perfil eletroforético dos padrões de açúcares (A), de uma amostra de vinho tinto fortificado (B) e de uma amostra de vinho branco fortificado (C). Identificação dos picos: 1 – frutose, 2 – glicose, 3 – fucose (PI). Condições eletroforéticas: capilar com 50 μm D.I. e comprimento de 40 cm (30 cm até o detector); eletrólito consistindo de 35 mmol L^{-1} NaOH, 10 mmol L^{-1} de ácido sórbico e 0,2 mmol L^{-1} CTAB; detecção indireta em 254 nm; voltagem de -30 kV.

Todas as amostras analisadas neste estudo apresentaram processo de vinificação semelhante, incluindo a parada de fermentação do mosto por adição de álcool vínico. O grau de doçura e as concentrações de glicose e frutose dos vinhos eram dependentes da etapa em que o álcool vínico é adicionado e da concentração de sacarose acrescida ao mosto. No Brasil, a chaptalização é uma prática permitida, especialmente em vinhos onde o propósito é obter maior grau de doçura.

Na Tabela 4.2 observam-se as diferenças nas concentrações de glicose e frutose das amostras analisadas. Em sete das onze amostras analisadas, a concentração de frutose foi maior do que de glicose. Resultados semelhantes foram descritos por Del Álamo et al. (2000) em

estudo sobre o conteúdo de monossacarídeos em vinhos espanhóis utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada, onde foram observados níveis de frutose de 16,0 a 50,6 g L⁻¹ e de glicose de 13,5 a 35,9 g L⁻¹.

A relação glicose/ frutose (G/ F) determina a doçura de um vinho e varia de acordo com a variedade da uva, a quantidade de sacarose adicionada ao mosto, o momento em que é realizada a chaptalização e o local de produção. Em climas frios, há uma tendência de se desenvolverem variedades de uvas com maior teor de frutose, enquanto em climas quentes, são obtidos maiores teores de glicose (AMERINE, 1956; DAUDT; SIMON, 2001). Em vinhos fortificados, a relação glicose/ frutose também pode estar relacionada com o momento em que se realiza a chaptalização e a fortificação. Se a chaptalização for efetuada após a adição do álcool vínico, a glicose adicionada ao vinho não será fermentada, proporcionando maior relação glicose/ frutose no produto final. Nas amostras analisadas (Tabela 4.2), verificaram-se as menores relações glicose/ frutose em vinhos fortificados produzidos nas regiões do Planalto Catarinense (0,63; 0,71 e 0,77), de clima frio e, Região Carbonífera (0,68), que apresentou a menor concentração de glicose observada neste estudo (29,39 g L⁻¹). Nas amostras que apresentaram relação glicose/ frutose superior a 1 (Tabela 4.2), há o indicativo de a chaptalização ter ocorrido após a etapa de fortificação, determinando maior concentração final de glicose do que de frutose.

4 CONCLUSÕES

Os métodos de eletroforese capilar utilizados neste trabalho mostraram-se de simples execução e podem ser usados como alternativa para a análise de vinhos fortificados não necessitando de pré-tratamento de amostra. O tempo de análise foi inferior a 0,7, 5 e 3 minutos, para a determinação de cátions inorgânicos, ácidos orgânicos e açúcares, respectivamente. As análises de vinhos fortificados produzidos no Sul do Brasil mostraram variações consideráveis nos níveis de concentração dos compostos estudados. Diferenças estatísticas entre as amostras analisadas foram observadas principalmente em função da região de produção e das práticas vitivinícolas empregadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁLVAREZ, M.; MORENO, I. M.; JOS, A. M.; CAMEÁN, A. M.; GONZÁLEZ, A. G. Study of mineral profile of Montilla-Moriles “fino” wines using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 391-395, 2007.

AMERINE, M. A. The maturation of wine grapes. **Wines and Vines**, v. 37, n.10, p. 27-32, 1956.

BERNAL, L. J.; DEL NOZAL, M. J.; TORIBIO, L.; DEL ÁLAMO, M. HPLC analysis of carbohydrates in wines and instant coffees using anion Exchange chromatography coupled to pulsed amperometric detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 507-511, 1996.

BIANCHI, F.; CARERI, M.; CORRADINI, C. Novel approach for the rapid determination of water-soluble organic acids in wine by co-electroosmotic flow capillary zone electrophoresis. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 898-904, 2005.

CASTIÑEIRA, A.; PEÑA, R. M.; HERRERO, C.; GARCÍA-MARTÍN, S. Simultaneous determination of organic acids in wine samples by capillary electrophoresis and UV detection: optimization with five different background electrolytes. **HCR – Journal of High Resolution Chromatography**, v. 23, p. 647-652, 2000.

CASTIÑEIRA, A.; PEÑA, R. M.; HERRERO, C.; GARCÍA-MARTÍN, S. Analysis of organic acids in wine by capillary electrophoresis with direct UV detection. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 319-331, 2002.

CATALDI, T. I.; NARDIELLO, D. Determination of free proline and monosaccharides in wine samples by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3737-3742, 2003.

- DAUDT, C. E.; SIMON, J. A. Um método rápido para análise de glicose em mostos e sua quantificação em algumas cultivares no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 31, p. 697-701, 2001.
- DE VILIERIS, A.; LYNEN, F.; CROUCH, A.; SANDRA, P. A robust capillary electrophoresis method for the determination of organic acids in wines. **European Food Research and Technology**, v. 217, p. 535-540, 2003.
- DEL ÁLAMO, M.; BERNAL, J. L.; DEL NOZAL, M. J.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. Red wine aging in oak barrels: evolution of the monossaccharides content. **Food Chemistry**, v. 71, p. 189 – 193, 2000.
- ESTEVES, V.; LIMA, S. S. F.; LIMA, D. L. D.; DUARTE, A. C. Using capillary electrophoresis for the determination of organic acids in Port wine. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 163-167, 2004.
- FABANI, M. P.; ARRÚA, R. C.; VÁSQUEZ, F.; DIAZ, M. P.; BARONI, M. V.; WUNDERLIN, D. A. Evaluation of elemental profile coupled to chemometrics to assess the geographical origin of Argentinean wines. **Food Chemistry**, v. 119, p. 372-379, 2010.
- GARCÍA-VIGUERA, C.; BAKKER, J.; BELLWORTHY, S. J.; READER, H. P.; WATKINS, S.; BRIDLE, P. The effect of some processing variables on non-coloured phenolic compounds in port wines. **Z Lebensm Unters Forsch**, v. 205, p. 321-324, 1997.
- GONZÁLVEZ, A.; LLORENS, A.; CERVERA, M. L.; ARMENTA, S.; DE LA GUARDIA, M. Elemental fingerprint of wines from the protected designation of origin Valencia. **Food Chemistry**, v. 112, p. 25-34, 2009.
- GORIUSHKINA, T. B.; SOLDATKIN, A. P.; DZYADEVYCH, S. V. Application of ampelometric biosensors for analysis of ethanol, glucose and lactate in wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6528-6535, 2009.
- HO, P.; HOGG, T. A.; SILVA, M. C. M. Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines. **Food Chemistry**, v. 64, p. 115-122, 1999.

JACKSON, R. S. **Wine Science – Principles, Practice, Perception**. 3^a ed. San Diego: Academic Press, 2008.

KELLY, L.; NELSON, R. J. Capillary zone electrophoresis of organic acids and anions. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 16 (9-10), p. 2103-2112, 1993.

KLAMPFL, C. W.; KATZMAYR, M. U.; BUCHBERGER, W. Separation of inorganic and organic anions by capillary zone electrophoresis with simultaneous indirect UV and conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 19, p. 2459-2464, 1998.

KRITSUNANKUL, O.; PRAMOTE, B.; JAKMUNEE, J. Flow injection on-line dialysis coupled to high performance liquid chromatography for the determination of some organic acids in wine. **Talanta**, v. 79, p. 1042-1049, 2009.

LEVI, V.; WEHR, T.; TALMADGE, K.; ZHU, M. Analysis of organic acids in wines by capillary electrophoresis and HPLC. **American Laboratory**, v. 25, p. 29-32, 1993.

MARDONES, C.; HITSCHFELD, A.; CONTRERAS, A.; LEPE, K. ; GUTOÉRREZ, L.; VON BAER, D. Comparison of shikimic acid determination by capillary zone electrophoresis with direct and indirect detection with liquid chromatography for varietal differentiation of red wines. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, p. 285-292, 2005.

MATO, I.; SUAREZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J. F. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. **Food Research International**, v. 38, p. 1175-1188, 2005.

MATO, I.; SUÁREZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J. F. Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection. **Food Chemistry**, v. 102, p. 104-112, 2007.

NUÑEZ, M.; PEÑA, R. M.; HERRERO, C.; GARCIA-MARTIN, S. Analysis of some metals in wine by means of capillary electrophoresis. Application to the differentiation of Ribeira Sacra Spanish red wines. **Analisis**, v. 28, p. 432-437, 2000.

O'FLAHERTY, B.; YANG, W. P.; SENGUPTA, S.; CHOLLI, A. L. Fast detection of anionic components in sugar and wine samples using a novel device based on capillary zone electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 74, p. 111-118, 2001.

PANEQUE, P.; ÁLVAREZ-SOTOMAYOR, M. T.; CLAVIJO, A.; GÓMEZ, I. A. Metal content in southern Spain wines and their classification according to origin and ageing. **Microchemical Journal**, v. 94, p. 175-179, 2010.

PANEQUE, P.; ÁLVAREZ-SOTOMAYOR, M. T.; GÓMEZ, I. A. Metal contents in "oloroso" Sherry wines and their classification according to provenance. **Food Chemistry**, v. 117, p. 302 – 305, 2009.

PERES, R. G.; MORAES, E. P.; MICKE, G. A.; TONIN, F. G.; TAVARES, M. F. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Food Control**, v. 20, p. 548-552, 2009.

RIBÉREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.; SUDRAUD, P. ; RIBÉREAU-GAYON, P. **Sciences et Techniques du Vin**. Tome 1 – Analyse et contrôle des vins. 2 édition. Dunod : Paris, 1982.

RIBÉREAU-GAYON, P. ; GLORIES, Y. ; MAUJEAN, A. ; DUBOURDIEU, D. **Traité d'Oenologie 2**. Chimie du vin. Stabilisation et traitements. Dunod: Paris, 1998.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Handbook of Enology**. Volume 2. 2ª edição. The chemistry of wine: stabilization and treatments. John Wiley & Sons Ltd, 2006. 450 p.

RIZZON, L. A.; SALVADOR, M. B. G.; MIELE, A. Teores de cátions dos vinhos da Serra Gaúcha. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28 (3); p. 635-641, jul.-set. 2008.

RIZZON, L. A.; SGANZERLA, V. M. A. Ácidos tartárico e málico no mosto de uva em Bento Gonçalves – RS. **Ciência Rural**, v. 37, p. 911-914, mai-jun 2007.

SAAVEDRA, L.; BARBAS, C. Validated capillary electrophoresis method for small-anions measurement in wines. **Electrophoresis**, v. 24, p. 2235-2243, 2003.

SANTALAD, A.; TEERAPORNCHASIT, P.; BURAKHAM, R.; SRIJARANAI, S. Capillary zone electrophoresis of organic acids in beverages. **LWT Food Science and Technology**, v. 40, p. 1741-1746, 2007.

SING FUNG, Y.; MAN LAU, K. Analysis of organic acids and inorganic anions in beverage drinks by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 24, p. 3224-3232, 2003.

SOGA, T.; SERWE, M. Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Food Chemistry**, v. 69, p. 339-344, 2000.

SUÁREZ-LUQUE, S.; MATO, I.; HUIDOBRO, J. F.; SIMAL-LOZANO, J. Rapid capillary zone electrophoresis method for the determination of metal cations in beverages. **Talanta**, v. 68, p. 1143-1147, 2006.

STATHAKIS, C.; CASSIDY, R. M. Effect of electrolyte composition in the capillary electrophoresis separation of inorganic/ organic anions in the presence of cationic polymers. **Journal of Chromatography A**, v. 699, p. 353-361, 1995.

TANG, A. N.; JIANG, D. Q.; YAN, X. P. Cloud point extraction preconcentration for capillary electrophoresis of metal ions. **Analytica Chimica Acta**, v. 507, p. 199-204, 2004.

TANG, Y.; WU, M. The simultaneous separation and determination of five organic acids in food by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 103, p. 243-248, 2007.

TRONCHONI, J.; GAMERO, A.; ARROYO-LÓPEZ, F. N.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, p. 237-243, 2009.

VARANDAS, S.; TEIXEIRA, M. J.; MARQUES, J. C.; AGUIAR, A.; ALVES, A.; BASTOS, M. M. S. M. Glucose and fructose levels on grape skin: interference in *Lobesia botrana* behaviour. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 351-355, 2004.

ZHENG, Y. J.; DUAN, Y. T.; ZHANG, Y. F.; PAN, Q. H.; LI, J. M., HUANG, W. D. Determination of organic acids in red wine and must on only one RP-LC-Column directly after sample dilution and filtration. **Chromatographia**, v. 69, p. 1-5, 2009.

CAPÍTULO 5

COMPOSIÇÃO DE MINERAIS, ÁLCOOIS SUPERIORES E ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO DE VINHOS FORTIFICADOS PRODUZIDOS EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

COMPOSIÇÃO DE MINERAIS, ÁLCOOIS SUPERIORES E ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO DE VINHOS FORTIFICADOS PRODUZIDOS EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

RESUMO

Amostras de vinhos fortificados brancos e tintos produzidas em três regiões vitivinícolas do Brasil foram analisadas para determinação da composição dos minerais Al, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Cd, Tl, Zn, Na, K, Ca, Mg; quantificação dos álcoois superiores etanal, acetato de etila, metanol, isobutanol e álcoois isoamílicos e; enumeração da razão de isótopos estáveis de carbono. Os minerais foram analisados por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado e eletroforese capilar de zona, os álcoois superiores por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama e a razão de isótopos estáveis de carbono por espectrometria de massa para razões isotópicas. As determinações analíticas evidenciaram diferenças entre as amostras de vinhos fortificados produzidas em diferentes regiões do Brasil: vinhos da região da Serra Gaúcha caracterizaram-se por maior conteúdo de alumínio, ferro, cobre, chumbo, níquel, zinco, cádmio, tálio, potássio, cálcio, magnésio e sódio; vinhos do Planalto Catarinense destacaram-se quanto ao maior conteúdo de álcoois isoamílicos, isobutanol, cobalto e manganês; vinhos da Região Carbonífera apresentaram a razão de isótopos estáveis de carbono menos negativa e maior concentração de etanal; a amostra de referência, proveniente da Região do Douro – Portugal caracterizou-se por maior conteúdo de níquel. A combinação dos resultados das variáveis analíticas e de estatística multivariada evidenciou as características das amostras provenientes de diferentes regiões do Brasil

Palavras-chave: minerais; álcoois superiores; razão de isótopos estáveis de carbono; vinhos fortificados.

COMPOSITION OF MINERALS, HIGHER ALCOHOLS AND STABLE CARBON ISOTOPE OF FORTIFIED WINES PRODUCED IN DIFFERENT REGIONS OF BRAZIL

ABSTRACT

Samples of white and red fortified wines produced in three wine-producing regions of Brazil were analyzed to determine the mineral composition of Al, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Cd, Tl, Zn, Na, K, Ca, Mg; measurement of higher alcohols ethanal, ethyl acetate, methanol, isobutanol and isoamyl alcohol; and enumeration of the stable carbon isotope ratio. The minerals were analyzed by inductively coupled plasma-mass spectrometry and capillary electrophoresis, the higher alcohols by gaseous chromatography with flame ionization detector and the stable carbon isotope ratio by isotope ratio mass spectrometer. The quantitative analysis revealed differences between the samples of fortified wines produced in different regions of Brazil: wines of the region of Serra Gaúcha characterized by higher content of aluminum, iron, copper, lead, nickel, zinc, cadmium, thallium, potassium, calcium, magnesium and sodium; wines from Planalto Catarinense stood out as the highest content of isoamyl alcohols, isobutanol, cobalt and manganese; wines from Carbonífera region showed the stable carbon isotope ratio less negative and higher concentration of ethanal; the reference sample, from the Douro – Portugal was characterized by higher nickel content. Combining the results of analytical variables and multivariate analysis showed the characteristics of samples from different regions of Brazil.

Keywords: minerals; higher alcohols; stable carbon isotope ratio; fortified wines.

1 INTRODUÇÃO

Vinhos fortificados são vinhos parcialmente fermentados cujo processo de vinificação inclui a parada de fermentação do mosto por adição de álcool vínico quando aproximadamente metade dos açúcares originais foram convertidos em álcool (GARCÍA-VIGUERA et al., 1997; ESTEVES et al., 2004). No Brasil, é permitida a adição de açúcar durante a fermentação do mosto com o objetivo de aumentar o conteúdo de etanol em até 3 %, ou também, após a fermentação, até o máximo de 10 % sobre o volume final do produto, a fim de adoçar o vinho licoroso fortificado de acordo com o grau de doçura requerido (BRASIL, 1988).

Dos compostos importantes na caracterização e diferenciação de vinhos fortificados destacam-se os minerais, os compostos voláteis e a razão de isótopos estáveis de carbono. A composição mineral dos vinhos fornece informações sobre sua origem e autenticidade (CATARINO; CURVELO-GARCIA; BRUNO DE SOUSA, 2008; IBANEZ et al., 2008; PANEQUE et al., 2010), pois é resultante de vários fatores como, por exemplo, a variedade de uva, características do solo e solubilidade dos compostos inorgânicos nele presentes, condições ambientais, práticas agrícolas, mudanças climáticas e processo de vinificação (COETZEE et al., 2005; ALVAREZ et al., 2007a; GALGANO et al., 2008; GRINDLAY et al., 2008; MORENO et al., 2008; FABANI et al., 2010).

Do ponto de vista toxicológico o vinho é importante como fonte de alguns elementos na dieta, inclusive de elementos que podem ser prejudiciais para seres humanos se consumidos em níveis elevados e, outros que podem ter impacto determinante nas propriedades sensoriais finais do vinho, com influência na cor, limpidez, gosto e aroma (CATARINO; CURVELO-GARCIA; BRUNO DE SOUSA, 2008; GRINDLAY et al., 2008). Uma das técnicas mais versáteis de análise multielementar é a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado - ICP-MS, que se destaca por seus baixos limites de detecção (COETZEE et al., 2005; GALGANO et al., 2008), seletividade e sensibilidade (ALMEIDA; VASCONCELOS, 2002; CATARINO; CURVELO-GARCIA; BRUNO DE SOUSA, 2008), rapidez e precisão para determinação de elementos-traço e oligoelementos em uma mesma amostra (GONZÁLVEZ et al., 2009).

O aroma do vinho depende de fatores como a variedade da uva, região de produção, condições climáticas, práticas vitivinícolas, processo de envelhecimento, entre outros (GIL et al., 2006). A maioria dos compostos aromáticos do vinho é produzida durante a fermentação.

Os álcoois superiores representam mais da metade dos compostos voláteis, sendo que a outra metade está distribuída entre os compostos minoritários presentes em quantidades muito baixas (REGODÓN MATEOS; PÉREZ-NEVADO; RAMÍREZ FERNÁNDEZ, 2006; JACKSON, 2008). Os álcoois superiores, quando presentes em concentrações baixas acrescentam notas de complexidade ao aroma, em concentrações mais elevadas, seus odores são dominantes e pungentes (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; JACKSON, 2008). A produção de álcoois superiores é influenciada pelas leveduras, pH, conteúdo e fontes de nitrogênio e açúcares, temperatura e quantidade de oxigênio durante a fermentação (DÍAZ et al., 2003). A chaptalização e o processo de prensagem tendem a aumentar a síntese de álcoois superiores (JACKSON, 2008). A principal técnica analítica empregada para a determinação de álcoois superiores é a cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama (GC-FID). O preparo de amostra, indispensável ao analisar vinhos fortificados, geralmente consiste de simultânea destilação/ extração (GIL et al., 2006).

A razão de isótopos estáveis de carbono é usada para determinar a presença de açúcar e álcool derivados da cana-de-açúcar em bebidas como o vinho, sendo aplicada para controle da autenticidade e denominação de origem (GIMENEZ-MIRALLES; SALAZAR; SOLANAS, 1999; OGRINC et al., 2001; MARTINELLI et al., 2003; BAUDLER et al., 2006; VERSINI et al., 2006; CABAÑERO; RECIO; RUPÉREZ, 2008). O método é baseado no fato de que as plantas podem apresentar duas vias principais de fotossíntese (C_3 e C_4). A cana-de-açúcar tem via fotossintética C_4 (Hatch-Slack), com a primeira molécula orgânica formada após a absorção do CO_2 atmosférico composta por quatro moléculas de carbono. Por outro lado, a uva apresenta via fotossintética C_3 (Ciclo de Calvin), em que a primeira molécula orgânica formada após a absorção de CO_2 é composta de três átomos de carbono. A razão de isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}C$) de plantas C_4 e C_3 é diferente, com valores de $\delta^{13}C$ para plantas C_4 variando de -9 a -15‰ e para plantas C_3 variando de -23 a -32‰. (PISSINATTO et al., 1999; MARTINELLI et al., 2003; CABAÑERO; SAN-HIPÓLITO; RUPÉREZ, 2007).

A razão de isótopos estáveis é definida como a quantidade relativa de duas formas de isótopos do mesmo elemento em uma determinada amostra e fornece informações sobre o clima, distância do mar, altitude, latitude e práticas vitivinícolas, por isso, pode ser usada para determinar a origem de produtos alimentícios e revelar se algum composto foi substituído por outra molécula quimicamente idêntica

(ALBERTINO et al., 2009; RUMMEL et al., 2010). As razões isotópicas podem ser medidas por espectrometria de massa para razões isotópicas – IRMS (KOSIR et al., 2001; BAUDLER et al., 2006; CABAÑERO; RECIO; RUPÉREZ, 2008; CALDERONE; GUILLOU, 2008; ALBERTINO et al., 2009) onde os compostos não são analisados diretamente, mas a partir dos gases produzidos por reações de combustão, pirólise ou de equilíbrio isotópico (BRAND, 1996).

O objetivo do presente estudo foi determinar a composição mineral, dosar os principais álcoois superiores e investigar a variação na razão de isótopos de carbono em vinhos fortificados produzidos em diferentes regiões do Brasil. A combinação de métodos analíticos e estatística multivariada foi aplicada para caracterizar as amostras de vinhos fortificados de três diferentes regiões vitivinícolas do Brasil de acordo com sua composição.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

Doze amostras comerciais de vinhos fortificados brancos e tintos foram analisadas. As amostras foram produzidas em três diferentes regiões vitivinícolas do Brasil, a partir de variedades de uvas distintas: uvas tintas (1, 2, 3) Cabernet Sauvignon/ Merlot, provenientes da Serra Gaúcha; (4) Cabernet Sauvignon/ Merlot, Planalto Catarinense; (5, 6) Cabernet Sauvignon/ Tannat, Serra Gaúcha; (7) Touriga Nacional, Planalto Catarinense; e uvas brancas (8) Goethe, Região Carbonífera; (9, 10) Moscato Giallo, Serra Gaúcha; (11) Moscato Giallo, Planalto Catarinense. Amostra de vinho tinto do Porto categoria Vintage, proveniente da Região Demarcada do Douro, foi utilizada como amostra de referência (12), por recomendação da Confraria do Vinho do Porto.

2.2 REAGENTES

Todos os reagentes empregados eram de grau analítico. A água utilizada foi destilada e posteriormente deionizada a uma resistividade de 18,2 M Ω cm em um sistema Milli-Q Millipore (Bedford, MA, EUA). Ácido nítrico (Carlo Erba, Milão, Itália) foi bidestilado abaixo do seu ponto de ebulição em um destilador de quartzo da *Kürner Analysetechnik* (Rosenheim, Alemanha). Foram utilizadas soluções estoque multielementar ICP IV (Merck, Darmstadt, Alemanha) e como padrão interno foi utilizada uma solução estoque de Rh 1000 mg L⁻¹

(Merck). Os padrões de etanal e dos álcoois superiores acetato de etila, metanol, isobutanol (2-metil-1-propanol) e álcoois isoamílicos (2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol) e do padrão interno 4-metil-2-pentanol foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany).

2.3 METODOLOGIAS

2.3.1 Determinação de Elementos Mineiras por ICP-MS

As medidas foram realizadas em um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado, modelo Elan 6000 (Perkin Elmer-Sciex, Thornhill, ON, Canadá), utilizando nebulização pneumática com nebulizador de fluxo cruzado (Perkin Elmer). O argônio utilizado foi de 99,996 % de pureza (White Martins, São Paulo, SP, Brasil). O instrumento foi otimizado (*daily performance*) para máxima sensibilidade para íons M^+ e a dupla ionização e os óxidos foram monitorados através das razões entre Ba^{2+}/Ba^+ e Ce^+/CeO^+ , respectivamente, sendo estas sempre menores que 3%.

A calibração foi realizada utilizando solução multielementar ICP VI e Rh na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ foi utilizado como padrão interno. As amostras de vinho fortificado foram diluídas dez vezes em água bidestilada, conforme procedimento descrito por Goossens et al. (1993), e introduzidas diretamente no ICP-MS onde foram determinados, conforme metodologia de Catarino, Curvelo-García e Sousa (2006), os seguintes elementos: Alumínio (Al), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Níquel (Ni), Chumbo (Pb), Cádmio (Cd), Tálcio (Tl) e Zinco (Zn).

As determinações de sódio (Na), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) foram realizadas por eletroforese capilar de zona, conforme metodologia descrita no Capítulo 4. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

2.3.2 - Determinação de Etanal e Álcoois Superiores por CG-FID

O pré-tratamento das amostras de vinho fortificado consistiu de destilação a vapor em destilador eletrônico Gibertini modelo D.E.E. (Gibertini, Novate Milanese, Itália). Posteriormente, $100 \mu\text{L}$ de 4-metil-2-pentanol foi adicionado a 5 mL do destilado, como padrão interno. Alíquotas de $1 \mu\text{L}$ foram injetadas no cromatógrafo gasoso Varian Star 3400 CX com detector FID (Varian, Palo Alto, USA). A coluna era da Varian ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$ diâmetro interno, $0,25 \mu\text{m}$), operada a

temperatura inicial de 40 °C, aumentando gradativamente 5 °C por minuto até 200 °C. Temperatura do injetor era de 220 °C e do detector 250 °C, utilizando hidrogênio a 1 mL min⁻¹ como gás carreador. A identificação e quantificação de etanal e dos alcoóis superiores acetato de etila, metanol, isobutanol (2-metil-1-propanol) e álcoois isoamílicos (2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol) foram efetuadas usando os padrões de cada composto. As curvas de calibração foram elaboradas para cada padrão em quatro diferentes concentrações e os coeficientes de regressão obtidos foram > 0,99. Os padrões foram preparados em solução de vinho sintético (5 g L⁻¹ de ácido tartárico, dissolvido em 18 % e solução de etanol (v/v), a pH 3,5 ajustado com NaOH 1N). As análises foram realizadas em triplicata.

2.3.3 Determinação da Razão de Isótopos Estáveis de Carbono por IRMS

As medidas de razão de isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) em etanol foram realizadas usando um espectrômetro de massa de razão isotópica Thermo Electron Finnigan-MAT modelo Delta^{Plus} XL (Bremen, Germany) acoplado a um analisador elementar Flash EA 1112, constituído de fornos de oxidação e redução, dessecante de perclorato de magnésio ($\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$) e coluna de separação cromatográfica Porapack Q (25 m x 0,32 mm diâmetro interno). Foi utilizada a metodologia analítica descrita na Instrução Normativa n.º 4 de 05/02/2001, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2001). A amostra (1,5 mL) foi destilada sob ação criogênica a -196 °C e sob vácuo (10^{-2} mbar) durante aproximadamente 25 minutos e, posteriormente, 100 μL do destilado foram empacotados em cápsula de estanho puro. O carbono da amostra sofreu combustão no interior do analisador elementar a 950 °C, sob fluxo contínuo de oxigênio a 1 mL min⁻¹. Os gases gerados passaram por uma coluna de redução contendo cobre reduzido a 680 °C e, após retenção de água, foram separados por coluna cromatográfica a temperatura de 43 °C, antes de chegar na fonte de íons do espectrômetro. O espectrômetro de massa contém um coletor triplo de íons com o objetivo de medir simultaneamente as relações massa/carga (m/z), correspondentes às massas 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$), 45 ($^{13}\text{C}^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{12}\text{C}_2^{17}\text{O}$) e 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$) do CO_2 formados pela combustão das amostras.

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ das amostras foram obtidos em relação ao padrão internacional PDB (Fóssil Bellemitella Americana, da

Formação Pee Dee do Sul da Carolina, USA), expressos em per mil (‰) e calculados segundo a Equação 1

$$\delta^{13}C = \left(\frac{R_{amostra} - R_{padrão}}{R_{padrão}} \right) \times 1000 \quad (1)$$

onde R é a razão de isótopos estáveis $^{13}C/^{12}C$. As amostras foram analisadas em triplicata e o desvio padrão para análise foi inferior ou igual a 0,2 ‰.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na primeira etapa de análise dos dados foram aplicados análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey para determinar as diferenças significativas entre as amostras, ao nível de significância $p < 0,05$. Posteriormente, os dados analíticos foram processados usando técnicas multivariadas, como análise de componentes principais e análise discriminante canônica. Todos os procedimentos estatísticos foram computados usando o Software Statistica 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As regiões vitivinícolas brasileiras apresentam variação de altitude e quanto às características edafoclimáticas. A Região do Planalto Catarinense caracteriza-se por apresentar clima frio (índice heliotérmico = 1714), úmido (índice de seca = 200) e noites frias (índice de frio noturno = 12,1), segundo dados obtidos através do sistema de Classificação Climática Multicritério Geovíticola, elaborado por Tonietto e Carbonneau (2004), apresentados na Tabela 5.1. A temperatura média anual é de 13 °C e a média histórica de precipitação, registrada entre 1956 e 2003, está entre 1300 a 1900 mm (BRIGHENTI; TONIETTO, 2004). A Serra Gaúcha, com altitude média de 640 m acima do nível do mar, apresenta média de precipitação anual de 1.700 mm, temperatura média anual de 17,2 °C e umidade relativa do ar 76 % (PROTAS; CAMARGO; MELO, 2008). É classificada como região temperada quente (índice heliotérmico = 2,361), úmida (índice de seca = 200) e de noites temperadas (índice de frio noturno = 16,1) (EMBRAPA UVA E VINHO; UFRGS; FEPAGRO, 2004). A Região Carbonífera,

com altitude média de 50 m, apresenta temperatura média anual de 19,4 °C, precipitação pluviométrica anual de 1.619 mm e 1.883 horas anuais de sol (TONIETTO; MANDELLI, 2003). É classificada como região quente/ temperado quente, segundo o Sistema de Classificação Climática Multicritério Geovíticola (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 Localização geográfica e índices climáticos geovítcolas das regiões da Serra Gaúcha, Planalto Catarinense e Região Carbonífera.

	Serra Gaúcha	Planalto Catarinense	Região Carbonífera
Latitude	29°09'S	28°17'S	28°28'S
Longitude	51°32'S	49°55'S	49°11'S
Altitude Média	640 m	1415 m	50 m
Índice Heliotérmico	Temperado Quente	Frio	Quente/ Temperado quente
Índice de Frio Noturno	Noites Temperadas	Noites Frias	-
Índice de Seca	Úmido	Úmido	-

Fonte: BRIGHENTI; TONIETTO, 2004; EMBRAPA UVA E VINHO; UFRGS; FEPAGRO, 2004; TONIETTO; CARBONNEAU, 2004; BONA-SARTOR, 2009

3.1 COMPOSIÇÃO MINERAL

Os resultados das análises de minerais são mostrados na Tabela 5.2. ANOVA e Teste de Tukey evidenciaram diferenças estatísticas entre as amostras analisadas, ao nível de 95 % de confiança, quanto às concentrações de Al, Mn, Fe, Co, Cu, Pb, Ni, Zn, Cd, Tl, Na, K e Mg.

O alumínio possui a capacidade de se combinar com ácidos orgânicos, o que o torna mais biodisponível. A sua presença no vinho está associada à utilização de pesticidas, contato com superfícies de alumínio e alguns produtos enológicos como bentonitas, taninos e adjuvantes de filtração (RIBÉREAU-GAYON et al., 1982; CATARINO; CURVELO-GARCIA; BRUNO DE SOUSA, 2008). Foram observados teores de 84 a 1086 $\mu\text{g L}^{-1}$ de alumínio nas amostras analisadas. Paneque et al. (2010) encontraram concentrações de 260 a 3460 $\mu\text{g L}^{-1}$ de alumínio e, Alvarez-Sotomayor; Gómez (2009)

detectaram valores no intervalo de 900 a 5070 $\mu\text{g L}^{-1}$ do mesmo elemento em vinhos fortificados espanhóis.

A concentração de manganês variou de 678 a 2890 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo o menor valor correspondente à amostra de vinho branco Goethe da Região Carbonífera e o maior, relativo ao vinho branco fortificado de Moscato Giallo produzido no Planalto Catarinense. Rizzon, Salvador e Miele (2008) encontraram concentração média de 2500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de manganês em vinhos brasileiros. Álvarez et al. (2007b) obtiveram valores de 130 a 1970 $\mu\text{g L}^{-1}$, Paneque; Alvarez-Sotomayor; Gómez (2009), intervalos de 670 a 2120 $\mu\text{g L}^{-1}$ e Paneque et al. (2010), concentrações de 430 a 2560 $\mu\text{g L}^{-1}$, em vinhos fortificados produzidos no Sul da Espanha. O teor de manganês é característico do solo de proveniência (MARENGO; ACETO, 2003; KMENT et al., 2005; ÁLVAREZ et al., 2007a) e, está associado à utilização de produtos fitossanitários contendo sais de manganês, conservação em recipientes de aço inoxidável, uso de bentonitas e enzimas pectolíticas (ÁLVAREZ et al., 2007a; CATARINO; CURVELO-GARCIA; BRUNO DE SOUSA, 2008; RIZZON; SALVADOR; MIELE, 2008; FABANI et al., 2010).

A presença de ferro no vinho está relacionada com a natureza do solo, diferentes equipamentos utilizados nos processos de vinificação, incluindo alguns aditivos tecnológicos (KMENT et al., 2005; CATARINO; CURVELO-GARCIA; BRUNO DE SOUSA, 2008; RIZZON; SALVADOR; MIELE, 2008). Este elemento desempenha um importante papel nos fenômenos de oxidação e de envelhecimento e, sua concentração está relacionada com a estabilidade do vinho (CATARINO; CURVELO-GARCIA; BRUNO DE SOUSA, 2008). O conteúdo de ferro dos vinhos analisados variou de 192 a 3335 $\mu\text{g L}^{-1}$. Ao estudarem a composição mineral de vinhos fortificados espanhóis, Alvarez et al. (2007b) detectaram concentrações de 690 a 8300 $\mu\text{g L}^{-1}$; Paneque; Alvarez-Sotomayor; Gómez (2009) determinaram conteúdos de 1400 a 8430 $\mu\text{g L}^{-1}$ e, Paneque et al. (2010) encontraram valores de 1070 a 12800 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ferro. Rizzon, Salvador e Miele (2008) obtiveram conteúdo médio de 5100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ferro em vinhos brasileiros.

Cobalto e níquel geralmente estão presentes em baixas concentrações e, são provenientes do contato do mosto e do vinho com equipamentos de aço inoxidável (KMENT et al., 2005), do uso de bentonitas, de produtos fitossanitários aplicados nos vinhedos e da contaminação atmosférica (CATARINO; CURVELO-GARCIA; BRUNO DE SOUSA, 2008). Níquel foi detectado na faixa de 6,47 a

42,19 $\mu\text{g L}^{-1}$ e, para cobalto, foram determinadas concentrações de 1,17 a 7,98 $\mu\text{g L}^{-1}$. A legislação brasileira (BRASIL, 1965) determina limite máximo de tolerância de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de níquel em bebidas alcoólicas fermentadas.

O conteúdo de cobre dos vinhos analisados variou de 37,38 a 1396 $\mu\text{g L}^{-1}$. A maior concentração foi observada em vinho branco Moscato Giallo produzido na Serra Gaúcha (amostra 9) e, a menor em vinho branco Moscato Giallo do Planalto Catarinense (amostra 11). A legislação brasileira (BRASIL, 1965) determina limite máximo de tolerância de 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre em bebidas alcoólicas fermentadas. Dugo et al. (2005) em pesquisa sobre a composição de ânions inorgânicos e metais pesados em vinhos fortificados italianos, determinaram concentrações médias de cobre de 600 a 900 $\mu\text{g L}^{-1}$. Rizzon, Salvador e Miele (2008) detectaram conteúdo médio de 640 $\mu\text{g L}^{-1}$ em vinhos brasileiros. O cobre é um importante constituinte do mosto, necessário para a fermentação como fator de crescimento para as leveduras (RIZZON; SALVADOR; MIELE, 2008). No mosto, o cobre pode ter origem dos tratamentos fitossanitários efetuados no vinhedo (KMENT et al., 2005; ÁLVAREZ et al., 2007a; CATARINO; CURVELO-GARCIA; BRUNO DE SOUSA, 2008; RIZZON; SALVADOR; MIELE, 2008), ou pode ser naturalmente oriundo do solo (MARENCO; ACETO, 2003). Durante a conservação, o seu teor pode aumentar por contato do vinho com materiais de cobre e, nos vinhos fortificados, através do álcool vínico adicionado (CATARINO; CURVELO-GARCIA; BRUNO DE SOUSA, 2008).

Uma das principais origens do chumbo no vinho é a poluição atmosférica, sendo que já foi comprovada a relação entre o teor de chumbo das uvas com a proximidade de vias rodoviárias (CATARINO; CURVELO-GARCIA; BRUNO DE SOUSA, 2008). Foram encontrados teores de chumbo de 3,38 a 49,36 $\mu\text{g L}^{-1}$. A legislação brasileira (BRASIL, 1965) determina limite máximo de tolerância de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de chumbo em bebidas alcoólicas fermentadas. Dugo et al. (2005) determinaram concentrações de 18,70 a 169,30 $\mu\text{g L}^{-1}$ de chumbo em vinhos fortificados produzidos na Itália.

O zinco é um constituinte natural da uva, do mosto e do vinho, presente sempre em pequenas quantidades. Um possível aumento no teor de zinco pode ser provocado pelo contato com materiais à base de ligas metálicas, aplicação de fungicidas nos vinhedos, e utilização de produtos enológicos que contenham zinco em sua composição. Vinhos de maceração mais prolongada apresentam concentração mais elevada de zinco (MARENCO; ACETO, 2003; ÁLVAREZ et al., 2007a;

CATARINO; CURVELO-GARCIA; BRUNO DE SOUSA, 2008; RIZZON; SALVADOR; MIELE, 2008). As amostras analisadas apresentaram concentrações de 287 a 1721 $\mu\text{g L}^{-1}$ de zinco, observadas nas amostras Goethe proveniente da Região Carbonífera (amostra 8) e Moscato Giallo da Serra Gaúcha (amostra 10), respectivamente. A legislação brasileira (BRASIL, 1965) determina limite máximo de tolerância de 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de zinco em bebidas alcoólicas fermentadas. Dugo et al. (2005) encontraram valores de 400 a 3100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de zinco em vinhos fortificados italianos. Rizzon, Salvador e Miele (2008) obtiveram conteúdo médio de 1070 $\mu\text{g L}^{-1}$ em vinhos brasileiros.

A maior concentração de cádmio (1,56 $\mu\text{g L}^{-1}$) foi observada na amostra produzida na Serra Gaúcha a partir de uvas Cabernet Sauvignon/ Merlot (amostra 1). Dugo et al. (2005) determinaram cádmio em vinhos fortificados italianos e encontraram valores de 2 a 12,4 $\mu\text{g L}^{-1}$. Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 1965) o limite máximo de tolerância para cádmio em bebidas alcoólicas fermentadas é de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. A presença deste elemento no vinho está associada com a poluição atmosférica, a produtos fitossanitários e ao contato com materiais de aço inoxidável (CATARINO; CURVELO-GARCIA; BRUNO DE SOUSA, 2008).

Os teores de tálio em vinhos não contaminados são normalmente da ordem de 2 a 8 $\mu\text{g L}^{-1}$ e tem origem dos solos e adubos (CATARINO; CURVELO-GARCIA; BRUNO DE SOUSA, 2008). O maior conteúdo de tálio foi determinado na amostra 1 (2,19 $\mu\text{g L}^{-1}$).

O conteúdo sódio dos vinhos está relacionado com a origem geográfica e com a adição de produtos enológicos (RIBÉREAU-GAYON et al., 1998; RIZZON; SALVADOR; MIELE, 2008). Nos vinhos analisados foram detectadas concentrações na faixa de 4,8 mg L^{-1} a 97,9 mg L^{-1} , respectivamente nas amostras Cabernet Sauvignon/ Merlot do Planalto Catarinense (amostra 4) e Moscato Giallo da Serra Gaúcha (amostra 10).

O potássio foi encontrando nos vinhos analisados em concentrações que variaram de 759,2 a 1656 mg L^{-1} , sendo a menor concentração observada na amostra de vinho branco da variedade Moscato Giallo produzida na Serra Gaúcha (amostra 9) e, a maior na amostra de vinho tinto Cabernet Sauvignon/ Tannat produzida na Serra Gaúcha (amostra 5). O teor de potássio é mais elevado nos vinhos tintos devido ao processo de maceração da casca empregado na elaboração desses vinhos (RIZZON; SALVADOR; MIELE, 2008).

A concentração de cálcio dos vinhos está relacionada principalmente com as técnicas de vinificação (RIBÉREAU-GAYON et

al., 1998; RIZZON; SALVADOR; MIELE, 2008). Nos vinhos analisados foram determinados valores de 43,0 a 316,7 mg L⁻¹, sendo que a menor concentração de cálcio foi observada na amostra de vinho fortificado Touriga Nacional do Planalto Catarinense (amostra 7) e, a maior na amostra de Moscato Giallo da Serra Gaúcha (amostra 10).

Nos vinhos analisados foram encontrados níveis de magnésio de 78,0 mg L⁻¹ na amostra Goethe da Região Carbonífera (amostra 8) a 370,2 mg L⁻¹ na amostra Moscato Giallo da Serra Gaúcha (amostra 10). O magnésio contribui para a caracterização da tipicidade, participa da estabilidade, dos aspectos sensoriais e até mesmo de determinadas alterações do vinho. É um elemento importante para a multiplicação e metabolismo das leveduras (RIZZON; SALVADOR; MIELE, 2008).

3.2 ÁLCOOIS SUPERIORES E ETANAL

A composição aromática dos vinhos é resultado do metabolismo das leveduras e da extração de alguns compostos das uvas e da madeira pelo etanol (ZEA; MORENO; MEDINA, 1995; ZEA et al., 1996). Os álcoois superiores são os compostos voláteis mais abundantemente estudados; eles são formados pelas leveduras, ou diretamente a partir de açúcares e aminoácidos do mosto, pela Reação de Ehrlich (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

O etanal é o principal aldeído formado durante a vinificação e sua concentração no vinho depende diretamente da quantidade de dióxido de enxofre e de etanol, com os quais se combina para formar acetais. Somente o etanal livre tem aroma significativo; em baixos níveis contribui para os aromas frutados, enquanto altas concentrações (> 200 mg L⁻¹) conferem aroma reduzido ao vinho. O excesso de etanal pode ser devido ao ácido acético da atividade bacteriana e/ou do processo oxidativo e, pode estar relacionado com problemas de conservação dos vinhos (GIL et al., 2006; REGODÓN MATEOS; PÉREZ-NEVADO; RAMÍREZ FERNÁNDEZ, 2006). As amostras analisadas apresentaram concentrações de etanal variáveis de 43,70 a 194,95 mg L⁻¹. Zea et al. (2001) determinaram concentrações de 126 a 545 mg L⁻¹ e, Moreno et al. (2005) observaram valores de 91,0 a 257,0 mg L⁻¹ de etanal em vinhos fortificados produzidos na Espanha.

Acetato de etila é produzido pela esterificação enzimática do ácido acético e do etanol. Concentrações maiores de 150-200 mg L⁻¹ são consideradas negativas para o aroma dos vinhos (REGODÓN MATEOS; PÉREZ-NEVADO; RAMÍREZ FERNÁNDEZ, 2006). Concentrações elevadas de acetato de etila estão normalmente

associadas à contaminação da uva, mosto ou vinho por bactérias acéticas, indicando a existência de más práticas no processo de vinificação e/ou conservação (GIL et al., 2006). Nas amostras analisadas foram observados valores de 10,49 a 240,30 mg L⁻¹, sendo o maior conteúdo de acetato de etila referente a amostra 1 (Cabernet Sauvignon/Merlot Serra Gaúcha). Zea et al. (2001) obtiveram conteúdo de 13,9 a 183,0 mg L⁻¹ de acetato de etila, Castro et al. (2004) obtiveram concentrações de 24,61 a 45,21 mg L⁻¹ e, Moreno et al. (2005) determinaram valores de 61,9 a 85,5 mg L⁻¹ em vinhos fortificados produzidos no Sul da Espanha. Rodríguez-Bencomo et al. (2003) encontraram concentrações médias de 156,7 mg L⁻¹ em vinhos naturalmente doces e, 65,1 mg L⁻¹ de acetato de etila em vinhos fortificados produzidos na Ilhas Canárias, Espanha.

Metanol foi determinado nas amostras analisadas em concentrações que variaram de 39,69 a 137,79 mg L⁻¹. O metanol é produzido durante a maceração, através da hidrólise das pectinas do mosto (DÍAZ et al., 2003; JACKSON, 2008). Está sempre presente no vinho em quantidades muito pequenas, sem apresentar impacto nas características sensoriais (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006), mas é importante devido a sua toxicidade (DÍAZ et al., 2003). Após a ingestão ele é oxidado produzindo aldeído fórmico e ácido fórmico, ambos tóxicos para o sistema nervoso central (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; JACKSON, 2008). Os níveis de risco para o ser humano são da ordem de 350 mg L⁻¹ (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). As menores concentrações de metanol foram observadas nas amostras provenientes do Planalto Catarinense e Região do Douro – Portugal, em que, provavelmente, foram empregados menores tempos de maceração ou, o conteúdo de pectinas das uvas era menor.

Álcoois isoamílicos (soma do 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol) e isobutanol (2-metil-1-propanol) são os álcoois superiores produzidos em maior concentração durante a fermentação do mosto. Eles são formados através da transaminação ou desaminação de aminoácidos (REGODÓN MATEOS; PÉREZ-NEVADO; RAMÍREZ FERNÁNDEZ, 2006). Isobutanol foi detectado em concentrações de 28,62 a 247,74 mg L⁻¹ e álcoois isoamílicos, de 30,87 a 429,93 mg L⁻¹. Ao estudarem os compostos voláteis de vinhos fortificados espanhóis, Zea et al. (2001) observaram valores de 25,7 a 39,2 mg L⁻¹ de isobutanol e, 171,0 a 324,0 mg L⁻¹ de álcoois isoamílicos; Rodríguez-Bencomo et al. (2003) encontraram concentrações médias de 167,1 mg L⁻¹ de álcoois isoamílicos e 20,4 mg L⁻¹ de isobutanol; Moreno et al. (2005)

determinaram conteúdo de álcoois isoamfílicos variando de 300 a 380 mg L⁻¹.

3.3 RAZÃO DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO

A determinação da razão de isótopos estáveis de carbono ¹³C/¹²C ($\delta^{13}\text{C}$) dos vinhos foi realizada a partir do etanol obtido na fermentação e do etanol adicionado na etapa de fortificação. Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ das amostras analisadas variaram de -27,40 a -17,47 ‰ para os vinhos brancos e, de -27,39 a -19,50 ‰ para os vinhos tintos fortificados (Tabela 5.2). A média de $\delta^{13}\text{C}$ obtida por Baudler et al. (2006), em estudo sobre a $\delta^{13}\text{C}$ do etanol das aguardentes vnicas adicionadas na fortificação de vinhos Sherry, com o intuito de investigar a região de proveniência dos destilados produzidos, foi de -27,32 ‰. Kosir et al. (2001) ao pesquisarem os valores de $\delta^{13}\text{C}$ de vinhos provenientes de três regiões da Eslovênia, para detecção da chaptalização (adição de açúcar da cana-de-açúcar) e classificação dos vinhos de acordo com a origem geográfica, observaram valores de -27,7 a -25,7 ‰ em vinhos naturais e, -26,9 a -23,1 ‰ em vinhos cuja adição de açúcar da cana-de-açúcar era conhecida; Ogrinc et al. (2001), em pesquisa sobre a origem geográfica de vinhos produzidos na Eslovênia detectaram valores de -27,9 a -25,2 ‰. Níveis de -25,6 a -25,0 ‰ foram encontrados em vinhos tintos espanhóis provenientes de três Denominações de Origem distintas, com o objetivo de usar a razão de isótopos estáveis como variável determinante da região de origem dos vinhos (GIMENEZ-MIRALLES; SALAZAR; SOLANA, 1999). Ao pesquisarem a $\delta^{13}\text{C}$ de vinhos espumantes, com o objetivo de investigar a origem botânica do açúcar adicionado na segunda fermentação destas bebidas, Martinelli et al. (2003) determinaram valores médios de -20,5 ‰, -26,1 ‰, -25,4 ‰, -20,0 ‰, -19,8 ‰, em espumantes brut produzidos no Brasil, América do Sul, Europa, Estados Unidos e Austrália, respectivamente, -18,1 ‰ em espumantes demi-sec brasileiros, -25,7 ‰ em espumantes asti italianos e -27,5 ‰ em espumantes asti brasileiros, demonstrando a maior adição de açúcar da cana-de-açúcar nos espumantes adocicados.

Tabela 5.2 Composição mineral, conteúdo de álcoois superiores e razão dos isótopos estáveis $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ do etanol de vinhos fortificados produzidos em diferentes regiões do Brasil.

Analito	Amostras					
	1	2	3	4	5	6
<i>Minerais</i>						
Al ($\mu\text{g L}^{-1}$)	252 \pm 4 ^f	369 \pm 2 ^j	235 \pm 5 ^e	98 \pm 3 ^b	261 \pm 6 ^g	84 \pm 5 ^a
Mn ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1805 \pm 18 ^h	1856 \pm 17 ^j	1279 \pm 13 ^e	2094 \pm 11 ^a	1452 \pm 27 ^f	1823 \pm 17 ⁱ
Fe ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1013 \pm 32 ^g	3335 \pm 59 ^k	876 \pm 20 ^f	353 \pm 6 ^a	1464 \pm 18 ^h	192 \pm 9 ^b
Co ($\mu\text{g L}^{-1}$)	3,61 \pm 0,16 ^d	3,74 \pm 0,08 ^e	2,05 \pm 0,15 ^c	5,03 \pm 0,25 ^h	2,28 \pm 0,03 ^a	2,37 \pm 0,11 ^a
Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$)	112 \pm 1 ^h	62,22 \pm 0,67 ^a	41,41 \pm 0,33 ^c	88,10 \pm 0,63 ^f	1023 \pm 8 ^j	62,59 \pm 3,12 ^a
Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$)	8,66 \pm 0,13 ^d	9,54 \pm 0,08 ^e	12,06 \pm 0,29 ^g	7,32 \pm 0,18 ^b	43,91 \pm 0,15 ⁱ	45,44 \pm 0,06 ^j
Ni ($\mu\text{g L}^{-1}$)	14,20 \pm 0,58 ^a	22,50 \pm 0,30 ^f	11,39 \pm 0,28 ^b	11,93 \pm 0,54 ^b	15,00 \pm 0,39 ^c	10,37 \pm 0,77 ^e
Zn ($\mu\text{g L}^{-1}$)	946 \pm 4 ^b	854 \pm 9 ^e	335 \pm 7 ^g	863 \pm 14 ^f	786 \pm 6 ^a	778 \pm 12 ^d
Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,56 \pm 0,18 ^g	1,00 \pm 0,11 ^d	1,36 \pm 0,2 ^f	< 0,02 ^a	1,17 \pm 0,21 ^e	0,45 \pm 0,06 ^b
Tl ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2,19 \pm 0,02 ^g	1,11 \pm 0,03 ^e	0,59 \pm 0,02 ^{ac}	< 0,4 ^a	0,85 \pm 0,05 ^c	1,84 \pm 0,10 ^f
Na (mg L ⁻¹)	19,8 \pm 0,4 ^{ab}	70,4 \pm 7,7 ^c	47,8 \pm 16,7 ^{bc}	4,8 \pm 2,40 ^a	41,2 \pm 10,1 ^{bc}	29,5 \pm 7,0 ^{ab}
K (mg L ⁻¹)	1532 \pm 196,21 ^c	1480 \pm 116,61 ^{ac}	1120 \pm 142,9 ^{ab}	1096 \pm 105,30 ^{ab}	1656 \pm 97,9 ^c	1364 \pm 100,10 ^{ac}
Ca (mg L ⁻¹)	102,4 \pm 4,33 ^a	230,2 \pm 7,90 ^a	145,3 \pm 35,40 ^a	50,8 \pm 7,10 ^a	98,5 \pm 15,10 ^a	57,4 \pm 1,40 ^a
Mg (mg L ⁻¹)	158,2 \pm 1,21 ^{bc}	304,6 \pm 26,02 ^d	179,3 \pm 40,6 ^c	100,4 \pm 2,60 ^{ab}	186,3 \pm 20,5 ^c	115,8 \pm 3,40 ^{ab}
<i>Álcoois superiores</i>						
Etanol (mg L ⁻¹)	85,83 \pm 0,56 ^{ab}	91,70 \pm 7,72 ^{ab}	107,66 \pm 1,06 ^a	108,64 \pm 12,8 ^a	92,34 \pm 5,65 ^{ab}	80,45 \pm 3,12 ^b
Acetato de Etila (mg L ⁻¹)	240,30 \pm 3,04 ^e	13,15 \pm 4,79 ^a	10,49 \pm 3,17 ^a	32,32 \pm 1,17 ^{ab}	25,54 \pm 9,59 ^a	70,80 \pm 0,11 ^{bc}
Metanol (mg L ⁻¹)	96,21 \pm 16,35 ^c	127,96 \pm 6,84 ^f	137,79 \pm 2,82 ^f	66,28 \pm 1,20 ^{abd}	80,97 \pm 5,65 ^{abc}	81,02 \pm 5,80 ^{abc}
Isobutanol (mg L ⁻¹)	92,97 \pm 3,23 ^{ab}	106,92 \pm 12,6 ^{abc}	76,88 \pm 3,007 ^{abd}	154,24 \pm 45,44 ^c	220,03 \pm 16,60 ^e	103,52 \pm 7,14 ^{abc}
Álcoois Isoamílicos (mg L ⁻¹)	206,62 \pm 0,90 ^{abc}	206,62 \pm 11,97 ^{ab}	153,52 \pm 6,72 ^{ae}	316,61 \pm 42,08 ^{bcd}	343,64 \pm 24,71 ^{cd}	213,40 \pm 5,37 ^{abc}
<i>Razão de Isótopos estáveis de carbono</i>						
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	-21,62 \pm 0,13 ^b	-21,95 \pm 0,10 ^b	-19,68 \pm 0,07 ^c	-26,52 \pm 0,04 ^a	-24,86 \pm 0,02 ^e	-19,50 \pm 0,06 ^c

Tabela 5.2 (Continuada).

Analito	Amostras					
	7	8	9	10	11	12
<i>Minerais</i>						
Al ($\mu\text{g L}^{-1}$)	227 \pm 3,35 ^d	198 \pm 1 ^c	1086 \pm 5 ^l	727 \pm 7 ^k	304 \pm 7 ⁱ	268 \pm 2 ^h
Mn ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2095 \pm 16 ^a	678 \pm 5 ^b	1151 \pm 8 ^d	1119 \pm 4 ^c	2890 \pm 37 ^k	1781 \pm 12 ^g
Fe ($\mu\text{g L}^{-1}$)	355 \pm 10 ^a	445 \pm 10 ^d	1752 \pm 20 ^j	1541 \pm 4 ⁱ	279 \pm 6 ^c	756 \pm 19 ^e
Co ($\mu\text{g L}^{-1}$)	7,61 \pm 0,25 ^j	1,17 \pm 0,10 ^b	4,50 \pm 0,16 ^g	4,03 \pm 0,03 ^f	7,98 \pm 0,19 ^k	6,60 \pm 0,26 ⁱ
Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$)	101 \pm 1 ^g	85,66 \pm 0,29 ^e	1396 \pm 4 ^k	574 \pm 2 ⁱ	37,38 \pm 0,93 ^b	50,51 \pm 0,85 ^d
Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$)	3,38 \pm 0,08 ^a	10,62 \pm 0,15 ^f	24,09 \pm 0,14 ^h	49,36 \pm 0,76 ^l	8,23 \pm 0,08 ^c	7,40 \pm 0,26 ^k
Ni ($\mu\text{g L}^{-1}$)	26,90 \pm 0,10 ^g	6,47 \pm 0,18 ^d	14,49 \pm 0,35 ^a	31,20 \pm 0,33 ^h	14,85 \pm 0,16 ^{ac}	42,19 \pm 0,68 ⁱ
Zn ($\mu\text{g L}^{-1}$)	464 \pm 7 ^c	287 \pm 4 ^h	728 \pm 8 ⁱ	1721 \pm 17 ^k	889 \pm 9 ^j	615 \pm 10 ^l
Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	< 0,02 ^a	< 0,02 ^a	0,80 \pm 0,07 ^c	0,77 \pm 0,21 ^c	< 0,02 ^a	0,51 \pm 0,2 ^b
Tl ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,83 \pm 0,03 ^c	< 0,4 ^a	1,40 \pm 0,04 ^d	1,40 \pm 0,04 ^d	0,80 \pm 0,02 ^{bc}	< 0,4 ^a
Na (mg L ⁻¹)	6,7 \pm 0,8 ^a	6,5 \pm 3,6 ^a	82,8 \pm 0,6 ^d	97,9 \pm 35,6 ^e	24,1 \pm 3,9 ^{ab}	5,55 \pm 0,5 ^a
K (mg L ⁻¹)	1461 \pm 139,01 ^{ac}	1117 \pm 66,03 ^{ab}	759,2 \pm 98,01 ^b	1108 \pm 18,05 ^{ab}	836,0 \pm 41,17 ^b	1115 \pm 51,50 ^{ab}
Ca (mg L ⁻¹)	43,0 \pm 1,90 ^a	56,1 \pm 3,75 ^a	277,6 \pm 6,13 ^a	316,7 \pm 43,02 ^a	52,4 \pm 1,16 ^a	48,0 \pm 2,01 ^a
Mg (mg L ⁻¹)	80,8 \pm 3,71 ^a	78,0 \pm 1,02 ^a	316,1 \pm 4,72 ^{de}	370,2 \pm 20,27 ^c	90,7 \pm 0,90 ^a	91,50 \pm 1,05 ^a
<i>Álcoois superiores</i>						
Etanol (mg L ⁻¹)	89,95 \pm 13,8 ^{ab}	194,95 \pm 17,3 ^e	146,21 \pm 4,56 ^c	147,21 \pm 12,5 ^c	139,16 \pm 9,22 ^c	43,70 \pm 3,88 ^d
Acetato de Etila (mg L ⁻¹)	44,82 \pm 2,55 ^{ab}	101,91 \pm 33,9 ^{cd}	30,66 \pm 0,45 ^{ab}	17,18 \pm 0,82 ^a	28,39 \pm 1,54 ^a	117,79 \pm 8,7 ^d
Metanol (mg L ⁻¹)	70,62 \pm 12,1 ^{ad}	86,32 \pm 5,26 ^{bc}	77,70 \pm 1,6 ^{abcd}	56,46 \pm 5,52 ^{de}	42,67 \pm 2,58 ^c	39,69 \pm 2,19 ^e
Isobutanol (mg L ⁻¹)	247,74 \pm 30,83 ^e	28,62 \pm 1,05 ^d	160,36 \pm 24,83 ^c	54,83 \pm 0,91 ^{ad}	226,60 \pm 11,06 ^e	123,88 \pm 7,96 ^{bc}
Álcoois Isoamílicos (mg L ⁻¹)	398,04 \pm 25,95 ^d	30,87 \pm 1,49 ^e	222,16 \pm 9,79 ^{abc}	147,18 \pm 5,01 ^{ae}	429,93 \pm 61,92 ^d	292,83 \pm 1,51 ^{abcd}
<i>Razão de Isótopos estáveis de carbono</i>						
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	-27,23 \pm 0,14 ^a	-17,47 \pm 0,09 ^h	-23,33 \pm 0,13 ^f	-21,06 \pm 0,04 ^g	-27,40 \pm 0,11 ^d	-27,39 \pm 0,06 ^a

Valores expressos como média \pm desvio padrão para determinações realizadas em triplicata. Amostras: 1, 2, 3 – Cabernet Sauvignon/ Merlot Serra Gaúcha; 4 - Cabernet Sauvignon/ Merlot Planalto Catarinense; 5, 6 - Cabernet Sauvignon/ Tannat Serra Gaúcha; 7 – Touriga Nacional Planalto Catarinense; 8 – Goethe Região Carbonífera; 9, 10 – Moscato Giallo Serra Gaúcha; 11 – Moscato Giallo Planalto Catarinense; 12 – Vinho do Porto Vintage Região do Douro – Portugal (amostra de referência).

O maior valor de $\delta^{13}\text{C}$ (-17,47 ‰) foi observado no vinho branco da variedade Goethe produzido na Região Carbonífera, enquanto o menor valor de $\delta^{13}\text{C}$ (-27,40 ‰) foi encontrado no vinho branco da variedade Moscato Giallo produzido no Planalto Catarinense. Os maiores valores de $\delta^{13}\text{C}$ (-19,50 ‰ e -19,68 ‰) foram observados nos vinhos produzidos na Serra Gaúcha a partir de uvas Cabernet Sauvignon/ Tannat (amostra 6) e Cabernet Sauvignon/ Merlot (amostra 3), respectivamente, e menor valor de $\delta^{13}\text{C}$ (-27,39 ‰) a amostra de referência (Vinho do Porto Vintage), que é estatisticamente igual, ao nível de significância de 95 %, às amostras 4 (Cabernet Sauvignon/ Merlot) e 7 (Touriga Nacional) produzidas no Planalto Catarinense (Tabela 5.2).

A $\delta^{13}\text{C}$ enfatiza preferencialmente a origem botânica e o modo de fixação fotossintético, mas também fornece informações relativas à origem geográfica. Plantas C_3 são predominantemente cultivadas em altas latitudes e plantas C_4 são mais comuns nos trópicos, regiões de clima quente, em que as plantas são cultivadas sob estresse hídrico. Os valores da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ são maiores em plantas C_3 cultivadas na região da Linha do Equador e diminuem em plantas cultivadas na direção aos pólos, cujo clima é mais frio (ROSSMANN et al., 1996; KELLY et al., 2005; RUMMEL et al., 2010). Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ são influenciados pelas características climáticas como umidade relativa e temperatura, que determinam o controle da abertura dos estômatos e da concentração interna de CO_2 nas folhas das plantas (CABAÑERO; RECIO; RUPÉREZ, 2008). O comportamento observado nas amostras analisadas, em que os menores valores de $\delta^{13}\text{C}$ foram encontrados nos vinhos oriundos da região mais fria (Planalto Catarinense) e, os maiores valores de $\delta^{13}\text{C}$ foram detectados nas amostras provenientes das regiões mais quentes, pode ser atribuído à dependência da temperatura para o fracionamento isotópico na fotossíntese (OGRINC et al., 2001). No entanto, quando as variações na $\delta^{13}\text{C}$ são muito altas (maiores que 2 – 3 ‰), o clima não é o único fator que tem efeito sobre o fracionamento isotópico. A causa mais provável para as variações observadas nas amostras analisadas (~ 9,9 ‰) é a adição de açúcar ou etanol derivado de plantas C_4 , a exemplo da cana-de-açúcar (VERSINI et al., 2006; CABAÑERO; RECIO; RUPÉREZ, 2008), cuja $\delta^{13}\text{C}$ média é de -11,5 ‰ (MARTINELLI et al., 2003). A contribuição do açúcar e do etanol C_4 é verificada através do aumento dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ dos vinhos; quanto maiores os valores de $\delta^{13}\text{C}$ (mais próximos de -11,5 ‰), maior a adição de açúcar ou de etanol obtidos de plantas C_4 . A presença de plantas C_4 pode ser resultante do processo de adição de açúcar da cana-

de-açúcar antes ou após a fermentação, ou devido à adição de etanol de cana-de-açúcar no processo de fortificação do vinho (PISSINATTO et al., 1999). Para as amostras analisadas, os resultados obtidos indicam que nos vinhos fortificados provenientes do Planalto Catarinense, provavelmente a chaptalização ocorreu em menor proporção do que nas amostras produzidas na Serra Gaúcha e Região Carbonífera. Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ das amostras produzidas no Planalto Catarinense são muito próximos dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ da amostra de referência, produzida no Douro – Portugal, região onde não é permitida a chaptalização dos vinhos.

3.4 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

A análise de componentes principais foi aplicada separadamente para os vinhos brancos e para os vinhos tintos fortificados, empregando as variáveis relativas ao conteúdo de minerais, álcoois superiores e razão de isótopos estáveis de carbono.

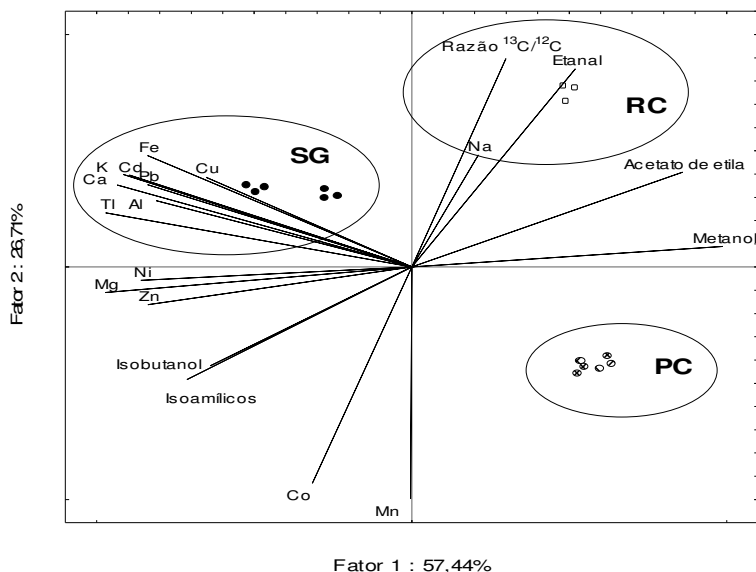


Figura 5.1 Análise de componentes principais das determinações de minerais, álcoois superiores e razão de isótopos estáveis de carbono para amostras de vinhos brancos fortificados produzidos no Sul do Brasil. Regiões de procedência das amostras: SG – Serra Gaúcha; PC – Planalto Catarinense; RC – Região Carbonífera.

Para os vinhos brancos fortificados a análise de componentes principais explicou 84,15 % da variação total dos dados nas duas primeiras dimensões, com 57,44 % e 26,71 % explicados pelo fator I e fator II, respectivamente (Figura 5.1). A maior separação ocorreu ao longo do fator I, em que estava negativamente localizada a maioria das variáveis relacionadas ao conteúdo de minerais e, positivamente, a maior parte das variáveis relativas ao conteúdo de álcoois superiores e a razão de isótopos estáveis de carbono. As variáveis com maior contribuição para a separação das amostras ao longo do fator I foram metanol, acetato de etila, álcoois isoamílicos, isobutanol, magnésio, cálcio, potássio, tálio, cádmio, zinco, níquel, chumbo, cobre, ferro e alumínio. Para o fator II, as variáveis de maior contribuição foram razão de isótopos estáveis de carbono, manganês, cobre, sódio e etanal. A amostra de vinho branco fortificado da variedade Goethe produzida na Região Carbonífera estava localizada positivamente nos fatores I e II e, caracterizava-se pelo maior conteúdo de etanal, acetato de etila, metanol e, pela maior razão de isótopos estáveis de carbono. Esta amostra provavelmente foi elaborada com maior tempo de maceração e maior chaptalização. As amostras provenientes da região da Serra Gaúcha apresentaram-se dispostas positivamente ao longo do Fator II e negativamente no Fator I, destacando-se quanto ao maior conteúdo dos minerais cobre, ferro, cádmio, chumbo, cálcio, tálio e alumínio. A amostra proveniente do Planalto Catarinense encontrou-se disposta negativamente no Fator I e positivamente no Fator II, apresentando a menor razão de isótopos estáveis de carbono, maior conteúdo isobutanol, álcoois isoamílicos, manganês e cobalto. Esta amostra apresentou atributos que determinam a qualidade aromática do vinho fortificado, baixo conteúdo de elementos minerais contaminantes e menor chaptalização.

A análise de componentes principais para os vinhos tintos fortificados explicou 53,28% da variação do sistema, sendo 34,28 % explicados pelo fator I e 19,00 % pelo fator II (Figura 5.2). A maior separação ocorreu ao longo do fator I, sendo as variáveis de maior contribuição a razão de isótopos estáveis de carbono, manganês, ferro, cobalto, cobre, chumbo, zinco, cádmio, tálio, sódio, potássio, cálcio, magnésio, isobutanol e álcoois isoamílicos. Ao longo do fator II, as variáveis de maior contribuição para a separação das amostras foram alumínio, níquel, etanal, acetato de etila e metanol.

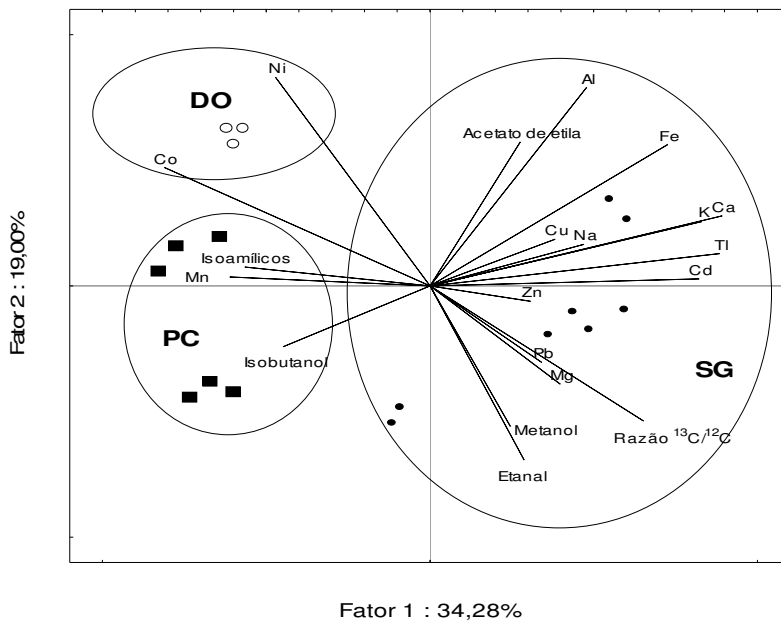


Figura 5.2 Análise de componentes principais das determinações de minerais, álcoois superiores e razão de isótopos estáveis de carbono para amostras de vinhos tintos fortificados produzidos no Sul do Brasil. Regiões de procedência das amostras: SG – Serra Gaúcha; PC – Planalto Catarinense; DO – Região do Douro, Portugal.

As amostras de vinhos fortificados provenientes da região da Serra Gaúcha, localizadas positivamente ao longo do fator I e, positivamente e negativamente ao longo do fator II, caracterizaram-se por apresentar maior concentração de alumínio, acetato de etila, ferro, cobre, sódio, potássio, cálcio, tálio, cádmio, zinco, chumbo, magnésio, metanol, e razão de isótopos estáveis de carbono. Estes resultados indicam que estas amostras apresentaram o maior conteúdo de minerais e sofreram maior chaptalização. As amostras de vinhos fortificados produzidas no Planalto Catarinense, localizadas negativamente no fator I e, positivamente e negativamente no fator II, apresentaram maior concentração de manganês, álcoois isoamílicos e isobutanol, atributos que contribuem para a qualidade sensorial dos vinhos. A amostra de referência, produzida na região do Douro – Portugal, estava localizada negativamente no fator I e positivamente no fator II, apresentando maior conteúdo de níquel. Observam-se semelhanças entre as amostras

produzidas no Planalto Catarinense e na Região do Douro – Portugal, o que é evidenciado pela proximidade das amostras nos quadrantes da ACP.

A análise de componentes principais evidenciou as semelhanças entre os vinhos fortificados brancos e vinhos tintos produzidos na mesma região, mostrando que a composição química do vinho é determinada pela região de produção dos vinhos.

3.5 ANÁLISE DISCRIMINANTE CANÔNICA

A análise discriminante canônica foi usada para a separação das amostras em diferentes grupos, de acordo com os resultados de composição mineral, álcoois superiores e razão de isótopos estáveis de carbono (Figura 5.3).

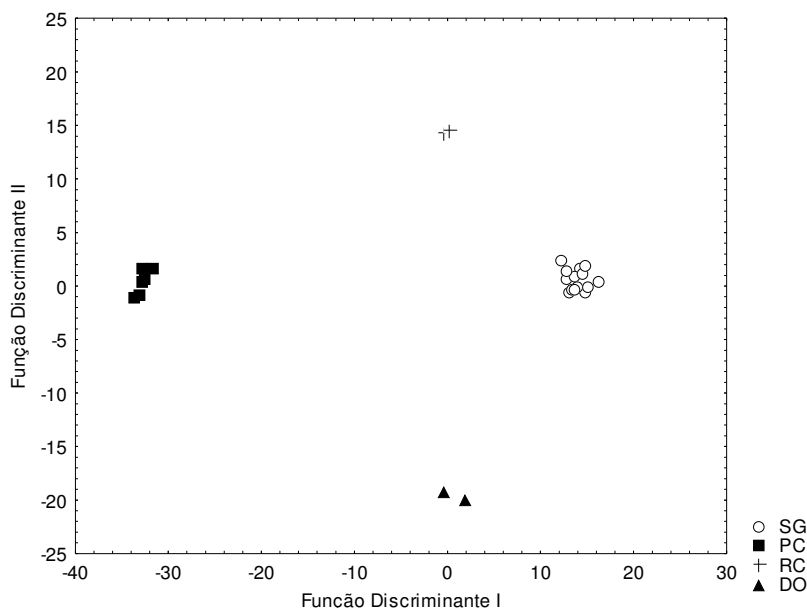


Figura 5.3 Análise discriminante canônica das determinações de compostos minerais, álcoois superiores e razão de isótopos estáveis de carbono para vinhos fortificados produzidos em diferentes regiões do Brasil, com a região de produção como variável de classificação. Regiões de procedência das amostras: SG – Serra Gaúcha; PC – Planalto Catarinense; RC – Região Carbonífera; DO – Região do Douro, Portugal.

A função discriminante I era responsável por 88,28 % do poder discriminante total e as separações ao longo desta função discriminante podem ser atribuídas à razão de isótopos estáveis de carbono, alumínio, ferro, cobre e chumbo, na direção negativa, ou diferenças no conteúdo de manganês, cobalto e potássio, na direção positiva. A função discriminante II explicava 11,41 % das separações e era atribuída às diferenças no conteúdo de níquel e zinco. As distâncias de Mahalanobis entre todas as regiões eram altamente significativas ($p < 0,0001$), indicando a separação entre as distintas regiões de produção de vinhos fortificados produzidos no Brasil. A Região Serra Gaúcha estava localizada positivamente nas funções discriminantes I e II, apresentando a razão de isótopos estáveis menos negativa, maior conteúdo de alumínio, ferro, cobre e chumbo; Planalto Catarinense estava localizado positivamente ao longo da função discriminante II e negativamente na função discriminante I, destacando-se quanto ao maior conteúdo de manganês e razão de isótopos estáveis de carbono mais negativa; Região Carbonífera estava localizada positivamente nas funções discriminantes I e II, com a razão de isótopos estáveis de carbono menos negativa e maior conteúdo de etanal e acetato de etila; a Região Demarcada do Douro (amostra de referência) estava localizada sobre o eixo da função discriminante I e negativamente na função discriminante II, com maior concentração de níquel.

4 CONCLUSÕES

As determinações analíticas de minerais, álcoois superiores e razão de isótopos estáveis de carbono evidenciaram diferenças entre as amostras de vinhos fortificados produzidas em diferentes regiões do Brasil. Os resultados indicaram que as amostras de vinhos fortificados produzidas na região da Serra Gaúcha caracterizaram-se por maior conteúdo dos minerais alumínio, ferro, cobre, chumbo, níquel, zinco, cádmio, tálio, potássio, cálcio, magnésio e sódio; as amostras de vinhos fortificados produzidas no Planalto Catarinense destacaram-se quanto ao maior conteúdo de álcoois isoamfílicos, isobutanol, cobalto, manganês e razão de isótopos estáveis de carbono mais negativa; as amostra da Região Carbonífera se sobressaiu quanto a razão de isótopos estáveis de carbono menos negativa e maior concentração de etanal. A amostra de referência, proveniente da Região do Douro – Portugal caracterizou-se por apresentar o maior conteúdo de níquel e apresentou semelhanças com as amostras produzidas no Planalto Catarinense. A combinação dos

resultados das variáveis analíticas e de estatística multivariada evidenciou as características das amostras provenientes de diferentes regiões do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTINO, A.; BARGE, A.; CRAVOTTO, G.; GENZINI, L.; GOBETTO, R.; VINCENZI, M. Natural origin of ascorbic acid: validation by ^{13}C NMR and IRMS. **Food Chemistry**, v. 112, p. 715-720, 2009.

ALMEIDA, C. M.; VASCONCELOS, M. T. S. D. Advantages and limitations of the semi-quantitative operation mode of an inductively coupled plasma-mass spectrometer for multi-element analysis of wines. **Analytica Chimica Acta**, v. 463, p. 165-175, 2002.

ÁLVAREZ, M.; MORENO, I. M.; JOS, A. M.; CAMEÁN, A. M.; GONZÁLEZ, A. G. Study of mineral profile of Montilla-Moriles “fino” wines using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 391-395, 2007 (a).

ÁLVAREZ, M.; MORENO, I. M.; JOS, A.; CAMEÁN, A. M.; GONZÁLEZ, A. G. Differentiation of two Andalusian “fino” wines according to their metal content from ICP-OES by using supervised pattern recognition methods. **Microchemical Journal**, v. 87, p. 72-76, 2007 (b).

BAUDLER, R.; ADAM, L.; ROSSMANN, A.; VERSINI, G.; ENGEL, K. H. Influence of the distillation step on the ratios of stable isotopes of ethanol in Cherry Brandies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 864-869, 2006.

BONA-SARTOR, S. de. **Caracterização química de uvas e vinhos Goethe produzidos na Região de Urussanga, Santa Catarina**. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

BRAND, W. A. High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 31, p. 225-235, 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto n. 55.871 de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto n. 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto n. 691, de 13 de março de 1962. **D.O.U.**, Brasília 29 maio 1965.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria n. 229 de 25 de outubro de 1988. Aprova as Normas referentes à Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho. **D.O.U.**, Brasília, 31 out. 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 4 de 05 de fevereiro de 2001. Aprova a Metodologia de Análise da Razão Isotópica que especifica em produtos e subprodutos das plantas do Ciclo Fotossintético que menciona. **D.O.U.**, Brasília, 08 fev. 2001.

BRIGHENTI, E.; TONIETTO, J. 2004. O clima de São Joaquim para a viticultura de vinhos finos: classificação pelo Sistema CCM Geovítica. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 18, Florianópolis. Florianópolis: SBF, 2004, 4 p. (CD-ROM).

CABAÑERO, A. I.; RECIO, J. L.; RUPÉREZ, M. Isotope ratio mass spectrometry coupled to liquid and gas chromatography for wine ethanol characterization. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, p. 3111-3118, 2008.

CABAÑERO, A. I.; SAN-HIPÓLITO, T.; RUPÉREZ, M. GasBench/ isotope ratio mass spectrometry: a carbon isotope approach to detect exogenous CO₂ in sparkling drinks. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, p. 3323-3328, 2007.

CALDERONE, G.; GUILLOU, C. Analysis of isotopic ratios for the detection of illegal watering of beverages. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1399-1405, 2008.

- CASTRO, R.; NATERA, R.; BENÍTEZ, P.; BARROSO, C. G. Comparative analysis of volatile compounds of “fino” sherry wine by rotatory and continuous liquid-liquid extraction and solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 141-150, 2004.
- CATARINO, S.; CURVELO-GARCIA, A. S.; BRUNO DE SOUSA, R. Measurements of contaminant elements of wines by inductively coupled plasma-mass spectrometry: a comparison of two calibration approaches. **Talanta**, v. 70, p. 1073-1080, 2006.
- CATARINO, S.; CURVELO-GARCIA, A. S.; BRUNO DE SOUSA, R. Revisão: Elementos contaminantes nos vinhos. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 23 (1), p. 3-19, 2008.
- COETZEE, P. P. ; STEFFENS, F. E.; EISELEN, R. J.; AUGUSTYN, O. P.; BALCAEN, L.; VANHAECKE, F. Multi-element analysis of South African wines by ICP-MS and their classification according to geographical origin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5060-5066, 2005.
- DIAZ, C.; CONDE, J. E.; MÉNDEZ, J. J.; TRUJILLO, J. P. P. Volatile compounds of bottled wines with Denomination of Origin from the Canary Islands (Spain). **Food Chemistry**, v. 81, p. 447-452, 2003.
- DUGO, G.; LA PERA, L.; PELLICANÓ, T. M.; DI BELLA, G.; D’IMPERIO, M. Determination of some inorganic anions and heavy metals in D.O.C. Golden and Amber Marsala wines: statistical study of the influence of ageing period, colour and sugar content. **Food Chemistry**, v. 91, p. 355-363, 2005.
- EMBRAPA UVA E VINHO; UFRGS; FEPAGRO. 2004. Zoneamento agroclimático para uma vitivinicultura de qualidade em diferentes regiões do Estado do Rio Grande do Sul: base de dados climáticos. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. Disco Rígido.
- ESTEVES, V. I.; LIMA, S. S. F.; LIMA, D. L. D.; DUARTE, A. C. Using capillary electrophoresis for the determination of organic acids in Port wine. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 163-167, 2004.

FABANI, M. P.; ARRÚA, R. C.; VÁSQUEZ, F.; DIAZ, M. P.; BARONI, M. V.; WUNDERLIN, D. A. Evaluation of elemental profile coupled to chemometrics to assess the geographical origin of Argentinean wines. **Food Chemistry**, v. 119, p. 372-379, 2010.

GALGANO, F.; FAVATI, F.; CARUSO, M.; SCARPA, T.; PALMA, A. Analysis of trace elements in southern Italian wines and their classification according to provenance. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 1808-1815, 2008.

GARCÍA-VIGUERA, C.; BAKKER, J.; BELLWORTHY, S. J.; READER, H. P.; WATKINS, S.; BRIDLE, P. The effect of some processing variables on non-coloured phenolic compounds in port wines. **Z Lebensm Unters Forsch**, v. 205, p. 321-324, 1997.

GIL, M.; CABELLOS, J. M.; ARROYO, T.; PRODANOV, M. Characterization of the volatile fraction of young wines from the Denomination of Origin “Vinos de Madrid” (Spain). **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 145-153, 2006.

GIMENEZ-MIRALLES, J. E.; SALAZAR, D. M.; SOLANA, I. Regional origin assignment of red wines from Valencia (Spain) by ^2H NMR and ^{13}C IRMS stable isotope analysis of fermentative ethanol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 2645-2652, 1999.

GONZÁLVEZ, A.; LLORENS, A.; CERVERA, M. L.; ARMENTA, S.; DE LA GUARDIA, M. Elemental fingerprint of wines from the protected designation of origin Valencia. **Food Chemistry**, v. 112, p. 25-34, 2009.

GOOSSENS, J.; SMAELE, T.; MOENS, L.; DAMS, R. Accurate determination of lead in wines by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 347, p. 119-125, 1993.

GRINDLAY, G.; MORA, J.; MAESTRE, S.; GRAS, L. Application of a microwave-based desolvation system for multi-elemental analysis of wine by inductively coupled plasma based techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 629, p. 24-37, 2008.

IBANEZ, J. G.; CARREON-ALVAREZ, A.; BARCENA-SOTO, M.; CASILLAS, N. Metals in alcoholic beverages: A review of sources, effects, concentrations, removal, speciation and analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 672-683, 2008.

JACKSON, R. S. **Wine Science – Principles and Applications**. 3^a ed. San Diego: Academic Press, 2008. 776 p.

KELLY, S.; HEATON, K.; HOOGEWERFF, J. Tracing the geographical origin of food: the application of multi-element and multi-isotope analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 555-567, 2005.

KMENT, P.; MIHALJEVIC, M.; ETTLER, V.; SEBEK, O.; STRNARD, L.; ROHLOVÁ, L. Differentiation of Czech wines using multielement composition – A comparison with vineyard soil. **Food Chemistry**, v. 91, p. 157-165, 2005.

KOSIR, I. J.; KOCJAN, M.; OGRINC, N.; KIDRI, J. Use of SNIF-NMR and IRMS in combination with chemometric methods for the determination of chaptalisation and geographical origin of wines (the example of Slovenian wines). **Analytica Chimica Acta**, v. 429, p. 195-206, 2001.

MARENGO, E.; ACETO, M. Statistical investigation of the differences in the distribution of metals in Nebbiolo-based wines. **Food Chemistry**, v. 81, p. 621-630, 2003.

MARTINELLI, L. A.; MOREIRA, M. A.; OMETTO, J. P. H. B.; ALCARDE, A. R.; RIZZON, L. A.; STANGE, E.; EHLERINGER, J. R. Stable carbon isotopic composition of the wine and CO₂ bubbles of sparkling wines: detecting C₄ sugar additions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2625-2631, 2003.

MORENO, J. A.; ZEA, L.; MOYANO, L.; MEDINA, M. Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to biological ageing. **Food Control**, v. 16, p. 333-338, 2005.

MORENO, I. M.; GONZÁLEZ-WELLER, D.; GUTIERREZ, V.; MARINO, M.; CARMEÁN, A. M.; GONZÁLEZ, G.; RADISSON, A. Determination of Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Sr and Zn in red

wine samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry: Evaluation of preliminary sample treatments. **Microchemical Journal**, v. 88, p. 56-61, 2008.

OGRINC, N.; KOSIR, I. J. ; KOCJANCIC, M.; KIDRIC, J.
Determination of authenticity, regional origin, and vintage of Slovenian wines using a combination of IRMS and SNIF-NMR analyses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1432-1440, 2001.

PANEQUE, P.; ÁLVAREZ-SOTOMAYOR, M. T.; CLAVIJO, A.; GÓMEZ, I. A. Metal content in southern Spain wines and their classification according to origin and ageing. **Microchemical Journal**, v. 94, p. 175-179, 2010.

PANEQUE, P.; ÁLVAREZ-SOTOMAYOR, M. T.; GÓMEZ, I. A.
Metal contents in “oloroso” Sherry wines and their classification according to provenance. **Food Chemistry**, v. 117, p. 302 – 305, 2009.

PISSINATTO, L.; MARTINELLI, L. A.; VICTORIA, R. L.; CAMARGO, P. B. Stable carbon isotopic analysis and the botanical origin of ethanol in Brazilian brandies. **Food Research International**, v. 32, p. 665-668, 1999.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A.; MELO, L. M. R. de. **A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas**. 2008. Disponível em:
<<http://www.cnpv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura.html>.>
Acesso em: 05 março 2010.

REGODÓN MATEOS; PÉREZ-NEVADO; RAMÍREZ FERNÁNDEZ.
Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 151-157, 2006.

RIBÉREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.; SUDRAUD, P. ;
RIBÉREAU-GAYON, P. **Sciences et techniques du vin**. Tome 1 –
Analyse et contrôle des vins. 2 édition. Dunod : Paris, 1982.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.;
DUBOURDIEU, D. **Handbook of enology**. Volume 2. 2ª edição. The

chemistry of wine: stabilization and treatments. John Wiley & Sons Ltd, 2006. 450 p.

RIZZON, L. A.; SALVADOR, M. B. G.; MIELE, A. Teores de cátions dos vinhos da Serra Gaúcha. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28 (3); p. 635-641, jul.-set. 2008.

RODRÍGUEZ-BENCOMO, J. J.; CONDE, J. E.; GARCÍA-MONTELONGO, F.; PÉREZ-TRUJILLO, J. P. Determination of major compounds in sweet wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 991, p. 13-22, 2003.

ROSSMANN, A.; RENIERO, F.; MOUSSA, I.; SCHIMIDT, A. L.; VERSINI, V.; MERLE, M. H. Stable carbon isotope content of ethanol of EC Data-bank wines from Italy, France and Germany. **Z Lebensm Hunters Forsch A.**, v. 203, p. 293-301, 1996.

RUMMEL, S.; HOELZL, S.; HOM, P.; ROSSMANN, A.; SCHLICHT, C. The combination of stable isotope abundance ratios of H, C, N and S with $^{87}\text{S}/^{86}\text{S}$ for geographical origin assignment of orange juices. **Food Chemistry**, v. 118, p. 890-900, 2010.

TONIETTO, J.; CARBONNEAU, A. A multicriteria climatic classification system for grape-growing regions worldwide. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 124/1-2, p. 81-97, 2004.

TONIETTO, J.; MANDELLI, F. Uvas americanas e híbridas para processamento em clima temperado. **Sistema de Produção**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. Versão Eletrônica.

VERSINI, G.; CAMIN, F.; RAMPONI, M.; DELLACASSA, E. Stable isotope analysis in grape products: ^{13}C -based internal standardization methods to improve the detection of some types of adulterations. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 325-330, 2006.

ZEA, L.; CORTÉS, M. B.; MORENO, J.; MEDINA, M. Vinos finos. Crianza. **Investigación y Ciencia**, v. 236, p. 78-81, 1996.

ZEA, L.; MORENO, J.; MEDINA, M. Characterization of aroma fractions in biological aging of "Fino" white wine produced in Montilla-

Moriles appellation d'origine. **Acta Horticolae**, v. 388, p. 233-238, 1995.

ZEA, L.; MOYANO, L.; MORENO, J.; CORTES, B.; MEDINA, M.
Discrimination of the aroma fraction of Sherry wines obtained by oxidative and biological ageing. **Food Chemistry**, v. 75, p. 79-84, 2001.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os vinhos fortificados são matrizes ricas em constituintes químicos e, para a determinação de compostos fenólicos não coloridos neste tipo de vinho, o pré-tratamento de amostra é uma etapa indispensável. A extração em fase sólida de compostos fenólicos de vinhos fortificados utilizando 5 mL de amostra, 20 mL de acetato de etila para eluição dos compostos, em vazão de $0,06 \text{ mL s}^{-1}$ mostrou-se um procedimento reprodutível, com bons percentuais de recuperação e baixos limites de detecção e quantificação.

Os vinhos fortificados brancos e tintos produzidos em diferentes regiões do Brasil mostraram-se ativos no sequestro dos radicais DPPH e ABTS e na redução do ferro (FRAP), observando-se maior atividade antioxidante nos vinhos tintos fortificados em comparação com os vinhos brancos fortificados. A atividade antioxidante *in vitro* dos vinhos fortificados está correlacionada positivamente com o conteúdo de polifenóis totais, *orto*-difenóis, ésteres tartáricos, flavonóis, antocianinas monoméricas totais, taninos totais, ácido gálico e *trans*-resveratrol.

As determinações analíticas de compostos fenólicos, atividade antioxidante, açúcares, ácidos orgânicos, minerais, álcoois superiores e razão de isótopos estáveis de carbono evidenciaram diferenças entre as amostras de vinhos fortificados produzidas em diferentes regiões do Brasil, destacando que a região de produção é determinante da composição química dos vinhos fortificados.

Os vinhos fortificados produzidos na Região da Serra Gaúcha apresentaram maior tonalidade de cor, maior atividade antioxidante, maiores conteúdos de catequina, quercetina, *trans*-resveratrol, *orto*-difenóis, flavonóis, ésteres tartáricos, polifenóis totais, maior conteúdo de alumínio, ferro, cobre, chumbo, níquel, zinco, cádmio, tálio, potássio, cálcio, magnésio e sódio.

Os vinhos fortificados produzidos no Planalto Catarinense apresentaram maior intensidade e densidade de cor, maior conteúdo de ácido cafeico e taninos totais, menor relação glicose/ frutose, maior conteúdo de ácido málico e menor conteúdo em ácido acético, razão de isótopos estáveis de carbono mais negativa, maior conteúdo de álcoois isoamílicos, isobutanol, cobalto e manganês.

A Região Carbonífera destacou-se quanto à produção de vinhos brancos fortificados de maior luminosidade ($> L^*$), menor conteúdo de ácido succínico e de ácido acético, alto conteúdo de ácido málico, razão de isótopos estáveis de carbono menos negativa e maior concentração de etanal.

A amostra de referência, produzida na região do Douro, Portugal, apresentou menor luminosidade, maior conteúdo de ácido ferúlico, ácido cumárico, compostos fenólicos não polimerizados e de níquel.

Os métodos analíticos de espectrofotometria, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar, espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, cromatografia gasosa e espectrometria de massas para razões isotópicas, empregados neste trabalho mostraram-se eficientes e confiáveis para a análise de amostras de vinhos fortificados. A combinação dos resultados das variáveis analíticas e de estatística multivariada evidenciou as características das amostras de vinhos fortificados provenientes de diferentes regiões do Brasil.

As análises de vinhos fortificados produzidos no Sul do Brasil mostraram variações consideráveis nas concentrações dos compostos estudados. Diferenças estatísticas entre as amostras analisadas foram observadas principalmente em função da região de produção e das práticas vitivinícolas empregadas. A análise de componentes principais evidenciou as similaridades entre a composição química das amostras de vinhos tintos fortificados produzidas no Planalto Catarinense e na Região do Douro – Portugal.

Cabe destacar, com base na composição química dos vinhos fortificados estudados, que a região do Planalto Catarinense apresenta grande potencial para a produção de vinhos fortificados de qualidade, por suas particularidades relativas a fatores naturais e fatores humanos, a semelhança da Região do Douro – Portugal.