

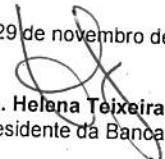
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

COMPOSTOS FUNCIONAIS NO PROCESSAMENTO DE VINHOS

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Elizete Maria P. Facco** aprovada pela Comissão Julgadora em 29 de novembro de 2006.

Campinas, 29 de novembro de 2006.


Prof. Dra. Helena Teixeira Godoy
Presidente da Banca

Elizete Maria Pesamosca Facco

Farmacêutica bioquímica
Mestre em Ciência de Alimentos

Prof. Dra. Helena Teixeira Godoy

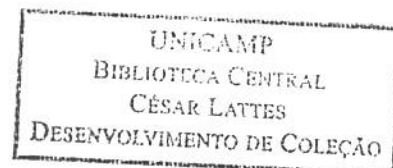
Orientadora

Prof. PhD Carlos Eugenio Daudt

Co-orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Campinas – SP, 2006



UNIDADE BC
 CHAMADA T/UNICAMP
F118c
 EX
 OMBG BC/ 71026
 ROC. 16.123-06
 C ☐ D ☒
 PREÇO 11,00
 DATA 20/12/06
 ID. 395138

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

F118c Facco, Elizete Maria Pesamosca
Compostos funcionais no processamento de vinhos / Elizete Maria
Pesamosca Facco. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Helena Teixeira Godoy
Co-orientador: Carlos Eugenio Daudt
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade
de Engenharia de Alimentos

1. Vinho e vinificação. 2. Compostos fenólicos. 3. Folatos. I.
Godoy, Helena Teixeira. II. Daudt, Carlos Eugenio.III. Universidade
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV.
Título.

Título em inglês: Functional compounds in wine processing

Palavras-chave em inglês (Keywords): Wine and wine making, Phenolic compounds
folates

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Helena Teixeira Godoy

Carla Beatriz Grespan Bottoli

Daniela Tomazella

Juliana Azevedo Lima Pallone

Elenice Murate

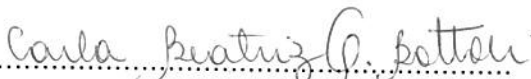
Neidi Garcia Penna

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

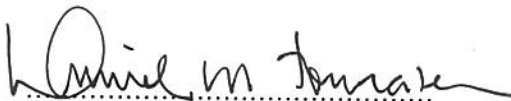
BANCA EXAMINADORA



.....
Helena Teixeira Godoy
FEA-UNICAMP
Presidente



.....
Carla Beatriz Grespan Bottoli
IQ-UNICAMP
Membro



.....
Daniela Tomazella
WATERS-Br
Membro

.....
Elenice Haruko Murate
UFPR
Membro



.....
Juliana Azevedo Lima Pallone
PUC-Campinas
Membro



.....
Neidi Garcia Penna
DTCA - UFSM
Membro

200636117

*"Agora que a velhice começa,
preciso aprender com o vinho a melhorar envelhecendo,
e sobretudo,
escapar do perigo terrível de envelhecendo virar vinagre."*

Dom Helder Câmara

Dedico e agradeço especialmente a meus pais *Vicente e Maria,*

“Nós não tivemos a oportunidade de estudar e, hoje, nos orgulhamos de ver o resultado do nosso esforço”

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a *Deus*, pela vida e por ter permitido que este trabalho fosse realizado.

A *Faculdade de Engenharia de Alimentos*, especialmente ao *Departamento de Ciências de Alimentos*, por possibilitar que este trabalho fosse desenvolvido.

Aos membros da *Banca Examinadora*, pelas sugestões e contribuições apresentadas.

À *vinícola Velho Amâncio*, obrigada pelas amostras dos vinhos analisados nesse trabalho, e pela oportunidade de aprender a magia de produzir o néctar dos deuses: o vinho.

À equipe do *Centro Interdipartimentale di Spectrometri di Massa-CISM*, pela oportunidade da realização do doutorado sanduíche. Agradeço em especial ao Diretor *Giusseppe Pieraccini* e ao pesquisador *Guido Mastrobuoni* pela atenção, paciência e aprendizado dispensado “con la brasiliana”.

À Profa. *Helena* por todo o carinho, orientação, paciência, amizade e por se mostrar um grande exemplo a ser seguido.

Ao prof. *Daudt*, pela co-orientação neste trabalho e por me presentear com o seu conhecimento e com a sua paixão pela viticultura e pela enologia.

Ao pesquisador *Gianluca Bartolucci*, pela orientação do doutorado sanduíche.

À mestre *Aline Fogaça*, pela oportunidade de vivenciar a rotina e o duro trabalho de uma vinícola. Obrigado pelo aprendizado e pela amizade.

Ao *Roger*, que é hoje, o meu irmão “mais velho”, e nosso inseparável amigo *Cd*, obrigado pela amizade e pelos tantos chimarrões que tomamos juntos esperando as corridas cromatográficas terminarem.

À minha irmã loira, *Lísia* e seu inesquecível “*bejinho!! Tchau!!*”, brigadinha.

Às minhas irmãs *Camila, Ju, Silvana e Lísia*, obrigado por permitirem que eu dividisse a minha vida com vocês, e tenho certeza que a morada de vocês no céu está garantida.

As minhas queridas irmãzinhas da masmorra, *Cíntia, Giovanna, Michelle* e os seus bravos guardiões: o *Fábio, o Mário, o Juliano*, obrigada pela amizade, pelo carinho e pela paciência.....que algumas vezes foi graaaande.

A um grande amigo *baiano*, simplesmente, muito obrigado.

Meus Irmãos, obrigado por aqui em Campinas serem a minha família.

Aos amigos do lab. *Dani, Cica, Élede, Paulo e Rodrigo*, obrigada pela paciência, pela amizade e pela colaboração. Vocês fizeram o peso da tese se tornar mais leve.

A *Cris* e a *Gi* por estarem sempre prontas a ajudar quando precisei.

Ao *Cosme*, pela atenção e disposição em ajudar sempre, muito obrigada.

À todos os *amigos que encontrei neste caminho*, que ao partirem levam um pouco de nós, mas com certeza deixam um pouco si, muito obrigada.

A *todos* que ajudaram de uma forma ou de outra na realização deste trabalho, muito obrigada.

Elizete

“Un bicchieri di vino alla menestra fa saltare il dottore dalla finestra”

Ditado popular

RESUMO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de alguns compostos fenólicos e de folatos (compostos com atividade semelhante a do ácido fólico) na fabricação de vinho tinto (Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir e Isabel) e vinho branco (Niágara). Os compostos fenólicos analisados foram: ácido gálico, ácido *p*-coumárico, ácido caféico, ácido ferrúlico, ácido vanílico, quercetina, kaempferol, (+)catequina, (-)epicatequina e trans-resveratrol. Foram analisadas amostras no início e no final da fermentação alcoólica, no final da fermentação maloláctica e de 3 em 3 meses até 1 ano de conservação e envelhecimento. Os resultados mostraram que o maior aumento de fenóis totais ocorreu durante a fermentação alcoólica, confirmando o que é sabido sobre a extração de fenóis das cascas e das sementes da uva para o meio alcoólico. Os valores passaram de 775,7 para 1361,7 mgL⁻¹ para vinho Cabernet Sauvignon e de 541,4 para 1249,5 mgL⁻¹ no vinho Pinot noir. No caso dos vinhos de Merlot e de Isabel os valores aumentaram de 159,3 para 1107,2 mgL⁻¹ e de 343 para 721,6 mgL⁻¹, respectivamente. Já para os compostos fenólicos, individualmente determinados nesse estudo, de uma forma geral, o aumento maior ocorreu depois do processo de fermentação maloláctica até um ano após a vinificação. Esse comportamento ocorre, provavelmente, por que os compostos fenólicos determinados por CLAE são compostos agliconas e sofrem hidrólise devido às condições de pH e do processos enzimáticos do vinho. Dentre as variedades analisadas, o Cabernet Sauvignon foi aquela que apresentou o ácido gálico em quantidades maiores comparado às demais variedades. Já entre Merlot, Pinot Noir e Isabel, como composto de destaque apareceram o resveratrol, as catequinas e a quercetina, respectivamente. Para os folatos, os resultados mostraram que os níveis aumentaram durante o processo fermentativo, mantendo os níveis estáveis durante 1 ano para os vinhos tintos Cabernet Sauvignon e Merlot, 6 meses para o Pinot noir e o Isabel e 2 meses para os vinhos brancos. Depois desse período, os

níveis de folatos começaram a diminuir e em certos casos, até desaparecem do meio, como foi observado nos vinhos da variedade Niágara 6 meses após a vinificação. Os vinhos tintos de viníferas se mostraram uma fonte de folatos por apresentarem quantidade semelhantes a outros alimentos considerados fonte destes compostos.

Palavras chave: Vinho, compostos fenólicos, folatos, vinificação

ABSTRACT

The objective of this work was to determine the behavior of some phenolic compounds and folates in the manufacture of the red wine (Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir and Isabel) and white wine (Niagara). The phenolic compounds analyzed had been: gallic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, ferrulic acid, vanilic acid, quercetina, Kaempferol, (+)catechin, (-)epicatechin and trans-resveratrol. Samples in the beginning and the end of the alcoholic fermentation, in the end of the malolactic fermentation and every 3 months until 1 year of conservation and maturation had been analyzed. The results had shown that the total phenol increase during the alcoholic fermentation, due the phenol extraction of the grape skins and seeds for the alcoholic way, as cited at literature. The values had increased of 775.7 for 1361.7 mgL⁻¹ for wine Cabernet Sauvignon and of 541.4 for 1249.5 mgL⁻¹ in the Pinot noir wine. And in the case of Merlot and Isabel wines the values had increased of 159.3 for 1107.2 mgL⁻¹ and 343 for 721.6 mgL⁻¹, respectively. Already for phenolic compounds, individually determined in this study, in general, the increase occurred after the process of malolactic fermentation up to one year the winemaking. This behavior occurs, probably, because the phenolic compounds determined for HPLC are aglicone molecules are composites aglicone and occur hydrolysis due to the conditions from pH and the enzymatic processes of the wine. Amongst the analyzed varieties, the Cabernet Sauvignon was that one that presented acid the gallic one in bigger amounts compared with the too much varieties. Already between Merlot, Pinot Noir and Isabel, as composed of prominence they had appeared resveratrol, the catequins and the quercetin, respectively. For the folates, the results had shown that the levels had increased during the fermentative process. After this process the stable levels keeping for 1 year for the red wines Cabernet Sauvignon and Merlot, 6 months for Pinot noir and Isabel and 2 months for the white wines. Later the levels of folates decreased and in certain cases until they disappear of the wine, as it was observed in the Niagara

wine, 6 months after the winemaking. The vinifera red wine can be considered source of folates for presenting similar amount to others food sources this compounds.

Keywords: Wine, phenolic compounds, folates, vinification

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1 – COMPOSTOS FENÓLICOS E FOLATOS EM VINHOS	5
RESUMO	6
SUMMARY	7
1 - VINHO	8
1.1 - Histórico e considerações gerais	8
1.2 – Elaboração de vinho tinto e de vinho branco	12
2 – COMPOSTOS FENÓLICOS	14
2.1- Origem e presença de compostos fenólicos na uva e no vinho	14
2.2- Fatores que afetam a presença de fenólicos na uva e no vinho	19
2.3- Efeito dos compostos fenólicos na saúde	22
2.4- Análise de compostos fenólicos	27
3 – FOLATOS	30
4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
 CAPÍTULO 2 - VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHOS	 47
RESUMO	48
SUMMARY	49
1-INTRODUÇÃO	50
2- MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1- Material	51
2.2- Métodos	53
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	55

4- CONCLUSÃO	64
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
 CAPITULO 3 - COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHOS BRASILEIROS E SEU COMPORTAMENTO DURANTE O PROCESSAMENTO	 69
RESUMO	70
ABSTRACT	71
1- INTRODUÇÃO	72
2- MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1- Material	73
2.2- Métodos	75
3- RESULTADOS E DISCUSÃO	77
4- CONCLUSÕES	90
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	91
 CAPITULO 4 - PHENOLIC COMPOUNDS IN BRAZILIAN AND ITALIAN WINES	 95
RESUMO	96
ABSTRACT	97
ABSTRACT	98
1- INTRODUCTION	99
2- EXPERIMENTAL	100
3- RESULTS AND DISCUSSION	103
4- CONCLUSION	108
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
 CAPITULO 5 - FOLATOS EM VINHOS BRASILEIROS E SEU COMPORTAMENTO DURANTE O PROCESSAMENTO	 113

RESUMO	114
ABSTRACT	115
1- INTRODUÇÃO	116
2- MATERIAL E MÉTODOS	118
2.1- Materiais	118
2.2- Métodos	119
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
4- CONCLUSÕES	124
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	125
CONCLUSÃO GERAL	131

INTRODUÇÃO GERAL

O vinho sempre exerceu enorme fascínio sobre o homem e o tem acompanhado em sua trajetória pelo mundo desde os primeiros passos das antigas civilizações. Porém, nunca se atribuiu tanta importância ao vinho como nos dias atuais. O fenômeno é mundial, mas no Brasil, país de pouca tradição vinícola, ele se apresenta de forma muito marcante. Isso está ligado à abertura do mercado às importações e as exportações (Johnson, 1999). As prateleiras dos estabelecimentos de vendas estão cheias de vinhos das mais variadas procedências inclusive de regiões produtoras desconhecidas do consumidor como, por exemplo, a Austrália e a África do Sul.

A maior parte dos dados conhecidos da composição fenólica em uvas e vinhos são provenientes de países desenvolvidos, principalmente na área enológica, tais como França, Itália, Estados Unidos, Portugal e outros, e com tradição no cultivo da videira para a vinificação. No Brasil onde a implantação de pesquisa em vitivinicultura é relativamente recente, a falta de conhecimento da composição das uvas e dos vinhos é uma realidade, que limita a produção de vinhos em safras seqüenciais, com alta qualidade e que possa competir com os vinhos internacionais, tanto no mercado brasileiro como estrangeiro (Camargo, 2003).

Nos vinhos, os compostos fenólicos são importantes tecnologicamente, pelas suas propriedades de cor, característica de textura e envelhecimento, principalmente, nos vinhos tintos (Daudt e Polenta, 1999). Mais recentemente, a bebida tem-se destacado pelas suas características funcionais e propriedades de manutenção da saúde. O consumo moderado de vinho por um longo tempo induzem aos efeitos cardiovasculares protetores, provenientes principalmente, da presença do trans-resveratrol (Orralo et al. 2002) e dos flavonóides (Soobrattee, et al. 2005) na bebida. Pequenas doses de bebida alcoólica, especialmente o

consumo de vinho tinto, está associado à diminuição da concentração de homocisteína, que reduz os riscos de problemas cardiovasculares (Orallo et al. 2002; Dixon et al., 2002).

Desde a década de 90, muitos estudos dos componentes do vinho foram realizados baseados, principalmente, no fenômeno observado na França, que relaciona o alto consumo de gorduras saturadas pela população e a baixa incidência de doenças do coração e arterosclerose. A ingestão de vinho teria sido o fator responsável por esse fenômeno (Renaud e Lorgeril, 1992). Há também outros estudos mostrando que, além dos compostos fenólicos, os folatos também estariam associados ao "paradoxo francês" (Parodi, 1997). Os folatos são associados aos níveis de homocisteína do plasma e, conseqüentemente, os riscos de distúrbios coronários (Jacques, 1996; Coppola et al., 2005; Caruso et al, 2006).

Além disso, a crescente busca do consumidor por um produto que forneça além de suas propriedades básicas, benefícios à saúde, têm impulsionado as pesquisas de compostos funcionais nos mais diversos alimentos. O conhecimento da presença e da quantidade desses compostos nos vinhos é o princípio para melhorar as características e a qualidade do produto nacional e conseqüentemente, tornar o vinho brasileiro competitivo no mercado nacional e internacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMARGO, U. A. **Porta-Enxertos e Cultivares de Videira**, Embrapa, www.cnpvu.embrapa.br, 2003.
- CARUSO, R.; CAMPOLO, J.; SEDDA V.; DE CHIARA, B.; DELLANOCE, C.; BAUDO, F.; TONINI, A.; PAROLINI, M.; CIGHETTI G.; PARODI, O. Effect of homocysteine lowering by 5- methyltetrahydrofolate on redox status in hyperhomocysteinemia., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v 47, p.549-555, 2006.

- COPPOLA, A.; D'ANGELO, A.; FERMO, I. Reduced *em vivo* oxidative stress following 5-methyltetrahydrofolate supplementation in patients with early-onset thrombosis and 677TT methyltetrahydrofolate reductase genotype. **Br. J. Haematol.**, 131, p.100-108, 2005.
- DAUDT, C. E.; POLENTA, G. Phenols from Cabernet sauvignon and Isabel musts submitted to several treatments. **J. Sci. Tech. Tonnellerie**, v.5, p.57-64, 1999.
- DIXON, J. B.; DIXON, M. E.; O'BRIEN, P. E. Reduced plasma homocysteine in obese red wine consumers: a potential contributor to reduced cardiovascular risk status. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.56, p.608-614, 2002.
- JACQUES, P. F. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. **Circulation**, v. 93, p. 7-9, 1996.
- JOHNSON, H. **A história do vinho**. Companhia das letras, 1999.
- ORRALO, F.; ALVAREZ, E.; CAMINA, M.; LEIRO, J. M.; GOMEZ, E.; FERNANDEZ, P. The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. **Mol. Pharmacol**, v.61, p.294-302, 2002.
- PARODI, P. W. The French Paradox unmasked: the role of folate. **Med. Hypotheses**, v.49, p.313-318, 1997.
- RENAUD, S.; LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets and the French Paradox for coronary heart disease. **Lancet**, v.339, p.1523-1526, 1992.
- SOOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutat. Res.** 579, 2005.



CAPÍTULO 1

COMPOSTOS FENÓLICOS E FOLATOS EM VINHOS

Facco, Elizete Maria Pesamosca^{*1}; Fogaça, Aline de Oliveira²; Daudt, Carlos. Eugenio²; Godoy, Helena Teixeira¹

¹ - Depto de Ciências de Alimentos, FEA-UNICAMP, Campinas, SP, 13083-970, Brasil,
Fone: 55 35214024 *e-mail: elizetefacco@gmail.com

² - Depto de Tecnologia e Ciência de Alimentos, CCR-UFSM, Santa Maria, RS, 97105900,
Brasil, Fone: 55 2208254.

COMPOSTOS FENÓLICOS E FOLATOS EM VINHOS

Facco, E. M. P.; Fogaça, A. de O.; Daudt, C. E.; Godoy, H.T.

RESUMO

A crescente busca do consumidor por alimentos que forneçam, além de suas propriedades básicas, benefícios à saúde, tem impulsionado as pesquisas de compostos funcionais. A identificação destes compostos nos alimentos é importante e necessário para a agregação de valor aos mesmos e dos segmentos a eles ligado. Produtos de origem vegetal, como frutas e bebidas, são ricos em compostos fenólicos. Os vinhos têm sido estudados como potencial fonte de fenóis. O resveratrol, os flavonóides e as catequinas são as substâncias mais estudadas, por estarem associadas aos benefícios à saúde, principalmente, pela sua ação como antioxidantes. Os folatos têm a função de vitaminas e esta, mais recentemente sendo associada, também, com funções antioxidantes. O principal método utilizado para a determinação das diferentes classes de fenólicos nos alimentos é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada ao detector de arranjo de diodos (DAD), e mais recentemente, ao espectrômetro de massas (MS). Essa associação (CLAE-MS) fornece vantagens importantes em virtude da identificação e da confirmação da identidade desses compostos.

Palavras chaves: Compostos fenólicos, vinho, saúde

PHENOLIC COMPOUNDS AND FOLATES IN WINE

Facco, E. M. P.; Fogaça, A de O.; Daudt, C. E.; Godoy, H. T

ABSTRACT

The increasing search by the consumer for products that supply, beside the basic properties, health benefits, has stimulated research of functional compounds in the several foods. The identification of these compounds in food is very important and needed to add value to them and to the segment linked to it. Vegetables fruits and beverages are rich in phenolics compounds. Compounds like resveratrol, flavonoids and catechins had been linked to benefits, mainly, for their antioxidants action. The main method used to determine phenolic compounds in food is high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to diode array detector (DAD), and, more recently, to mass spectrometer (MS). This last configuration (HPLC-MS) has many important advantages with regard to identification and confirmation of the compounds.

Keywords: Phenolic compounds, wine, health

1 - VINHO

1.1 – HISTÓRICO E CONSIDERAÇÕES GERAIS

Mais do que um luxo, o vinho foi uma bebida sagrada por excelência. Dos rituais a Dionísio, na Grécia antiga, até a celebração da eucaristia católica, repetida até hoje, ele atravessou milhares de anos sem perder sua aura divina. Seu comércio aproximou povos, mobilizou monarcas, enriqueceu Estados e foi sinônimo do poder. Desde a Idade Média, o vinho era mais do que uma simples bebida de celebração. Renomados médicos da antiguidade como Hipócrates, Galeno e Celsus já exaltavam as propriedades alimentares e medicinais do vinho. Pode-se destacar ainda que, considerando a péssima qualidade da água que se bebia, o vinho era uma bebida mais segura (Johnson, 1999).

No Brasil a videira foi introduzida por Martins Afonso de Sousa, no século XVI, na capitania de São Vicente, no atual estado de São Paulo. Os registros históricos relatam que, no Rio Grande do Sul, a videira foi introduzida pela missão jesuítica do século XVII. Assim, os primeiros vinhedos gaúchos foram implantados com variedades espanholas e portuguesas de *Vitis vinifera*, seguidas das italianas e alemãs (Cataluña, 1991).

Nas primeiras décadas do século XIX, com a importação de uvas americanas, rústicas e produtivas surgiram as doenças fúngicas que dizimaram a viticultura colonial. A partir dessa fase, a cultivar Isabel, por ser resistente às doenças, passou a ser plantada nas diversas regiões do país, tornando-se a base do desenvolvimento da viticultura comercial nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul. A partir do início do século XX, o panorama da viticultura paulista e gaúcha mudou, pois foram reintroduzidas as cultivares viníferas e, assim, a

difusão de híbridas e viníferas começou a alterar a composição dos vinhedos, principalmente no Rio Grande do Sul, onde as condições climáticas são mais favoráveis ao seu desenvolvimento (Camargo, 2003). São Paulo substituiu a cultivar Isabel pelos cultivares Niágara e Seibel 2 e a região sul recebeu incentivos para o cultivo de viníferas (Protas, *et al.*, 2002). A evolução de recursos tecnológicos aplicados à viticultura e enologia, entre os quais se incluem o melhoramento genético de cepas de uva, o desenvolvimento de cepas de leveduras selecionadas, a colheita mecanizada e o controle de temperatura na fermentação, contribuíram para a formação do novo panorama da enologia mundial e brasileira (Camargo, 2003).

Deve ser mencionado, ainda, que a viticultura tropical foi efetivamente desenvolvida no Brasil, 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 (Camargo, 2003).

O vinho é definido como uma bebida obtida da fermentação alcoólica do mosto de uvas sãs, frescas e maduras, contendo álcool etílico em proporções variáveis de 9 a 13% em volume e outros produtos da fermentação alcoólica. Suas características físico-químicas dependem da matéria-prima, de fatores ambientais e do processo de fermentação. Variações nestes fatores contribuem para a diversidade dos vinhos e se refletem na sua composição química. Vinhos elaborados com outras frutas devem obrigatoriamente, pela legislação brasileira, serem denominados com a palavra vinho seguida do nome da fruta (Amerine *et al.*, 1967).

A classificação dos vinhos, no Brasil, foi regulamentada pelo Ministério da Agricultura pela lei nº 7.678 de 08.11.1988 que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e alterada sob o decreto nº 10.970 de 12.11.2004 (Brasil, 2004). Quanto à classe os vinhos são classificados como: fino, de mesa, leve, frisanter, espumante, gaseificado,

licoroso e composto; quanto à cor a classificação dos vinhos é: tinto, rosado (rose ou clarete) e branco; E quanto ao teor de açúcar os vinhos finos, de mesa, leves e frisantes são classificados como: seco, demi-sec e suave ou doce (Brasil, 2004).

As uvas cultivadas no Brasil são classificadas como européias (*Vitis vinifera*), denominadas finas, e americanas ou híbridas (cruzamento entre européias e americanas), denominadas comuns (Cataluña, 1988). As cultivares americanas ou híbridas são cultivares de *Vitis labrusca*, *Vitis bourquina* e híbridos interespecíficos, às vezes complexos, envolvendo várias espécies americanas e também *Vitis vinifera*. Como regra, são cultivares de alta produtividade e resistentes às doenças fúngicas, adaptando-se bem às condições ambientais do Sul do Brasil. Para a produção de vinhos comuns de mesa e sucos são utilizadas as variedades híbridas e americanas (Camargo, 2003).

Por outro lado, as cultivares de *Vitis vinifera* usadas para a fabricação de vinhos finos, são as mais cultivadas no mundo, produzindo uvas para mesa, vinho, passas e outros derivados. São consideradas uvas de alta qualidade. Dentre as viníferas tintas, destacam-se as cultivares Cabernet Sauvignon, Merlot, Cabernet Franc e Tannat e, entre as brancas, destacam-se a Moscato, Riesling Itálico, Trebbiano e Chardonnay (Camargo, 2003).

Segundo o IBGE, a safra de 2004, foi uma das maiores em termos de quantidade de uva produzidas: 1.283.203 t de uvas. Já na safra de 2005 houve uma redução de 2,89%, o que segundo Mello (2006), não chega a representar uma redução no agronegócio, pois a qualidade da safra 2005 foi excepcional. Na **Tabela 1** são apresentados os valores da quantidade em kg de grupos de uvas vinificadas, em 2002, 2003, 2004 e 2005, no estado do Rio Grande do Sul. A safra de 2004 foi a maior em quantidade de uva processada, e a safra de 2005 teve um aumento na quantidade de uvas finas transformadas em vinhos.

Cerca de 80% da produção é de uvas americanas (*V. labrusca*, *V. bourquina*) e híbridas, sendo a Isabel a cultivar de maior expressão. A maior parte

da uva cultivada é destinada à elaboração de vinhos, sucos e outros derivados. Uma pequena porcentagem da produção é destinada ao consumo *in natura* (Protas *et al.*, 2002).

Tabela 1. Produção de Uvas no Rio grande do Sul, em toneladas.

Produção	2002	2003	2004	2005
Uva para vinho de mesa	259.589.740	202.545.724	312.549.281	226.080.432
Tinto	215.892.333	155.513.687	252.979.739	180.698.666
Rosado	35.329.657	40.861.639	51.497.025	39.212.146
Branco	8.367.750	6.170.398	8.072.517	6.169.620
Uva para vinho fino	31.655.226	29.551.457	43.084.644	45.453.898
Tinto	13.619.033	15.357.576	23.160.118	25.409.805
Branco	17.911.689	14.058.481	19.887.747	20.012.363
Rosado	124.504	135.400	36.779	31.730
Suco de uvas simples	5.505.889	4.659.258	6.200.037	9.798.024
Suco concentrado*	73.614.010	55.241.820	89.390.375	97.566.220
Outros derivados	19.932.187	20.741.475	21.693.858	23.549.751
Total	390.297.052	312.819.734	472.918.195	402.448.325

*transformados em litros de suco simples.

Fontes: União Brasileira de Vitivinicultura – Uvibra, Instituto Brasileiro do Vinho – Ibravin

Adaptação: Mello, 2006 – Embrapa Uva e Vinho

O grande interesse em uvas e derivados tem aumentado nos últimos anos em função da crescente atribuição a esses produtos de funções que contribuem

ou promovem a saúde humana, quando ingeridos moderadamente. O princípio das pesquisas sobre as propriedades desses alimentos está associado a um dos mais discutidos fenômenos que teve o seu início na França, país onde foi constatado alta ingestão de alimentos ricos em gordura e a baixa ocorrência de distúrbios cardiovasculares, relacionados a ingestão de alimentos lipídicos (Renaud e Lorgeril, 1992). O vinho tem sido associado a esse paradoxo como um dos grandes responsáveis por esse fenômeno (Parodi, 1997) principalmente por conter resveratrol e outros compostos fenólicos

1.2 - ELABORAÇÃO DE VINHO TINTO E DE VINHO BRANCO

A avaliação da maturidade da uva tinta e branca é observada pelo aumento na porcentagem de açúcares redutores e pH, e decréscimo da acidez titulável (Amerine et al., 1967) e mais, recentemente, também pelo grau da maturação fenólica (Vivas, 1998).

No Brasil a colheita é manual e, geralmente, é executada entre os meses de janeiro e abril. As uvas são condicionadas em caixas plásticas de 25 Kg, de modo a evitar o esmagamento prematuro do produto (Amarante, 1986). O primeiro processo que a uva sofre ao chegar na vinícola é o esmagamento, feito em desengaçadeira. A desengaçadeira tem duas funções fundamentais: retirar o engaço (cacho da uva) e esmagamento do grão sem o rompimento da semente, evitando assim um excesso de compostos taninos no vinho. As uvas esmagadas ou mosto são, então, transportados para os tanques onde inicia o processo de fermentação (Amerine et al. 1967).

Após o processo de desengaçagem é feita a sulfitação, adição de SO₂ para prevenir a fermentação acética e inibir a atividade de polifeniloxidas, parte é perdida durante a fermentação (Amerine et al.1967).

Nos fermentadores, geralmente de inox, o mosto, junto com o bagaço recebe a adição de cultura de leveduras selecionadas (*Saccharomyces cerevisiae*) para favorecer uma fermentação homogênea. Na primeira etapa ocorre a fermentação alcoólica ou tumultuosa, responsável pela transformação do açúcar em álcool e a extração dos compostos presentes na casca e nas sementes do grão da uva (Cataluña, 1991). A variação do tempo de exposição das cascas e da semente durante a fermentação e a temperatura usada nesse processo são fatores marcantes na extração de compostos fenólicos (Kovac *et al.*,1992). Logo após quando desejável ocorre a fermentação lenta ou maloláctica que constitui uma melhora considerável do vinho, que o torna macio e elimina a característica ácida do vinho novo ou de vinhos excessivamente ácido (Amerine et al., 1967)

Para a vinificação em branco são realizadas a desmontagem e a debourbagem, que consistem na separação do mosto das cascas e da parte sólida, ocorrendo a fermentação somente com a parte líquida. Quando necessário é realizada a correção do teor de açúcar até limites estabelecidos pela legislação. (Cataluña, 1991).

A característica principal da vinificação em tinto reside no fato de o mosto fermentar em contato com quase todo o cacho. Esse processo é responsável pela extração de substâncias úteis para o envelhecimento e maturação dos vinhos tintos, como os compostos fenólicos (Cataluña, 1991).

Após a fermentação lenta o mosto é transfegado para outros recipientes, sendo submetido aos estágios de estabilização, onde as partículas sólidas se depositam na parte inferior. O vinho é, periodicamente, transfegado para outros recipientes esterilizados até que atinja o ponto de clarificação desejado (Jackson, 1994).

Assim, o vinho pronto inicia o processo de envelhecimento, que pode ocorrer na garrafa, em tonéis ou em barris de carvalho. Normalmente os vinhos brancos não são envelhecidos ou são envelhecidos por poucos anos. Já os vinhos tintos precisam dessa etapa para que adquiram o “bouquet” característico de cada variedade e desejáveis ao consumidor.

2 - COMPOSTOS FENÓLICOS

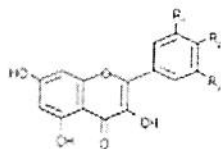
2.1 – ORIGEM E PRESENÇA DE FENÓLICOS NA UVA E NO VINHO

Os compostos fenólicos são largamente distribuídos no reino vegetal fazendo parte da composição da dieta de forma significativa e são particularmente importantes atrativos como agentes profiláticos e também pelo seu efeito plurifarmacológico (Bahorun *et al.*, 2004; Soobrattee *et al.*, 2005). Em vinhos tintos foram identificados mais de 200 compostos fenólicos diferentes (German e Walzem, 2000).

Os compostos fenólicos são classificados em dois grandes grupos, os flavonóides e os não flavonóides. Os flavonóides representam o maior grupo de polifenóis encontrados em alimentos (Scalbert e Willianson 2000), além de serem considerados os mais potentes antioxidantes entre os compostos fenólicos (Shahid *et al.*, 1992; Soobrattee *et al.*, 2005). Os principais flavonóides presentes no vinho abrangem os flavonóis (quercetina, kaempferol e miricetina); os flavanóis (+)-catequina, (-)-epicatequina, galocatequina, procianidinas, taninos condensados) e as antocianinas, (cianina e principalmente a malvidina-3-glicosídeo). Dentre os fenólicos não flavonóides destacam-se os derivados do ácido hidroxibenzóico, ácido gálico e elágico; os derivados do ácido

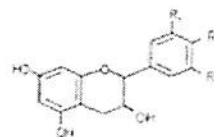
hidroxicinâmico (ácido cafeico, caftárico e *p*-coumárico) e o estilbeno (resveratrol *cise trans*) (Jackson, 1994) (Figura 1).

FLAVONÓIS



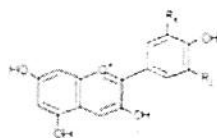
$R_2 = \text{OH}, R_1, R_3 = \text{H}$: Kaempferol
 $R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$: Quercetina
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$: Miricetina

FLAVANÓIS



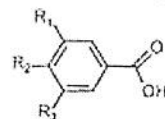
$R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$: Catequina
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$: Galocatequina

ANTOCIANINAS



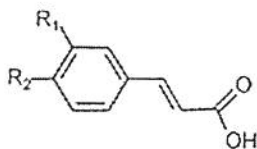
$R_1 = R_2 = \text{H}$: Pelargonidina
 $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}$: Cianidina
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$: Delfinidina
 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}$: Petunidina
 $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$: Malvidina

ÁCIDO HIDROXIBENZÓICO



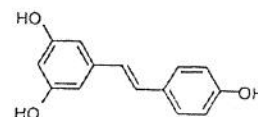
$R = R_2 = R_3 = \text{OH}$: Ácido gálico

ÁCIDO HIDROXICINÂMICO



$R_1 = \text{OH}$: Ácido coumarico
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$: Ácido caféico
 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}$: Ácido ferrúlico

STILBENO ou ESTILBENOS



Resveratrol

Figura 1 – Estrutura química dos principais representantes dos compostos fenólicos encontrados em vinhos.

As antocianinas são flavonóides que se encontram largamente distribuídos na natureza e são responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e todas as tonalidades de vermelho que aparecem em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas (Markakis, 1982). Nas videiras, elas acumulam-se 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 e Lorgehil, 1992).

As antocianinas são compostos que, com o envelhecimento do vinho tendem a formar complexos com outros compostos fenólicos dando a estabilidade de cor desejável ao vinho, e também estão associadas aos efeitos benéficos à saúde (Tedesco et al., 2001).

Os flavonóis se acumulam nas cascas e folhas das plantas porque a sua síntese é estimulada pela luz. Isso pode explicar a possível diferença de composição entre frutos de uma mesma planta, ou seja, os frutos que recebem uma maior quantidade de luz tendem a ter uma síntese pronunciada desses compostos (Price et al., 1995). Os flavonóis são os pigmentos amarelos da uva e são encontrados principalmente na película, e geralmente, ligados a açúcares como a glicose, rafinose e o ácido glucorônico. O flavonol predominante nas cultivares de *Vitis vinifera* é o kaempferol, enquanto que nas cultivares de *Vitis labrusca* é a quercetina (Jackson, 1994).

A (+) -catequina e (-)-epicatequina são as unidades básicas do grupo dos flavanóis. As procianidinas (também conhecidos como taninos condensados) são formadas pela associação de várias unidades monoméricas (2 a 5 unidades) de catequinas oligoméricas, além de 5 unidades de catequinas poliméricas. As procianidinas diferem em posição e configuração de outras ligações monoméricas. A estrutura das procianidinas dímeras B₁, B₂, B₃ e B₄ lhes conferem propriedades antioxidantes as quais podem inibir os processos de trombose arterial (Teissedre e Landrault, 2000). A catequina e a epicatequina são, normalmente, encontradas em frutas, enquanto que a galocatequina, a epigalocatequina e a epigalatocatequina

são encontradas em sementes (Yilmaz e Toledo, 2004) e, principalmente, em chás (Luximon-Ramma *et al.*, 2005).

A quantidade de catequinas, proantocianinas e seus derivados com características tânicas é baixa em vinhos brancos (Jackson, 1994) e em extratos de uva tinta (Revilla *et al.*, 2000). Os resultados encontrados na literatura para a (+)-catequina e para a (-)-epicatequina, em vinhos tintos, variam muito abrangendo, de uma forma geral, valores que vão de 7mgL^{-1} (Rodriguez-Delgado *et al.*, 2001) a $81,7\text{mgL}^{-1}$ (Frankel *et al.*, 1995) para a epicatequina e de $10,6\text{mg/L}$ (Rodriguez-Delgado *et al.*, 2001) até 169mgL^{-1} para a (-)-epicatequina (Frankel *et al.*, 1995).

Em vinhos, os flavonóis contribuem, principalmente, para as características aromáticas e de cor e os flavanóis, especialmente os taninos, contribuem com a adstringência (Amerine e Ough, 1980).

Os ácidos fenólicos são os compostos derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico, geralmente encontrados na forma de ésteres do ácido caftárico, localizados, principalmente, na película (Jackson, 1994). Os ácidos cinâmicos, principalmente, o ácido *p*-coumárico, o ácido caféico, o ácido ferrúlico e o ácido sinápico são mais comumente encontrados que os ácidos hidroxibenzóicos. Esses ácidos são, raramente, encontrados na forma livre, exceto em alimentos que passam por processos de congelamento, esterilização e fermentação. (Manach *et al.* 2003). Para ácidos fenólicos em vinhos, os valores médios encontrados por esses autores foram de $31,43\text{mgL}^{-1}$ para ácido caftárico, $7,07\text{mgL}^{-1}$ para o ácido caféico, $7,5\text{mgL}^{-1}$ para o ácido coumárico. Esses dados dependem muito do processo contínuo de hidrólise dos ésteres onde estes são hidrolizados a ácidos. Dessa forma, vinhos envelhecidos tendem a ter mais ácidos livres (Ritchey e Waterhouse, 1999). Os autores ainda comentam que o nível de fenólicos foi geralmente maior em vinhos como Cabernet Sauvignon quando comparados com vinhos de mesa produzidos em grande escala.

Os estilbenos são representados principalmente pelo resveratrol (3,5,4' – trihidroxiestilbeno). A síntese inicia na condensação de 3 malonil-CoA com o *p*-coumaril CoA formando tanto o *cis* como o *trans*-resveratrol (Harbone e Dey, 1997). As uvas e os produtos relacionados, como o vinho são, provavelmente, os produtos alimentícios que contêm os maiores teores de resveratrol. Primeiramente, foi demonstrado que o resveratrol atua como fitoalexina, uma classe de antibiótico da planta, e que é sintetizado quando a planta é submetida a um estresse, como o ataque de patógenos, radiação UV ou lesão (Bravo, 1996). A segunda razão do grande interesse dos pesquisadores sobre o resveratrol são os possíveis benefícios para a saúde humana, principalmente pelas suas propriedades antioxidantes e a diminuição da incidência de distúrbios cardiovasculares (Frankel et al., 1995; Bravo, 1996; Stivala et al., 2001). Em vinhos tintos a quantidade de *cis* e *trans*-resveratrol encontrada varia de valores não detectados a valores próximos de 2mg/L, valores que corroboram com os encontrados por Dominguez et. al. (2001) e López et al. (2001).

Até pouco tempo atrás, praticamente não se comentava muito da importância dos compostos fenólicos na alimentação. No entanto, nos últimos anos, em função da popularização do conceito de alimentos funcionais e da sua associação a essa classe, os compostos fenólicos passaram a ter grande importância na alimentação. A busca de novas fontes e o avanço nas hipóteses formuladas para os mecanismos de ação na prevenção de doenças, tem impulsionado as pesquisas na área.

O vinho foi uma das primeiras bebidas a ser pesquisada, pela sua associação com o “Paradoxo francês”. A análise de multi-variáveis mostrou que o consumo de vinho tinto foi o único fator da dieta que mostrou correlação negativa com a aterosclerose e os distúrbios coronários e pode ajudar a explicar esse paradoxo (Renaud e Langeril, 1992).

2.2 – FATORES QUE AFETAM A PRESENÇA DE COMPOSTOS FENÓLICOS NA UVA E NO VINHO

A síntese dos polifenóis tem início durante o desenvolvimento do grão da uva. Algumas antocianinas são sintetizadas nas primeiras etapas, mas a maior produção, nesta fase, é mesmo de outros fenóis flavonóides e não flavonóides (Jackson, 1994). A síntese pronunciada de compostos fenólicos somente começa depois do “veraison” mas o tempo específico da produção desses pigmentos característicos da uva e do vinho depende de diversos fatores. “Veraison” é o período do começo da maturação da baga. As bagas tornam-se macias e adquirem a cor característica da sua variedade específica. Do começo do veraison à colheita as bagas aumentaram no volume, no peso e no índice de açúcar (Mullins et al., 2002),

A presença desses compostos em uvas e seus derivados estão sendo muito estudados nos últimos anos. Os taninos situam-se no envelope externo das sementes e um pouco nas camadas internas. Encontram-se basicamente taninos oligoméricos, que são bastante agressivos e ásperos ao paladar, mas importantes durante a estabilização do vinho, pois participam das reações de condensação com as antocianinas (Daudt, 1998).

O longo contato com a casca durante a vinificação, a temperatura, a presença das sementes e, às vezes, do engaço e de enzimas, são fatores que tem grande influência na extração dos fenólicos (catequinas e procianidinas) durante a fermentação do suco da uva (Kovac et al., 1992).

Conforme já citado o efeito do potencial de proteção à saúde dos vinhos tintos pode ser realçado pelo aumento da quantidade de compostos fenólicos. Esse aumento pode ser obtido através de uma combinação no processamento da uva destinada à produção do vinho. Uma combinação de aquecimento da mistura e fermentação na casca aumenta a razão de transferência de polifenóis bioativos

(especialmente antocianinas, flana-3-ols, flavanols e resveratrol) da uva para o produto final (Netzel *et al.*, 2003).

O conteúdo relativo de compostos fenólicos varia de cultivar para cultivar, e mesmo dentro de uma mesma cultivar podem ocorrer diferenças, devido à diversos fatores edafoclimáticos, como as diferenças de temperatura, de irrigação, de intensidade de luz, composição do solo, entre outros (Amerine e Joslyn, 1987; Singleton e Trousdale, 1983; Tomás-Barberán *et al.*, 2001; Cantos *et al.*, 2002). A variação da ocorrência de substâncias fenólicas em vinhos tintos não é somente em função das características da viticultura, mas também e não menos importante, das técnicas enológicas (Netzel *et al.*, 2003; Saucier *et al.*, 1997). Fatores de importante influência são a vindima, o tempo de colheita da uva e o tempo de armazenagem do vinho na garrafa, pelas reações que ocorrem durante o processo de maturação do vinho. Essas reações de condensação que têm efeito em antocianinas, catequinas e procianidinas proporcionam uma longa vida de prateleira para os vinhos tintos, resultando numa diminuição destas substâncias em prol da formação de novos pigmentos poliméricos (Echeverry *et al.*, 2005; Netzel *et al.*, 2003; Saucier *et al.*, 1997).

Em vinhos brancos também ocorrem alterações qualitativas e quantitativas no conteúdo de compostos fenólicos. Essa variação ocorre em função da variedade da uva utilizada, do estado de maturação, dos fatores ambientais, bem como variações nas técnicas de extração e elaboração dos vinhos. As operações de desengace, eliminação de sementes e o tempo que o suco permanece em contato com a casca também são fatores que se somam na variação do conteúdo de compostos fenólicos em vinhos (Singleton e Trousdale 1983; Frankel *et al.*, 1995).

Umas das técnicas que está sendo muito usada nas vinícolas é a substituição do barril de carvalho pelo uso dos *chips*. Arapitsas *et al.* (2004) analisando vinhos que foram submetidos ao tratamento com os chips e com o

envelhecimento do barril de carvalho, concluíram que para a maioria dos compostos fenólicos não houve diferença marcante entre os dois vinhos. Os autores também comentaram que alguns desses compostos, como o guaiacol, o ácido vanílico e o furfural poderiam ser usados para identificar qual foi a técnica usada no amadurecimento do vinho.

Em função da grande quantidade e da diversidade dos compostos fenólicos em uvas e vinhos, esses, mais recentemente, vem sendo usados como um parâmetro a mais na classificação de vinhos. A similaridade de alguns compostos e a diferença de outros servem como base de dados para a análise de variáveis e classificação dos vinhos (Villers *et al.*, 2005)

Os compostos fenólicos interagem entre si e com outras moléculas para formar novos compostos que são responsáveis pela estabilidade e maturação dos vinhos e são formados, principalmente, durante a estocagem e envelhecimento. Recentemente algumas pesquisas (Es-Safi *et al.*, 2003; Gutierrez *et al.*, 2005; Duenas *et al.*, 2006) objetivam elucidar essas moléculas e também relatam a importância da presença desses compostos na qualidade do vinho. Essas pesquisas sugerem que a seqüência de diversas reações enzimáticas e não enzimáticas, que ocorrem em derivados de frutas, podem alterar a coloração e a estabilidade durante a estocagem e o envelhecimento (Singleton *et al.*, 1987; Es-Safi *et al.*, 2003). Geralmente, as reações enzimáticas ocorrem durante as operações tecnológicas iniciais, como o esmagamento, (Singleton *et al.*, 1987; Cheynier *et al.*, 1995) e as interações não enzimáticas nos últimos estágios do processamento, na estocagem e no envelhecimento (Es-Safi *et al.*, 2003; Singleton *et al.*, 1987). Na etapa de envelhecimento de vinhos foi demonstrada a formação de novos pigmentos por copigmentação (Fulcrand *et al.*, 1996; Gutierrez *et al.*, 2005; Duenas *et al.*, 2006) uma condensação direta entre aldeídos, antocianinas e flavonóis e pela influência de derivados de aldeídos (Monagas *et al.*, 2005; Alcalde-Eon *et al.*, 2006).

A formação de compostos coloridos a partir de compostos sem cor é um conceito novo em enologia. O uso de técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (LC/ESI-MS) e a Ressonância Magnética Nuclear possibilitaram a elucidação de muitas estruturas e o entendimento do mecanismo de formação desses novos compostos (Duenas *et al.*, 2006, Alcalde-Eon *et al.*, 2006). Es-Safi e colaboradores (2003), usando a técnica de LC/ESI-MS e o auxílio da RMN, mostraram que a formação de estruturas pela reação de antocianinas e flavonóis é a ligação com o fenômeno da mudança de coloração no vinho envelhecido.

Os poucos dados sobre o teor de fenólicos em vinhos e uvas brasileiras levam em consideração os fenólicos totais por grama de amostra. Encontrou-se em vinhos produzidos na região da Serra Gaúcha-RS um teor de taninos, que é maior em Cabernet Sauvignon seguido da Merlot, Pinot Noir e Isabel (Ide, 1992). Quanto ao teor de polifenóis totais, o autor encontrou que, na safra de 1991 a quantidade é maior nos vinhos Merlot e menor nos vinhos da Isabel, e maior que os valores encontrados na safra de 1990.

Vinhos tintos brasileiros analisados apresentaram maiores teores de compostos fenólicos e os melhores resultados de avaliação de atividade antioxidante que os vinhos rosês e brancos. Observou-se também que os vinhos produzidos por diferentes variedades de uva como Merlot, Cabernet Sauvignon e Pinot Noir apresentaram diferentes teores de compostos fenólicos, sendo que a concentração destes também variaram entre os produtores, o que provavelmente, esta relacionado com às condições empregadas na vinificação e a qualidade da uva (Ishimoto, 2003).

2.3 - EFEITOS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NA SAÚDE

Nas uvas, os compostos fenólicos constituem o terceiro grupo mais importante dentre os compostos orgânicos. Os compostos fenólicos são metabólitos secundários naturalmente presentes em uvas e extraídos durante os processos de vinificação. A importância dos compostos fenólicos em enologia está em sua participação da cor dos vinhos tintos, no sabor amargo e adstringente, intervenção nos fenômenos de turvamento, participação sobre o aroma, além de constituir o principal reservatório de substâncias auto-oxidáveis, formando o maior sistema de proteção dos vinhos contra fenômenos de oxidação (Daudt e Polenta, 1999).

A autooxidação em alimentos e nos sistemas biológicos tem diversas implicações não somente para a grande área da ciência e da tecnologia de alimentos, mas também para o estado nutricional e para a saúde humana. Nos sistemas celulares, a peroxidação lipídica leva a produção de radicais livres. O sistema biológico é dotado de mecanismos de inativação desses radicais livres, pela ação de enzimas endógenas. Quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de radicais livres, seja pela queda de ação do sistema enzimático ou pelo excesso de produção de espécies radicalares, induz-se o estresse oxidativo. O estresse oxidativo está diretamente relacionado com diversos distúrbios do organismo como doenças coronárias, aterosclerose, câncer e processos de envelhecimento e de doenças degenerativas (Madhavi *et al.*, 1996).

Antioxidantes naturais ou sintéticos são amplamente estudados e têm um papel importante na prevenção ou retardamento das reações de autooxidação. Mais recentemente, as pesquisas estão direcionadas aos antioxidantes naturalmente presentes em alimentos, ou extratos desses. As bebidas alcoólicas têm sido associadas a esses efeitos benéficos pela possível ação dos compostos fenólicos e do álcool presente nesses produtos (Frankel *et al.*, 1993; Frankel *et al.*, 1995; Nigidikar *et al.*, 1998; Estruch, 2000; Orralo *et al.*, 2002; Wallerath *et al.*, 2005; Padilla *et al.*, 2005).

Um dos mais notórios estudos que investigaram a relação dos benefícios do consumo moderado de vinho e a sua relação com as doenças cardiovasculares foi realizado por Reunaud e Lorgerrill (1992), que correlacionaram os hábitos da população francesa, como o sedentarismo e o consumo de gordura saturada e colesterol, com a baixa incidência dessas doenças. O estudo revelou que possivelmente, esse paradoxo se devia ao consumo habitual de vinho tinto, que em comparação a outras bebidas alcoólicas é rico em compostos fenólicos (Frankel *et al.*, 1993; Frankel *et al.*, 1995; Nigidakar *et al.*, 1998; Estruch 2000; Orallo *et al.*, 2002; Wallerath *et al.*, 2005; Padilla *et al.*, 2005).

Além disso, o consumo moderado de bebida alcoólica, especialmente o consumo de vinho tinto, está associado à diminuição da concentração de homocisteína, a qual reduz os riscos de problemas cardiovasculares, o que pode explicar o “Paradoxo Francês” (Dixon *et al.*, 2002).

Soleas *et al.* (1997), numa revisão apresentada em 1997, relataram experimentos *in vitro*, *in vivo* e com animais que mostram que o resveratrol possui muitos atributos biológicos que favorecem a proteção contra a aterosclerose incluindo atividade antioxidante, inibição da agregação plaquetária, bem como a produção dos pro-aterogênicos eicosanóides através das plaquetas humanas. Os vinhos tintos representam a principal fonte de resveratrol na dieta humana e têm sido apontados como o maior constituinte da fração polifenólica, da qual os efeitos benéficos à saúde tem sido atribuídos.

A literatura também chama a atenção de um item importante para a constatação da atividade benéfica à saúde dos compostos fenólicos. A maior parte das pesquisas desse gênero é realizada *in vitro* e com os compostos provenientes de plantas. No entanto, estudos têm mostrado que os compostos fenólicos são metabolizados *in vivo*, no trajeto do intestino delgado pela ação do fígado e da microflora presente, resultando em alterações na estrutura inicial. Dessa forma

aidna não e sabe ao certo qual é a ação desses compostos no organismo. (Donavan e Waterhouse, 2003).

Frankel e Meyer (1998) sumarizaram dados da atividade antioxidante de vinhos e sucos comerciais de uva, com relação aos mais diversos compostos fenólicos, dentre eles as antocianinas, os flavonóis, os flavanóis, os derivados hidroxibenzoatos e hidroxicinâmicos. Polifenóis como o resveratrol e a quercetina, bem como outros antioxidantes do vinho, possuem baixas propriedades antioxidantes quando comparadas com extrato de vinhos envelhecidos em barris de carvalho, indicando que a interação entre os constituintes pode induzir os efeitos antioxidantes, e que estes não são, necessariamente, provenientes dos compostos simples (Tedesco *et al.*, 2000). O consumo moderado de vinho por um longo tempo induz aos efeitos protetores cardiovasculares provenientes, principalmente, da presença do *trans*-resveratrol na bebida. (Orallo *et al.*, 2002).

Segundo Soobrattee e colaboradores (2005), a atividade antioxidante dos flavonóis aglicona é relativamente alta, seguindo uma ordem decrescente para quercetina, a miricetina e o kaempferol. Segundo os autores, a atividade antioxidante dessa classe de compostos está relacionada com o número de grupos hidroxila, sendo que as moléculas com mais grupos hidroxila tem capacidade antioxidante melhor.

Frankel *et al.* (1993) estudaram, *in vitro*, o efeito dos fenólicos do vinho na susceptibilidade do LDL (low density lipoprotein) à oxidação e concluíram que os compostos fenólicos extraídos do vinho inibem a oxidação dessas lipoproteínas. Frankel *et al.* (1995) determinaram, *in vitro*, a atividade antioxidante de 20 vinhos comerciais da Flórida na inibição da oxidação do LDL. A inibição relativa foi de 37 a 65% em vinhos tintos e 3 a 7% em vinhos brancos, concluindo que a proteção à oxidação do LDL estaria atribuída a um grande número de fenóis constituintes do vinho. Teissedre e Landrault (2000) sugeriram que a inibição da oxidação do LDL

estaria associada à presença de compostos fenólicos presentes no vinho, particularmente a catequina, a malvidina, a procianidina B₁ e a quercetina.

Aumento nos teores de lipoproteínas de alta densidade (HDL), inibição da agregação de plaquetas, aumento na fibrinólise, são alguns mecanismos bioquímicos conhecidos que podem ser favorecidos com o consumo de vinhos tintos, e que estão associados a prevenção ou atenuação do desenvolvimento da aterosclerose (Goldberg *et al.*, 2003).

O extrato de vinho respondeu positivamente a ação antioxidante quando testado o seu efeito sobre as espécies reativas ao oxigênio. No entanto, a resposta encontrada quando testados a ação em particular do resveratrol e da quercetina, em concentrações similares as presentes no vinho, não foi a mesma. O efeito protetor do extrato é atribuído aos outros compostos fenólicos presentes no vinho, e que atuam como responsáveis pela proteção das injúrias oxidativas (Tedesco *et al.*, 2000).

Alguns estudos defendem a hipótese que, a ação benéfica das bebidas alcoólicas sobre os fatores de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, é de responsabilidade do álcool. Ou seja, a presença de compostos fenólicos não tem uma importância primária na diminuição dos fatores de risco (Hansen *et al.*, 2005). O efeito benéfico na inibição da oxidação do LDL pode vir também do álcool que exerce proteção aumentando os níveis séricos do (HDL)-colesterol, das apolipoproteínas A-I, A-II, LpA-I e a atividade da Pai-I (Estruch, 2000).

Outros pesquisadores defendem que o efeito benéfico do consumo regular de vinho está baseado no efeito somatório da ação dos compostos fenólicos e do etanol sobre o sistema cardiovascular, aterosclerose e oxidação do LDL (Estruch, 2000; Frankel *et al.*, 1993; Frankel *et al.*, 1995; Nigidakar *et al.*, 1998; Orallo *et al.*, 2002; Wallerath *et al.*, 2005; Padilla *et al.*, 2005). Estruch (2000) relatou o estudo realizado pela European Commission chamado "Wine and Cardiovascular

disease” que mostrou o efeito positivo do consumo moderado de vinho. O autor cita e discute, como possíveis mecanismos de ação benéfica, o aumento dos níveis séricos de HDL-colesterol e de apolipoproteínas, a atuação no sistema de coagulação, no enfarto do miocárdio, a ação antioxidante e a regulação do fluxo sanguíneo diminuindo os problemas com a aterosclerose. Naissides *et al.* (2004) destacaram que o consumo prolongado de doses moderadas de vinho tinto teve um efeito negativo em relação às doenças cardiovasculares.

No entanto, algumas pesquisas relatam que o consumo de bebidas ricas em compostos fenólicos como o vinho nem sempre têm um resultado benéfico na manutenção da saúde (Eigenbrodt *et al.*, 2006; Zilkens *et al.*, 2005). Zilkens *et al.*, (2005) demonstraram num estudo que os polifenóis do vinho tinto não têm um papel significativo na diminuição dos efeitos de pressão alta do sangue em humanos.

2.4 - ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A análise dos compostos fenólicos tem sido, comumente, realizada por métodos colorimétricos e enzimáticos que determinam as quantidades totais desses compostos. No entanto, são métodos que exigem longo tempo de análise, além de serem trabalhosos e poucos sensíveis.

A concentração total de compostos fenólicos é determinada pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965) e o resultado expresso em equivalente de ácido gálico. O método ainda é utilizado na análise de fenólicos totais e os resultados são uma importante ferramenta comparativa a métodos novos e como base nas pesquisas das propriedades benéficas dos vinhos (Tedesco *et al.*, 2000; Chamkha *et al.*, 2003; Minussi *et al.* 2003; Echeverry *et al.*, 2005; Caillet *et al.*, 2006).

A busca da composição individual dos compostos fenólicos em matrizes complexas, como o vinho, proporcionou um impulso no desenvolvimento de novos métodos de análise. Técnicas de separação como a eletroforese capilar e a cromatografia líquida acoplada a sistemas de detecção como a espectrofotometria, a fluorimetria e a espectrometria de massas, possibilitaram o desenvolvimento de métodos sensíveis, rápidos e práticos.

A eletroforese capilar (EC) vem sendo apontada como uma técnica bastante satisfatória para a determinação simultânea de diferentes compostos, entre eles os polifenóis e os minerais. Essa técnica tem apresentado maior versatilidade e simplicidade que as demais técnicas de separação empregadas, além de menores custos e maior durabilidade das colunas, menores tempos de análise, volumes de amostra e custos finais (Andrade *et al.*, 1997; Kulomaá *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1998).

A eletroforese capilar tem sido, utilizada para a determinação de compostos fenólicos por diversos autores (Andrade *et al.*, 1997; Kulomaá *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1998; Minussi *et al.*, 2003; Hamoudová *et al.*, 2004). A combinação da isotacoforese com a eletroforese de zonas proporcionou a separação e quantificação de 14 compostos fenólicos da classe dos flavonóides e dos ácidos fenólicos em vinhos (Hamoudová *et al.*, 2004). Minussi e colaboradores (2003), utilizando a eletroforese capilar de zonas separaram, identificaram e quantificaram 18 compostos fenólicos de vinhos italianos. Ambos os autores descrevem o método de eletroforese acoplado ao detector de DAD, como uma poderosa ferramenta para analisar matrizes complexas como os vinhos.

Alguns trabalhos começam a estudar métodos alternativos para a análise de compostos fenólicos, o que pode ser útil nas indústrias. As quantidades de compostos fenólicos foram investigadas em vinhos da Turquia usando eletrodos preparados pela imobilização da tirosina. Os resultados foram comparados ao método de Folin-Ciocalteu e se mostrou eficiente (Kiralp e Toppare, 2006).

No entanto, nos últimos anos, a técnica que tem se consolidado como a metodologia para as determinações dos compostos fenólicos em vinhos é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os métodos descritos por CLAE usam, na sua maioria, fase reversa com eluição por gradiente. A preparação das amostras pode ser feita por uma etapa de limpeza utilizando cartucho de fase sólida (Oszmianski *et al.*, 1988) ou simplesmente a injeção direta sem prévio tratamento das amostras (Revilla e Ryan, 2000).

Há uma grande discrepância no conteúdo total de fenóis quando estes são analisados por CLAE e por Folin-Ciocalteu. O total de fenóis, em vinhos tintos, por CLAE é de 307,3 mgL⁻¹, comparado a 1784 mgL⁻¹ GAE por Folin-Ciocalteu. A explicação desta diferença é que no método por CLAE somente 20 compostos foram usados para a soma total de fenólicos nas amostras de vinho, enquanto que no outro método são quantificados todos os fenóis. Na quantificação por cromatografia não são quantificados polímeros de alta massa molecular, que tem pouca importância em relação aos efeitos do vinho na saúde (Ritchey e Waterhouse, 1999).

A determinação das diferentes moléculas químicas de cada classe de fenólicos, proporcionou o conhecimento das características e das potencialidades de cada composto separadamente, e também o seu papel em matrizes complexas como os vinhos. Diversos trabalhos usam a cromatografia como método de determinação dos compostos fenólicos e de moléculas químicas de suas classes: antocianinas, fenóis ácidos, flavonóides, taninos e estilbenos (Singleton e Trousdale, 1983, Ritchey e Waterhouse, 1999, Revilla e Ryan, 2000, Netzel *et al.*, 2003, Abert Vian *et al.*, 2005). A cromatografia acoplada a diferentes métodos de identificação tem sido instrumento imprescindível na elucidação dos mecanismos de interação entre os compostos fenólicos e desses com outras moléculas, como ácidos orgânicos, álcoois e aldeídos, durante as etapas de produção e envelhecimento do vinho (Es-Safi *et al.*, 2003; Echeverry *et al.*, 2005; Monagas *et*

al., 2005; Gutierrez *et al.*, 2005; Fulcrand *et al.*, 1996; Duenas *et al.* 2006) e em derivados de uvas, como extratos de cascas e sementes (Yilmaz e Toledo, 2004)

Os métodos cromatográficos, mais comumente desenvolvidos para a análise de compostos fenólicos em vinhos, utilizam detecção espectrofotométrica (Revilla e Ryan, 2000; Malovaná *et al.*, 2001; Castellari *et al.*, 2002; Monagas *et al.*, 2005) e fluorimétrica (Rodriguez-Delgado *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2006). Mais recentemente, com as interfaces de ligação entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massas, a detecção tem sido feita usando essa ferramenta que fornece vantagens na confirmação de identidade dos compostos. A espectrometria de massas é importante, principalmente, na identificação dos compostos fenólicos, bem como na elucidação de novos compostos, normalmente envolvidos em reações de condensação (Monagas *et al.*, 2005; Alcalde-Eon *et al.*, 2006), copigmentação (Fulcrand *et al.*, 1996; Gutierrez *et al.*, 2005; Duenas *et al.*, 2006) e na elucidação dos processos bioquímicos responsáveis pela estabilização dos vinhos durante envelhecimento (Singleton *et al.*, 1987; Es-Safi *et al.*, 2003).

3 – FOLATOS

O ácido fólico (2-amino-4-hidroxi-6-metilenoaminobenzol-L-glutâmico), conhecido como ácido pteroilglutâmico, vitamina B₆, vitamina B₉ e vitamina M (Brody, 1991), foi descoberto em 1935 quando começaram a ser descritos distúrbios decorrentes da deficiência nutricional de um composto pertencente à família do ácido pteroilglutâmico (Katzung, 1994). Comumente, para o grupo de vitaminas hidrossolúveis com estruturas e atividades semelhantes ao ácido fólico é utilizado o termo folato. Os folatos encontrados nos alimentos estão, predominantemente, na forma de poliglutamatos, sendo o 5-metiltetraidrofolato o congênere majoritário (Czeize e Dudas, 1992; Zanini e Oga, 1994). O ácido

pteroilglutâmico (PteGlu-1) (**Figura 1**) é a estrutura química comum aos folatos, suas diferentes formas são sintetizadas a partir de reação de metilação e replicação celular no organismo humano e desempenham um papel específico no metabolismo intracelular (Goodman e Gilman, 1991).

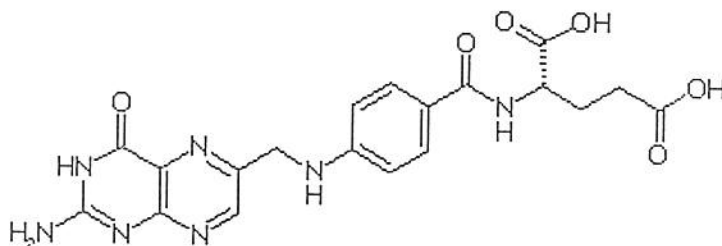


Figura 1- Estrutura química do ácido fólico

O ácido fólico e os folatos são vitaminas essenciais, que possuem um papel chave nas reações de transferência de carbono, que ocorrem na biossíntese de DNA, como doador e receptor dos grupos C1, e no ciclo da metilação [Katzung, 1994; Devlin, 1998; Scott et al., 2000; Trumbo 2003]. Os diferentes tipos de folatos são necessários na formação de produtos intermediários do metabolismo, estando envolvidos na síntese de purina, timidilato (dTMP), colina, serina e glicina, (Thomas et al., 2003).

O interesse pelos folatos tem crescido nos últimos anos com as descobertas relacionadas com suas funções nos vários processos metabólicos no organismo humano. Os folatos são essenciais na prevenção e redução significativa do risco de malformação do tubo neural na gestação (Daly et al., 1997; Crane et al., 1995; Gregory, 2001; Evans et al., 2004). A carência de alimentos que contenham a vitamina na dieta pode levar à anemia megaloblástica (Dierkes et al., 1998; Scott et al., 2000; Asok, 2005) além de doenças crônicas

como câncer de mama e cólon, mal de Alzheimer e depressão (Luccock, 2000; Alpert et al., 2000; Jacques et al., 1999; Malinow et al., 1998; Kim, 1999).

Parodi, 1997b, associa também os folatos como um dos responsáveis pelo chamado “paradoxo francês”, aparente discrepância entre o alto consumo de gorduras saturadas pelos franceses e a baixa incidência de doenças do coração e aterosclerose. O tetraidrofolato juntamente com a vitamina B₁₂ é necessário para a conversão de homocisteína em metionina [Devlin, 1998]. A homocisteína vem alcançando grande importância como fator de risco para doença arterial coronária [Welch e Loscalzo, 1998; Rodrigo et al., 2003; Schnabel et al., 2005], pois o alto nível de homocisteína no sangue pode aumentar a agregação de plaquetas, causando trombose e inativando anticoagulantes (Malinow, 1994; Scholl e Johnson, 2000; Willcox et al., 2003). Com o suplemento dos folatos ocorre diminuição dos níveis de homocisteína (Jacques, 1996; Moat et al., 2004; Coppola et al., 2005; Caruso et al., 2006).

Pesquisas mais recentes, demonstram o potencial antioxidante das formas fisiológicas dos folatos (Stocker et al., 2003; Gliszczyńska-Swigło, 2007), inclusive do ácido fólico, forma utilizada na suplementação dos alimentos (Gliszczyńska-Swigło, 2007).

As principais fontes de folatos são os cogumelos, rim, fígado, vegetais, leveduras [Brody, 1991; Franco, 1992, Quirós et al., 2005], e produtos da fermentação (Seyoum e Selhub, 1998; Kariluoto et al., 2004; Jägerstad et al., 2005). Em menores quantidades os folatos também são encontrados em carnes, cereais, frutas e em algumas raízes [Quirós et al., 2004]. Ainda segundo The National Findiet, 2002 Study (2003), os cereais, principalmente os produtos de grãos inteiros, são os maiores contribuidores de folatos na dieta.

Algumas técnicas no processamento de alimentos podem aumentar as concentrações de folatos, como por exemplo o bioprocessamento da fermentação [Seyoum e Selhub, 1998; Osseyi et al., 2001; Kariluoto et al., 2004]. Produtos que

tem na sua fabricação a presença de leveduras, como os pães de farinha de trigo (Arcot et. al., 2002), pães de centeio (Kariluoto et al., 2006) e leites fermentados (Crittenden et. al., 2002) tem a sua quantidade de folatos aumentada no final do processo. No estudo de Jägerstad et al (2005), pães, leite e vegetais fermentados tiveram um aumento na concentração de folatos de no mínimo 100%. O nível de folatos em cereais não malteados está entre 0,5 e 1,0mgKg⁻¹, mas durante o processo de malteação da cevada, por exemplo, estes níveis podem dobrar ou triplicar, particularmente durante os dois primeiros dias de germinação [Jägerstad et al, 2005].

O produto da fermentação contém folatos, mas a maior quantidade encontra-se na massa celular microbiana (Kariluoto et. al., 2006).

Kariluoto et. Al., (2006) descreve que a habilidade de leveduras típicas de fermento, *Saccharomyces cerevisiae* para produzir folatos em meios específicos para o crescimento dos microorganismos é maior que outros tipos de levedura e bactérias. As bebidas fermentadas, como a cerveja e o vinho, usam a *Saccharomyces* como levedura de fermentação.

Cervejas americanas apresentaram uma concentração entre 30 e 18,0µg/100mL de folatos (Jägerstad et al., 2005) e cervejas pilsen brasileiras apresentaram teores de folatos totais numa faixa de 292,8 a 652,6µg/100mL, sendo considerada excelente fonte de folatos (Catharino, 2003).

Praticamente não são encontrados dados de folatos em vinhos. Catharino et al. (2002), encontraram uma concentração de 6,5 a 23,7 µg/100ml de folatos totais em vinhos brasileiros.

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABERT VIAN, M.; TOMAO, V.; GALLET, S.; COULOMB, P. O.; LACOMBE, J. M. Simple and rapid method for *cis*- and *trans*-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns. **J. Chromatogr A**, v.1085, n. 2, p.224-229, 2005.
- ALCALDE-EON, C.; ESCRIBANO-BAIL'ON, M. T.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing. A comprehensive study. **Anal. Chim. Acta** v.563, p. 238-254, 2006.
- ANDRADE, P.; FERRERES, F.; GIL, M. I.; TOMASBARBERAN, F. A. Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis. **Food Chem.**, v.60, p.79-84, 1997.
- AMARANTE, J. O. A. **Vinhos e vinícolas do Brasil**. Summus Editorial, São Paulo, 1986, 167p.
- AMERINE, A.; JOSLYN, M. A. **Composition of grapes and distribution of phenolics from table wines, the technology of their production**. Berkeley: University of California Press, 1987. p 234-238.
- AMERINE, M. A.; OUGH, C. S. **Methods for analysis of musts and wines**. 2 edição, Ed Willy Interscience, New York, 1980, 377p.
- AMERINE, M. A.; BERG, H.W.; CRUESS, W. V. **The technology of wine making**. AVI Publishing company, Inc., Westport, 1967, 799p.
- ALPERT, J. E.; MISCHOULON, D.; NIERENBERG, A. A.; FAVA, M. Nutrition and depression: focus on folate. **Nutrition**, v. 16, p. 544-546, 2000.
- ARAPITSAS, P; ANTONOPOULOS, A.; STEFANO, E.; DOURTOGLOU, V. G. Artificial aging of wines using oak chips. **Food Chem.** v.86, p.563-570, 2004.
- ARCOT, J.; WOOTTON, M.; ALURY, S.; CHAN, H.Y.; SHRESTHA, A.K. Folate levels in twelve Australian wheats and changes during processing into bread. **Food Aust.**, n.54, p.18-20, 2002.

- ASOK C. A., **Megaloblastic anemias**. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE. Hematology. Basic Principles and Practice. 2 ed.. Nova York: Churchill Livingstone, 2005, p 519-556.
- BAHORUN, T.; LUXIMON-RAMMA, A.; CROZIER, A.; ARUOMA, O. I. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. **J. Sc. Food Agric.** v.84, p.1553-1561, 2004.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA-MAA, LEGISLAÇÃO BRASILEIRA DE VINHOS, Lei nº 10.970, (DOU de 16.11.2004).
- BRAVO, M. N.; SILVA, S.; COELHO, A. V.; BOAS, L. V.; BRONZE, M. R. Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. **Anal. Chim. Acta**, v.563 p.84-92, 2006.
- BRAVO, A. E. Resveratrol in wine: contribution to potential cardiovascular protective activity. **Alimentaria**, v.269, p.71-72, 1996.
- BRODY, T. Folic acid In: MACHLIN, L.J. **Handbook of vitamins**. 2ed. rev. New York: Marcel Decker, 1991, p.453-490.
- CAILLET, S.; SALMIÉRI, S.; LACROIX, M. Evaluation of free radical-scavenging properties of commercial grape phenol extracts by a fast colorimetric method. **Food Chem.** v.95, p.1-8, 2006.
- CAMARGO, U. A. **Porta-Enxertos e Cultivares de Videira**, Embrapa, www.cnpvu.embrapa.br, acessado em 2003.
- CANTOS, E.; ESPIN, J. C.; TOMÁS-BARBERAN, F. A. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivares studies by LC-DAD-MS-MS. **J. Agr. Food Chem.**, v.50, p.5691-5696, 2002.
- CARUSO, R., CAMPOLO, J., SEDDA V., DE CHIARA, B., DELLANOCE, C., BAUDO, F., TONINI, A., PAROLINI, M., CIGHETTI G., PARODI, O. Effect of homocysteine lowering by 5- methyltetrahydrofolate on redox status in hyperhomocysteinemia. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** v.47, p.549-555, 2006.
- CASTELLARI, M.; SARTINI, E.; FABIANI, A.; ARFELLI, G.; AMATI, A. Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. **J. Chromatogr. A** v.973, p. 221-227, 2002.

- CATALUNÃ, E. **As uvas e os vinhos**. Editora Globo. 3 ed., 1991, 140p.
- CATHARINO, R. R.; LIMA, J. A.; GODOY, H. T. Ocorrência de vitaminas em vinho tinto. **Anais do IV Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages**, Campinas-SP, p.45, 2002.
- CATHARINO, R.R. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de folatos em alimentos**. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas, 2003.
- CHAMKHA, M.; CATHALA, B.; CHEYNIER, V.; DOUILLARD, R. Phenolic composition of champagnes from Chardonnay and Pinot Noir vintages. **J. Agric. Food Chem.** v.31, p.3179-3184, 2003.
- CHEYNIER, V.; FULCRAND, H.; GUYOT, S.; OSZMIANSKI, J.; MOUTOUNET, M. Reactions of enzymatically generated quinones in relation to browning in grape musts and wines. **Acs Symposium Series**, v.600, p.130-143, 1995.
- COPPOLA, A., D'ANGELO, A., FERMO, I. Reduced *in vivo* oxidative stress following 5-methyltetrahydrofolate supplementation in patients with early-onset thrombosis and 677TT methyltetrahydrofolate reductase genotype. **Br. J. Haematol.** v.131, p.100-108, 2005.
- CRANE, N. T.; WILSON, D. B.; COOK, D. A.; LEWIS, C. J.; YETLEY, E. A.; RADER, J. L. Evaluating food fortification options: general principles revisited with folic acid. **Am. J. Public Health**, v.85, p.660-666, 1995.
- CRITTENDEN, R.G.; MARTINEZ, N.R.; PLAUNE, M.J., Synthesis and utilization of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. **Int. J. Food Microbiol.** v.80, p.217– 222, 2002.
- CZEIZE, A. E.; DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. **N. Engl. J. Medicine**, v.327, n.226, p.1832-1835, 1992.
- DAUDT, C. E.; POLENTA, Phenols from Cabernet sauvignon and Isabel musts submitted to several treatments. **J. Sci. Tech. Tonnellerie**, v.5, p.57-64, 1999.
- DAUDT, C. E. Aspectos bioquímicos, sensoriais e aspectos ligados à saúde humana dos taninos do vinho. In **Anais do Seminário Franco-Brasileiro de**

- Viticultura enologia e gastronomia**, EMBRAPA CNPUV, Bento Gonçalves, p.103-106, 1998.
- DALY, S.; MILLS, J. R.; MOLLOY, A. M.; CONLEY, M.; LEE, Y. J.; KIRKE, P. N.; WEIR, D. G.; SCOTT, J. M. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural tube defects. **Lancet**, v.350, p.1666-69, 1997.
- DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 1ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1998, 1007p.
- DIERKES, J.; KROESEN, M.; PIETRZIK, K. Folic acid and vitamin B₆ supplementation and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. **Int. J. Vitamin Nutr. Res.**, v.68, p.98-103, 1998.
- DIXON, J. B.; DIXON, M. E.; O'BRIEN, P. E. Reduced plasma homocysteine in obese red wine consumers: a potential contributor to reduced cardiovascular risk status. **Eur. J. Clin. Nut.**, v.56, n.7, p.608-614, 2002.
- DOMINGUEZ, D.; GUILLÉN, D. A.; BARROSO, C.G. Automated solid-phase extraction for sample preparation followed by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for analysis of resveratrol derivatives in wine. **J. Chromatogr. A**, v.918, p.303-310, 2001.
- DONOVAN, J. L.; WATERHOUSE, A. L.; **Bioavailability of flavanol monomers**, in: Rice-Evans, C.; Packer, L.. *Flavonoids in Health and disease*, New York, Marcel Dekker, 2003, p.413-440.
- DUEÑAS, M.; FULCRAND, H.; CHEYNIER, V. Formation of anthocyanin-flavanol adducts in model solutions. **Anal. Chim. Acta** v. 563 p.15-25, 2006.
- ECHEVERRY, C.; FERREIRA, M.; REYES-PARADA, M.; ABIN-CARRIQUIRY, J.A.; BLASINA, F.; GONZÁLVEZ-NEVES, G.; DAJAS, F. Changes in antioxidante capacity of Tannat red wines during early maturation. **J. Food Eng.** v.69, p.147-154, 2005.
- EIGENBRODT, M. L.; FUCHS, F. D.; COUPER, D. J.; GOFF, D. C.; SANFORD, C. P.; HUTCHINSON, R. G.; BURSAC, Z. Changing drinking pattern does not influence health perception: a longitudinal study of the atherosclerosis risk in communities study. **J. Epidemiol. Comm. Health**, v.60, n.4, p.345-350, 2006.

- ES-SAFI N-E.; CHEYNIER V.; MOUTOUNET M. Effect of copper on oxidation of (+)-catechin in a model solution system. **Int. J. Food Sci. Tech.** v.38, n.2, p.153-163, 2003.
- ESTRUCH, R. Wine and cardiovascular disease. **Food Res. Int.** v.33, p.219-226, 2000.
- EVANS, M. I., LLURBA, E., LANDSBERGER, E. J., OBRIEN, J. E., HARRISON, H. H., Impact of folic acid fortification in the United States: Markedly diminished high maternal serum alpha-feto-protein values. **Obstet. and Gynecol.**, v.103, p.474-479, 2004.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1992, 307p.
- FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. Antioxidants in grapes and grape juices and their potential health effects. **Pharmac. Biol.** v.36, p.14-20, 1998.
- FRANKEL, E.; WATERHOUSE, A. L. TESSEDRE, P.L. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity inhibiting opxidation of human low-density lipoproteins. **J. Agric. Food Chem.**, v.43, p.890-894, 1995.
- FRANKEL, E.; KANNER, J.; GERMAN, J. B.; PARKS, E. KINSELLA, J. E. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenoli substances in red wine. **Lancet**, v.34, p.454-457, 1993.
- FULCRAND, H.; DOS SANTOS, P. J. C.; SARNIMANCHADO, P.; CHEYNIER, V.; FAVREBONVIN J. Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. **J. Chem. Soc.-Perkin Trans.** n.1 v.7, p.735-739, 1996.
- GERMAN, J. B.; WALZEM, R. L. The health benefits of wine. **Annu. Rev. Nutr.** n.20, p.561-593, 2000.
- GLISZCZYNSKA-SWIGŁO, A. Folates as antioxidants. **Food Chem.** v.101, p.1497-1500, 2007.

- GOLDBERG, D.A.; YAN, J.; SOLEAS, G.J. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. **Clin. Biochem.** v.36 n.1, p.79-87, 2003.
- GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1987, 1985p.
- GREGORY, J. F., Case study: Folate bioavailability. **J. Nutr.**, v.131, p.1376-1382, 2001.
- GUTIERREZ, I. H.; SA'NCHEZ-PALOMO, E.; LORENZO, E. S.; 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 Chem.** v. 92 p.269-283, 2005.
- HAMOUDOVÁ, R.; URBÁNEK, M.; POSPÍSILOVÁ, M.; POLÁSEK, M. Assay phenolic compounds in red wine by on-line combination of capillary isotachopheresis with capillary zone electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, v.1032, p.281-287, 2004.
- HANSEN, A. S.; MARCKMANN, P.; DRAGSTED, L. O.; NIELSEN, I. L. F.; NIELSEN, S. E.; GRONBAEK, M. Effect of red wine and red grape extract on blood lipids, haemostatic factors, and other risk factors for cardiovascular disease. **European J. Clin. Nutr.** v.59, n.3, p.449-455, 2005.
- HARBONE, J. B.; DEY, P. M. **Plant biochemistry**. Califórnia, Ed. Academic Press, , p.554, 1997.
- IDE, G. M. **Evolução dos compostos fenólicos na maturação da uva e no tempo de maceração do vinho**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 1992.
- ISHIMOTO, E. Y. **Atividade antioxidante *in vitro* em vinhos e sucos de uva**. Tese mestrado- Faculdade de Saúde pública da Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, 2003.
- JACKSON, R. S. **Wine Science: principles and applications**. San Diego, Ed. Academic Press, Inc., 1994, 475p.

- JACQUES, P. F., Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. **Circulation** v.93, p.7-9, 1996.
- JACQUES, P. F.; SELHUB, J.; BOSTOM, A G.; WILSON, P. W. F.; ROSENBERG, I. H. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. **New Engl. J Med.**, v.340, n.19, p. 1449-1454, 1999.
- JÄGERSTAD, M., PIIRONEN, V., WALKER, C., ROS, G., CARNOVALE, E., HOLASOVA, M., NAU, H., Increasing natural food folates through bioprocessing and biotechnology. **Trends Food Sci. Tech.** v.16, p.298-306, 2005.
- JOHNSON, H. **A história do vinho**. São Paulo, Companhia das letras, 1999.
- KARILUOTO, S., AITTAMAA, M., KORHOLA, M., SALOVAARA, H., VAHTERISTO, L., PIIRONEN, V., Effects of yeasts and bacteria on the levels of folates in rye sourdoughs. **Int. J. Food Microbiol.** v.106, p.137-143, 2006.
- KARILUOTO, S., VAHTERISTO, L., SALOVAARA, H., KATINA, K., LIUKKONEN, K. H., PIIRONEN, V. Effect of baking method and fermentation on folate content of rye and wheat breads. **Cereal Chem.** v.81, p.134-139, 2004.
- KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 5ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1994, 755p.
- KIM, Y. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms and implications. **J. Nutr. Biochem.** v.10, p.66-88, 1999.
- KIRALP, S.; TOPPARE, L. Polyphenol content in selected Turkish wines, an alternative method of detection of phenolics. **Process biochemistry**, v.41, p.236-239, 2006.
- KOVAC, V.; ALONSO, E.; BOURZEIX, M.; REVILLA, E. Effect of several enological practices on the content of catechins and proanthocyanidins of red wines. **J. Agric. Food Chem.** v.40, p.1953-1957, 1992.
- KULOMAA, A., SIRÉN, H., RIEKKOLA, M.-L., Identification of antioxidative compounds in plant beverages by capillary electrophoresis with the marker index technique. **J. Chromatogr. A**, v.781, p.523-532, 1997.

- LÓPEZ, M. , MARTÍNEZ, F.; DEL VALLE, C.; ORTE, C.; MIRO, M. Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr A** v.922, p.359–363, 2001.
- LUCOCK, M. D. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology and role in disease process. **Mol. Genet. Metab.** v.71, p.121-38, 2000.
- LUXIMON-RAMMA, A.; BAHORUN, T.; CROZIER, A.; ZBARSKY, V.; DALTA, K. P.; DEXTER, D. T.; ARUONA, O. I. Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas. **Food Res. Int.** v.38, n.4, p. 357-367, 2005.
- MALINOW, M.R. et al. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary disease. **New Engl. J. Med.**, v.338, p.1009-1015, 1998.
- MALINOW, M. R., Plasma homocystine and arterial occlusive diseases: a mini-review. **Clin. Chem.**, v.40, p 173-176, 1994.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 79, p.727-747, 2003.
- MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. **Food antioxidants: Technological, toxicological, and health perspectives**. 1^o edição, New York, Marcel dekker Ed., 1996, 490p.
- MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in foods. In: MARKAKIS, P. (Ed.) **Anthocyanins as Food Colors**. New York: Academic Press, 1982, p. 163-180.
- MELLO, L. M. R. de, **Produção e Comercialização de Uvas e Vinhos – Panorama 2005**, www.cnpv.embrapa.br/public/artigos/panorama2005-producao.pdf, acessado em 4-07-2006.
- MINUSSI, R. C.; ROSSI, M.; BOLOGNA, L.; CORDI, L.; ROTILIO, D.; PASTORE, G. M.; DURÁN, N. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. **Food Chem.** v.82, p. 409-416, 2003.
- MOAT, S. J., LANG, D., McDOWELL, I. F. W., Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. **J. Nutr. Biochem**, v.15, p.64-79, 2004.

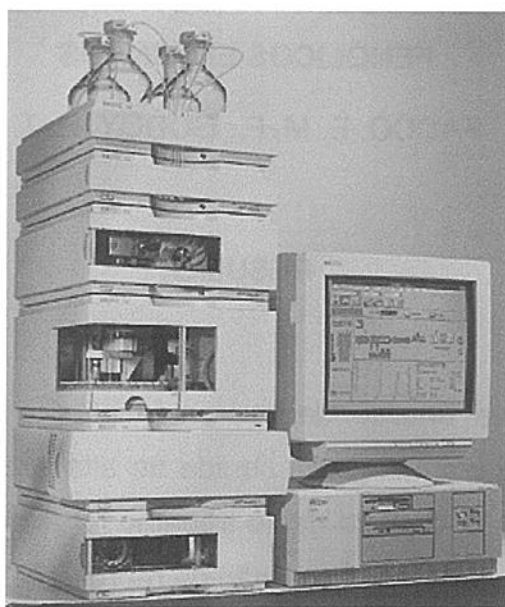
- MONAGAS, M.; BARTOLOMÉ, B.; GOMEZ-CORDOVÉZ, C. Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle. II. Non-anthocyanin phenolic compounds. **Eur. Food Res Tech.** v.220 p.331–340, 2005.
- MULLINS, M. G.; BOUQUET, A.; WILLIAMS, L. E. Biology of the grape. Cambridge. United Kingdom Cambridge e University Press, 2002, 239p.
- NAISSIDES, M.; MAMO, J. C. L.; JAMES, A. P.; PAL, S. The effect of acute red wine polyphenol consumption on postprandial lipaemia in postmenopausal women. **Atherosclerosis**, v.177, p. 401-408, 2004.
- NETZEL, M.; STRASS, G.; BITSCH, I.; KÖNITZ, R.; CHRISTMANN, M.; BITSCH, R. Effect of grape processing on selected antioxidant phenolics in red wine. **J. Food Eng.** v.56, p.223-228, 2003.
- NIGIDIKAR, S. V.; WILLIAMS, N. R.; GRIFFIN, B. A.; HOWARD, A. N. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation *in vivo*. **Am. J. Clin. Nutr.** v.68, p. 258-265, 1998.
- ORRALO, F.; ALVAREZ, E.; CAMINA, M.; LEIRO, J. M.; GOMEZ, E.; FERNANDEZ, P. The possible implication of *trans*-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. **Mol. Pharmacol.** v.61, n.2, p.294-302, 2002.
- OSSEYI, E. S., EWHLING, R. L., ALBRECHT, J. A., HPLC determination of stability and distribution of added folic acid and some endogenous folates during breadmaking. **Cereal Chem.** v 78, p. 375-378, 2001.
- OSZMIANSKI, J.; RAMOS, T.; BOURZEIX, M. Fractionation of phenolic-compounds in red wine. **Am. J. Enol. Viticult.** v.39, n. 3, p.259-262, 1988.
- PADILLA, E.; RUIZ, E.; REDONDO, S.; GORDILLO-MOSCOSO, A.; SLOWING, K.; TEJERINA, T. Relationship between vasodilation capacity and Phenolic Content Of Spanish wines. **Eur. J. Pharmacol.**, v.517 p.84-91, 2005.
- PARODI, P. W. The French Paradox unmasked: the role of folate. **Med. Hypotheses**, v.49, n.4, p.313-318, 1997.

- PRICE, S. F.; BREEN, P. J.; VALLADAO, M.; WATSON, B. T. Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. **Am. J. Enol. Viticult.** v.46, p.187-194, 1995.
- PROTAS, J. F. da S.; CAMARGO, U. A.; MELO, L. M. R. de. **A viticultura brasileira: realidade e perspectivas.** Referência internet, <http://www.cnpqv.embrapa.br/vitivini.html>, acessado em 2002.
- QUIRÓS, A. R. B.; RON, C. C. LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J., LAGE-YUSTY, M. A., Determination of folates in seaweeds by high-performance liquid chromatography, **J. Chrom. A** v.1032, p.135-139, 2005.
- RENAUD, S.; LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets and the French Paradox for coronary heart disease. **Lancet**, v.339, p.1523-1526, 1992.
- REVILLA, E.; RYAN, J. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. **J. Chromatogr. A**, v.881, p.461-469, 2000.
- RITCHEY, J. G.; WATERHOUSE, A. L. A standard red wine: monomeric phenolic analysis of commercial Cabernet Sauvignon wines. **Am. J. Enol. Viticult.**, v.50, n.1, p.91-100, 1999.
- RODRIGO, R., PASSALACQUA, W., ARAYA, J., Implications of oxidative stress and homocysteine in the pathophysiology of essential hypertension. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** v.42, p.453-461, 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. **J. Chromatogr. A**, v.912, p. 249-257, 2001.
- SAUCIER, C.; LITTLE, D.; GLORIES, Y. First evidence of acetaldehyde-flavanol condensation products in red wine. **Am. J. Enol. Viticult.**, v.48, p.369-373, 1997.
- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols, **J. Nutr.** v.130, p. 2073S-2085S, 2000.

- SCHNABEL, R., LACKNER, K. J., RUPPRECHT, H. J., Glutathione peroxidase-1 and homocysteine for cardiovascular risk prediction. **J. Am. Coll Cardiol.** v.45, p.1631-1637, 2005.
- SCHOLL, T. O., JOHNSON, W. G., Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. **Am. J. Clin. Nutr.** v.71, p.1295S-1303S, 2000.
- SCOTT, J.; RÉBEILLE, F.; FLETCHER, J. Review: Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **J. Sci. Food Agric.** v.80, p.795-824, 2000.
- SEYOUM, E., SELHUB, J., Properties of food folates determined by stability and susceptibility to intestinal pteroylpolyglutamatehydrolase action. **J. Nutr.** v.128, p.1956-1960, 1998.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI Jr, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am. J. Enol. Viticult.** v.26, n.2, p.62-69, 1965.
- SINGLETON, V. L.; TROUSDALE, E. White wine phenolics. Varietal and processing differences as shown by HPLC. **Am. J. Enol. Viticult.** v.34, n.1, p.27-34, 1983.
- SINGLETON, V. L.; SALGUES, M.; ZAYA, J.; TROUSDALE, E. Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine. **Am. J. Enol. Viticult.** v.36, n.1, p.50-56, 1987.
- SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Resveratrol: A molecule whose time has come? And Gone? **Clin. Biochem.** v.30, n.2, p.91-113, 1997.
- SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutat. Res.** v.579, n.1, p.200-213, 2005.
- SHAHID, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** v.130, p.2073S-2085S, 1992.
- STIVALA, L. A.; SAVIO, M.; CARAFOLI, F.; PERUCCA, P.; BIANCHI, L.; MAGA, G.; FORTI, L.; PAGNONI, U. M.; ALBINI, A.; PROSPERI, E.; VANNINI, V.

- Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. **J. Biol. Chem.** v.276, p.22586-22594, 2001.
- STOCKER, P.; LESGARDS, J-F.; VIDAL, N.; CHALIER, F.; PROST, M.. ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins. **Biochim. Biophys. Acta** v.1621, p.1-8, 2003.
- TEDESCO, I.; RUSSO, G. L.; NAZZARO, F.; RUSSO, M.; PALUMBO, P. Antioxidant effect of red wine anthocyanins in normal and catalase-inactive human erythrocytes. **J. Nutr. Biochem.** v.12 p.505-511, 2001
- TEDESCO, I.; RUSSO, M.; RUSSO, P.; IACOMINO, G.; RUSSO, G. L.; CARRATURO, A.; FERUOLO, C.; MOIO, L.; PALUMBO, R. Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. **J. Nutr. Biochem.**, v.11, p.114-119, 2000.
- TEISSEDRE, P. L.; LANDRAULT, Wine phenolics contribution to dietary intake and bioavailability. **Food Res Int.** v.33, n.6, p.461-467, 2000.
- THOMAS P. M, FLANAGAN, V. P, PAWLOSKY R. J. Determination of 5-methyltetrahydrofolic acid and folic acid in citrus juices using stable isotope dilution-mass spectrometry. **J Agric Food Chem.** v.51, p.1293-1296, 2003.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **J. Sci. Food Agric.** v.35, p.853-876, 2001.
- TRUMBO, P.R.. Dietary Reference Intakes: Revised nutritional equivalents for folate, vitamin e and provitamin a carotenoids. **J. Food Comp. Anal.** v.16, p. 379-382, 2003.
- VIVAS, N. Maturação fenólica: adaptação da vinificação à composição fenólica de uvas tintas finas. In **Anais do Seminário Franco-Brasileiro de Viticultura enologia e gastronomia**, EMBRAPA CNPUV, Bento Gonçalves, p.67-76, 1998.
- YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidant capacity of catechin, epicatechin and gallic acid. **J. Agric. Food Chem.** v.52, p.255-260, 2004.

- VILLERS, A. de; MAJEK, P.; LYNEN, F.; CROUCH, A. LAUER, P. SANDRA, P. Classification of South African red and white wines according to grape variety based on the non-colored phenolic content. **Eur. Food Res. Tech.** v.221, p. 520-528, 2005.
- WALLERATH, T.; LI, H.; GO'DTEL-AMBRUST, U.; SCHWARZ, P. M.; FO'RSTERMANN, U. A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial no synthase. **Nitric Oxide**, v.12, p.97-104, 2005.
- WATANABE, T.; YAMAMOTO, A.; NAGAI, S.; TERABE, S. Micellar electrokinetic chromatography as an alternative to highperformance liquid chromatography for separation and determination of phenolic compounds in Japanese spirituous liquor. **J. Chromatogr. A**, v.793, p.409-413, 1998.
- WELCH, G. N., LOSCALZO, J., Homocysteine an atherothrombosis. **New. Engl. J. Med.** v.338, p. 1042-1050, 1998.
- WILLCOX J. K., CATIGNANI G. L., LAZARUS S. Tomatoes and cardiovascular health. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** v.43, p.1-18, 2003.
- ZANINI, A. C.; OGA, S. **Farmacologia Aplicada**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 1994, 739p.
- ZILKENS; R. R.; BURKE, V.; HODGSON, J. M.; BARDEN, A.; BEILIN, L. J.; PUDDEY, I. B. Red Wine and Beer Elevate Blood Pressure in Normotensive Men. **Hypertension**, v.45, p.874-879, 2005.



Capítulo 2

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHOS

FACCO, Elizete Maria Pesamosca^{*1}; GODOY, Helena Teixeira¹

¹- Depto de Ciências de Alimentos, FEA-UNICAMP, Campinas, SP, 13083-970, Brasil,
Fone: 55 37884024 *e-mail: elizetefacco@gmail.com

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHOS

FACCO, E. M. P.; GODOY, H. T.

RESUMO

Vários métodos para a análise de micronutrientes em alimentos podem ser utilizados, entre eles a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), pela sua versatilidade e rapidez. O objetivo deste trabalho foi avaliar e validar um método, empregando a CLAE, para a determinação de representantes da classe dos fenóis ácidos (ácido gálico, ácido *p*-coumarico, ácido caféico, ácido ferrúlico e ácido vanílico), dos flavonóides (quercetina, (+)catequina e a (-)epicatequina) e o *trans*-resveratrol em vinhos tintos e brancos. Após a filtração, o vinho foi injetado no cromatógrafo a líquido, utilizando uma coluna C₃₀ e sistema de eluição por gradiente, a uma vazão de 0,7 mLmin⁻¹, sendo a fase móvel composta por como fase móvel acetonitrila:água acidificados com ácido fórmico. A detecção foi feita na região do uv/visível usando detectores de arranjos de diodos (DAD) operando a 280 e 310 nm, e detector de fluorescência (FLD) com comprimento de onda de excitação de 280nm e de emissão de 360nm. A quantificação foi realizada por padronização externa. Os limites de detecção determinados foram em valores de µg L⁻¹. As taxas de recuperação, tanto para os vinhos tintos quanto para os vinhos brancos, variaram de 96% a 102%, para todos os compostos analisados, com boa repetibilidade dentro do limite de confiança estabelecido. As curvas apresentaram R² superiores a 0,9930 para todos os compostos fenólicos.

Palavras chaves: Compostos fenólicos, validação de metodologia, vinhos.

VALIDATION OF THE METHODOLOGY FOR PHENOLIC COMPOUNDS

IN WINES

FACCO, E. M. P.; GODOY, H. T.

ABSTRACT

For the analysis of micronutrients some methods are used, and between them high performance liquid chromatographic (HPLC) distinguished for versatility and speed. The aim of this work was to study and to validate a method employing the HPLC for the determination of phenolic acids (gallic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, ferrulic acid, vanillic acid), flavonoids (quercetin, (+)-catechin and (-)-epicatechin and *trans*-resveratrol in red and white wines. The filtrated samples were injected in the system, using a C₃₀ column at a flow rate of 0,7mLmin⁻¹, using acetonitrile:water acidified with formic acid as mobile phase. Detection was operated using a diode array operating 280 and 310 nm and a fluorescence detector with 280 nm for excitation and 360 nm for emission. The quantification was performed using a external calibration method and the detection limits were determined in ngmL⁻¹. The percentages of recovery for wines had varied from 96% to 102%, with good repeatability inside of the established reliable limit. The calibration curves had presented r^2 highest 0,9930 for all phenolic compounds.

Keywords: phenolics compounds, validation, wines

1 – INTRODUÇÃO

A importância dos compostos fenólicos em enologia está na sua participação na cor dos vinhos tintos, no sabor amargo e adstringente, intervenção nos fenômenos de turvamento, sobre o aroma, além de constituir o principal reservatório de substâncias auto-oxidáveis, formando o maior sistema de proteção dos vinhos contra fenômenos de oxidação (Daudt e Polenta, 1999).

Entretanto, a análise dos compostos fenólicos tem sido, comumente, realizada por métodos colorimétricos. O mais conhecido deles é o método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965) que determina as quantidades totais de fenólicos em vinhos (Tedesco *et al.*, 2000; Chamkha *et al.*, 2003; Minussi *et al.*, 2003; Echeverry *et al.*, 2005; Caillet *et al.*, 2006).

A busca da composição individual dos compostos fenólicos em matrizes complexas, como o vinho, proporcionou um impulso no desenvolvimento de novos métodos de análise. Técnicas de separação como a eletroforese capilar e a cromatografia líquida acoplada a sistemas de detecção como a espectrofotometria, a fluorimetria e a espectrometria de massas, possibilitaram o desenvolvimento de métodos sensíveis, rápidos e práticos. A tendência atual é, principalmente, a utilização da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Rodríguez-Delgado *et al.*, 2001; Revilla e Ryan, 2000; Malovaná *et al.*, 2001), que além de ser mais prática, rápida e sensível também possibilita a análise qualitativa e quantitativa de cada um dos compostos fenólicos separadamente.

Os métodos descritos por CLAE usam em sua maioria, fase reversa com eluição por gradiente (Rodríguez-Delgado *et al.*, 2001; Revilla e Ryan, 2000;

Malovaná *et al.*, 2001; Castellari *et al.*, 2002; Es-Safi *et al.*, 2003; Monagas *et al.*, 2005; Alcalde-Eon *et al.*, 2006). Na preparação das amostras pode existir uma etapa de limpeza utilizando cartucho de fase sólida (Oszmianski *et al.*, 1988;) ou simplesmente a injeção direta sem prévio tratamento das amostras (Revilla e Ryan, 2000).

O objetivo deste trabalho foi a validação da metodologia para a determinação dos compostos fenólicos agliconas em mostos e vinhos branco e tinto, utilizando coluna de fase reversa C₃₀, na tentativa de estabelecer um método para a determinação simultânea dos principais compostos fenólicos presentes em vinhos.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – MATERIAIS

AMOSTRAS

Foram utilizadas amostras de vinhos brasileiros, tintos e brancos, coletadas em supermercados da cidade de Campinas. As amostras foram filtradas em filtros MILLIPORE 0,45µm e injetadas diretamente no cromatógrafo a líquido.

REAGENTES

Utilizou-se metanol e a acetonitrila grau cromatográfico e os ácidos acético e fórmico (MERCK do Brasil),. A água utilizada para preparar a fase móvel foi purificada usando sistema Milli-Q (MILLIPORE). As fases móveis foram filtradas com filtros MILLIPORE com poros de 0,45µm de diâmetro.

Os padrões de ácido gálico, ácido *p*-coumárico, ácido ferrúlico, ácido caféico, ácido vanílico, (+)catequina, (-)epicatequina, quercetina, kaempferol e resveratrol, com pureza foram obtidos da SIGMA. As soluções estoques foram preparadas em solução de metanol:água 90:10, acidificada com 0,1 % de ácido fórmico, em concentrações que variaram para cada composto fenólico. Para eliminar o oxigênio e evitar a degradação dos padrões, as soluções foram armazenadas com nitrogênio a -4⁰ C protegidos da luz.

INSTRUMENTO

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido HP (Hewlett Packard) série 1100, equipado com degaseificador, bomba quaternária, injetor automático com capacidade de 1 a 100 µL e detectores de arranjo de diodos (UV - VIS) e fluorescência. As colunas analíticas testadas foram uma Varian C₁₈ (4,6x150mm) e uma C₃₀ (4,6x250mm) YMC carotenoidTM Waters. Para a análise dos dados utilizou-se o sistema de software HP-Chemstation acoplado ao cromatógrafo, que além de monitorar todos os componentes eluidos, permitiu o melhor tratamento dos dados.

2.2 – MÉTODO

DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

Foram testados vários sistemas cromatográficos de separação dos compostos, utilizando dois tipos de colunas cromatográficas (C_{18} e C_{30}), e diferentes sistemas de eluição, sempre por gradiente. Os solventes, como fases móveis, utilizados para os testes foram metanol, acetonitrila e água acidificados nas seguintes combinações: metanol e água acidificados com 0,4 % de ácido acético; metanol e água acidificados com 0,4 % de ácido fórmico; acetonitrila e água acidificados com 0,4 % de ácido acético e acetonitrila e água acidificados com 0,4 % de ácido fórmico.

Os compostos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com os padrões analisados nas mesmas condições e pelo espectro obtido no detector de arranjo de diodos (DAD) e no detector de fluorescência (FLD). A quantificação foi realizada por padronização externa, curvas de calibração foram construídas para cada um dos compostos analisados.

VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

Para validar o método empregado, foram utilizados os seguintes parâmetros: os limites de detecção e de quantificação, faixa de concentração, percentual de recuperação e repetibilidade.

a) Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção foram estimados através da diluição sucessiva do padrão adicionado às matrizes. Foi considerado o limite de detecção a menor quantidade detectável na matriz que produziu um sinal com uma amplitude três vezes à do ruído ($S/R = 3$). Através da estimativa do desvio padrão (DP) produzido por 10 leituras do sistema se estabeleceu o critério de detecção (amplitude do ruído) (Calcutt e Boddy, 1983). O limite de quantificação foi considerado como sendo três vezes o limite de detecção.

b) Faixa de concentração

A faixa de linearidade do método por cromatografia foi verificada para cada um dos compostos fenólicos analisados. Foram construídas curvas de calibração com diferentes faixas de concentração visto que as quantidades encontradas nas amostras variavam desde valores muito baixos até valores em mgL^{-1} .

c) Recuperação de padrões

A exatidão do método foi avaliada pelos testes de recuperação de padrões adicionados às amostras de vinho tinto e branco..

d) Repetibilidade

A avaliação deste parâmetro foi realizada através de cinco determinações, em duplicata. A repetibilidade foi calculada de acordo com Calcutt e Body (1983) através da fórmula:

$$r = t\sqrt{2.sr}$$

Onde:

r=repeticibilidade,

sr= estimativa do desvio padrão

t=t de student

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

ETAPA ANALÍTICA

Foi avaliado o desempenho das colunas C₁₈ e C₃₀ na separação dos compostos. Iniciaram-se os testes utilizando os padrões. Nessa etapa verificou-se que ambas as colunas apresentaram bons resultados. Entretanto, quando efetuaram-se os mesmos testes com as amostras de mostos e vinho não foi possível constatar a mesma performance. Para a separação dos fenólicos presentes nos vinhos analisados, observou-se que a coluna C₃₀ era a mais indicada. Combinando coluna e fases móveis foi possível concluir que o sistema acetonitrila:água acidificados com ácido fórmico se mostrou mais eficiente.

Portanto, a coluna de C₃₀ e fase móvel composta por (A) água:ácido fórmico (996mL:4mL), e fase móvel (B) acetonitrila:ácido fórmico (996mL:4mL), em gradiente, descrito na **Tabela 1**, a uma vazão de 0,7 mLmin⁻¹, temperatura da coluna a 35 °C, e volume de injeção 20 µl, com tempo de corrida de 50 min, mantendo-se 10 min de re-equilíbrio do sistema antes da próxima injeção. A detecção foi realizada em arranjos de diodos (DAD) e fluorescência (FLD). O ácido gálico, o ácido caféico, a quercetina e o kaempferol foram detectados no DAD a 280 nm; o ácido p-coumárico, o ácido ferrúlico e o resveratrol a 310 nm. Já a (+)-

catequina, a (-)-epicatequina e o ácido vanílico foram detectados no FLD com comprimento de onda de excitação de 280 nm e comprimento de onda de emissão de 360 nm.

As condições descritas foram, aparentemente, as melhores condições cromatográficas encontradas para a análise de fenólicos em vinhos avaliados nesse trabalho.

Tabela 1 - Gradiente da fase móvel usada na metodologia.

<i>solventes</i>	Tempo (min)						
	0	10	25	38	40	45	50
% A	95	91	83	70	40	10	95
%B	5	9	17	30	60	90	5

A- água:ácido fórmico (996:4) e % B- acetonitrila:ácido fórmico (996:4)

A metodologia foi validada para vinhos tintos e brancos, em razão das características de composição de cada uma das matrizes. Os parâmetros avaliados foram limite de detecção, limite de quantificação, faixa de concentração, recuperação e repetibilidade.

Os limites de detecção (LD) encontrados para as amostras ficaram entre 0,001mgL⁻¹ para o os ácidos caféico, *p*-coumárico e ferrúlico e 0,016µgL⁻¹ para a quercetina (**Tabela 2**). O limite de quantificação foi considerado como sendo três vezes o limite de detecção, segundo Calcutt e Boddy, (1983).

Tabela 2 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para o cada composto fenólico analisado.

Composto fenólico	LD (mgL ⁻¹)*	LQ (mgL ⁻¹)*
Ácido gálico	0,0024	0,0073
Ácido caféico	0,001	0,0029
Ácido p-coumarico	0,001	0,003
Ácido ferrulico	0,001	0,003
Ácido vanílico	0,0011	0,0033
Kaempferol	0,0013	0,004
Quercetina	0,0016	0,0049
Resveratrol	0,0010	0,0031
Catequina	0,0019	0,0058
Epicatequina	0,0016	0,0048

* Os resultados são médias de dez determinações

Os valores determinados neste trabalho, tanto para o limite de detecção como para o de quantificação, foram menores que os encontrados por Castellari, *et al.* (2002), utilizando detectores de DAD E FLD. Os valores de recuperação para compostos fenólicos, encontrados pelos autores, variaram de 8µgL⁻¹ para o *trans*-resveratrol até 161µgL⁻¹ para a (-)-epicatequina. A catequina, a epicatequina e o ácido vanílico foram identificados e quantificados por fluorescência, assim como realizado neste trabalho, possibilitando determinar limites de detecção menores e, conseqüentemente, a detecção de quantidades mais baixas nos vinhos analisados.

Os valores da faixa de concentração e do método estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Intervalo de concentração de cada um dos compostos fenólicos analisados.

Composto fenólico	Intervalo de concetração (mgL ⁻¹)		r2	
	Curva 1 (mgL ⁻¹)	Curva 2 (mgL ⁻¹)	r2curva 1	r ² curva 2
Ácido gálico	0,007 – 0,147	0,122 - 2,444	0,9966	0,9997
Ácido caféico	0,0029 – 0,0518	0,043 – 0,864	0,9979	0,9991
Ácido p-coumarico	0,003 – 0,0474	0,0395 – 0,790	0,9992	0,9995
Ácido ferrúlico	0,003 – 0,0864	0,072 – 0,144	0,9925	0,9988
Ácido vanílico	0,0033 – 0,02784	0,0345 – 0,556	0,9952	0,9969
Kaempferol	0,0041 – 0,0416	-	0,9971	-
Quercetina	0,0049 – 0,0495	0,0412 - 0,826	0,9975	0,9997
Resveratrol	0,0031 – 0,0309	0,0257 - 0,515	0,9963	0,9998
Catequina	0,0058 – 0,0958	0,0971 - 1,942	0,9938	0,9970
Epicatequina	0,0048 – 0,1165	0,0798 - 1,596	0,9987	0,9934

Optou-se por trabalhar construindo 2 curvas de calibração para cada um dos compostos fenólicos, para evitar que uma única curva apresentasse uma diferença de concentração entre o primeiro ponto e o último de 10⁶ unidades. Essa grande diferença entre os pontos da curva foi considerada pelos autores como uma variação muito grande, para observar a linearidade em concentrações menores. As concentrações de cada um dos compostos foram determinados com a curva que melhor se adaptava, com exceção para o kaempferol, que apresentou pequenas quantidades em todas as amostras.

As taxas de recuperação encontradas para os compostos fenólicos em vinhos tintos e brancos, estão apresentadas na **Tabela 4**. Os valores variaram entre 96,0 e 101,6%. Esses valores indicam uma boa taxa de recuperação para os níveis presentes no vinho.

Tabela 4 - Taxas de recuperação do padrão dos compostos fenólicos.

Compostos Fenólicos	Nível (mgL ⁻¹)	Recuperação* vinho tinto (%)	Recuperação* vinho branco (%)
Ácido gálico	0,147	100,0±0,4	99,5±0,8
Ácido caféico	0,0518	99,6±1,4	98,3±1,2
Ácido p-coumarico	0,0474	99,1±0,1	101,6±0,3
Ácido ferrúlico	0,0864	96,0±1,0	97,8±1,2
Ácido vanílico	0,02784	96,78±1,1	98,33±0,7
Kaempferol	0,0416	96,5±2,6	98±2,0
Quercetina	0,0495	97,9±1,4	101,4±1,2
Resveratrol	0,0309	97,2±0,5	98,1±0,4
Catequina	0,0958	98,1±1,6	97,4±1,7
Epicatequina	0,1165	99,5±1,9	100,7±2,0

*Os resultados são médias de 10 determinações.

A **Tabela 5** apresenta as faixas de repetibilidade entre as determinações de cada um dos compostos analisados, com 95% de confiança, em vinhos brancos e tintos. Desta forma, espera-se que valores fornecidos por determinações em replicata difiram dentro dos limites fornecidos pela repetibilidade, com a confiança indicada.

Tabela 5 - Repetibilidade dos compostos fenólicos.

Composto Fenólico	Concentração (mgL ⁻¹)*	Estimativa do desvio padrão	Repetibilidade
Ácido gálico	0,122	0,01	0,386
Ácido caféico	0,043	0,006	0,309
Ácido p-coumarico	0,0395	0,005	0,284
Ácido ferrúlico	0,0072	0,058	0,946
Ácido vanílico	0,0345	0,011	0,406
Kaempferol	0,0416	0,013	0,450
Quercetina	0,0412	0,001	0,109
Resveratrol	0,0257	0,003	0,225
Catequina	0,0971	0,063	0,986
Epicatequina	0,0798	0,03	0,678

Limite de confiança de 95% (t= 2,78) t = t de Student

*Valores são médias de dez determinações.

Nessas condições cromatográficas foram separados 10 compostos fenólicos em vinhos tintos e brancos: o ácido gálico, o ácido p-coumárico, o ácido ferrúlico, o ácido caféico, o ácido vanílico, a quercetina, o kaempferol, a (+)catequina, a (-) epicatequina e o resveratrol;

Para a aplicação do método, foram analisadas amostras de vinho tinto e vinho branco. A **Figura 1** e **Figura 2** apresentam os cromatogramas obtidos para os vinhos tintos e brancos, respectivamente. Pode-se verificar que os picos referentes a cada um dos compostos fenólicos aparecem separados.

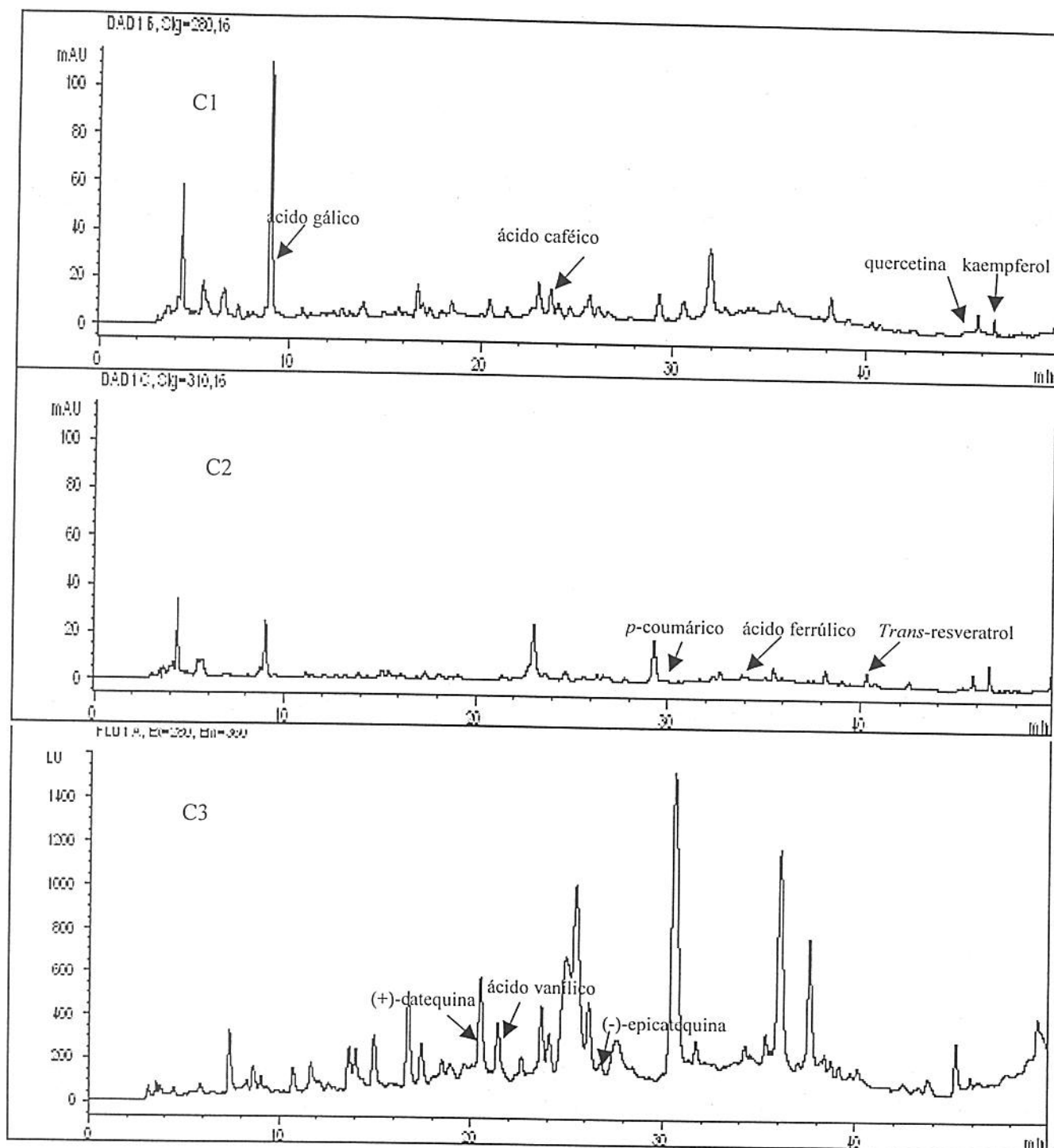


Figura 1 – Cromatograma do vinho tinto. As condições cromatográficas: Coluna C_{30} , fluxo de $0,7\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, eluição por gradiente, fase móvel A=água:ácido acético 0,4% e B=acetonitrila:ácido fórmico 0,4% (0 min 95% A, 10min 91% A, 25min 83%, 38min 70%A, 40min 40%A, 45min 10%A e 50min 95%A. E detecção por DAD (C1)=280nm, (C2)=310nm e FLD (C3)=280nm excitação e 360nm emissão.

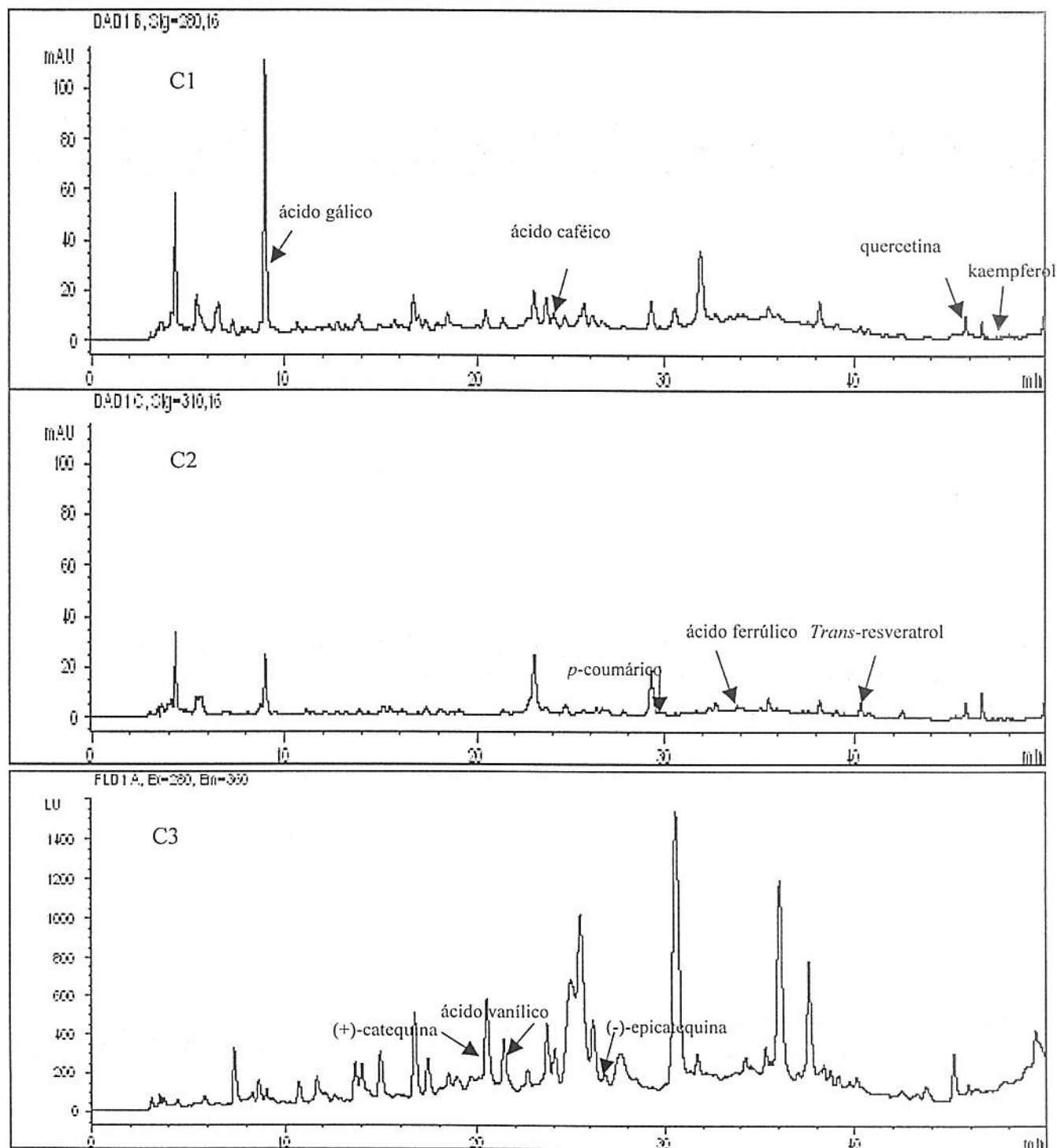


Figura 2 – Cromatograma vinho branco. As condições cromatográficas: Coluna C₃₀, fluxo de 0,7ml.min⁻¹, eluição por gradiente, fase móvel A=água:ácido acético 0,4% e B=acetonitrila:ácido fórmico 0,4% (0 min 95% A, 10min 91% A, 25min 83%, 38min 70%A, 40min 40%A, 45min 10%A e 50min 95%A. E detecção por DAD (C1)=280nm, (C2)=310nm e FLD (C3)=excitação 280nm e emissão 360nm.

Os dados quantitativos são apresentados na **Tabela 6**. Os resultados mostram que o método pode ser aplicado para análise de diferentes classes de compostos fenólicos em vinhos brancos e vinhos tintos. Dentre os ácidos fenólicos, os que se apresentaram em quantidades mais expressivas foram o ácido gálico e o ácido p-coumárico. As catequinas estavam em quantidades expressivas entre os fenólicos analisados.

Tabela 6 – Valores em mgL^{-1} dos compostos fenólicos em amostras de vinho tinto e branco.

Compostos Fenólico	Tinto 1 (mgL^{-1})*	Tinto 2 (mgL^{-1})*	Tinto 3 (mgL^{-1})*	Branco (mgL^{-1})*
Ácido gálico	8,07±0,09	1,26±0,02	1,32±0,01	nd
Ácido caféico	1,84±0,03	0,58±0,01	1,59±0,06	nd
Ácido p-coumarico	1,41±0,04	nd	1,16±0,03	nd
Ácido ferrúlico	0,21±0,03	0,584±0,003	0,281±0,003	nd
Ácido vanílico	0,89±0,002	1,82±0,001	16,4±0,01	0,383±0,0002
Kaempferol	0,031±0,001	nd	nd	nd
Quercetina	0,016±0,0001	0,078±0,001	0,435±0,009	nd
Resveratrol	0,286±0,004	1,21±0,01	1,581±0,005	nd
Catequina	26,6±0,04	26,4±0,01	12,8±0,02	3,67±0,003
Epicatequina	8,80±0,008	9,24±0,006	6,15±0,008	1,197±0,0002

*Valores são médias de determinações em triplicata.

Dados semelhantes de *trans*-resveratrol foram encontrados por Dominguez et al. (2001), Rodriguez-Delgado et al. (2001), Careri et al. (2004). As quantidades encontradas, para os compostos analisados, estão próximos aos valores citados por Villers et al. (2005) que analisaram amostras de vinhos africanos. Os níveis de fenóis ácidos encontrados, nos vinhos analisados neste trabalho, são semelhantes aos encontrados por Rodríguez-Delgado et al. (2001), que analisou diferentes vinhos tintos.

Os resultados obtidos após a avaliação dos vinhos tintos analisados nesse trabalho mostraram valores para a (+)-catequina que variaram de 12,4 mgL⁻¹ a 26,6 mgL⁻¹ e para a (-)-epicatequina variam de 6,1 mgL⁻¹ a 9,3 mgL⁻¹. Esses dados são menores que os encontrados para vinhos tintos na literatura (Rodriguez-Delgado et al., 2001; Frankel et al., 1995). Já para os vinhos brancos os valores encontrados são maiores que os da literatura (Rodriguez-Delgado et al., 2001).

4 – CONCLUSÃO

Com a metodologia validada neste trabalho foi possível a separação, a identificação e a quantificação de 10 compostos fenólicos em vinhos tintos e brancos.

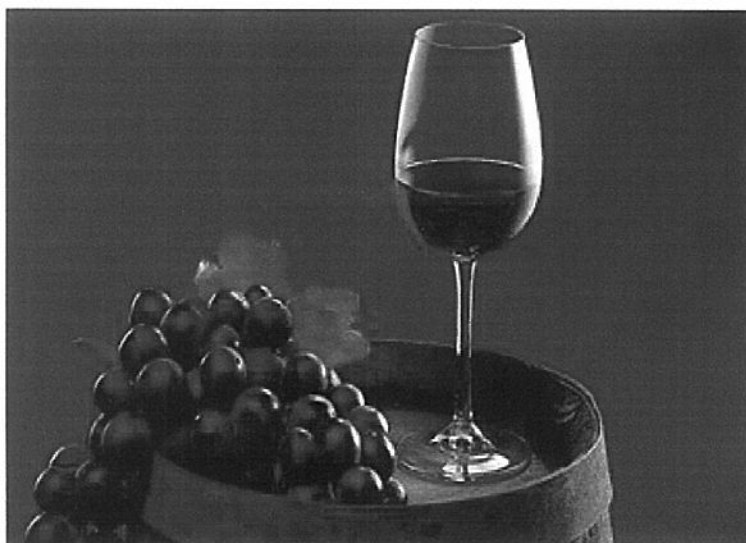
O método desenvolvido por CLAE para a separação compostos fenólicos apresentou resultados satisfatórios pela simplicidade e rapidez, já que não é preciso preparação de amostra para a análise. Também mostrou ser mais uma aplicação para a coluna de fase reversa C₃₀ e para a detecção espectrofluorimétrica.

5 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALCALDE-EON, C.; ESCRIBANO-BAILÓN, M. T.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing. A comprehensive study. **Anal. Chim. Acta** v.563, p. 238–254, 2006.
- CAILLET, S.; SALMIÉRI, S.; LACROIX, M. Evaluation of free radical-scavenging properties of commercial grape phenol extracts by a fast colorimetric method. **Food Chem.** v.95, p.1-8, 2006.
- CALCUTT, R.; BODDY, R. **Statistic for analytical chemists**. 1ed. Londres, 1983.
- CARERI, M.; CORRADINI, C.; ELVERI, L.; NICOLETTI, I.; ZAGNONI, I. Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry of *cis*-Resveratrol and *trans*-Resveratrol: Development, Validation, and Application of the Method to Red Wine, Grape, and Winemaking Byproducts. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p.6868-6874, 2004.
- CASTELLARI, M.; SARTINI, E.; FABIANI, A.; ARFELLI, G.; AMATI, A. Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. **J. Chromatogr. A** v.973, p.221-227, 2002.
- CHAMKHA, M.; CATHALA, B.; CHEYNIER, V.; DOUILLARD, R. Phenolic composition of champagnes from Chardonay and Pinot noir vintages. **J. Agric. Food Chem.**, n.31, p. 3179-3184, 2003.
- DAUDT, C. E.; POLENTA, Phenols from Cabernet sauvignon and Isabel musts submitted to several treatments. **J. Sci. Tech. Tonnellerie**, v.5, p.57-64, 1999.
- DOMINGUEZ, D.; GUILLÉN, D. A.; BARROSO, C.G. Automated solid-phase extraction for sample preparation followed by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for analysis of resveratrol derivatives in wine. **J. Chromatogr. A** v.918, p.303-310, 2001.
- ECHEVERRY, C.; FERREIRA, M.; REYES-PARADA, M.; ABIN-CARRIQUIRY, J.A.; BLASINA, F.; GONZÁLVEZ-NEVES, G.; DAJAS, F. Changes in

- antioxidante capacity of Tannat red wines during early maturation. **J. Food Eng.** v.69, p.147-154, 2005.
- ES-SAFI N-E.; CHEYNIER V.; MOUTOUNET M. Effect of copper on oxidation of (+)-catechin in a model solution system, **Int. J. Food Sci. Tech.** v.38, n.2, p.153-163, 2003.
- FRANKEL, E.; WATERHOUSE, A. L. TESSEDRE, P.L. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. **J. Agr Food Chem.**, v.43, p.890-894, 1995.
- MALOVANÁ, S.; GARCIA MONTELONGO, F. J.; PÉREZ, J. P.; RODRIGUEZ-DELGADO, M. A. Optimization of sample preparation for the determination of trans-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography. **Anal. Chim. Acta** n.428, p.245-253, 2001.
- MINUSSI, R. C.; ROSSI, M.; BOLOGNA, L.; CORDI, L.; ROTILIO, D.; PASTORE, G. M.; DURÁN, N. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. **Food Chem.** n.82, p.409-416, 2003.
- MONAGAS, M.; BARTOLOMÉ, B.; GOMEZ-CORDOVÉZ, C. Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle. II. Non-anthocyanin phenolic compounds. **Eur. Food Res. Technol.** v.220 p.331–340, 2005.
- OSZMIANSKI, J.; RAMOS, T.; BOURZEIX, M. Fractionation of phenolic-compounds in red wine. **Am. J. Enol. Viticult.** v.39, n.3, p.259-262 1988.
- REVILLA, E.; RYAN, J. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. **J. Chromatogr. A**, v.881, p.461-469, 2000.
- 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. **J. Chromatogr. A** v.912, p. 249-257, 2001.

- SINGLETON, V. L.; ROSSI Jr, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am. J. Enol. viticult.**, v.26, n.2, p.62-69, 1965.
- TEDESCO, I.; RUSSO, M.; RUSSO, P.; IACOMINO, G.; RUSSO, G. L.; CARRATURO, A.; FERUOLO, C.; MOIO, L.; PALUMBO, R. Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. **J. Nutr. Biochem.** v.11, p.114-119, 2000.
- VILLERS, A. DE; MAJEK, P.; LYNEN, F.; CROUCH, A. LAUER, P. SANDRA, P. Classification of South African red and white wines according to grape variety based on the non-colored phenolic content. **Eur. Food Res. Tech.** v.221, p. 520-528, 2005.



Capítulo 3

COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHOS E SEU COMPORTAMENTO DURANTE O PROCESSAMENTO

Facco, Elizete Maria Pesamosca¹; Fogaça, Aline de Oliveira²; Daudt, Carlos
Eugenio²; Godoy, Helena Teixeira¹

¹ - Depto de Ciência de Alimentos, FEA-UNICAMP, Campinas, SP, 13083-970, Brasil,
Fone: 55 32514024 *e-mail: elizetefacco@gmail.com

² - Depto de Tecnologia e Ciência de Alimentos, CCR-UFSM, Santa Maria, RS, 97105900,
Brasil, Fone: 55 2208254.

COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHOS E SEU COMPORTAMENTO DURANTE O PROCESSAMENTO

Facco, E. M. P.; Fogaça, A. de O.; Daudt, C. E.; Godoy, H.T.

RESUMO

O trabalho objetivou avaliar o comportamento de alguns compostos fenólicos mais importantes durante as etapas de produção de vinhos. Foram analisadas amostras desde a colheita da uva até doze meses após a fermentação. O maior aumento de fenóis totais ocorreu durante a fermentação alcoólica, confirmando o que já foi demonstrado sobre a extração de fenóis das cascas para o meio alcoólico. De forma geral, para os compostos fenólicos individuais, determinados por CLAE, o aumento maior ocorreu depois do processo de fermentação maloláctica até um ano após a vinificação. Das variedades analisadas, a Merlot foi a que apresentou menores valores iniciais de todas as classes de fenólicos individuais e totais. Quando analisados cada um dos compostos fenólicos, foi verificado que um deles encontrava-se em maior concentração em uma das variedades de vinho tinto estudadas. Mas não necessariamente era o composto em maior quantidade no vinho daquela variedade. O Cabernet sauvignon apresentou o ácido gálico como composto em destaque em relação aos demais fenólicos. Já entre as variedades Merlot, Pinot Noir e Isabel, entre os compostos de destaque apareceram o resveratrol, as catequinas e a quercetina, respectivamente.

Palavras chave: Compostos fenólicos, vinho, vinificação

BEHAVIOR OF PHENOLIC COMPOUNDS IN BRAZILIAN WINES DURING THE WINEMAKING

Facco, E. M. P.; Fogaça, A. de O.; Daudt, C. E.; Godoy, H.T.

ABSTRACT

The aim of this work was the evaluation of the behavior of the phenolic compounds in wines. The samples were analyzed since the harvest of grape until 12 months after the fermentation. The highest increase of the total phenolic content was observed during the alcoholic fermentation, according to the literature reporting that the phenolic compounds are extracted from skin by the alcoholic medium. As a general rule, for single individuals phenolic compounds, determined by HPLC, the high increase occurred after the malolactic fermentation process until 1 year after the winemaking. From all analysed variety the Merlot was the one that showed the smallest initial concentrations—for single phenolic compounds and also in total phenolic content. When the phenolic compounds were studied individually, it was observed that for each variety of wine there was a significative compound, and that this compound was not necessarily the most concentrated. In the Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir and Isabel varieties, the main phenolic compound that differentiated them was gallic acid, t-resveratrol, catechins and quercetin, respectively.

Keywords: phenolic compounds, wine, winemaking

1 - INTRODUÇÃO

As uvas contêm uma grande quantidade de diferentes compostos fenólicos nas cascas, na polpa e nas sementes que são parcialmente extraídas durante os processos de vinificação (Jackson, 1994). A importância dos compostos fenólicos em enologia está na participação na cor dos vinhos tintos, no sabor amargo e adstringente, intervenção nos fenômenos de turvamento e participação na formação do aroma, além de constituir o principal reservatório de substâncias auto-oxidáveis, formando o maior sistema de proteção dos vinhos contra fenômenos de oxidação (Daudt e Polenta, 1999).

Os ácidos fenólicos são os compostos derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico, geralmente encontrados na forma de ésteres do ácido caftarico, localizados, principalmente, na casca da uva (Jackson, 1994). Os ácidos cinâmicos, principalmente o ácido p-coumárico, o ácido caféico, o ácido ferrúlico e o ácido sinápico são mais comumente encontrados que os ácidos hidroxibenzoicos. Esses ácidos são raramente encontrados na forma livre, exceto em alimentos que passam por processos de congelamento, esterilização e fermentação (Manach *et al.*, 2003).

Os flavonóides representam o maior grupo de polifenóis encontrados em alimentos, além de serem considerados os mais potentes antioxidantes, entre os compostos fenólicos (Shahidi *et al.*, 1992; Soobrattee *et al.*, 2005).

Outro composto importante em vinhos é o resveratrol classificado como estilbeno, uma classe de antibiótico da planta, e que é sintetizado quando a mesma é submetida a um estresse, como o ataque de patógenos, radiação UV ou lesão (Bravo, 1996). Além da função protetora, o resveratrol está diretamente relacionado a diversos benefícios para a saúde humana, principalmente pelas

suas propriedades antioxidantes, e a diminuição da incidência de distúrbios cardiovasculares (Bravo, 1996; Frankel *et al.*, 1995; Stivala *et al.*, 2001).

A análise dos compostos fenólicos tem sido, comumente, realizada por métodos colorimétricos e enzimáticos que determinam as quantidades das diferentes classes desses compostos, no entanto, são métodos que exigem longo tempo de análise além de serem trabalhosos e não muito sensíveis. A tendência atual é a utilização das análises cromatográficas utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que além de ser mais prática, rápida e sensível também possibilita a análise qualitativa e quantitativa de cada um dos compostos fenólicos separadamente.

O objetivo do trabalho foi determinar o teor dos compostos fenólicos em uvas tintas das variedades viníferas Cabernet Sauvignon, Pinot Noir e Merlot e nas variedades americanas tinta Isabel e branca Niagara, bem como acompanhar o comportamento durante o processamento de vinificação.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – MATERIAIS

AMOSTRAS

As uvas tintas das variedades viníferas Cabernet Sauvignon (CS), Pinot Noir (Pn) e Merlot (Me), destinadas a produção de vinho tinto fino, estão entre as uvas varietais mais cultivadas no Brasil (Mello, 2006), e por isso escolhidas para o estudo.

As amostras de uvas *Vitis vinífera*, tintas Cabernet Sauvignon, Pinot Noir e Merlot, utilizadas no experimento, foram provenientes da vinícola Velho Amâncio, localizada em Itaara, região central do Rio Grande do Sul. As variedades tinta americana Isabel (Is) e branca Niagára (Ni) foram provenientes da Serra gaúcha. Todas as uvas foram vinificadas na Vinícola Velho Amâncio e as amostras foram coletadas durante diferentes etapas do processo de vinificação, no início e no final da fermentação alcoólica (aproximadamente 8 dias), no final da fermentação maloláctica (aproximadamente 40 dias) e, após 120 (3 meses), 210 (6 meses) e 365 (12 meses) dias depois da fermentação alcoólica. No vinho Cabernet sauvignon foi realizada ainda uma amostragem com 720 (24 meses) dias de processamento. Foram coletadas amostras em replicata, devidamente armazenadas a -18 °C e posteriormente transportadas até o laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-São Paulo para a realização das análises químicas.

A maturação da uva foi controlada pela análise do grau de açúcar, da acidez e da medida do pH. A fermentação alcoólica foi controlada pela análise de açúcar, e considerada terminada quando esse valor atingiu zero. Depois do processo de fermentação maloláctica, os vinhos passaram pelo processo de resfriamento. Depois dessa etapa e da filtração, quando necessária, os vinhos Isabel e Niagára já estavam prontos para consumo, o que explica a ausência desses vinhos nas etapas finais do processamento.

O vinho produzido com a variedade americana Isabel foi induzido ao tratamento com ácido tartárico e sob temperaturas controladas para acelerar a precipitação dos sais e o amadurecimento do vinho. Esse processo pode ser observado no comportamento dos fenóis totais.

REAGENTES

Os solventes usados como fase móvel foram grau cromatográfico e os ácidos da marca MERCK do Brasil. A água utilizada para preparar a fase móvel foi purificada usando sistema Milli-Q (MILLIPORE). Os padrões de ácido gálico, ácido p-coumárico, ácido ferrúlico, ácido caféico, ácido vanílico, (+)catequina, (-)-epicatequina, quercetina, kaempferol e resveratrol foram obtidos da SIGMA.

2.2 – MÉTODOS

A porcentagem de sólidos solúveis foi medida com o auxílio de um densímetro de °Brix, posteriormente, corrigidas em função da temperatura. A determinação da acidez titulável foi realizada segundo Amerine e Ough, (1980), pipetando 10 ml da amostra e usando solução de hidróxido de potássio $0,1\text{molL}^{-1}$, previamente padronizada, como titulante. O valor de pH foi medido em pHmetro (Digimed) (AOAC, 2000).

A concentração de polifenóis totais foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Singleton e Rossi (1965). Foram adicionados 2 ml de amostra diluída 1:10 (em água destilada) para o vinho tinto e 1ml de amostra para o vinho branco, 1 ml de reagente Folin-Ciocalteu e 8 ml de sol. Na_2CO_3 20% e o volume completado a 25 ml com água destilada. A quantificação foi realizada com o auxílio da curva de calibração feita com solução de ácido gálico. O teor de fenólicos totais foi expresso em equivalentes de ácido gálico (mgL^{-1}). As leituras do padrão e das amostras foram realizadas em espectrofotômetro (Perkin Elmer lambda 6 Series PECSS) a 765 nm após 2 horas.

Para a determinação individual dos fenólicos utilizou-se a técnica de CLAE e o método foi validado por Facco e Godoy, (2006). Foram analisados o ácido

gálico, o ácido caféico, o ácido p-coumárico, o ácido ferrúlico e o ácido vanílico, como representantes dos fenóis ácidos; a catequina e a epicatequina representando os flavanais; a quercetina e o resveratrol representando a classe dos flavonóis e dos stilbenos, respectivamente.

Os padrões foram dissolvidos em solução de metanol:água acidificados com ácido fórmico, com concentrações que variaram para cada composto fenólico e armazenados a -4°C no escuro. Para eliminar o oxigênio e evitar a degradação dos padrões, as soluções foram armazenadas com nitrogênio.

O instrumento utilizado foi um cromatógrafo a líquido HP (Hewlett Packard) série 1100, equipado com degaseificador, bomba quaternária, injetor automático com capacidade de 1 a 100 μL e detector de arranjo de diodos (UV - VIS). A separação dos compostos foi realizada utilizando coluna C_{30} (4,6x250mm) YMC carotenoidTM Waters, fase móvel composta por (A) água:ácido fórmico (99,6:0,4) e fase móvel (B) acetonitrila:ácido fórmico (99,6:0,4), a uma vazão de 0,8 mLmin^{-1} , temperatura da coluna a 35°C , e volume de injeção 20 μL , com tempo de corrida de 50 min. O gradiente de separação dos compostos está apresentado na **Tabela 1**. As fases móveis foram filtradas com filtros MILLIPORE com poros de 0,45 μm de diâmetro.

Tabela 1 - Gradiente da fase móvel usada no método.

<i>solventes</i>	Tempo (min)						
	0	10	25	38	40	45	50
% A	95	91	83	70	40	10	95
% B	5	9	17	30	60	90	5

A- água:ácido fórmico (996:4) e % B- acetonitrila:ácido fórmico (996:4)

Os picos cromatográficos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com os padrões e pelo espectro obtido no detector de Arranjos de

Diodos (DAD) e de fluorescência (FLD). A quantificação foi realizada por padronização externa, onde curvas de calibração foram construídas para cada um dos compostos analisados. As amostras foram diluídas, em solução alcoólica acidificada com ácido fórmico 0,4 %, filtradas em filtros MILLIPORE 0,45 µm e injetadas diretamente no cromatógrafo.

Para a análise dos dados utilizou-se o sistema de software HP-Chemstation acoplado ao cromatógrafo, que além de monitorar todos os componentes, permitiu o melhor tratamento dos dados.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de fenólicos totais das amostras de vinhos tintos (Cabernet Sauvignon, Pinot Noir, Merlot e Isabel) e branco (Niágara) analisados nesse estudo são apresentados na **Tabela 2**.

Os resultados mostraram que o maior aumento de fenólicos totais ocorreu durante a fermentação alcoólica, mostrando que os compostos presentes na casca migram para o vinho, como é amplamente conhecido. Essa transferência ocorre gradativamente durante a fermentação alcoólica influenciada pela ação enzimática e pelo efeito do álcool produzido durante o processo de fermentação (Singleton e Trousdale, 1983; Cheynier *et al.*, 1995).

Tabela 2 - Concentração dos fenóis totais (mg de ácido gálico L⁻¹) durante o processamento de vinhos Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Isabel, e Niágara.

Etapas do processamento	Variedades de uva				
Vinificação (dias)	Cabernet Sauvignon	Merlot	Pinot Noir	Isabel	Niágara
Colheita (0 dias)	775 ± 20	159 ± 7	542 ± 16	350 ± 31	247 ± 21
Alcoólica (8 dias)	1362 ± 15	1108 ± 21	1248 ± 22	1562 ± 11	389 ± 24
Maloláctica (38 dias)	1408 ± 34	1341 ± 30	1516 ± 35	1064 ± 9	369 ± 4
120 dias	1388 ± 18	1054 ± 22	1550 ± 14	♣	320 ± 11
210 dias	1468 ± 19	1075 ± 3	1698 ± 26	806 ± 25	249 ± 18
365 dias	1539 ± 28	1188 ± 23	1699 ± 37	858 ± 40	-
720 dias	1405 ± 12	-	-	-	-

M±DP

♣ Não foi realizada coleta porque a coleta do final da fermentação maloláctica coincidiu com o período de 120 dias

Os dados deste estudo estão de acordo com a literatura que descreve que os compostos fenólicos são provenientes da casca e da semente da uva e que tem sua extração na etapa da fermentação alcoólica (Singleton e Trousdale, 1983; Jackson, 1994, Kovac *et al.*, 1992, Netzel *et al.*, 2003). Esse comportamento foi observado para todas as variedades de uvas analisadas. As variedades Cabernet Sauvignon e Pinot Noir já no momento da colheita apresentavam valores elevados de fenóis totais 775 mgL⁻¹ e 542 mgL⁻¹, respectivamente, contra os 159 mgL⁻¹ do Merlot. A diferença de fenólicos totais entre os vinhos estudados se manteve, também depois do vinho pronto, onde o cabernet Sauvignon apresentou 1539 mgL⁻¹ e o Pinot Noir 1699 mgL⁻¹ e o Merlot 1188mgL⁻¹. Dentre os vinhos tintos o Isabel foi o que apresentou os menores valores para fenólicos totais. Esse resultado pode ser atribuído ao tratamento com ácido tartárico e frio que acelera a precipitação dos sais e dos fenólicos. A diminuição da quantidade de fenólicos

tende a ocorrer durante o envelhecimento, como o observado no vinho Cabernet Sauvignon após 2 anos, quando ocorrem reações de complexação e condensação entre compostos presentes no vinho (Fulcrand *et al.*, 1996; Gutierrez *et al.*, 2005; Duenas *et al.*, 2006). Resultados semelhantes para os fenólicos totais durante o processamento da uva Isabel foram encontrados por Daudt e Polenta (1999).

Já para o vinho branco de Niágara o total de fenólicos não variou no decorrer da vinificação. Acredita-se, que esse comportamento ocorreu, porque a fermentação foi realizada somente com o mosto, sem a presença das cascas. Provavelmente, os poucos fenólicos dessa variedade de vinho, são provenientes do rápido contato (aproximadamente 12 horas) do mosto, com as sementes e com as cascas, durante o processo de esmagamento e decantação da casca da uva.

A variedade americana branca, Niagára, tem 4 vezes menos fenólicos que a variedade tinta. A quantidade encontrada no mosto é muito similar àquela presente nas demais etapas de vinificação, nesse caso concentração de fenólicos é proveniente do suco da uva, já que a Niagára foi fermentada sem a casca. E depois de 6 meses, período em que o vinho já se encontra pronto para o consumo a tendência é de diminuição desses compostos (Castro e Barroso, 2003).

A determinação dos fenólicos totais inclui todas os compostos que possuem na estrutura um grupo fenol (Singleton e Rossi 1965) e nesse caso abrange os compostos fenólicos glicosilados e os agliconas. Já os compostos determinados por CLAE, nesse estudo, foram moléculas agliconas.

De um modo geral, durante a vinificação, o comportamento dos compostos fenólicos agliconas determinados por CLAE não muda muito. A **Figura 1** mostra o cromatograma do vinho Cabernet Sauvignon no início da fermentação e a **Figura 2** mostras o vinho branco Niágara no inicio da fermentação. Já a **Figura 3** mostra o vinho Cabernet Sauvignon um ano após a fermentação e a **Figura 4** mostra o Niágara, 6 meses depois do processo de fermentação.

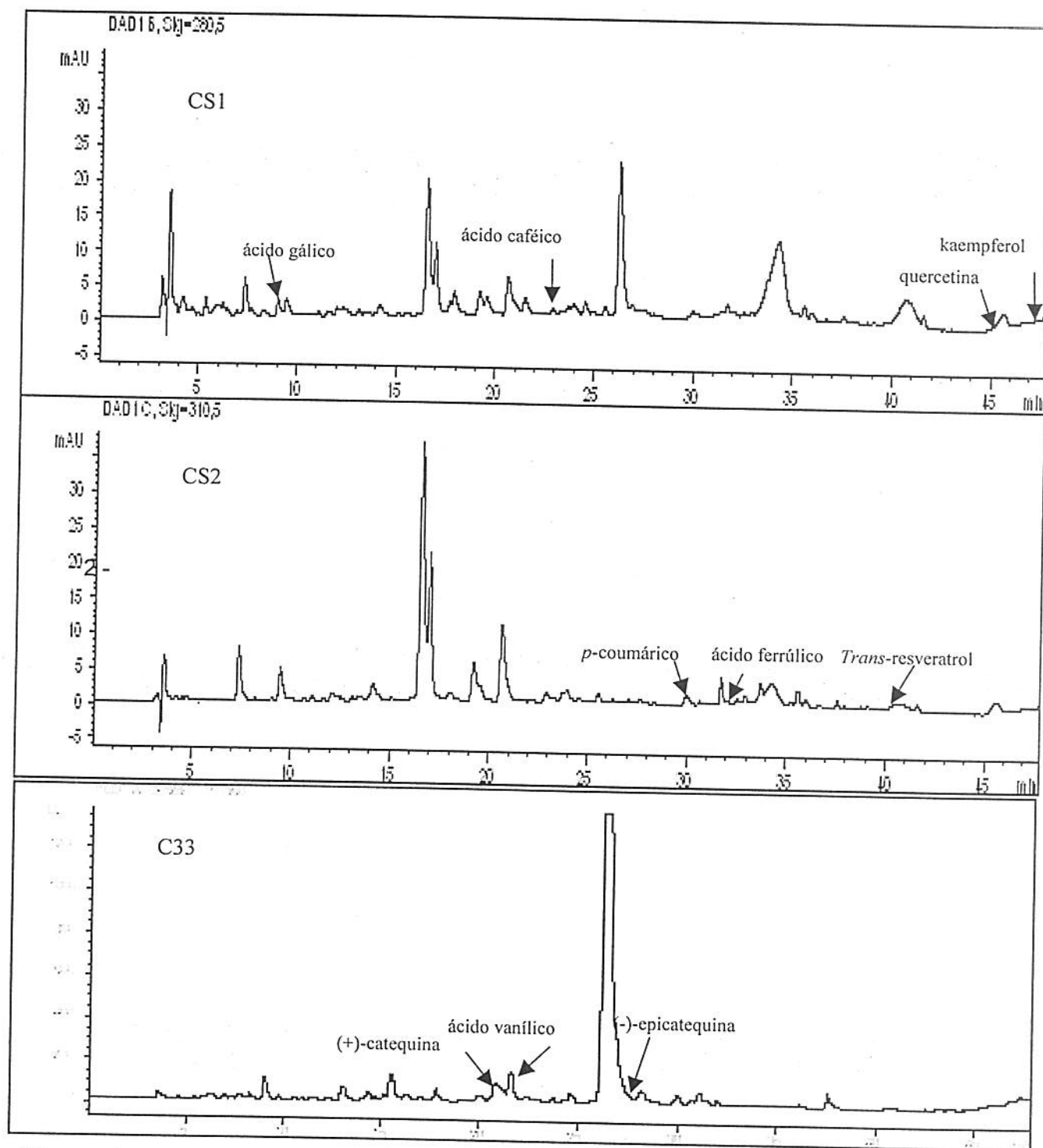


Figura 1 – Cromatograma vinho tinto Cabernet Sauvignon no início da fermentação. As condições cromatográficas: Coluna C_{30} , fluxo de $0,7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, fase móvel A=água:ácido acético 0,4% e B=acetonitrila:ácido fórmico 0,4% (0 min 95% A, 10min 91% A, 25min 83%A, 38min 70%A, 40min 40%A, 45min 10%A e 50min 95%A. E detecção por DAD (CS1)=280nm, (CS2)=310nm e FLD (CS3)=290nm excitação e 360nm emissão).

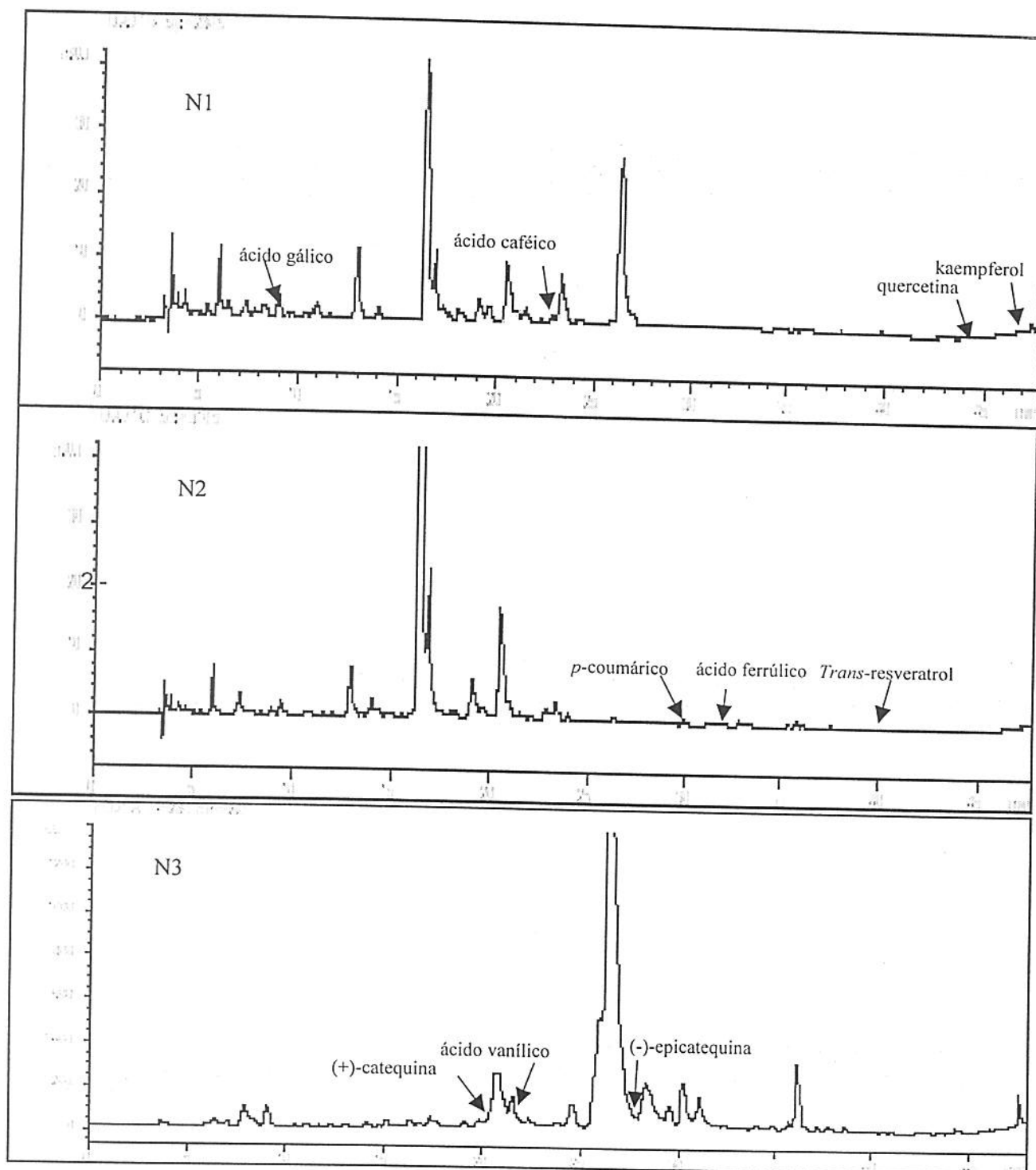


Figura 2 – Cromatograma vinho branco Niagara no início da fermentação. As condições cromatográficas: Coluna C₃₀, fluxo de 0,7ml.min⁻¹, fase móvel A=água:ácido acético 0,4% e B=acetonitrila:ácido fórmico 0,4% (0 min 95% A, 10min 91% A, 25min 83%A, 38min 70%A, 40min 40%A, 45min 10%A e 50min 95%A. E detecção por DAD (CS1)=280nm, (CS2)=310nm e FLD (CS3)=290nm excitação e 360nm emissão).

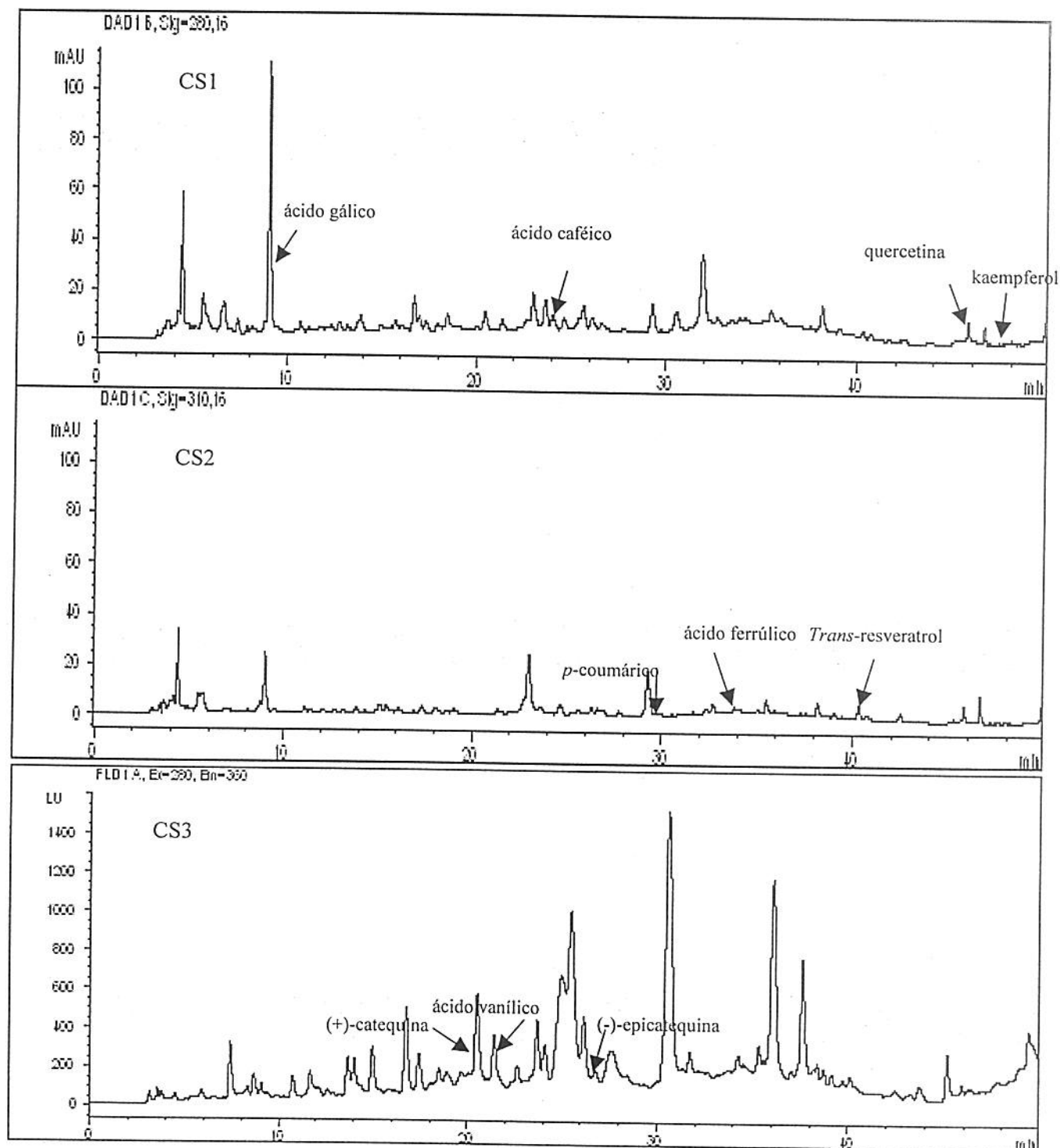


Figura 3 – Cromatograma do tinto Cabernet Sauvignon um ano após o processo de fermentação. As condições cromatográficas: Coluna C₃₀, fluxo de 0,7ml.min⁻¹, fase móvel A=água:ácido acético 0,4% e B=acetonitrila:ácido fórmico 0,4% (0 min 95% A, 10min 91% A, 25min 83%A, 38min 70%A, 40min 40%A, 45min 10%A e 50min 95%A. E detecção por DAD (CS1)=280nm, (CS2)=310nm e FLD (CS3)=290nm excitação e 360nm emissão).

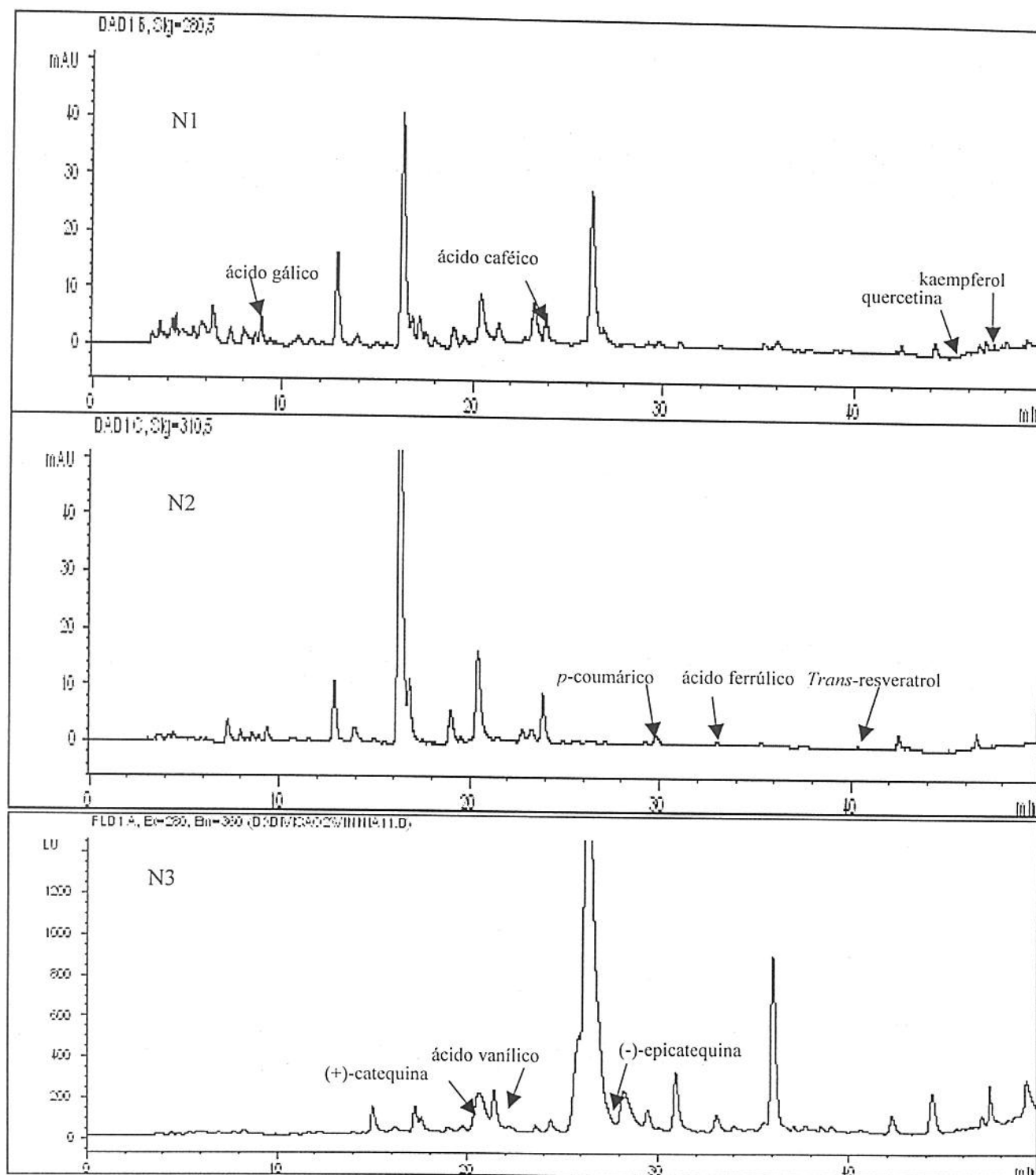


Figura 4 – Cromatograma do vinho branco Niagara 6 meses após o processo de fermentação. As condições cromatográficas: Coluna C_{30} , fluxo de $0,7\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, fase móvel A=água:ácido acético 0,4% e B=acetonitrila:ácido fórmico 0,4% (0 min 95% A, 10min 91% A, 25min 83%A, 38min 70%A, 40min 40%A, 45min 10%A e 50min 95%A. E detecção por DAD (CS1)=280nm, (CS2)=310nm e FLD (CS3)=290nm excitação e 360nm emissão).

As letras "CS1 e N1" e "CS2 e N2" dos cromatogramas apresentam os compostos detectados no DAD a 280nm e a 310nm, respectivamente, e a letra "CS3 e N3" os compostos detectados no FLD com $\lambda_{\text{excitação}}$ a 290nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ a 360nm. Observou-se que a amostra possui uma quantidade grande de interferentes e que nesse caso o uso do detector de fluorescência facilitou a detecção de 3 dos compostos analisados, a catequina, a epicatequina e o ácido vanílico. Esse comportamento também foi observado e utilizado por Rodriguez delgado e colaboradores (2001) para melhorar a eficiência dos métodos de detecção dos compostos fenólicos em vinhos.

As concentrações dos fenóis ácidos nas amostras de vinhos tintos e branco tiveram um aumento elevado depois do processo de fermentação maloláctica, como mostra a **Tabela 3**. Dentre os fenóis ácidos, depois de um ano da vinificação, o que se apresenta em maior quantidade é o ácido gálico. O vinho Cabernet Sauvignon é o que apresentou os maiores valores, aproximadamente, 8 mgL⁻¹; já o vinho Pinot Noir e o Merlot apresentaram 2 e 7 vezes menos do ácido. O ácido gálico é um importante fenol ácido relacionado aos processos de oxidação no envelhecimento dos vinhos (Tulyathan *et al.*, 1989). A quantidade encontrada para o vinho Isabel foi menor que aquela encontrada nos vinhos de uvas viníferas, e menor ainda no vinho branco. Os fenóis ácidos e as catequinas estão, principalmente, relacionadas com a tecnologia de vinhos (Echeverry *et al.*, 2005; Netzel *et al.*, 2003; Saucier *et al.*, 1997) e a quercetina e o resveratrol com as propriedades benéficas a saúde (Soleas *et al.*, 1997, Orallo *et al.*, 2002, Soobrattee *et al.*, 2005).

Tabela 3 - Concentração dos fenóis ácidos (mgL⁻¹) durante o processamento de vinhos brasileiros Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Isabel, e Niágara.

Vinho	Etapa vinificação (dias)	Ac. gálico	Ác. caféico	Ác. P-coumárico	Ác. ferrúlico	Ác. vanílico
CS	Colheita (0)	0,002 (1,5)	0,002 (1,8)	Nd	Nd	Nd
	Alcoólica (8)	0,47 (0,8)	0,03 (0,3)	0,02 (1,0)	0,03 (0,9)	0,01 (3,4)
	Malolactica (38)	0,47 (0,7)	0,03 (0,7)	0,02 (0,17)	0,02 (0,4)	0,01 (0,12)
	120 dias	1,62 (0,2)	0,64 (0,8)	0,29 (1,3)	0,06 (0,2)	0,04 (1,6)
	210 dias	5,76 (2,7)	2,02 (2,25)	1,11 (3,6)	0,12 (3,1)	0,16 (2,7)
	365 dias	8,12 (2,9)	2,14 (3,7)	1,20 (2,9)	0,21 (1,6)	0,10 (1,3)
	720 dias	7,71 (0,3)	1,50 (1,2)	1,38 (0,1)	0,20 (0,6)	0,04 (2,3)
Me	Colheita (0)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	Alcoólica (8)	0,19 (0,6)	0,021 (2,1)	0,008 (0,2)	0,12 (0,5)	0,006 (6,2)
	Malolactica (38)	0,34 (0,3)	0,009 (0,4)	0,005 (0,9)	0,11 (0,6)	Nd
	120 dias	1,04 (0,4)	0,54 (0,4)	0,015 (0,9)	0,46 (0,6)	0,05 (1,4)
	210 dias	1,19 (0,8)	0,52 (0,5)	0,016 (1,1)	0,57 (1,3)	0,2 (1,6)
	365 dias	1,24 (2,2)	0,58 (0,6)	0,014 (0,6)	0,58 (0,6)	0,18 (0,5)
Pn	Colheita (0)	Nd	Nd	Nd	Nd	0,006 (0,7)
	Alcoólica (8)	0,2 (1,7)	0,003 (5,4)	0,004 (1,3)	0,005 (1,1)	0,016 (0,7)
	Malolactica (38)	0,7 (0,9)	0,10 (0,5)	0,05 (0,5)	0,01 (1,0)	0,03 (0,8)
	120 dias	2,1 (0,6)	0,36 (1,7)	0,16 (0,3)	0,04 (2,9)	0,08 (0,1)
	210 dias	3,9 (6,1)	0,67 (0,9)	0,51 (2,2)	0,08 (1,0)	0,07 (2,1)
	365 dias	3,9 (2,3)	0,59 (2,4)	0,53 (1,0)	0,06 (1,1)	0,07 (1,9)
Is	Colheita (0)	0,002 (3,2)	Nd	Nd	Nd	Nd
	Alcoólica(8)	0,255 (1,3)	0,20 (1,2)	0,21 (4,3)	0,04 (3,9)	0,83 (0,91)
	Malolactica (38)	0,37 (1,2)	0,36 (0,8)	0,2 (1,7)	0,12 (1,7)	0,62 (0,72)
	120 dias	Na	Na	Na	Na	Na
	210 dias	1,32 (0,8)	1,54 (4,07)	1,14 (2,5)	0,28 (1,06)	1,63 (0,7)
Ni	Colheita (0)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
	Alcoólica(8)	0,021 (4,3)	0,004 (4,9)	Nd	Nd	Nd
	Malolactica (38)	0,025 (5,1)	0,005 (3,9)	Nd	Nd	Nd
	120 dias	0,029 (3,4)	0,004 (1,6)	Nd	Nd	Nd
	210	0,27 (2,5)	0,70 (4,8)	0,17(0,9)	Nd	0,017 (4,5)

M (CV)= Média e coeficiente de variação entre as médias.

na = não analisado=a amostragem do final da fermentação maloláctica coincidiu com a coleta de 120 dias das demais amostras.

Nd = não detectado

Cs = Cabernet Sauvignon; Me = Merlot; Pn = Pinot Noir; Is = Isabel; Ni = Niágara

A **Figura 5** mostra o comportamento do ácido gálico e das catequinas durante o processamento do vinho.

O grupo das catequinas são representadas pela soma da (+)-catequina e do seu isômero a (-)-epicatequina. As quantidades encontradas para a (+)-catequina são, aproximadamente, 3 vezes maior que para a (-)-epicatequina. Os vinhos de uvas viníferas são os que apresentam os maiores valores dos flavonóides durante o processamento do vinho, aumentando de forma uniforme em todas as variedades analisadas, durante as diferentes etapas da vinificação. O Pinot Noir apresentou a maior quantidade de (+)-catequina e de (-)-epicatequina.

A **Figura 6** mostra os gráficos com a evolução do *trans*-resveratrol e da quercetina durante o período avaliado. O *trans*-resveratrol, um importante composto presente em vinhos com propriedades benéficas a saúde, devido aos efeitos relacionados à diminuição de doenças cardiovasculares e a ação antioxidante (Orallo *et al.*, 2002) foi encontrado em maior quantidade no vinho Me, cerca de $1,2 \text{ mgL}^{-1}$. Observou-se que a forma aglicona *trans*-resveratrol aumenta durante todo o processo de vinificação.

A quercetina, representante dos flavonóis analisado nesse trabalho, é também importante pelas suas propriedades de manutenção da saúde, foi encontrada em maior quantidade no vinho da variedade americana Isabel, cerca $0,44 \text{ mgL}^{-1}$, e em menor quantidade nos vinhos produzidos com variedades viníferas, conforme descrito por (Jackson, 1994). O aumento na concentração da forma aglicona ocorre depois da fermentação maloláctica.

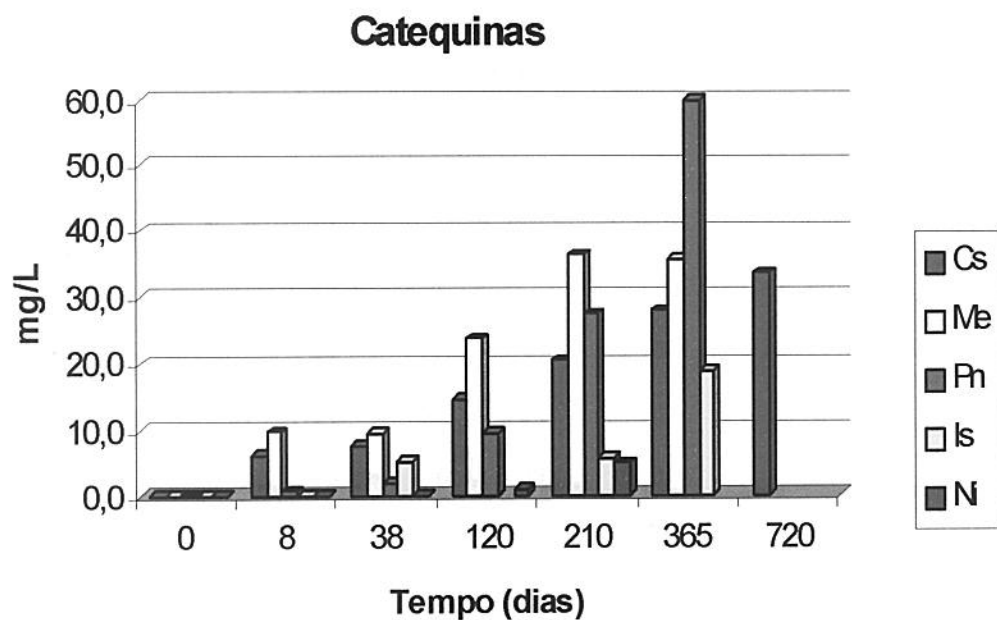
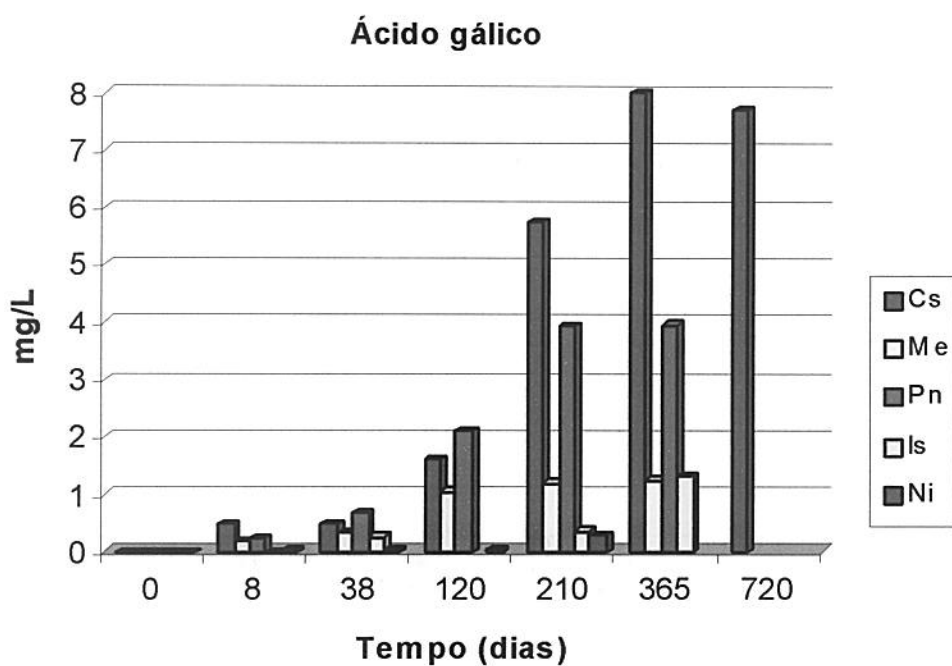


Figura 5: Comportamento do ácido gálico e das catequinas durante as diferentes etapas do processamento do vinhos Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Isabel e Niágara (Cs = Cabernet sauvignon; Me = Merlot; Pn = Pnot Noir; Is =Isabel; Ni = Niágara).

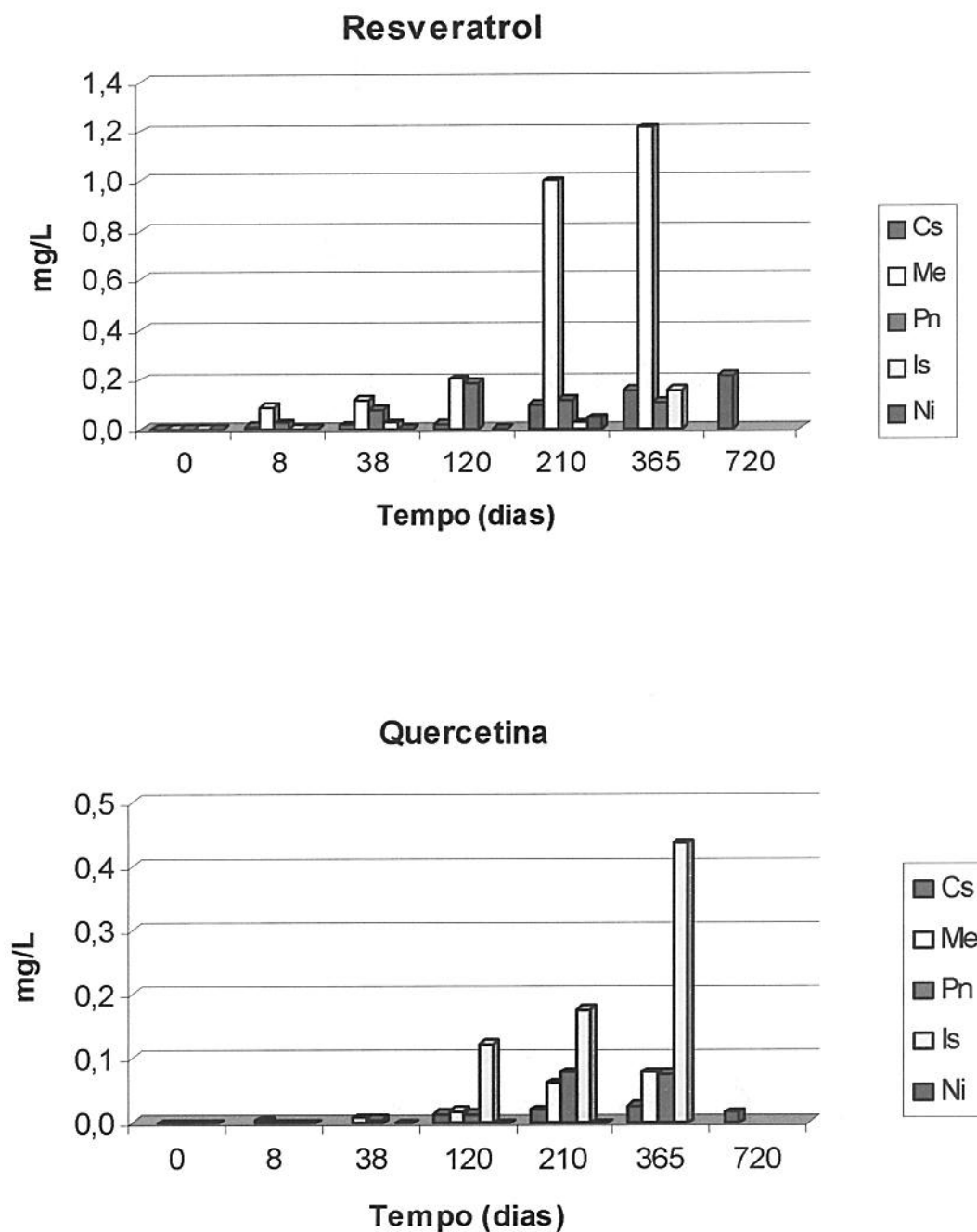


Figura 6: Comportamento do resveratrol e da quercetina durante as diferentes etapas do processamento dos vinhos Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Isabel e Niágara (Cs = Cabernet Sauvignon; Me = Merlot; Pn = Pinot Noir; Is = Isabel; Ni = Niágara).

A maior parte dos compostos foi extraída para o líquido no decorrer do processamento fermentativo, em maior quantidade no alcoólico. Depois dessa etapa os valores aumentaram, mas a tendência foi de estabilizar, inclusive com a diminuição de alguns compostos. De forma geral, esse processo foi observado principalmente nos vinhos de Pinot Noir.

Inúmeros trabalhos demonstram que o vinho é uma bebida rica em compostos fenólicos. A maioria relata a presença de inúmeros fenóis ácidos, de flavonóides e do resveratrol (Bahorun *et al.*, 2004; Soobrattee *et al.*, 2005; Wallerath *et al.*, 2005; Padilla *et al.*, 2005; Es-Safi *et al.*, 2003). Os níveis de fenóis ácidos encontrados nos vinhos, analisados neste trabalho, são semelhantes aos encontrados por Rodriguez Delgado *et al.* (2001), que também analisou diferentes vinhos tintos, e menor que os citados por Ritchey e Waterhouse, (1999).

Os resultados encontrados para a (+)-catequina e para a (-)-epicatequina variaram, respectivamente, de 36 mgL⁻¹ e 20 mgL⁻¹ para o vinho Pinot Noir. Para os vinhos Cabernet Sauvignon e Merlot os valores encontrados são ainda menores. Os dados de catequina e epicatequina encontrados na literatura, para os vinhos tintos, variam muito, abrangendo valores que vão de 11 mgL⁻¹ a 32 mgL⁻¹ para a catequina e de 7 mgL⁻¹ até 20 mgL⁻¹ para a (-)-epicatequina (Rodriguez-Delgado *et al.*, 2001). Frankel *et al.* (1995) relata que vinhos californianos apresentam uma quantidade maior de catequina e de epicatequina. A análise das catequinas pelo método de fluorimetria, descrito por Rodriguez-Delgado *et al.* (2001) mostrou que os valores encontrados foram inferiores aos que se obteriam se a detecção fosse feita por detector de DAD, o que pode explicar os níveis menores encontrados neste trabalho.

De uma forma geral foram encontrados maiores quantidades de resveratrol, quercetina e catequinas no vinho Merlot em comparação com o vinho Cabernet sauvignon. Resultado semelhante para o perfil desses compostos foi encontrado por outros autores (Villiers *et al.*, 2005).

4 – CONCLUSÕES

Entre os ácidos fenólicos analisados o ácido vanílico e o ácido ferrúlico, nos vinhos de Cabernet Sauvignon e Pinot Noir, apresentam os valores mais baixos; entretanto, o ácido p-coumárico e o ácido vanílico apresentam os valores mais baixos no vinho Merlot.

Cabernet Sauvignon é o vinho que apresenta a menor quantidade de catequinas, seguida por Merlot e Pinot Noir. Em todos os vinhos analisados, foi observado aproximadamente 3 e 4 vezes mais (+)-catequina que (-)-epicatequina.

Cada um dos vinhos tintos analisados apresentou um dos compostos fenólicos como característico da variedade, não necessariamente encontrado em maior quantidade. O composto encontrado em destaque no Cabernet Sauvignon em relação às demais variedades foi o ácido gálico. O *trans*-resveratrol foi o composto que caracterizou o vinho Merlot. Para o vinho Pinot Noir o composto fenólico que se destacou nessa variedade foram as catequinas. Já o Isabel apresentou a quercetina como fenólico característico.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERINE, M. A.; OUGH, C. S. **Methods for analysis of musts and wines**. 2 edição, Ed Willy Interscience, New York, 1980, 377p.
- AOAC Beverages: wines. In: **Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists**, Washington, 2000.
- BAHORUN, T.; LUXIMON-RAMMA, A.; CROZIER, A.; ARUOMA, O. I. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. **J. Sc. Food Agric.** v.84, p.1553-1561, 2004.
- BRAVO, A. E. Resveratrol in wine: contribution to potential cardiovascular protective activity. **Alimentaria** v.269, p.71-72, 1996.
- CASTRO, P. B. R.; BARROSO, C. G. Changes in the polyphenolic and volatile contents of "fino" sherry wine exposed to ultraviolet and visible radiation during storage. **J. Agric. Food Chem.** v.51, p. 6482-6487, 2003.
- CHEYNIER, V.; FULCRAND, H.; GUYOT, S.; OSZMIANSKI, J.; MOUTOUNET, M. Reactions of enzymatically generated quinones in relation to browning in grape musts and wines. Enzymatic Browning and its Prevention. **ACS Sym. Ser.** v.600, p.130-143, 1995.
- DAUDT, C. E.; POLENTA, Phenols from Cabernet sauvignon and Isabel musts submitted to several treatments. **J. Sci. Tech. Tonnellerie** v.5, p.57-64, 1999.
- DUEÑAS, M.; FULCRAND, H.; CHEYNIER, V. Formation of anthocyanin-flavanol adducts in model solutions. **Anal. Chim. Acta** v. 563 p.15–25, 2006.
- ECHEVERRY, C.; FERREIRA, M.; REYES-PARADA, M.; ABIN-CARRIQUIRY, J.A.; BLASINA, F.; GONZÁLVEZ-NEVES, G.; DAJAS, F. Changes in antioxidant capacity of Tannat red wines during early maturation. **J. Food Eng.** v.69, p.147-154, 2005.
- ES-SAFI N-E.; CHEYNIER V.; MOUTOUNET M. Effect of copper on oxidation of (+)-catechin in a model solution system, **Int. J. Food Sci. Tech.**, v.38, n.2, p.153-163, 2003.

- FACCO, E. M. P., GODOY, H. T. **Compostos funcionais no processamento de vinhos**. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP, 131p., 2006.
- FRANKEL, E.; WATERHOUSE, A. L. TESSEDRE, P.L. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. **J. Agric. Food Chem.** v.43, p.890-894, 1995.
- FULCRAND, H.; DOS SANTOS, P. J. C.; SARNIMANCHADO, P.; CHEYNIER, V.; FAVREBONVIN J. Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. **J. Chem. Soc.-Perkin Trans.** n.1 v.7, p.735-739, 1996.
- GUTIERREZ, I. H.; SA'NCHEZ-PALOMO, E.; LORENZO, E. S.; 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 Chem.** v. 92 p.269-283, 2005.
- JACKSON, R. S. **Wine Science: principles and aplications**. San Diego, Ed. Academic Press, 1994, 475p.
- KOVAC, V.; ALONSO, E.; BOURZEIX, M.; REVILLA, E. Effect of several enological practices on the content of catechins and proanthocyanidins of red wines. **J. Agr. Food Chem.** v.40, p.1953-1957, 1992.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.** v.79, p.727-747, 2004.
- MELLO, L. M. R. de, **Produção e Comercialização de Uvas e Vinhos – Panorama 2005**, www.cnpv.embrapa.br/public/artigos/panorama2005-producao.pdf, acessado em 2006.
- NETZEL, M.; STRASS, G.; BITSCH, I.; KÖNITZ, R.; CHRISTMANN, M.; BITSCH, R. Effect of grape processing on selected antioxidant phenolics in red wine. **J. Food Eng.** v.56, p.223-228, 2003.
- ORRALO, F.; ALVAREZ, E.; CAMINA, M.; LEIRO, J. M.; GOMEZ, E.; FERNANDEZ, P. The possible implication of *trans*-resveratrol in the

- cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. **Mol. Pharmacol.** v.61, n.2, p.294-302, 2002.
- PADILLA, E.; RUIZ, E.; REDONDO, S.; GORDILLO-MOSCOSO, A.; SLOWING, K.; TEJERINA, T. Relationship between vasodilation capacity and Phenolic Content of Spanish wines. **Eur. J. Pharmacol.** v.517 p.84-91, 2005.
- RITCHEY, J. G.; WATERHOUSE, A. L. A standart red wine: monomeric phenolic analysis of commercial Cabernet Sauvignon wines. **Am. J. Enol. Viticult.** v.50, n. 1, p. 91-100, 1999.
- RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A.; MALOVANÁ, S.; PÉREZ, J. P.; BORGES, T.; GARCÍA MONTELONGO, F. J. Separation of phenolic compouds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. **J. Chromatogr. A** v.912, p.249-257, 2001..
- SAUCIER, C.; LITTLE, D.; GLORIES, Y. First evidence of acetaldehyde-flavanol condensation products in red wine. **Am. J. Enol. Viticult.** v.48, p.369-373, 1997.
- SHAHID, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** v.130, p.2073S-2085S, 1992.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI Jr, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am. J. Enol. Vitivult.**, v.26, n.2, p.62-69, 1965.
- SINGLETON, V. L.; TROUSDALE, E. White wine phenolics. Varietal and processing differences as shown by HPLC. **Am. J. Enol Viticult.** v.34, n.1, p.27-34, 1983.
- SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Resveratrol: A molecule whose time has come? And Gone? **Clin. Biochem.** v.30, n.2, p.91-113, 1997.
- SOOBRAATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutat. Res.** v.579, n.1, p.200-213, 2005.
- STIVALA, L. A.; SAVIO, M.; CARAFOLI, F.; PERUCCA, P.; BIANCHI, L.; MAGA, G.; FORTI, L.; PAGNONI, U. M.; ALBINI, A.; PROSPERI, E.; VANNINI, V.

- Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. **J. Biol. Chem.** v.276, p.22586-22594, 2001.
- TULYATHAN, V.; BOULTON, R.; SINGLETON, V. L. Oxygen uptake by gallic acid as a model for similar reactions in wines. **J. Agric. Food Chem.** v.37, p.844–849, 1989.
- VILLERS, A. DE; MAJEK, P.; LYNEN, F.; CROUCH, A. LAUER, P. SANDRA, P. Classification of South African red and white wines according to grape variety based on the non-colored phenolic content. **Eur. Food Res. Technol.** v.221, p. 520-528, 2005.
- WALLERATH, T.; LI, H.; GO'DTEL-AMBRUST, U.; SCHWARZ, P. M.; FO'RSTERMANN, U. A blend of polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial no synthase. **Nitric Oxide**, v.12, p.97-104, 2005.

CAPITULO 4

DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN BRAZILIAN AND ITALIAN WINES

Elizete Maria Pesamosca Facco^a, Giuseppe Pieraccini^b, Gianluca Bartolucci^c,
Carlos Eugenio Daudt^d; Helena Teixeira Godoy^a

^aDepto de Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, CP – 6121, CEP13083 862, Campinas, SP, Brasil.
elizetefacco@gmail.com

^bCISM - Centro Interdipartimentale di Spettrometria di Massa, Università di Firenze, Firenze, Italia.

^cDipartimento di Scienze Farmaceutiche - Università di Firenze, Sesto Fiorentino, Italia.

^dDepto de Tecnologia e Ciência de Alimentos, CCR-UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHOS BRASILEIROS E ITALIANOS

FACCO, E. M. P., PIERACCINI, G; BARTOLUCCI, G; DAUDT, C. E.; GODOY, H. T.

RESUMO

A quantidade de compostos fenólicos pode variar muito devido aos fatores edafoclimáticos, como: diferentes temperaturas, intensidade da luz e composição do solo. Além disso a composição das uvas e as técnicas de vinificação também contribuem para essa diferença. Neste trabalho, foram analisados vinhos brasileiros e italianos das variedades tintas: Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir e brancas: Chardonay, Riesling and Cabernet Blanc. Treze compostos fenólicos foram avaliados através da técnica de CLAE acoplada ao detector de massas (HPLC-ESI/MS): ácido gálico, ácido caféico, ácido p-coumárico, ácido vanílico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, procianidina B1, procianidina B2, etil galato, trans-resveratrol, quercetina e kaempferol. A identificação e a quantificação foram realizadas pela comparação dos tempos de retenção e pelos espectros de massas das soluções padrão. Os níveis dos compostos fenólicos nos vinhos tintos brasileiros e italianos, encontrados nesse trabalho, mostraram que, de uma forma geral, os maiores valores estão presentes nos vinhos da variedade Merlot. Observou-se, também, diferença na quantidade de compostos entre os vinhos dos dois países, particularmente, nos derivados das catequinas nos vinhos Italianos.

Palavras chaves: Vinho, espectrometria de massa, compostos fenólicos

COMPOSTI FENOLICI IN VINO BRASILIANO E ITALIANO

FACCO, E. M. P., PIERACCINI, G; BARTOLUCCI, G; DAUDT, C. E.; GODOY, H. T.

ABSTRACT

Il contenuto di composti fenolici può variare in dipendenza di diversi fattori edafoclimatici, come temperatura, intensità della luce e composizione del terreno. In aggiunta alla composizione dell'uva, anche le tecniche di vinificazione contribuiscono alle differenze nella composizione della parte fenolica del vino. In questo lavoro sono stati analizzati e comparati campioni provenienti da vini italiani e brasiliani, sia rossi (Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir) che bianchi (Chardonay, Riesling and Cabernet Blanc). Tredici composti fenolici sono stati analizzati mediante HPLC-ESI/MS (acido gallico, acido caffeico, acido p-cumarico, acido vanillico, (+)-catechina, (-)-epicatechina, procianidina B1, procianidina B2, etil gallate, resveratrolo, quercetina e kaempferolo). L'identificazione e la quantificazione sono state effettuate mediante comparazione dei tempi di ritenzione e degli spettri di massa con quelli di standard commerciali. I dati riportati in questo studio sui livelli di tutti i composti fenolici nei vini dei due paesi mostrano che i vini ottenuti da uve Merlot generalmente hanno il contenuto più elevato di composti fenolici. Inoltre sono anche ben evidenti differenze nella composizione della parte fenolica dei vini brasiliani e italiani. In particolare questi ultimi hanno un più elevato numero di derivati catechinici.

Keywords: Wine, mass spectrometry, phenolic compounds.

PHENOLIC COMPOUNDS IN BRAZILIAN AND ITALIAN WINES

FACCO, E. M. P.; PIERACCINI, G; BARTOLUCCI, G; DAUDT, C. E.; GODOY, H. T.

ABSTRACT

Phenolic compound content can vary due diverse to edafoclimatic factors, as temperature difference, light intensity and ground composition. In addition to fruit composition, winemaking techniques also contribute to differentiate phenolic composition. In this work, samples of Brazilian and Italian red and white wines have been analyzed: Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Chardonay, Riesling and Cabernet Blanc. Thirteen phenolic compounds have been evaluated through HPLC-ESI/MS: gallic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, vanilic acid, (+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidin B1, procyanidin B2, ethyl gallate, resveratrol, quercetin and kaempferol. Identification and quantification have been carried out by comparison of retention times and mass spectra of standard solutions. The data on the levels of all the phenolic compounds in the red Brazilian an Italian wines reported in this study showed that the wine samples from Merlot grapes generally had the highest phenolic compounds content. There was difference in phenolic compounds between wines of the two countries, in particular, italian wine has a higher number of catechin derivates.

Keywords: wine, mass spectrometry, phenolic compounds.

1 – INTRODUCTION

The first vineyards in Brazil were established approximately in the 1550 by Brás Cubas who introduced Portuguese wines to the region which is nowadays the state of São Paulo; nevertheless he had few success and after he moved to the state of Rio Grande do Sul, in the south of Brazil, where most of the Brazilian wine is presently produced. Later the German (1825) and the Italian immigrants (1875) contributed to the production of wine in this state.

Phenolic compounds in grapes constitute the third more important group amongst organic compounds. The phenolic compounds are extracted from grapes or metabolites produced during the winemaking processes. Their importance in enology is in the contribution to the color of red wines, in the bitter taste and astringent action, in their intervention in the phenomenon of disturbance and participation to the aroma, beyond the fact that they constitute the main antioxidizing substance reservoir (Daudt e Polenta, 1999, Shahidi et al., 1992; Soobrattee et al., 2005) and they have pluriparmacological effects (Bahorun et al., 2004; Soobrattee et al., 2005).

Phenolic benzoic acids (e.g. gallic acid), hydroxycinnamic acids (e.g. caffeic, ferulic and *p*-coumaric acids) and their esters obtained by condensation with tartaric acid (hydroxycinnamoyltartaric acids), flavanols (catechin), flavonols (e.g. quercetin) and anthocyanins are extracted from grapes during the winemaking process. Also flavan-3-ols, as catechins, present in the grape as monomers or in a polymerized form as proanthocyanidins and hydrolysable tannins (Netzel et al., 2003; Bronze et al., 1997; Monagas et al., 2003) and stilbenes, as resveratrol or its glycoside glycosidic form (piceid) occur in wine (La Torre et al., 2006).

The phenolic compounds are secondary plant metabolites that are contained within the skin, seed, and flesh of grapes and are extracted into wines (especially red ones) during winemaking process. The types and concentrations of these

compounds may depend on a number of factors: grape variety and ripening stage, soil and climatic conditions, vine cultivation and the treatment to which it is subjected (Singleton e Trousdale, 1983; Tomás-Barberán and Espin. 2001; Cantos et al., 2002).

The great advantage of wine as a matrix for polyphenols in the diet is that here they are present in soluble state and hence they are biologically available more easily, in contrast with plants that contain their polyphenolic compounds in polymeric, insoluble or strongly bonded forms and are thus less available for absorption. In fact, the World Health Organization (WHO) recommends the moderate consumption of wine as part of a healthy and balanced diet (Lamuela-Raventos and Torre-Boronat 1996).

Recently the HPLC–MS technique has increased its popularity, mainly due to the development of MS interface technology. Many HPLC–MS methods for the analysis of phenolic compounds have been published up to date (La Torre et al. 2006; Monagas et al., 2005; Alcalde-Eon et al., 2006, Fulcrand et al., 1996; Gutierrez et al., 2005; Duenas et al., 2006).

The research in vitiviniculture and enology is relatively recent in Brazil and the few of data on wines and grapes composition really limits the production of high quality wines in sequential harvests that can compete with wines from other countries. Thus, the goal of this work was to compare the phenolic composition in the Brazilian and Italian wines to evaluate to the potential of the Brazilian ones.

2 – EXPERIMENTAL

2. 1 – Reagents

The solvent acetonitrile employed for the LC–MS analysis was HPLC grade and the formic acid analytical grade were purchased from Sigma Aldrich . Deionized water was from a Milli-Q water system from Millipore.

The standard gallic acid, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (vanillic acid), 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid), 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (ferulic acid), 4-hydroxycinnamic acid, p-coumaric acid, (-)-epicatechin, (+)-catechin, quercetin, and trans-resveratrol were purchased from Sigma–Aldrich (USA). The other phenolic compounds procyanidin B1, procyanidin B2, ethylgallate and were supplied by Extrasynthese (France).

The stock solutions of the individual standards were prepared by dissolving standard into aqueous formic acid (0.1%)/methanol (90:10) because the alcoholic content in wines is between 8 and 14% v/v and the pH of this complex mixture of natural products is acid (pH 3.5). Stock solutions of each standard were prepared by dissolving 1,00 mg of standard into 1,00 ml water:methanol (90:10) containing 0.1% formic acid. Stock solutions of the standards were then diluted to obtain five solutions at different concentrations (0.1, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 mg/L) and were injected to determine their retention times. The five differently diluted standards obtained from stock solutions were injected for linearity range and detection limit tests. All the solutions were stored at -20 °C and protected from light.

2. 2 – Samples

We carried on comparative studies on three varieties of Brazilian and Italian red grapes, Cabernet Sauvignon (CS), Merlot (Me) and Pinot noir (Pn), and three white ones, Chardonay (Ch), Riesling (Ri) and Sauvignon Blanc (BS). The Samples were acquired from Brazilian and Italian supermarket.

The samples were diluted into aqueous formic acid (0.1%)/methanol (90:10) similar to the standard and filtered through a 0.45µm filter, before the HPLC analysis.

2. 3 – Analysis by LC-MS

The qualitative study of the polyphenol content was performed on a LTQ linear ion trap mass spectrometer coupled to LC system (Thermo, California). The mass spectrometer was equipped with a conventional ESI interface.

The separation was performed on a 150 mm × 2.1 mm, 5 µm particle size, C₁₈ column (Phenomenex, U.S.A.).

Water containing formic acid 0.1% (phase A) and acetonitrile containing formic acid 0.1% (phase B) were used as mobile phases. Flow-rate was 0.2 mL/min, sample injection volume was 20 µl. The gradient program is specified in Table 1.

Table 1 - Elution gradient program for LC–MS.

	Time (min)					
	0	10	25	29	30	40
<i>Solvent A (%)</i>	95	75	20	20	95	95
<i>Solvent B (%)</i>	5	15	80	80	5	5

Solvent A = Water: formic acid 0,1% and solvent B = Acetonitrile: formic acid 0,1%

ESI source and negative ionization mode was used with different fragment voltages. Nitrogen was used as the nebulizing and drying gas. The MS acquisition with the ESI interface was performed under the following condition: Spray voltage, 5 kV; nebulizing gas (N₂) flow rate 35; capillary voltage, 35 V; capillary temperature, 250 °C; acquisition mode, full scan, 50–1000 *m/z* and MS/MS select ion. The SIM (selected ion monitoring) mode was used when a search for some particular ions should be done.

Once the analytical conditions for the separation and detection were optimized, the procedure was used to determine phenolic compounds in 18

commercial Brazilian and Italian red and white wines from different varieties. The peaks were identified by comparing the retention time obtained for the wine sample, the standards mixture and the wine spiked with the standards under identical conditions and ESI-MS data.

3 – RESULTS AND DISCUSSION

In all the samples analyzed, thirteen phenolic compounds were clearly identified: gallic acid, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (vanillic acid), 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid), 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (ferulic acid), 4-hydroxycinnamic acid (p-coumaric acid), (-)-epicatechin, (+)-catechin, quercetin, trans-resveratrol, procyanidin B1, procyanidin B2 and ethylgallate. Optimization of the phenolic compounds separation using mass spectrometry detection in the present study, have included analysis of the compounds listed in **Table 2**. The chromatographic conditions were first optimized by use of a standard mixture of phenolic compounds, to ensure that the compounds of interest were well resolved by the system. Several experiments (various elution phases and corresponding chromatographic gradient) were carried out to achieve an appropriate resolution, as well as a better signal in the mass detector.

Calibration graphs were performed by plotting concentration (mgL^{-1}) against peak area. **Table 2** shows the data obtained for the calibration graphs of 13 standard samples. The precision of the method was evaluated by repetitive analyses, calculating the average relative standard deviation (RSD) for 5 replicate determinations of a solution containing each standard at the concentration of 1 mgL^{-1} . Values are also given in **Table 2**.

The obtained data provided evidence that all the identified phenolic compounds showed the molecular ion $[\text{M-H}]^-$ (deprotonated species) in the MS spectrum acquired at voltage -22 V in mass spectra were visible other ions useful

for structure elucidation. A typical fragment ethyl gallate, which have an ethoxy group, showed the ion at m/z 169 $[M-C_2H_5]^+$. In procyanidin B1 and procyanidin B2 mass spectra were observable ions at m/z 289, corresponding to loss of catechine and epicatechin, respectively. Moreover, (+)-catechin (peak 6) and (-)-epicatechin (peak 10) showed a peak at m/z 245 (loss of a $CH_2-CHOH-$ group). The results were similar to that obtained by La Torre et al. (2006).

Table 2 - Characterization of phenolic compounds identified in Brazilian and Italian wines.

Compound (peak number)	<i>tr</i> (min)	MW	Main ion observed (m/z)	Fragments m/z (MS2)	Detection Limit (mg/L)	R^2
Gallic acid (1)	5.28	170	169	169, 125	0.05	0.9979
Procyanidin B1 (2)	12.27	578	577	577, 425, 407, 289	0.04	0.9999
Catechin (3)	13.86	290	289	289, 245, 205,	0.06	0.9993
Procyanidin B2 (4)	14.91	578	577	577, 425, 407, 289	0.08	0.9923
Caffeic acid (5)	14.94	180	179	179, 135	0.01	0.9922
Epicatechin (6)	15.45	290	289	289, 245, 205	0.07	0.9999
Ethyl gallate (7)	16.60	198	197	197, 169	0.01	0.9996
Vanillic acid (8)	16.69	168	167	167, 152, 123	0.03	0.9968
p-coumaric acid (9)	16.90	164	163	163, 119	0.01	0.9955
Ferrulic acid (10)	17.34	194	193	193, 178, 149, 134	0.01	0.9976
Resveratrol (11)	19.36	228	227	227, 185	0.01	0.9997
Quercetin (12)	21.17	302	301	301, 179, 151	0.02	0.9962
Kaempferol (13)	22.20	288	287	285, 257, 151	0.02	0.9948

The presence of 2-o-caffeoyltartaric acid (caftaric acid) and p-coumaroyl-tartaric acid (coutaric acid) was based on a tentative identification, because we could not confirm the results with those of an authentic sample, which is non-commercial. However, the fragment ion at m/z 311 and 295, respectively, was detected and mass spectra obtained showed also a peak at m/z 179. The m/z 311

and 295 values could be indicative of the molecular ion $[M - H]^-$ (deprotonated caftaric acid and coutaric acid, respectively) and the ion at m/z 179 probably resulted from the loss of tartaric acid. The spectral data are in agreement with the results of La Torre et al. (2006).

Beyond the peaks identified and quantified in this work other compounds with a significative area were present in the samples. However, it was not possible to identify these compounds, which had molecular ions at m/z 411, 729 e 865.

Table 3 and **Table 4** shows the median value of concentration of the phenolic compounds found in the Brazilian and Italian red wines and white wines, respectively, samples analyzed using the proposed HPLC–MS method. The data here presented were obtained as average values of triplicate analysis.

Table 3 – Average values (mgL^{-1}) of phenolic compounds in brazilian and italian red wine.

	Cabernet sauvignon <i>br</i>	Cabernet sauvignon <i>it</i>	Merlot <i>br</i>	Merlot <i>it</i>	Pinot noir <i>br</i>	Pinot noir <i>it</i>
Gallic acid	3.02 ±0.7	3.51±0.9	3.74±0.05	1.1±0.01	5.52±0.6	2.75±0.16
Caffeic acid	3.57±0.3	0.72±0.6	10.71±0.1	0.98±0.03	5.09±0.15	0.67±0.01
p-coumaric acid	3.34±0.7	1.91±0.3	6.61±0.3	4.07±0.3	4.01±0.07	0.75±0.02
Catechin	5.03±0.5	4.84±0.1	5.71±0.2	5.78±0.2	5.34±0.1	6.29±0.4
Epicatechin	2.99±0.1	3.99±0.1	4.85±0.2	5.13±0.3	4.55±0.3	5.46±0.2
Procyanidin B1	29.26±2.2	26.41±3	46.19±2.1	63.45±2.57	43.12±0.81	57.21±0.18
Procyanidin B2	8.78±0.52	11.54±0.5	0.834±0.05	2.71±0.027	0.24±0.04	1.7±0.01
Ethyl gallate	6.99±0.9	6.73±0.15	39.77±1.4	43.2±1.1	4.18±0.15	6.62±0.1
Resveratrol	0.94±0.92	0.39±03	0.45±0.01	0.36±0.003	nd	nd
Quercetin	2.97±0.001	1.7±0.05	2.64±0.1	3.41±0,2	0.98±0.05	1.36±0,13
Kaempferol	0.04±0,0004	0.06±0.0007	0.05±0.001	0.03±0.0004	nd	nd

M±SD

it= wine from Italy

br= wine from Brazil

It can be stated that, in all the red wine varieties tested, procyanidin B1 is the compound present in the greatest quantity and, together with ethyl gallate, is notably above all the rest of the polyphenols.

Table 4 – Average values (mgL⁻¹) of phenolic compounds in Brazilian and Italian white wine.

	Riesling br	Sauvignon Blanc br	Chardonay it
Gallic acid	0.96±0.001	3.05±0.03	3.41±0.0
Caffeic acid	0.35±0.01	6.88±0.1	5.66±0.04
p-coumaric acid	0.07±0.01	2.46±0.08	3.85±0.29
Catechin	3.71±0.01	3.82± 0.04	6.28±0.01
Epicatechin	2.96±0.04	2.44±0.03	5.44±0.02
Procyanindin B1	2.80±0.14	0.48±0.05	0.02±0.02
Procyanidin B2	0.08±0.004	0.02±0	0.020±0.006
Ethyl gallate	0.09±0.0003	4.97±0.1	6.48±0.18
Resveratrol	nd	nd	nd
Quercetin	nd	nd	0.061±0.07
Kaempferol	nd	0.001±0	nd

M±SD

It= wine from Italy

Br= wine from Brazil

Content of procyanindin B1 were higher than content of procyanidin B2. Determination of procyanidin B1 and B2 levels in red wines showed range values from 26.4 to 63.5 mgL⁻¹ and from 11.4 to 0.2 mgL⁻¹, respectively. The same difference was found for catechin and its isomeric form epicatechin. These results corroborates other studies (La Torre et al., 2006, Monagás et al., 2003, Minussi et

al., 2003, Malovaná et al., 2001). The Merlot and the Pinot noir red wine had the highest content of the flavan-3-ol between the wines analyzed.

Very high catechin level was found in previous studies with French wines. Teissedre e Landrault (2000) analysed 50 red wines (Merlot, Cabernet Sauvignon, Grenache, Syrah and Egirodola) from all viticultural areas of Languedoc with a average concentration of 202 mgL^{-1} (range: $101\text{--}294 \text{ mgL}^{-1}$). The catechins are some of the most widely occurring flavonoids, and the most important sources of these compounds in the diet are grapes, grape juice and especially red wine. Catechins and procyanidins (oligomers and polymers of catechin and epicatechin units) have been shown in vitro to be powerful inhibitors of LDL oxidation (Teissedre et al., 1996), and of platelet aggregation (Ruf et al., 1995).

The flavan-3-ol phenolic compound was extracted from the seeds and the flesh of the grape during the fermentation process (Kovac et al., 1992). The elevated amount of these compounds indicates that probably the most part of catechin derivates were carried from the seed.

The phenolic compounds behavior can be indicative that the Brazilian red wines tend to be younger than the Italian wines.

The measurement of the concentration of phenolic compounds in several kinds of wines shows that the Italian wines presents the biggest values among the results presented in the work. According to literature, the phenolic compounds interact between itself and with other molecules to form new compounds that are responsible for the stability and maturation of the wines. They are mainly formed during the stockage and aging (Singleton e Trousdale, 1983; Es-Safi et al., 2003; Echeverry et al., 2005; Netzel et al., 2003; Saucier et al., 1997).

The wines with elevated amounts of catechin and prociandin make possible a great number of reactions of condensation with antocyanins and others phenolic compounds. These new compounds provide a long shelf life for the red wines and

the reduction of these substances increase the formation of new polymeric pigments (Echeverry et al., 2005; Netzel et al., 2003; Saucier et al., 1997).

The results show that in particular, (+)-catechin, (-)-epicatechin and procyanidin B1 were the most abundant phenolic compounds founded in white wine obtained with Riesling grapes, while caffeic acid, (+)-catechin, (-)-epicatechin and ethyl gallate were founded in Chardonay and Sauvignon Blanc wines.

The resveratrol, a biologically active compound that is produced by plants in response to fungal infection or abiotic stress (Bravo, 1996), was detected in the Merlot and Cabernet Sauvignon wines. The values obtained from Brazilian and Italian Merlot wine were 0.45 and 0.36 mgL⁻¹ respectively 0.94 and 0.39 mgL⁻¹ for the Cabernet Sauvignon wines.

The Brazilian wine had the biggest level of resveratrol considering the Cabernet Sauvignon variety. At the same time, this data on quantitative phenolic compounds were found in other various studies. (La Torre et al., 2006; Monagás et al., 2003; Minussi et al., 2003; Malovaná et al., 2001).

The results are in accordance with other studies, that shown that the phenolic compounds content can vary due various edafoclimatic factors, as temperature difference, light intensity, ground composition, viticultural practices and fruit composition (Nagel and Wulf, 1979; La Presa-Owens at al., 1995; Singleton and Trousdale, 1983; Tomás-Barberán and Espin, 2001; Cantos et al., 2002). In addition to winemaking techniques also play an important role to determinate the wine style (Netzel et al., 2003; Saucier et al., 1997).

4 - CONCLUSION

Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (ESI) is a very attractive technique. The advantages are the small time needed to perform the

analysis, beyond the facts that it requires few amounts of sample for direct analysis without any derivatisation.

As a general rule, Brazilian wines present a bigger amount of phenolic acids than the Italian ones. The highest content was founded in Brazilian Merlot wine. However, the values of catechin, epicatechin, procyanidin B1 and B2 in the Italian wine were higher than Brazilian wines.

The results show that the final concentration of phenolic compounds is quite variable in red and white wines because of this large number of influencing factors. The occurrence of phenolic substances is not only a consequence of their extraction from grapes during the winemaking process or the use of different grape varieties. Other important influencing factors are the viticultural area and edafoclimatic factors.

5- REFERENCES

- ALCALDE-EON, C.; ESCRIBANO-BAILÓN, M. T.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing. A comprehensive study. **Anal. Chim. Acta** v.563, p. 238–254, 2006.
- BAHORUN, T.; LUXIMON-RAMMA, A.; CROZIER, A.; ARUOMA, O. I. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. **J. Sc. Food Agric**, v.84, p.1553-1561, 2004.
- BRAVO, A. E. Resveratrol in wine: contribution to potential cardiovascular protective activity. **Alimentaria**, v.269, p.71-72, 1996.
- BRONZE, M. R.; BOAS, L. F. V.; BELCHIOR, A. P. Analysis of old brandy and oak extracts by capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A** v.768 p.143, 1997.
- CANTOS, E.; ESPIN, J. C.; TOMÁS-BARBERAN, F. A varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivares studies by LC-DAD-MS-MS. **J. Agric. Food Chem.** v. 50, p. 5691-5696, 2002.
- DAUDT, C. E.; POLENTA, Phenols from Cabernet sauvignon and Isabel musts submitted to several treatments. **J. Sci. Techn. Tonnellerie** v.5, p.57-64, 1999.
- DUEÑAS, M.; FULCRAND, H.; CHEYNIER, V. Formation of anthocyanin-flavanol adducts in model solutions. **Anal. Chim. Acta** v.563 p.15–25, 2006.
- ECHEVERRY, C.; FERREIRA, M.; REYES-PARADA, M.; ABIN-CARRIQUIRY, J.A.; BLASINA, F.; GONZÁLVEZ-NEVES, G.; DAJAS, F. Changes in antioxidant capacity of Tannat red wines during early maturation. **J. Food Eng.** v.69, p.147-154, 2005.
- ES-SAFI N-E.; CHEYNIER V.; MOUTOUNET M. Effect of copper on oxidation of (+)-catechin in a model solution system, **Int. J. Food Sci. Tech.** v.38, n.2, p.153-163, 2003.
- FULCRAND, H.; DOS SANTOS, P. J. C.; SARNIMANCHADO, P.; CHEYNIER, V.; FAVREBONVIN J. Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. **J. Chem. Soc.-Perkin Trans.** v.7, n.1, p.735-739, 1996.

- GUTIERREZ, I. H.; LORENZO, E. S.; ESPINOSA, A. V. Phenolic composition and magnitude of co pigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. **Food Chem.** v.92 p.269-283, 2005.
- KOVAC, V.; ALONSO, E.; BOURZEIX, M.; REVILLA, E. Effect of several enological practices on the content of catechins and proanthocyanidins of red wines. **J. Agr. Food Chem.** v.40, p.1953-1957, 1992.
- LA TORRE G. L.; SAITTA, M.; VILASI, F.; PELLICANO, T.; DUGO, G. Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection. **Food Chem.** v.94 p.640-650, 2006.
- MALOVANA, S.; MONTELONGO, F.J.G.; PEREZ, J.P.; RODRIGUEZ-DELGADO, M.A. Optimisation of sample preparation for the determination of *trans*-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography. **Anal. Chim. Acta** v.428 n.2, p.245-253, 2001.
- LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; TORRE-BORONAT, M.C. in: *Iberica* . 1996, p. 562.
- LA PRESA-OWENS, C.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; BUXADERAS, S.; LA TORRE-BORONAT, M. C. Characterization of Macabeo, Xarello, and Parellada White Wines from the Penedi's Region. **Am. J. Enol. Viticult.** v.46, n.4, p.529-541 1995.
- MCCARTHY AND EDWIG-MULLIGAN, *Vinho para Leigos*, 4a ed, Ed. Mandarin, São Paulo, 1996
- MINUSSI, R. C.; ROSSI, M.; BOLOGNA, L.; CORDI, L.; ROTILIO, D.; PASTORE, G. M.; DURÁN, N. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. **Food Chem.** v.82, p.409-416, 2003.
- MONAGAS, M.; GÓMEZ-CORDOVÈS, C; BARTOLOMÉ, B.; LAUREANO, O.; RICARDO DA SILVA, J. M. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. **J. Agric. Food Chem.** v.51, p.6475, 2003.
- MONAGAS, M.; BARTOLOMÉ, B.; GOMEZ-CORDOVÉZ, C. Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle. Non-

- anthocyanin phenolic compounds. **Eur Food Res. Technol.** v.220 p.331–340, 2005.
- NAGEL, C. W.; WULF, L. W. Changes in the anthocyanins, flavanoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of Merlot and Cabernet Sauvignon. **Am. J. Enol. Viticult.** v.30, p.111-116, 1979.
- NETZEL, M.; STRASS, G.; BITSCH, I.; KÖNITZ, R.; CHRISTMANN, M.; BITSCH, R. Effect of grape processing on selected antioxidant phenolics in red wine. **J. Food Eng.** v.56, p.223-228, 2003.
- RUF, J.; BERGER, J.; RENAUD, S. P. R. Effect of Alcohol Withdrawal and Wine Drinking in Rats: Relation to Tannins and Lipid Peroxidation. **Arteri. Thromb. Vasc. Biol.** v.15, p.140-144, 1995.
- SAUCIER, C.; LITTLE, D.; GLORIES, Y. First evidence of acetaldehyde-flavanol condensation products in red wine. **Am. J. Enol. Viticult.** v.48, p.369-373, 1997.
- SHAHID, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** v.130, p.2073S-2085S, 1992.
- SINGLETON, V. L.; TROUSDALE, E. White wine phenolics. Varietal and processing differences as shown by HPLC. **Am. J. Enol. Viticult.** v.34, n.1, p.27-34, 1983.
- SOOBRAATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutat. Res.** v.579, n.1, p.200-213, 2005.
- TEISSEDRE, P. L.; FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; PELEG, H.; GERMAN, J. B. Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines **J. Sci. Food Agric.** v.70. p.55-61, 1996.
- TEISSEDRE, P. L.; LANDRAULT, Wine phenolics contribution to dietary intake and bioavailability. **Food Res. Int.** v.33, n.6, p.461-467, 2000.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J.C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **J. Sci. Food Agric.** v.35, p.853-876, 2001.



Capítulo 5

FOLATOS EM VINHOS BRASILEIROS E SEU COMPORTAMENTO DURANTE O PROCESSAMENTO

Facco, Elizete Maria Pesamosca¹; Fogaça, Aline de Oliveira²; Daudt, Carlos
Eugenio²; Godoy, Helena Teixeira¹.

¹ - Depto de Ciência de Alimentos, FEA-UNICAMP, Campinas, SP, 13083-970, Brasil,
Fone: 55 35214024 *e-mail: helen@fea.unicamp.br;

² - Depto de Tecnologia e Ciência de Alimentos, CCR-UFSM, Santa Maria, RS, 97105900,
Brasil, Fone: 55 2208254.

FOLATOS EM VINHOS BRASILEIROS E SEU COMPORTAMENTO DURANTE O PROCESSAMENTO

Facco, E. M. P.; Fogaça, A. de O.; Daudt, C. E.; Godoy, H.T.

RESUMO

Os folatos compõem uma classe de vitamina redescoberta nas últimas décadas pela sua importante associação com diversas funções, nos vários processos metabólicos no organismo humano. As principais fontes descritas na literatura são os vegetais, os cereais e as leveduras. O objetivo do trabalho foi determinar a quantidade de folatos em vinhos. Foram coletadas amostras de vinhos tintos das variedades viníferas Cabernet Sauvignon, Merlot e Pinot *Noir* e das não viníferas Isabel (tinta) e Niágara (branca) na colheita, durante a fermentação alcoólica, durante a fermentação maloláctica e periodicamente até os 24 meses de conservação e envelhecimento. A técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizada para a separação, identificação e quantificação. Os resultados mostraram que os níveis de 5-metil-THF aumentaram consideravelmente durante a fermentação alcoólica e continuaram aumentando até o término da fermentação maloláctica. Os níveis mantiveram-se estáveis durante um período de 3, 6 para vinhos brancos e de 1 a 2 anos para os vinhos tintos, dependendo da variedade. Os vinhos tintos de viníferas se mostraram uma boa fonte de folatos.

Palavras chave: Folatos, vinho, leveduras

BEHAVIOR OF FOLATES IN BRAZILIAN WINE DURING THE WINEMAKING

Facco, E. M. P.; Fogaça, A. de O.; Daudt, C. E.; Godoy, H.T.

ABSTRACT

The folates are vitamins rediscovery mainly because of its association to the metabolic process in the human organism. The main source related in the scientific literature are vegetables, cereal and yeast. The purpose of this work was to determinate the amount of the folates in wines. The red wine vinifera variety analized were Cabernet sauvignon, Merlot, Pinot *Noir*, and the non vinifera variety were Isabel (red) and the Niagara (white). Samples in the beginning and the end of the alcoholic fermentation, in the end of the malolactic fermentation and periodically until 1 year of conservation and maturation had been analyzed. High Performance Liquid cromatograph tecnic was used for separation, identification and quantification. The results showed that levels of folates increased considerably during the alcoholic fermentation and keep increasing until the end of malactic fermentation. The levels had been remained steady during a period of 3, 6 for white wines and of 1 the 2 years for the red wines, depending on the variety. The red wines showed as source of the folates.

Keywords: Folate, wine, yeast

1 – INTRODUÇÃO

O ácido fólico (2-amino-4-hidroxi-6-metilenoaminobenzol-L-glutâmico), também é conhecido como ácido pteroilglutâmico, vitamina B₉, vitamina B₁₂ e vitamina M. Está naturalmente presente em alimentos, geralmente, na forma reduzida, como derivados de poliglutamatos, com 2 a 7 resíduos de ácido glutâmico, conhecidos como folatos (Franco, 1992). Folato é um termo geral que se refere a compostos não só estruturalmente, mas também com atividade semelhante a do ácido fólico (Brody, 1991; Keagy, 1985).

O interesse pelos folatos tem crescido nos últimos anos com as descobertas relacionadas às suas funções nos diversos processos metabólicos no organismo humano. Os folatos são essenciais na prevenção e redução significativa do risco de mal formação do tubo neural na gestação (Daly *et al.*, 1997; Crane *et al.*, 1995; Czizel e Dudas, 1992; Gregory, 2001; Evans *et al.*, 2004). Também participam na produção normal das hemáceas, sendo que a carência de alimentos que contenham a vitamina na dieta, pode levar à anemia megaloblástica (Dierkes *et al.*, 1998; Scott, Rébeille e Fletcher, 2000; Asok, 2005) além de doenças crônicas como câncer de mama e cólon, mal de Alzheimer e depressão (Lucock, 2000; Alpert *et al.*, 2000; Jacques *et al.*, 1999; Malinow *et al.*, 1998; Kim, 1999).

Desde a década de 90 muitos estudos dos componentes do vinho estão sendo realizados baseados, principalmente no chamado “paradoxo Francês”, que é uma análise de multivariáveis que mostra que o consumo de vinho tinto foi o único fator da dieta que mostrou correlação negativa com a aterosclerose e os distúrbios coronários (Renaud e Langeril, 1992). O “paradoxo francês” é uma aparente discrepância entre o alto consumo de gorduras saturadas e colesterol pelos franceses e a baixa incidência de doenças do coração e aterosclerose. Há estudos mostrando que, não somente os compostos fenólicos mas também os

folatos estariam associados a esse paradoxo (Parodi, 1997). Além disso, o tetraidrofolato juntamente com a vitamina B₁₂ é necessário para a conversão de homocisteína em metionina (Devlin, 1998). A homocisteína vem alcançando grande importância como fator de risco para a doença arterial coronária (Welch e Loscalzo, 1998; Rodrigo, *et al.*, 2003; Schnabel *et al.*, 2005), pois o alto nível desta no sangue pode aumentar a agregação de plaquetas, causando trombose e inativando anticoagulantes (Malinow, 1994; Scholl e Johnson, 2000; Willcox *et al.*, 2003). Com o suplemento dos folatos na dieta ocorre redução dos níveis de homocisteína (Jacques, 1996; Moat *et al.*, 2004; Coppola *et al.*, 2005; Caruso *et al.*, 2006).

De acordo com Brody (1991) e Franco (1992) entre outros autores, os vegetais e as leveduras, seguidos pelas carnes, fígado, rim, frutas e cereais são considerados as principais fontes desse grupo de vitamina.

A capacidade de leveduras típicas de fermentação, como a *Saccharomyces cerevisiae*, para produzir folatos em meios específicos para o crescimento dos microorganismos é maior que outros tipos de levedura e bactérias. A quantidade de vitamina encontrada na biomassa celular é 40 vezes maior que a encontrada no meio, (Kariluoto *et al.*, 2006), fato que confirma que não só os alimentos produzidos por leveduras contêm folatos, mas também a próprio microorganismo. Vinho, cerveja e pães, são exemplos de alimentos produzidos através da fermentação por leveduras (Seyoum e Selhub, 1998).

Folatos são encontrados em produtos de bioprocessos como produtos lácteos (Crittenden *et al.*, 2002) e de panificação (Osseyi *et al.*, 2001; Arcot *et al.*, 2002; Kariluoto *et al.*, 2004), mostrando que as leveduras, mesmo em processos de transformação de alguns tipos de produtos de origem animal e vegetal, mantém e/ou aumentam a quantidade de folatos originalmente presente nesses alimentos (Kariluoto *et al.*, 2004).

O objetivo deste trabalho foi determinar folatos em vinhos tintos e brancos e acompanhar a presença desses compostos durante o processamento do vinho.

2 - MATERIAIS E MÉTODO

2.1 – MATERIAIS

Amostras

As amostras das variedades tintas viníferas Pinot *Noir* (PN), Cabernet Sauvignon (CS), Merlot (ME) utilizada no experimento foram provenientes da Vinícola Velho Amâncio localizada em Itaara, localizada na região central do Rio Grande do Sul. As outras amostras são das variedades americanas tinta Isabel (IS) e branca Niágara (NI) e provenientes da serra gaúcha. Todas as uvas foram vinificadas na Vinícola Velho Amâncio. De cada amostra foram coletadas alíquotas nas seguintes etapas: início e final da fermentação alcoólica, no final, da fermentação maloláctica e no vinho, 120, 210 e 365 dias após o início da vinificação.

A levedura utilizada no processo da fermentação alcoólica foi a *Saccharomyces cerevisiae*, com variação de cepa dependendo da variedade da uva vinificada. *Saccharomyces cerevisiae* (var. bayanus) foi utilizada para as variedades Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot *Noir* e a *Saccharomyces sp* na vinificação da uva Isabel e Niágara. As amostras foram coletadas em duplicata e devidamente armazenadas a -18°C sendo posteriormente transportadas até o laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Faculdade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas - São Paulo.

Reagentes

Os padrões de tetraidrofolato (THF), 5-metil-5,6,7,8-tetraidrofolato de cálcio (5-MetilTHF), 10-metil- ácido-fólico (10-MetilAF), 5-formil-5,6,7,8-tetraidrofolato de cálcio (5-FormilAF), 10- formil-ácido-fólico (10-FormilAF) foram adquiridos do Laboratório Dr. Schircks (Suíça). A acetonitrila (grau cromatográfico), o ácido acético e o hidróxido de potássio (grau analítico) eram da marca Merck. A água utilizada tanto no preparo das amostras como no preparo das fases móveis, foi purificada no sistema Milli-Q (Millipore). As fases móveis foram filtradas em filtros Millipore (HAWP e HVLP 04700 Millipore), com poros de 0,45 µm de diâmetro.

Instrumento

Utilizou-se um cromatógrafo a líquido HEWLETT PACKARD (HP) série 1100, com injetor automático, degaseificador, bomba quaternária, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), UV-visível e de fluorescência, dispostos em sequência. A coluna Microsorb-MV, ODS-2, 5 µm, 250 X 4,6 mm d.i. (Rainin Instrument Company) foi utilizada para a separação dos folatos, protegida por uma coluna de guarda Bondesil C₁₈, 5 µm, 10 X 4,6 mm d.i (Varian).

2.2 – MÉTODO

A metodologia utilizada foi desenvolvida e validada por Catharino *et al.* (2006) objetivando a determinação simultânea das várias formas de folatos. Os folatos foram eluídos através de um sistema por gradiente, com vazão de 0,5 mLmin⁻¹, sendo a fase móvel composta por solução de ácido acético (a pH 2,8) no início da corrida, chegando a 76 % de solução de ácido acético e 24 % de

acetonitrila em 26 minutos. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada durante 15 minutos antes da próxima injeção. As formas de folatos foram detectadas em detector de fluorescência e UV/visível com arranjo de diodos, sendo $\lambda_{\text{excitação}}$ 290 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 360 nm para THF, 5-MetilTHF e 5-FormilTHF e o $\lambda_{\text{excitação}}$ 290 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 445 nm para 10-FormilAF. Já para 10-MetilAF a detecção foi feita a 290 nm.

A identificação foi feita por comparação entre os tempos de retenção dos analitos com os padrões analisados nas mesmas condições, por co-cromatografia e através dos espectros de fluorescência e UV-visível.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da quantidade de 5-metilTHF em vinhos tintos varietais e vinhos comuns brancos e tintos, encontram-se na **Tabela 1**. Esses dados mostram que a quantidade de 5-metilTHF no mosto é pequena quando comparada às quantidades encontradas no vinho depois do processo fermentativo, principalmente, depois da fermentação alcoólica. Baseado nesses resultados pode-se afirmar que a vitamina encontrada no vinho pronto pode ser proveniente da uva e, principalmente, proveniente das leveduras responsáveis pelo processo de fabricação do vinho. É importante lembrar que o aumento é maior durante a fermentação alcoólica onde temos uma atividade e uma multiplicação muito intensa das leveduras (Amerine *et al.*, 1967).

O vinho Pinot *Noir* foi o que apresentou quantidades maiores de 5MetilTHF, seguido do vinho Cabernet sauvignon e do Merlot. Já o vinho Isabel apresentou 6 vezes menos 5-metilTHF que o vinho Pinot *Noir*. Dentre os vinhos analisados o

vinho branco de Niágara apresentou os menores valores, 30,7 mgL⁻¹ e 6 meses após a vinificação apenas traços da vitamina.

Tabela 1- 5-metilTHF (mgL⁻¹) em diferentes variedades de vinhos e em diferentes etapas da vinificação.

Fases da vinificação	Cabernet sauvignon	Merlot	Pinot <i>Noir</i>	Isabel	Niagara
Colheita	0,6 (4,1)	9,3 (1,8)	49,9 (3,7)	nq	1,7 (1,6)
Alcoólica	65,6 (3,7)	74,8 (1,9)	263,8 (0,6)	53,5 (1,7)	11,1 (3,9)
Maloláctica	87,0 (2,2)	na	333,3 (1,8)	58,7 (1,4)	17,5 (3,2)
3 meses*	127,3 (0,5)	126,4 (1,9)	366,1 (4,0)	60,6 (2,8)	30,7 (3,8)
6 meses*	145,1 (1,6)	145,4 (2,3)	368,1 (4,2)	64,7 (3,2)	nq
12 meses*	152,4 (1,2)	154,9 (3,8)	335,4 (2,1)	na	na
24 meses*	150,7 (3,6)	164,2 (1,3)	na	na	na

M (CV)-Valores médios e coeficiente de variação das determinações em duplicata.

nq=não quantificado

na=não analisado

alcoólica-final da fermentação alcoólica

maloláctica- final da fermentação maloláctica

*-Tempo em meses apartir do início da fermentação alcoólica.

Após 6 meses os maiores valores de 5-metilTHF foram encontrados nos vinhos Pinot *Noir* 368,1 mgL⁻¹, seguido do Merlot 145,4 mgL⁻¹ e do Cabernet sauvignon 145,1 mgL⁻¹. Já o vinho não varietal, Isabel, apresentou valores de 64,7 mgL⁻¹.

A diferença do teor de folatos nas diferentes etapas do processamento e das variedades pode ser explicada pelas diferentes espécies de leveduras usadas no processo fermentativo, já que a quantidade de folatos está relacionada ao tipo e a cepa da levedura (Patring *et al.*, 2005; Patring *et al.*, 2006).

No estudo de Jägerstad *et al.* (2005), pães, leite e vegetais fermentados tiveram um aumento na concentração de folatos de no mínimo 100%. Esses dados corroboram com o conhecimento de que as leveduras são fonte desta vitamina [Brody, 1991]. Das leveduras testadas as que mais produzem folatos são a *Saccharomyces cerevisiae* ALKO 743 e a *Candida. Milleri* CBS 8195 (Kariluoto, *et. al.*, 2006). Os autores ainda citam que a levedura comumente usada em panificação, *Saccharomyces cerevisiae* ALKO 743, produz folatos quando incubada sozinha assim como em combinação com bactérias lácticas. Essas leveduras são da mesma espécie usada no nosso estudo. E diferentes espécies de *Saccharomyces cerevisiae* são, comumente, usadas para a fermentação de mostos de uva.

Para o vinho branco e para o vinho obtido da uva Isabel foi utilizada a *Saccharomyces sp* e para as demais a *Saccharomyces bayanus*. Outro fator que pode contribuir para a diferença dos folatos nas diferentes variedades de uva é a concentração de nitrogênio no solo; o nitrogênio é importante na síntese dos folatos em vegetais. Outro fator, ainda, está relacionado com as condições de temperatura e com o próprio solo (Scott, *et al.*, 2000).

Os cromatogramas referentes às amostras de vinho tinto Cabernet sauvignon no início da fermentação alcoólica (CS1) e do vinho tinto Cabernet Sauvignon um ano após a fermentação (CS2) estão apresentados na **Figura 1**. Na **Figura 2** são encontrados os cromatogramas do vinho branco Niagara no início da fermentação alcoólica (N1) e com 6 meses de fermentação (N2). Neles, o pico do 5-metilTHF, forma de folato observada nas matrizes avaliadas, aparece isolado, com tempo de retenção de aproximadamente 20 minutos.

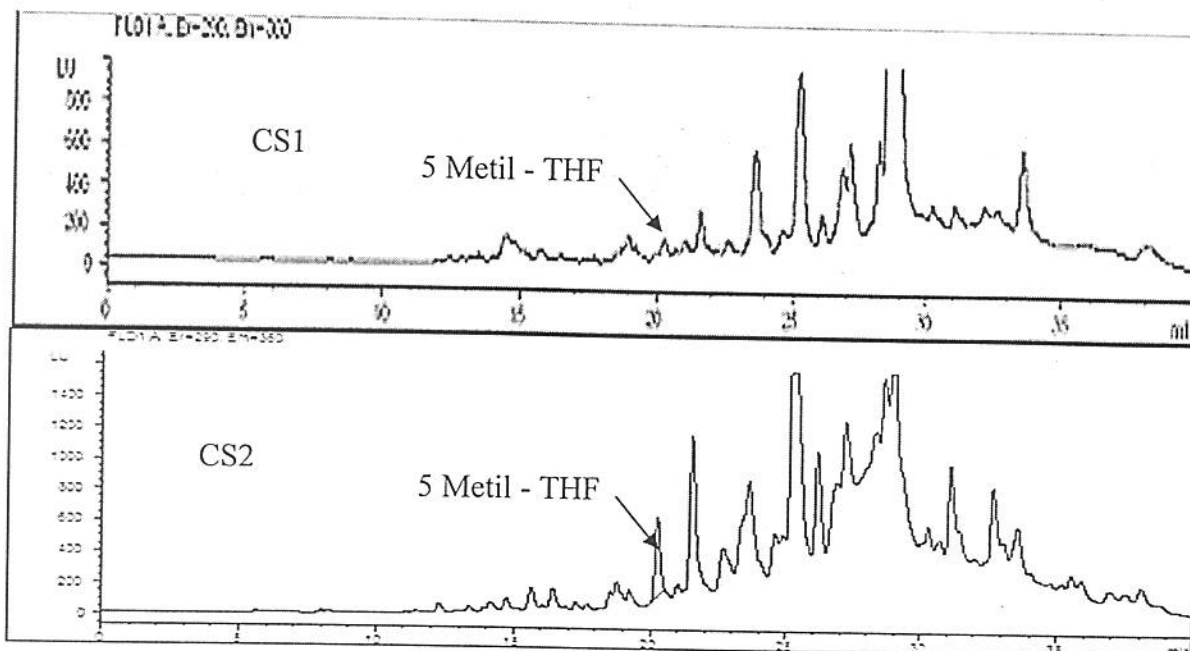


Figura 1: Cromatograma de 5-metilTHF no vinho de Cabernet Sauvignon no início da fermentação (C1) e no vinho de Cabernet Sauvignon um ano após a fermentação (C2). Condições cromatográficas: Coluna C_{18} , eluição por gradiente, $0,5 \text{ mLmin}^{-1}$, sendo fase móvel composta por solução de ácido acético (a pH 2,8) acetonitrila, corrida com 26 minutos e 15 minutos de re-equilíbrio. FLD ($\lambda_{\text{excitação}}$ 290 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 360 nm para THF, 5-MetilTHF e 5-FormilTHF e o $\lambda_{\text{excitação}}$ 290 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 445 nm para 10-FormilAF) e UV/visível (290 nm para 10-MetilAF).

Existem poucos dados na literatura sobre a presença de folatos em vinhos e outras bebidas fermentadas, dificultando dessa forma a comparação dos dados.

No processo da vinificação, a fermentação é a transformação de fontes de carbono em etanol. Nesse processo, ocorre também um crescimento na quantidade de levedura no meio (Amerine *et al.*, 1967). Essa levedura depois dos processos fermentativos permanece no meio. À medida que o vinho sofre os processos posteriores da fermentação maloláctica, como processos da clarificação e envelhecimento, estas leveduras tendem a precipitar para o fundo do recipiente sendo separadas do líquido por transfegas e ou filtração. Como consequência o teor de 5-metilTHF tende a diminuir ou mesmo desaparecer.

Quando este último fato ocorre pode ser dito que o 5-metilTHF presente é oriundo das leveduras e quando diminuem, pode ser dito, que esta diminuição foi por retirada das leveduras do meio.

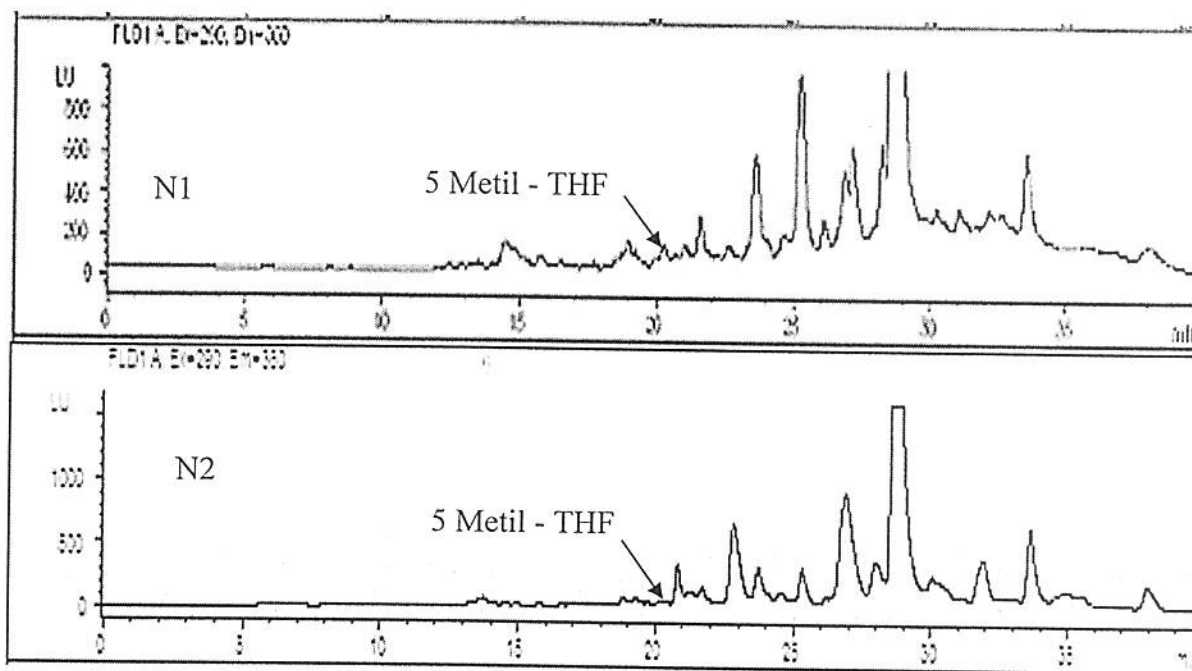


Figura 2: Cromatograma de 5-metilTHF no início da fermentação (C1) de vinho Niagara e no vinho (C2) de Niagara, 6 meses após a fermentação. Condições cromatográficas: Coluna C_{18} , eluição por gradiente, $0,5 \text{ mLmin}^{-1}$, sendo fase móvel composta por solução de ácido acético (a pH 2,8) acetonitrila, corrida com 26 minutos e 15 minutos de re-equilíbrio. FLD ($\lambda_{\text{excitação}}$ 290 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 360 nm para THF, 5-MetilTHF e 5-FormilTHF e o $\lambda_{\text{excitação}}$ 290 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 445 nm para 10-FormilAF) e UV/visível (290 nm para 10-MetilAF).

4 – CONCLUSÃO

Os resultados desse trabalho mostraram que os vinhos apresentam valores de 5-metilTHF semelhantes a outros alimentos considerados fontes do mesmo, como os vegetais, e as próprias leveduras.

A quantidade de 5-metilTHF aumenta durante os processos de fermentação alcoólica e maloláctica, sendo que o maior aumento ocorre na primeira, fermentação alcoólica. Depois desse processo, para os vinhos tintos, a quantidade de 5-metilTHF se estabiliza e, para os vinhos brancos ocorre uma diminuição.

5 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALPERT, J. E.; MISCHOULON, D.; NIERENBERG, A. A.; FAVA, M. Nutrition and depression: focus on folate. **Nutrition**, v. 16, n. 7/8, p. 544-546, 2000.
- AMERINE, M. A.; BERG, H. W.; CRUESS, W. V. **The technology of wine making**. 2 edição, The AVI Publishing company, Connecticut, 1967, 243p.
- ARCOT, J.; WOOTTON, M.; ALURY, S.; CHAN, H.Y.; SHRESTHA, A.K. Folate levels in twelve Australian wheats and changes during processing into bread. **Food Aust.**, v.54, p.18-20, 2002.
- ASOK C. A., **Megaloblastic anemias**. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE. Hematology. Basic Principles and Practice. 2 ed.. Nova York: Churchill Livingstone, 2005, p. 519-556.
- BRODY, T. Folic acid In: MACHLIN, L.J. **Handbook of vitamins**. 2ed. rev. New York: Marcel Decker, 1991, p.453-490.
- CARUSO, R.; CAMPOLO, J.; SEDDA V.; DE CHIARA, B.; DELLANOCE, C.; BAUDO, F.; TONINI, A.; PAROLINI, M.; CIGHETTI G.; PARODI, O.; Effect of homocysteine lowering by 5- methyltetrahydrofolate on redox status in hyperhomocysteinemia., **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v.47, n.4, p.549-555, 2006.
- CATHARINO, R. R.; LIMA-PALLONE, J. A.; GODOY, H. T. Metodologia analítica para determinação de folatos e ácido fólico em alimentos, **Quim. Nova**, v. 29, n.5, p.972-976, 2006.
- COPPOLA, A.; D'ANGELO, A.; FERMO, I. Reduced in vivo oxidative stress following 5-methyltetrahydrofolate supplementation in patients with early-onset thrombosis and 677TT methyltetrahydrofolate reductase genotype. **Br. J. Haematol.**, v.131, p 100-108, 2005.
- CRANE , N. T.; WILSON, D. B.; COOK, D. A. ; LEWIS, C. J.; YETLEY, E. A.; RADER, J. L. Evaluating food fortification options: general principles revisited with folic acid. **Am. J. Public Health**, v.85, n.5, p. 660-666, 1995.

- CRITTENDEN, R.G.; MARTINEZ, N.R.; PLAUNE, M.J., Synthesis and utilization of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. **Int. J. Food Microbiol.** v.80, p.217– 222, 2002.
- CZEIZE, A.E.; DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. **N. Engl. J. Medicine**, v. 327, n.226, p. 1832-1835, 1992.
- DALY, S.; MILLS, J. R.; MOLLOY, A. M.; CONLEY, M.; LEE, Y. J.; KIRKE, P. N.; WEIR, D. G.; SCOTT, J. M. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural tube defects. **Lancet**, v.350, n. 9092, p. 1666-69, 1997.
- DEVLIN, T.M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1998, 1007p.
- DIERKES, J.; KROESEN, M.; PIETRZIK, K. Folic acid and vitamin B₆ supplementation and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. **Int. J. Vitamin Nutr. Res.**, v.68, p.98-103, 1998.
- FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1992, 307p.
- EVANS, M. I., LLURBA, E., LANDSBERGER, E. J., OBRIEN, J. E., HARRISON, H. H., Impact of folic acid fortification in the United States: Markedly diminished high maternal serum alpha-feto-protein values. **Obstet. Gynecol.**, v.103, p.474-479, 2004.
- GREGORY, J. F., Case study: Folate bioavailability. **J. Nutr.**, v.131, p.1376-1382, 2001.
- IWATANI Y., ARCOT J., SHRESTHA A. K. Determination of folate contents in some Australian vegetables. **J. Food Comp. Anal.**, v.16, p.37-48, 2003.
- HJORTMO, S.; PATRING, J.; JASTREBOVA, J.; T. ANDLID. Inherent biodiversity of folate content and composition in yeasts. **Trends Food Sci. Techn.** v.16, p. 311–316, 2005.
- JACQUES, P. F.; SELHUB, J.; BOSTOM, A G.; WILSON, P. W. F.; ROSENBERG, I. H. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total

- homocysteine concentrations. **New Engl. J. Med.**, v.340, n.19, p.1449-1454, 1999.
- JACQUES, P. F., Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. **Circulation**, v.93, p.7-9, 1996.
- JÄGERSTAD, M., PIIRONEN, V., WALKER, C., ROS, G., CARNOVALE, E., HOLASOVA, M., NAU, H., Increasing natural food folates through bioprocessing and biotechnology. **Trends Food Sci. Tech.**, v.16, p.298-306, 2005.
- KARILUOTO, S., VAHTERISTO, L., SALOVAARA, H., KATINA, K., LIUKKONEN, K. H., PIIRONEN, V. Effect of baking method and fermentation on folate content of rye and wheat breads. **Cereal Chem.**, v. 81, n.1, p.134-139, 2004.
- KARILUOTO, S., AITTAMAA, M., KORHOLA, M., SALOVAARA, H., VAHTERISTO, L., PIIRONEN, V., Effects of yeasts and bacteria on the levels of folates in rye sourdoughs. **Int. J. Food Microbiol.**, v.106, p.137-143, 2006.
- KEAGY, P.M. Folacin In: **Methods of vitamin assay**. New York: John Wiley & Sons, 1985, p. 445-471.
- KIM, Y. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms and implications. **J. Nutr. Biochem.**, v. 10, p. 66-88, 1999.
- LUCOCK, M. D. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology and role in disease process. **Mol. Genet. Metab.**, v.71, p.121-38, 2000.
- MALINOW, M. R., Plasma homocystine and arterial occlusive diseases: a mini-review. **Clin. Chem.**, v.40, p.173-176, 1994.
- MALINOW, M.R. *et al.* Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary disease. **New Engl. J. Med.**, v.338, n.15, p.1009-1015, 1998.
- MOAT, S. J., LANG, D., McDOWELL, I. F. W., Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. **J. Nutr. Biochem**, v.15, p.64-79, 2004.

- OSSEYI, E. S., EWHLING, R. L., ALBRECHT, J. A., HPLC determination of stability and distribution of added folic acid and some endogenous folates during breadmaking. **Cereal Chem.**, v.78, n. 4, p.375-378, 2001
- PATRING, J. M. D.; JASTREBOVA, J. A.; HJORTMO, S. B.; ANDLID, T. A.; JÄGERSTAD, I. M. Development of a Simplified Method for the Determination of Folates in Baker's Yeast by HPLC with Ultraviolet and Fluorescence Detection. **J. Agric. Food Chem.** v.53, p.2406-2411, 2005.
- PATRING, J. D. M.; HJORTMO, S. B.; JASTREBOVA, J. A.; SVENSSON, U. K.; ANDLID, T. A.; JÄGERSTAD, I. M. Characterization and quantification of folates produced by yeast strains isolated from kefir granules. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 223, p.633-637, 2006.
- PARODI, P. W. The French Paradox unmasked: the role of folate. **Med. Hypotheses**, v.49, n.4, p.313-318, 1997.
- RENAUD, S.; LORGERIL, M. Wine, alcohol, plateles and the French Paradox for coronary heart disease. **Lancet**, v.339, p.1523-1526, 1992.
- RODRIGO, R., PASSALACQUA, W., ARAYA, J., Implications of oxidative stress and homocysteine in the pathophysiology of essential hypertension. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v.42, p.453-461, 2003.
- SCHNABEL, R., LACKNER, K. J., RUPPRECHT, H. J., Glutathione peroxidase-1 and homocysteine for cardiovascular risk prediction. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.45, p.1631-1637, 2005.
- SCHOLL, T. O., JOHNSON, W. G., Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.71, n.5, p.1295-1303, 2000.
- SCOTT, J.; RÉBEILLE, F.; FLETCHER, J. Review: Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **J. Sci. Food Agric.**, v.80, p.795-824, 2000.
- SEYOUM, E., SELHUB, J., Properties of food folates determined by stability and susceptibility to intestinal pteroylpolyglutamatehydrolase action. **J. Nutr.**, v.128, p.1956-1960, 1998.

WELCH, G. N., LOSCALZO, J., Homocysteine an atherothrombosis. **New. Engl. J. Med.** v.338, p.1042-1050, 1998.

WILLCOX J.K., CATIGNANI G.L., LAZARUS S. Tomatoes and cardiovascular health. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.43, n.1, p.1-18, 2003.

CONCLUSÃO GERAL

Os vinhos tintos além de apresentarem maiores quantidades de compostos fenólicos que os vinhos brancos apresentaram também uma maior tendência de conservação desses compostos.

Cabernet Sauvignon é o vinho que apresenta a menor quantidade de catequinas, seguida por Merlot e Pinot Noir. Em todos os vinhos analisados, foi observado aproximadamente 3 e 5 vezes mais catequina que epicatequina.

De uma forma geral foram encontrados maiores quantidades de resveratrol, quercetina e catequinas no vinho Merlot em comparação com o vinho Cabernet Sauvignon.

Cada um dos vinhos tintos analisados apresentou um dos compostos fenólicos em maior quantidade quando comparados entre os vinhos estudados, não necessariamente sendo o encontrado em maior quantidade naquele vinho. O composto encontrado em destaque no Cabernet Sauvignon em relação às demais variedades foi o ácido gálico. O *trans*-resveratrol foi o composto que teve valores maiores no vinho Merlot que nas outras variedades. Já para o vinho Pinot Noir o composto fenólico que diferencia essa variedade das demais foram as catequinas. Já o Isabel apresentou a quercetina como fenólico característico.

A quantidade de folatos aumenta durante os processos de fermentação tanto alcoólica como maloláctica, sendo que o maior aumento ocorre na alcoólica. Depois desse processo, as quantidades de folatos se estabilizam e ocorre uma tendência à diminuição.

