

Carla Valéria da Silva Padilha

**NOVAS CULTIVARES DE UVAS BRASILEIRAS PLANTADAS
EM REGIÃO TROPICAL SEMIÁRIDA: CARACTERIZAÇÃO
QUÍMICA E INFLUÊNCIA DA ÉPOCA DE COLHEITA NA
COMPOSIÇÃO DE UVAS E DERIVADOS**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marilde T. Bordignon Luiz

Coorientador: Prof. Dr. Marcos dos Santos Lima

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Padilha, Carla Valéria da Silva
Novas cultivares de uvas brasileiras plantadas
em região tropical semiárida: caracterização química
e influência da época de colheita na composição de
uvas e derivados / Carla Valéria da Silva Padilha ;
orientador, Marilde Terezinha Bordignon Luiz,
coorientador, Marcos dos Santos Lima, 2019.
133 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Uvas . 3. Sucos de
uva. 4. Vale do São Francisco. 5. Composição química.
I. Bordignon Luiz, Marilde Terezinha . II. Lima,
Marcos dos Santos. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência
dos Alimentos. IV. Título.

Carla Valéria da Silva Padilha

**NOVAS CULTIVARES DE UVAS BRASILEIRAS
PLANTADAS EM REGIÃO TROPICAL SEMIÁRIDA:
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E INFLUÊNCIA DA ÉPOCA
DE COLHEITA NA COMPOSIÇÃO DE UVAS E DERIVADOS**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em
Ciência dos Alimentos” e aprovada em sua forma final pelo Programa
de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 22 de maio de 2019.

Prof.^a Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa
Coordenadora

Banca Examinadora:

Prof.^a. Dra. Marilde Terezinha Bordignon Luiz
Orientadora - Universidade Federal de Santa Catarina (CCA/UFSC)

Prof. Dr. Giuliano Elias Pereira
Membro – EMBRAPA UVA E VINHO

Prof. Dr. Alberto Brighenti
Membro - Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dra Carlise Beddin Fritzen Freire
Membro - Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado à viticultura tropical realizada no Vale do Submédio São Francisco, por todo desenvolvimento econômico e social que representa para esta região.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela minha vida e saúde e por me permitir mais esta vitória.

Aos meus pais, **Juarez e Soneide**, por terem me proporcionado educação, por me apoiarem em todas as etapas da minha vida, fazendo do amor a chave para transmitir força, tranquilidade e paz para a filha. Amo vocês imensamente!

A todos meus familiares e aos que se fizeram família; por me mostrarem que o termo família não depende apenas da proximidade física ou genética para existir no coração. Em especial aos meus irmãos **Camila, Caio e João Paulo**; meus sobrinhos **Miguel e Pedro**; meus sogros **Marlenice e José Pinheiro**; meus cunhados **Abílio, Cida, Priscila e Aline** e ao meu concunhado **Romero**.

Ao meu namorado, **José Eduardo**, pelo amor, compreensão, paciência e pela sua incansável boa vontade em me ajudar, incentivando a realização desse trabalho.

À professora Dra. **Marilde T. Bordignon Luiz**, minha orientadora, por ter me aceitado como orientada e por confiar a mim este trabalho. Por compartilhar o seu conhecimento, por ouvir minhas questões e problemas que surgiram durante o processo desta pesquisa.

Ao professor, coorientador e amigo Dr. **Marcos dos Santos Lima** por ter participado diretamente em todas as decisões do meu trabalho, pelas orientações e o prazer em compartilhar o seu conhecimento. Dizem que o bom orientador orienta para além da academia, orienta para a vida. Tenho certeza que tive um dos melhores, tanto para a academia, quanto para a vida.

Ao professor Dr. **Giuliano Elias Pereira** que criou as condições necessárias para que eu pudesse iniciar o doutorado e pelo exemplo de dedicação ao desenvolvimento da vitivinicultura tropical.

À **Universidade Federal de Santa Catarina**, seus professores, funcionários e, em especial ao **Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos**, por viabilizar o desenvolvimento desta tese.

Ao Instituto Federal do Sertão Pernambucano (IF Sertão PE), por disponibilizar toda a infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de estudos.

À Cooperativa Agrícola Nova Aliança (COANA), por contribuir com a disponibilização de matéria-prima para realização desse trabalho.

*Aos meus companheiros de trabalho do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da UFSC, **Aline, Ingrid, Isabel, Isabela, Robson, Saionara, Trilícia e Vívian**, e do Laboratório de Águas e Bebidas do IF Sertão-PE, **Gabriela, Jamillis, Lorena, Maria e Tamna**, pela parceria no decorrer destes 4 anos juntos.*

A todos que contribuíram para realização deste trabalho, meu respeito e agradecimento.

“A gratidão é a lembrança do coração.”

RESUMO

PADILHA, Carla Valéria da Silva. Novas cultivares de uvas brasileiras plantadas em região tropical semiárida: caracterização química e influência da época de colheita na composição de uvas derivados. 2019.133p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-SC.

Novas cultivares de uvas adaptadas às diferentes regiões brasileiras, com elevada produtividade e maior resistência às principais doenças que atacam a cultura da videira foram desenvolvidas pela EMBRAPA visando o consumo *in natura* da uva e também a produção de derivados. Este trabalho teve como objetivos a validação de um método para determinação rápida de compostos fenólicos em sucos e vinhos tintos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com fase reversa (RP-HPLC/DAD) utilizando uma nova coluna de resolução rápida; a caracterização bioativa e a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de novas cultivares de uvas de mesa brasileiras plantadas na região do Vale do Submédio São Francisco; a avaliação da influência da época de colheita na composição da uva e de sucos de uva. A validação do método cromatográfico seguiu as recomendações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil. Uvas, sucos de uvas e vinhos foram avaliados quanto ao pH, sólidos solúveis, acidez titulável, polifenóis totais, antocianinas monoméricas totais, compostos fenólicos individuais, ácidos orgânicos, açúcares e atividade antioxidante *in vitro*. O método validado mostrou linearidade ($R > 0,9995$), boa precisão ($CV\% < 2,78$), recuperação (91,8 -105,1%) e limites de detecção (0,04 – 0,85 mg L⁻¹) e quantificação (0,04 - 1,41 mg L⁻¹) de acordo com outros métodos previamente publicados, com o diferencial de possuir um tempo de corrida de apenas 25 minutos. A aplicabilidade do método validado foi verificada por meio da caracterização de compostos fenólicos em sucos de uva e vinhos comerciais de novas variedades brasileiras de uva, onde os resultados obtidos diferiram dos produtos estudados de sucos e vinhos de outras regiões mundiais. Os perfis fenólicos das novas variedades de uvas de mesa estudadas (BRS Isis e BRS Vitória) mostraram diferenças em relação a composição fenólica, destacando alta concentração de flavanols, flavonols e estilbenos na cultivar BRS Isis e de antocianinas, flavononas e ácidos fenólicos na cultivar BRS Vitória. Quanto ao potencial bioativo, as uvas mostraram alta atividade antioxidante, especialmente a uva BRS Vitória, em comparação a uvas de mesa de outras regiões do mundo. O cultivo de uva em uma região de pouca

variabilidade climática anual como no Vale do São Francisco permite que a colheita seja programada para qualquer mês do ano, este trabalho evidenciou que as sucessivas colheitas realizadas ao longo do ano são influenciadas por parâmetros climáticos e propiciam uvas e sucos com diferentes valores e perfis de compostos bioativos e atividade antioxidante.

Palavras-chave: Uvas de mesa. Sucos de uva. *Vitis labrusca* L. Híbridos. Compostos bioativos. Viticultura tropical.

ABSTRACT

PADILHA, Carla Valéria da Silva. New cultivars of Brazilian grapes planted in a semi-arid tropical region: chemical characterization and influence of harvest season on the composition of grapes and derived grapes. 2019.133p. Thesis (Doctorate in Food Science). Federal University of Santa Catarina. Florianópolis-SC.

New grape cultivars adapted to the different Brazilian regions, with high productivity and greater resistance to the main diseases that attack the grapevine culture were developed by EMBRAPA aiming at the *in nature* consumption of the grape and the production of derivatives. The objective of this work was to validate a method for the rapid determination of phenolic compounds in juices and red wines by high-performance liquid chromatography with reverse phase (RP-HPLC / DAD) using a new column of fast resolution; the bioactive characterization and the evaluation of the *in vitro* antioxidant activity of new cultivars of Brazilian table grapes planted in the region of Vale do Submédio São Francisco; the evaluation of the influence of the harvest season on the composition of the grape and grape juice. The validation of the chromatographic method followed the recommendations of the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Grapes, grape juices and wines were evaluated for pH, soluble solids, titratable acidity, total polyphenols, total monomeric anthocyanins, individual phenolic compounds, organic acids, sugars and antioxidant activity *in vitro*. The validated method showed linearity ($R > 0.9995$), good precision ($CV\% < 2.78$), recovery (91.8 - 105.1%) and detection limits (0.04-0.85 mg L⁻¹) and quantification (0.04 - 1.41 mg L⁻¹) according to other previously published methods, with the differential having a running time of only 25 minutes. The applicability of the validated method was verified through the characterization of phenolic compounds in grape juice and commercial wines of new Brazilian grape varieties, where the results obtained differed the products studied from juices and wines from other regions of the world. The phenolic profiles of the new varieties of table grapes studied (BRS Isis and BRS Vitória) showed differences in phenolic composition, with a high concentration of flavanols, flavonols and stilbenes in BRS Isis and anthocyanins, flavanones and phenolic acids in cultivar BRS Victory. As for the bioactive potential, the grapes showed high antioxidant activity, especially the BRS Vitória grape, in comparison to table grapes from other regions of the world. Grape cultivation in a region of low annual

climatic variability such as in the São Francisco Valley allows the harvest to be scheduled for any month of the year. This work evidenced that the successive harvests during the year are influenced by climatic parameters and provide grapes and juices with different values and profiles of bioactive compounds and antioxidant activity.

Keywords: Table grapes. Grape juice. *Vitis labrusca* L. Hybrids. Bioactive compounds. Tropical viticulture.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1. Novas cultivares de uvas empregadas na elaboração de suco de uva. (A) Isabel Precoce; (B) BRS Violeta; (C) BRS Cora; (D) BRS Magna----- 32
- Figura 2. Novas cultivares de uvas de mesa sem sementes. (A) BRS Vitória e (B) BRS Isis ----- 33
- Figura 3. Estrutura do anel flavonoide e numeração----- 36

CAPÍTULO 2

- Figura 1. Cromatogramas dos compostos fenólicos e seus respectivos tempos de retenção (RT). 1: ácido gálico (RT: 3,89); 2: procianidina B1 (RT: 6,81); 3: (-) - epigallocatequina (RT: 7,31); 4. (+) - catequina (RT: 7,65); 5. Procianidina B2 (RT: 8,26); 6. ácido t- caftárico (RT: 7.13); 7. ácido siríngico (RT: 10,48); 8. ácido p-cumarico (RT: 13,08); 9. ácido cafeico (RT: 9,46); 10. (-) – epicatequina galato (RT: 14,07); 11. Cianidina 3,5-diglicosídeo (RT: 9,28); 12. Pelargonidina 3,5-diglicosídeo (RT: 10,47); 13. Malvidina 3, 5-diglicósideo (RT: 12,34); 14. Peonidina 3-O-glicosídeo (RT: 18,34); 15. Malvidina 3-O-glicosídeo (RT: 19,12)----- 65
- Figura 2. Teste de limiar para verificação da pureza espectral do pico de (-) - epigallocatequina (DAD 220 nm) em uma corrida de suco de uva----- 70
- Figura 3. Percentual de recuperação individual obtido para as seis repetições de amostras de sucos de uva e vinho tinto analisadas em condições de reprodutibilidade 1. Ácido gálico; 2. Ácido siríngico; 3. Ácido p-cumárico; 4. Ácido cafeico; 5. Ácido t-caftárico; 6. (+) - Catequina; 7. (-) – Epicatequina galato; 8. (-) - Epigallocatequina; 9. Procianidina B1; 10. Procianidina B2; 11. Cianidina 3,5-diglicosídeo; 12. Malvidina 3,5-diglicosídeo; 13. Pelargonidina 3,5-diglicosídeo; 14. Peonidina 3-O-glicosídeo; 15. Malvidina 3-O-glicosídeo----- 71
- Figura 4. Valores médios da atividade antioxidante de sucos de uva e vinhos produzidos a partir de novas cultivares de uva brasileiras plantadas no Vale do Submédio São Francisco, Brasil. Médias seguidas das mesmas letras as amostras não

diferem de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade----- 81

CAPÍTULO 3

Figura 1. Cachos das uvas BRS Isis (A) e BRS Vitória (B) -- 96

Figura 2. Capacidade antioxidante das uvas BRS Isis e BRS Vitória avaliadas pelos métodos DPPH e ABTS (mM Trolox (TEAC) kg⁻¹ de uva). ----- 104

CAPÍTULO 4

Figura 1. Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando os resultados para compostos fenólicos individuais, atividade antioxidante e parâmetros climáticos para cascas (A) e semente (B) de uvas colhidas nos meses de fevereiro, maio, agosto e novembro de 2016 ----- 136

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Resultados para os parâmetros de validação do método de determinação rápida de compostos fenólicos em vinhos e sucos de uva por RP-HPLC / DAD -----	72
Tabela 2. Compostos fenólicos individuais de sucos de uvas e vinhos tintos comerciais de novas cultivares brasileiras (<i>Vitis labrusca</i> L. e híbridos) plantadas no Vale do São Francisco, no nordeste do Brasil -----	75

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Concentração (mg kg^{-1} de uva) de compostos fenólicos quantificados em uvas de mesa sem sementes--	101
--	-----

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Parâmetros climáticos durante o ciclo de colheita das uvas BRS Violeta e Isabel Precoce em quatro meses distintos do mesmo ano-----	120
Tabela 2. Parâmetros de qualidade das uvas colhidas em quatro meses do ano -----	126
Tabela 3. Composição fenólica (mg kg^{-1} de peso fresco) e atividade antioxidante dos extratos de cascas obtidos das uvas BRS Violeta e Isabel Precoce em quatro meses do mesmo ano -----	128
Tabela 4. Composição fenólica (mg kg^{-1} de peso fresco) e atividade antioxidante de extratos de sementes obtidos das uvas BRS Violeta e Isabel Precoce colhidas em quatro meses do mesmo ano -----	131
Tabela 5. Parâmetros físico-químicos, ácidos orgânicos, açúcares, composição polifenólica e atividade antioxidante dos sucos de uva das uvas BRS Violeta e Isabel Precoce -----	138

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS – 2,20-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ACP – Análise de Componentes Principais
AMT – Antocianinas monoméricas totais
ANOVA – Análise de variância
AOX – Atividade antioxidante
AT – Acidez titulável
BV – BRS Violeta
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
CP: Componente principal
DAD – Detector de Arranjos Diodos
DPPH – 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERO – Espécies reativas de oxigênio
FRAP – Poder antioxidante de redução do íon férrico
FD – Fator de diluição
FT – Fenólicos totais
IP – Isabel Precoce
IPBV – Isabel Precoce + BRS Violeta
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
LOD – Limite de detecção
LOQ – Limite de quantificação
MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
OIV – Organização Internacional da Vinha e do Vinho
r – coeficiente de correlação de Pearson
RT – Tempo de retenção
SS – Sólidos solúveis
TEAC – Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
TROLOX – 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromato-2-ácido carboxílico
UV-VIS -ultravioleta visível
VSF – Vale do Submédio São Francisco

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO -----	21
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -----	25
1.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA E INFLUÊNCIA DO CLIMA NO CULTIVO DE VIDEIRAS-----	27
1.2 A PRODUÇÃO DE UVA NO BRASIL E A PARTICIPAÇÃO DO VALE DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO -----	29
1.3 NOVAS CULTIVARES BRASILEIRAS DE UVAS PLANTADAS NO VALE DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO-----	31
1.4 COMPOSIÇÃO DA UVA, SUCO DE UVA E VINHO-----	34
1.4.1 Ácidos orgânicos e açúcares -----	34
1.4.2 Compostos fenólicos -----	36
1.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE UVAS, SUCOS DE UVAS E VINHOS-----	38
1.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) – PARÂMETROS ANALÍTICOS DE VALIDAÇÃO-----	41
1.6.1 Especificidade e seletividade -----	42
1.6.2 Precisão e exatidão -----	43
1.6.3 Linearidade -----	43
1.6.4 Limiares analíticos -----	43
1.6.5 Robustez -----	44
1.7 REFERÊNCIAS -----	45
CAPÍTULO 2 - DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE FLAVONOÍDES E ÁCIDOS FENÓLICOS EM SUCOS E VINHOS DE UVAS POR RP- HPLC/DAD: VALIDAÇÃO DO MÉTODO E CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS COMERCIAIS DAS NOVAS VARIEDADES BRASILEIRAS DE UVA -----	59
RESUMO-----	60
2.1 INTRODUÇÃO-----	61
2.2 MATERIAL E MÉTODOS-----	62
2.2.1 Padrões e reagentes -----	62
2.2.2 Amostras -----	63
2.2.3 Instrumentos e condições -----	63
2.2.4 Validação do método -----	64
2.2.4.1 Linearidade-----	65
2.2.4.2 Especificidade-----	65
2.2.4.3 Precisão e recuperação-----	66
2.2.4.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)-----	66

2.2.5 Composição bioativa: fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais -----	67
2.2.6 Atividade antioxidante -----	67
2.2.7 Análise estatística -----	68
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	68
2.3.1 Validação do método -----	68
2.3.1.1 Linearidade e especificidade-----	69
2.3.1.2 Precisão e recuperação-----	70
2.3.1.3 Limite de detecção e limite de quantificação-----	71
2.3.2 Caracterização de produtos comerciais produzidos com as novas variedades brasileiras de uva -----	74
2.3.2.1 Teor de fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais-----	74
2.3.2.3 Flavonóis-----	78
2.3.2.4 Antocianinas individuais-----	79
2.3.2.5 Atividade antioxidante-----	80
2.4 CONCLUSÕES -----	82
2.5 AGRADECIMENTOS -----	83
2.6 REFERÊNCIAS -----	84
CAPÍTULO 3 - NOVAS VARIEDADES BRASILEIRAS DE UVAS DE MESA (BRS ISIS E BRS VITÓRIA) CULTIVADAS NO NORDESTE DO BRASIL: COMPOSIÇÃO BIOATIVA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE -----	89
RESUMO -----	91
3.1 INTRODUÇÃO -----	93
3.2 MATERIAL E MÉTODOS -----	94
3.2.1 Reagentes químicos, padrões e solventes -----	94
3.2.2 Amostras -----	95
3.2.3 Preparação de extratos -----	96
3.2.4 Fenólicos totais e atividade antioxidante <i>in vitro</i> -----	96
3.2.5 Perfil fenólico -----	97
3.2.6 Análise estatística -----	98
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	98
3.3.1 Perfil fenólico -----	98
3.3.2.1 Flavonols-----	99
3.3.2.2 Antocianinas-----	99
3.3.3.3 Flavonols-----	102
3.3.3.4 Flavanonas-----	102
3.3.3.5 Ácidos fenólicos-----	103
3.3.3.6 Estilbenos-----	103
3.3.3 Atividade antioxidante -----	104
3.4 CONCLUSÃO -----	105

3.5 REFERÊNCIAS-----	106
CAPÍTULO 4 – EFEITOS DA COLHEITA SUCESSIVA NO MESMO ANO SOBRE A QUALIDADE E COMPOSTOS BIOATIVOS DE UVAS E SUCOS NA VITICULTURA TROPICAL SEMIÁRIDA-----	113
RESUMO-----	114
4.1 INTRODUÇÃO-----	115
4.2 MATERIAL E MÉTODOS-----	117
4.2.1 Reagentes e padrões-----	117
4.2.2. Amostras de uva e época de colheita-----	117
4.2.3. Parâmetros de maturidade física e tecnológica-----	118
4.2.4. Preparação dos extratos de sementes e casca das uvas-----	118
4.2.5. Suco de uva-----	121
4.2.6. Análises cromatográficas-----	121
4.2.7 Atividade antioxidante-----	122
4.2.8 Análise estatística-----	123
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	123
4.3.1 Parâmetros de maturidade física e tecnológica-----	123
4.3.2 Perfil de compostos fenólicos e atividade antioxidante <i>in vitro</i> de cascas e sementes das uvas-----	124
4.3.2.1 Ácidos fenólicos-----	125
4.3.2.2 Estilbenos-----	127
4.3.2.3 Flavanois, proantocianidinas, flavonols e flavononas-----	130
4.3.2.4 Antocianinas-----	133
4.3.3 Associação entre colheita sucessiva e composição polifenólica-----	134
4.4 CONCLUSÃO-----	139
4.5 AGRADECIMENTOS-----	140
4.6 REFERENCIAS-----	141
CONSIDERAÇÕES FINAIS-----	145

INTRODUÇÃO

O Brasil se classifica como o 15º maior produtor mundial de uva, com uma área colhida de 75 mil hectares e produção de 1,6 milhões de toneladas desta fruta (IBGE, 2019). O cultivo de uva no país, tanto para consumo *in natura* quanto para processamento, vem crescendo consideravelmente nos últimos anos em função da diversidade ambiental brasileira. Existem áreas com viticultura característica de regiões temperadas e subtropicais, onde a prática cultural é de uma safra por ano e áreas de viticultura tropical onde é possível se ter colheitas em todos os meses do ano (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011; PROTAS; et al., 2012).

A produção de uva brasileira é realizada entre o paralelo 30 °S, no Estado do Rio Grande do Sul, e o paralelo 8 °S, na região Nordeste do país. No Nordeste o destaque é para a região do Vale do Submédio São Francisco (VSF), representada principalmente pelos municípios de Petrolina (Pernambuco) e Juazeiro (Bahia). A alta luminosidade, baixos índices pluviométricos e baixa umidade relativa do ar são fatores ambientais que caracterizam esta região cujo clima, segundo classificação Köppen, é definido como tropical semiárido (TEIXEIRA, 2010). Devido a associação entre irrigação e o manejo das videiras é possível a produção de uvas durante o ano inteiro, favorecendo a exportação e garantindo expressão econômica e social (TEIXEIRA; AZEVEDO, 1996).

Devido ao crescimento da demanda por uvas, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), por meio do seu programa de melhoramento genético da uva, vem desenvolvendo novas cultivares de uvas adaptadas às diferentes regiões brasileiras, com elevada produtividade e maior resistência às principais doenças que atacam a cultura da videira, tanto para o consumo *in natura* como para a produção de sucos de alta qualidade (CAMARGO; MAIA; RITSCHHEL, 2010). As novas variedades de uvas plantadas comercialmente no Vale do Submédio São Francisco são “BRS Violeta”, “BRS Cora”, “BRS Magna” que são destinadas para a produção de sucos de uva; além da “BRS Vitória” e “BRS Isis” destinados ao consumo *in natura*. Uvas, vinhos e sucos do VSF têm recebido destaque pela concentração bioativa, alta atividade antioxidante associada a compostos fenólicos (PADILHA *et al.*, 2016; NATIVIDADE *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2014; CAMARGO *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016) e por promover melhoria no efeito ergogênico em corredores recreacionais, atividade antioxidante

in vivo e possível redução de marcadores inflamatórios associados ao seu consumo (TOALDO *et al.*, 2015; TOSCANO *et al.*, 2015).

Compostos fenólicos são importantes metabólitos vegetais presente nas uvas e além de atuarem como moléculas biofuncionais estão relacionados com as características sensoriais e estabilidade química dos produtos derivados, como sucos e vinhos (FARHADI *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2014; RECAMALES *et al.*, 2006). A literatura dispõe de diversos protocolos para determinação simultânea de compostos fenólicos em uvas, sucos e vinhos. Na maioria dos casos estes compostos são quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) com detecção no ultra violeta, detector de arranjos de diodo e detector de fluorescência (OBÓN; DÍAZ-GARCÍA; CASTELLAR, 2011; NATIVIDADE *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2016) utilizando principalmente colunas clássicas do tipo RP-C₁₈ (250 x 4.6 mm com partículas internas de 5 µm). Também são encontrados métodos por CLAE-FR com detecção em ionização por eletro spray e espectrometria de massa (RAMIREZ-LOPEZ *et al.*, 2014), assim como métodos de determinação rápida por CLAE-FR utilizando colunas de resolução rápida RP-C₁₈ (150 x 4.6 mm - partículas internas de 3 µm) e do tipo Core-Shell RP-C₁₈ (100 x 4.6 mm - partículas internas de 2.6 µm) (MANNIS; MANSFIELD, 2012; NATIVIDADE *et al.*, 2013).

Assim, é esperado que a composição química das novas cultivares de uvas brasileiras plantadas no VSF seja diferenciada, visto que se trata de uma região de clima tropical semiárido, caracterizado por altas temperaturas e luminosidade durante todo o ano. Além disso, sabe-se que o conhecimento da composição fenólica representa informação importante para a produção de vinhos e sucos de uva devido a relação que estas substâncias têm com a qualidade dos produtos finais.

Este trabalho apresenta como objetivos: validar uma metodologia de determinação rápida de compostos fenólicos em sucos e vinhos tintos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com fase reversa (RP-HPLC/DAD) utilizando uma nova coluna de resolução rápida; realizar caracterização química e bioativa das novas variedades brasileiras de uva de mesa plantadas na região do Vale do Submédio São Francisco, Nordeste do Brasil; e avaliar da influência da época de colheita na composição de uvas e sucos de uva.

A presente tese é estruturada em capítulos. O primeiro capítulo é referente a revisão bibliográfica onde são abordados os principais aspectos da viticultura nacional, com destaque para a região do Vale do

Submédio São Francisco. A revisão contempla também a influência do clima no cultivo da videira; as novas cultivares de uvas brasileiras; a composição química e atividade antioxidante de uvas, sucos e vinhos; e a validação de métodos cromatográficos. O capítulo dois apresenta a validação da metodologia para análise de compostos fenólicos em sucos de uva e vinhos usando uma coluna de resolução rápida. O capítulo três descreve o perfil fenólico e a atividade antioxidante de duas novas variedades de uvas de mesa cultivadas no VSF. Por fim, o capítulo quatro compreende o estudo da influência das condições climáticas da região do VSF na composição química de uvas e suco de uva. Neste estudo, foram avaliadas duas uvas colhidas em quatro diferentes meses do mesmo ano, bem como o suco elaborado com essas uvas.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA E INFLUÊNCIA DO CLIMA NO CULTIVO DE VIDEIRAS

A videira é uma das culturas mais antigas sendo a uva uma das frutas mais cultivadas em todo o mundo (XU *et al.*, 2010). A videira pertence à família *Vitaceae* que compreende 19 gêneros. O gênero *Vitis* é o único que possui frutos comestíveis e o mais importante economicamente. Formado por mais de 60 espécies o gênero *Vitis* se subdivide em dois subgêneros ou seções: *Muscadinia* Planch e *Euvitis* Planch. O subgênero *Muscadinia* é originado do Sudeste dos Estados Unidos e México e possui três espécies conhecidas, *Vitis rotundifolia* Michaux, *Vitis munsoniana* Simpson e *Vitis popenoi* Fennel. No subgênero *Euvitis* encontram-se duas espécies de grande importância para a agricultura, *Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L, consumidas de maneira *in natura* e também utilizadas para a produção de vinhos e sucos de uva (GALET, 1998; GIOVANNINI, 2008).

A espécie *Vitis vinifera* L. é a principal espécie do gênero *Vitis*, com mais de 17 mil variedades (VIVC, 2017). De origem europeia, as *Vitis vinifera* se destacam pela qualidade dos seus frutos, sendo a principal espécie para o consumo *in natura* e elaboração de vinhos finos. Dentre as principais variedades viníferas utilizadas na elaboração de vinhos finos estão a Cabernet Sauvignon, Syrah, Merlot, Chenin Blanc e Moscato Canelli (GIOVANNINI, 2008).

A espécie *Vitis labrusca* L. é originada da região sul da América do Norte. Essas videiras apresentam elevada produtividade e características rústicas, principalmente em relação a alta resistência às doenças que ocorrem nas cultivares *V. vinifera* L., a exemplo do míldio (*Plasmopara viticola*) e oídio (*Uncinula necator*). No Brasil, as variedades *Vitis labrusca* são amplamente utilizadas para processamento de sucos, sendo as mais comuns a Isabel, Concord, Niagra e Bordo, no sul e sudeste do país por apresentarem melhor adaptação ao clima temperado nessas regiões (CAMARGO *et al.*, 2010).

Quanto as condições climáticas para se desenvolver, embora possa ser considerada uma planta de clima temperado a videira apresenta elevada capacidade de adaptação, encontrando condições favoráveis em quase todas as regiões brasileiras. No entanto, essa amplitude climática de cultivo da videira não significa que os produtos originados em regiões distintas sejam idênticos no seu valor e qualidade (MOURA; TEIXEIRA; SOAREZ, 2009).

Em relação a radiação solar a videira é uma planta exigente, principalmente entre os períodos de floração e maturação, necessitando entre 1200 a 1400 horas de sol. Além do efeito direto sobre a fotossíntese, a exposição da planta à radiação solar estimula a brotação e a fertilidade das gemas, e conseqüentemente o aumento da produtividade dos cachos. Enquanto que a deficiência desse elemento climático pode ser prejudicial principalmente nos períodos de floração e maturação dos frutos, pois a radiação solar é fundamental para coloração das bagas e acúmulo de açúcar, sendo que maior parte do açúcar do fruto é sintetizado nas folhas pela ação da luz solar durante o período de maturação das bagas (GIOVANINNI, 2008; POMMER, 2003).

Assim como a luminosidade, a temperatura do ar influencia no crescimento e atividade fotossintética da videira, pois é necessária para que os catalizadores (enzimas) das reações bioquímicas, que ocorrem durante a fotossíntese, expressem sua atividade máxima. A faixa de temperatura média considerada ideal para o cultivo da videira situa-se entre 25 e 30 °C (GIOVANNINI; MANFROI, 2009). Leão e Soares (2009), afirmam que acima de 30 °C a atividade fotossintética é reduzida pela inativação térmica de enzimas, dissecação de tecido e fechamento dos estômatos das folhas, podendo chegar a zero em temperaturas próximas a 45 °C.

Por possuir um sistema radicular profundo, a videira possui uma necessidade hídrica variável, podendo vegetar em situações adversas e se adaptar em zonas onde a precipitação pluviométrica não ultrapassa 200 mm anuais até aquelas mais úmidas, com mais de 1000 mm anuais (PEDRO JR; SENTELHAS, 2003). Porém, em locais onde as precipitações anuais são inferiores a 450 mm ou que o regime de chuvas é mal distribuído, a viticultura deve ser irrigada (GIOVANINNI, 2009).

Os estádios fenológicos da videira são afetados tanto pela deficiência como pelo excesso hídrico, comprometendo a produtividade e qualidade das uvas (TEIXEIRA, 2004). Em condição de elevada quantidade de água disponível no solo, o crescimento vegetativo é excessivo e compete com as bagas pelos produtos da fotossíntese. Já o déficit hídrico pode provocar diversas respostas fisiológicas nas culturas, dentre as quais se destacam o fechamento dos estômatos, a redução da transpiração e o crescimento celular. Além disso, quando a deficiência hídrica ocorre durante o período inicial de crescimento das bagas pode ocasionar a redução no tamanho dos frutos. Enquanto que se acontece durante a maturação, pode causar o atraso do amadurecimento, afetando

a coloração e favorecendo a queima de frutos pela radiação solar (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A umidade do ar é o fator climático de maior relação com o surgimento de doenças fúngicas em videiras. No entanto, também está relacionado a aspectos fisiológicos da planta. Elevada umidade relativa (UR) do ar proporciona maior vigor dos ramos, acelera a emissão das folhas e favorece maior longevidade da planta. Porém, se associada a altas temperaturas favorece a maior incidência de fungos (TEIXEIRA, 2004). De acordo com Kishino & Caramori (2007), umidade relativa entre 62 - 68% são consideradas ideais para o desenvolvimento da videira. UR acima de 75% associada a altas temperaturas favorece o desenvolvimento de fungos responsáveis por causar prejuízos no parreiral, a exemplo do míldio (*Plasmopara viticola*), ferrugem (*Phakopsora euvtitis*) e podridões do cacho (*Melanconium fuligineum* e *Glomerella cingulata*). Enquanto baixa umidade relativa do ar favorece a transpiração da planta e a proliferação de ácaros e oídio (*Uncinula necator*).

Outro fator que pode afetar o desenvolvimento da videira é a velocidade do vento. Os ventos fortes podem causar danos físicos nas plantas em formação, pela quebra dos ramos novos, além de danos mecânicos nos frutos. A influência do vento sobre a transpiração da cultura está relacionada ao processo de remoção do vapor de água na atmosfera, pois o ar acima da cultura vai se tornando gradativamente saturado com vapor d'água e se não há reposição de ar seco, a evapotranspiração da cultura decresce (TEIXEIRA, 2004). Além da transpiração e do efeito mecânico, o vento é também um dos principais agentes de disseminação de fungos (SÔNEGO; GARRIDO; GRIGOLETTI JUNIOR, 2005).

1.2 A PRODUÇÃO DE UVA NO BRASIL E A PARTICIPAÇÃO DO VALE DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO

Atualmente, o Brasil ocupa a 15ª posição no ranking de produção de uva mundial, com 1,6 milhões de toneladas, numa área aproximada de 75 mil hectares (IBGE, 2019) distribuídas em nove regiões brasileiras, sendo agrupadas em zonas de viticultura de clima temperado, clima subtropical e clima tropical.

Em regiões de clima tropical, as temperaturas ambientais são elevadas e a videira não entra naturalmente no estado de repouso vegetativo, crescendo continuamente. Nestas condições, com a adequada

programação de podas, irrigação e aplicação de produtos químicos, é possível promover a produção de uvas em ciclos consecutivos. Com a ausência de repouso invernal ou dormência das gemas o ciclo vegetativo é encurtado, o que possibilita colheitas durante todo o ano e maiores produtividades (CAMARGO *et al.*, 2011).

Embora a viticultura tropical seja uma atividade recente em nível mundial, esta tem alcançado significativa evolução tecnológica no Brasil, especialmente no Vale do Submédio São Francisco, devido a utilização de novas cultivares e porta-enxertos, bem como a aplicação de técnicas de manejo apropriadas.

A cadeia produtiva de uva no VSF destina-se a três mercados específicos: uva de mesa (finas e comuns), uvas para elaboração de vinhos (finos e comuns) e uvas para produção de sucos, cujo crescimento vem aumentando nos últimos anos. A estrutura produtiva da região compõe-se de pequenos produtores vinculados aos projetos de colonização e associados em cooperativas, além de médios e grandes produtores que atuam em escala empresarial.

A relevância do VSF para a viticultura é atribuída, principalmente, pelo direcionamento da produção de uva fina de mesa (*Vitis vinifera* L.) para o mercado externo. Sob o ponto de vista comercial, a possibilidade de escalonamento da produção de uvas nessa região, permite a administração da oferta, fazendo-a coincidir com as entressafas tanto nas regiões vitícolas tradicionais brasileiras, como do exterior, fugindo, portanto, das limitações relacionadas à sazonalidade. Essa característica é a principal responsável pela inserção do VSF como responsável por 95% da exportação de uva fina de mesa do Brasil, que em 2016 respondeu por cerca de 30 mil toneladas e pelo valor aproximado de 64 milhões de dólares (IBRAF, 2017). Segundo dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC) esta região exporta uvas principalmente para os mercados da Europa, Estados Unidos e Canadá.

Atualmente a produção de vinho no VSF é realizada principalmente utilizando uvas *Vitis vinifera* L. São produzidos, em média, 4 milhões de litros de vinhos por ano, onde 2,8 milhões de litros (70%) são vinhos espumantes, 1,16 milhões de litros de vinhos tintos (29%) e 40 mil litros de vinhos brancos (1%) (PEREIRA *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, os produtores do VSF tem investido em grande escala na produção comercial de suco de uva. A área comercialmente plantada para elaboração de suco no VSF é composta por variedades

pertencentes às novas cultivares brasileiras de uva para produção de suco, sendo representada pelas cultivares “Isabel Precoce” (*Vitis labrusca*), e os híbridos, “BRS Cora”, “BRS Violeta” e BRS Magna (LIMA *et al.*, 2014; PADILHA *et al.*, 2017), com volume de suco produzido de aproximadamente 10 milhões de litros por ano.

1.3 NOVAS CULTIVARES BRASILEIRAS DE UVAS PLANTADAS NO VALE DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO

Devido ao crescimento da demanda por uvas, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) criou o programa de melhoramento genético da uva, e assim vem desenvolvendo nos últimos anos novas cultivares de uvas adaptadas às diferentes regiões brasileiras, com elevada produtividade e maior resistência às principais doenças que atacam a cultura da videira (CAMARGO *et al.*, 2010).

As novas variedades de uvas plantadas comercialmente no Vale do Submédio São Francisco são “Isabel Precoce” (*V. labrusca*), e os híbridos (*V. vinifera* x *V. labrusca*) “BRS Violeta”, “BRS Cora”, “BRS Magna” – para a produção de sucos de uva; além dos híbridos (*V. vinifera* x *V. labrusca*) BRS Vitória e BRS Isis para o consumo *in natura*.

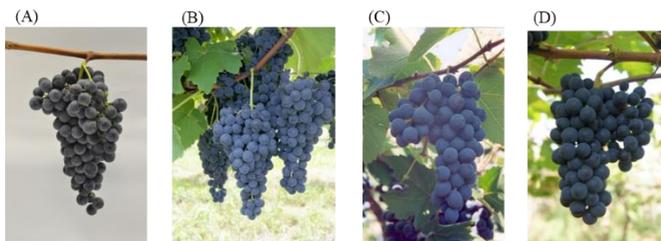
A cultivar ‘Isabel Precoce’ (Figura 1 A) é uma mutação somática espontânea que apresenta as características gerais da cultivar ‘Isabel’ em relação ao comportamento agrônômico, produção e qualidade do fruto. No entanto, diferencia-se da cultivar Isabel devido à redução no ciclo vegetativo entre a floração e a colheita, antecipada em cerca de 35 dias. Possui produtividade na faixa de 25 a 30 t/ha/safra; cacho em formato cilindro-cônico, pesando em média 110 g; baga de cor preta, com em média 17,2 cm de diâmetro x 18,7 cm de comprimento e uvas com cerca de 18 a 20 °Brix (CAMARGO, 2004). Sua precocidade é vista como uma opção para a ampliação do período de produção e processamento de suco e vinho de mesa. Por este motivo, o cultivo de Isabel Precoce aumentou nas regiões produtoras, tornando-se base para a produção de vinho em Goiás e de suco em Mato Grosso e no Vale do Submédio São Francisco (BOLIANI; FRACARO; CORRÊA, 2008), sendo a principal cultivar utilizada na elaboração de sucos de uvas na região do VSF (LIMA *et al.*, 2014).

A cultivar híbrida ‘BRS Violeta’ (Figura 1 B) é uma cultivar de uva tinta, lançada pela Embrapa em 2005 e obtida a partir de cruzamento ‘BRS Rúbea’ x ‘IAC 1398-21’. Apresentou boa adaptação à região Sul do

Brasil, sob condições de clima temperado e subtropical, como também, em regiões tropicais. Produz aproximadamente 25 a 30 toneladas de uva por hectare/safra. Seu cacho é de tamanho médio, pesando em torno de 150 g, possui formato cilíndrico, bagas esféricas com coloração preto-azulada, casca espessa e resistente, polpa colorida, sabor que remete a framboesa e sementes normais (CAMARGO; MAIA; NACHTIGAL, 2005).

A cultivar híbrida “BRS Cora” (Figura 1 C) foi obtida a partir do cruzamento ‘Muscat Belly A x H. 65.9.14’. É uma cultivar de uva tinta, lançada em 2004 como alternativa de uva tintureira para a elaboração de suco em regiões tropicais. Seu cacho tem tamanho médio, pesando em torno de 150 g, formato cilindro-cônico. Sua baga apresenta tamanho médio, elíptica larga, cor preto-azulada, casca espessa e resistente, polpa incolor, ligeiramente firme, e sabor que remete a framboesa. Em plena maturação, apresenta agradável sabor, típico das labruscas e mosto intensamente colorido, com teor aproximado de sólidos solúveis entre 18 e 20 °Brix, acidez total ao redor de 0,75 g de ácido tartárico 100 mL⁻¹ e pH na faixa de 3,45. Por originar sucos de coloração intensa, é utilizada para a melhoria da coloração de sucos de uvas deficientes nesse atributo (CAMARGO; MAIA, 2004), a exemplo do que ocorre no Vale do Submédio São Francisco, onde a BRS Cora é utilizada em cortes com a cultivar Isabel Precoce na elaboração de sucos de uva. (LIMA *et al.*, 2014).

Figura 1. Novas cultivares de uvas utilizadas na elaboração de suco de uva. (A) Isabel Precoce; (B) BRS Violeta; (C) BRS Cora; (D) BRS Magna.



Fonte: EMBRAPA (2017).

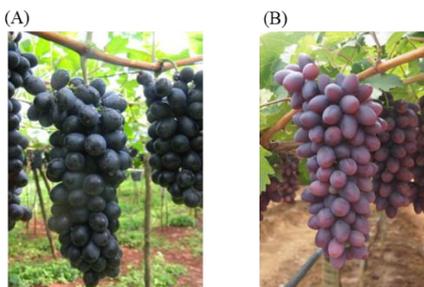
A cultivar híbrida ‘BRS Magna’ (Figura 1 D) é resultante do cruzamento ‘BRS Rúbea’ x IAC 1398-21 (‘Traviú’). Lançada em 2012

como uma alternativa para melhoria da cor, doçura e sabor de sucos de uva, a BRS Magna apresenta ampla adaptação climática, sendo recomendada para cultivo em regiões de clima tropical e temperado. Produz aproximadamente 25 a 30 toneladas de uva por hectare. Seus cachos são médios, em torno de 200 g, compostos por bagas pequenas (18 mm x 20 mm), esféricas, de coloração preto-azulada, cascas de espessura média, polpas apresentando pigmentação antocianica de intensidade fraca, macia, sabor que remete a framboesa e sementes normais (RITSCHHEL *et al.*, 2012).

Atualmente na região do VSF são plantados aproximadamente 250 hectares com as uvas Isabel Precoce, BRS Violeta, BRS Cora e BRS Magna, respectivamente.

As cultivares ‘BRS Vitória’ e ‘BRS Isis’ (Figura 2) foram obtidas pelo cruzamento das cultivares BRS Linda x CNPUV 681-29 [‘Arkansas 1976 x CNPUV 147-3’ (‘Niagara Branca’ x ‘Vênus’)] são cultivares sem sementes desenvolvidas para o consumo *in natura* (MAIA *et al.*, 2012; RITSCHHEL *et al.*, 2013).

Figura 2. Novas cultivares de uvas de mesa sem sementes. (A) BRS Vitória e (B) BRS Isis.



Fonte: EMBRAPA (2017)

A cultivar BRS Vitória é uma uva negra (preta-azulada), com alta fertilidade de gemas (até 40 toneladas/ha/ano), cachos levemente compactos, bagas esféricas e pequenas (em média 17 x 19 mm) e casca grossa, responsável por conferir a uva uma leve crocância. Apresenta um ciclo de 90 a 135 dias e alta resistência a míldio. Embora desenvolvida em 2007, somente no ano de 2014 foi iniciado o cultivo comercial desta cultivar na região do Vale do São Francisco (MAIA *et al.*, 2012).

A ‘BRS Isis’ é uma cultivar de ciclo tardio (da brotação ao final da maturação), cuja duração pode variar entre 116 e 126 dias, em regiões de clima tropical semiárido (Vale do Submédio São Francisco) até 135 e 145 dias, em regiões de clima tropical úmido (noroeste paulista). A produtividade média é de 26 t/ha/safra. Seus cachos são de tamanho médio, com peso médio de 375 g. As bagas são grandes (18,5 x 28,5 mm), de cor vermelha, sabor neutro agradável e sem sementes. Apresenta resistência ao míldio, principal doença da videira no Brasil (RITSCHER *et al.*, 2013).

1.4 COMPOSIÇÃO DA UVA, SUCO DE UVA E VINHO

A baga de uva é composta de casca, polpa e semente. A casca cobre a baga, representa de 6 e 12% do peso total da uva e é composta de seis a dez camadas de células recoberta externamente por um revestimento fino de cera chamado cutícula. A cutícula é responsável por tornar a baga impermeável protegendo as células contra o efeito do calor e da umidade e também evitar a penetração de microrganismos patogênicos. Os principais componentes da casca são: matéria corante (antocianinas), taninos, substâncias aromáticas e minerais (DHARMADHIKARI, 1994). Abaixo da camada de casca encontra-se a polpa que compõe a maior parte do volume de baga (85-92%). A polpa possui grandes vacúolos contidos de suco celular que são liberados quando as bagas são esmagadas, constituindo o mosto. A polpa é rica, principalmente, em água, açúcares, ácidos, minerais e substâncias pécticas (AQUARONE, 2001; DHARMADHIKARI, 1994). As sementes estão localizadas no centro da polpa. Cada baga contém de duas a quatro sementes que variam de tamanho e formato de acordo com a variedade de uva e que representam de 2 a 5% do peso da uva. A composição de sementes de uva é basicamente fibra, óleos essenciais, proteínas, compostos fenólicos complexos como açúcares, minerais e taninos (AQUARONE, 2001; CAMPOS *et al.*, 2008).

1.4.1 Ácidos orgânicos e açúcares

Ácidos orgânicos e açúcares são metabólitos primários importantes para o crescimento e desenvolvimento da videira e da uva. Os ácidos orgânicos são produzidos nas folhas da videira e nas bagas da uva e começam a se acumular nos estádios iniciais de desenvolvimento

do fruto. Os açúcares são produzidos nas folhas e transportados para a baga onde se acumulam ao longo do tempo. Após o período de mudança de cor das bagas as concentrações de açúcares aumentam consideravelmente na baga, enquanto que as dos ácidos começam a diminuir, com exceção de ácido tartárico, que permanece relativamente constante ao longo de amadurecimento (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2003).

Nas uvas predominam os ácidos tartárico e málico, que representam aproximadamente 90% da acidez, enquanto que os ácidos succínico, cítrico, acético, ascórbico e outros estão presentes em menores quantidades (LIANG *et al.*, 2011; EYDURAN *et al.*, 2015). O perfil e concentração destes compostos são importantes parâmetros para o processamento e composição química de sucos de uva e vinhos, pois ácidos reduzem o pH destes produtos e conseqüentemente aumentam a estabilidade da cor, uma vez que as antocianinas mantém a coloração vermelha em pH baixo, além de assegurar o equilíbrio gustativo entre o gosto ácido e doce (ALI *et al.*, 2010; SINGLETON, 1987).

Em relação à capacidade bioativa de ácidos orgânicos, Tang *et al.* (2013) mencionam que alguns ácidos (ácidos cítrico e málico) apresentaram efeitos protetores do miocárdio e atuaram sobre lesões de isquemia, sendo destacada a importância da inserção destes compostos na dieta de pacientes em tratamento da doença isquêmica.

A glicose e frutose são os principais açúcares presentes nas uvas e sucos e geralmente encontram-se em proporções semelhantes (razão 1:1) no período de maturação da uva. No entanto, em sucos elaborados com uvas em estágio de maturação avançado encontra-se maior proporção de frutose (DHARMADHIKARI, 1994). Derivados da uva podem ainda apresentar outros açúcares provenientes da hidrólise de polissacarídeos da uva por ação de enzimas pectinases, como a rramnose (ARNOUS; MEYER, 2010) e outros açúcares em pequenas quantidades como a maltose (MORVAI; MOLNÁR-PERL, 1992).

A concentração de açúcares na uva e produtos derivados depende da espécie, variedade, maturidade e sanidade do fruto. Um fator determinante para o acúmulo de açúcar na baga é o total de horas de insolação ao qual a planta foi submetida durante o período vegetativo (POMMER, 2003). Assim, uvas cultivadas em regiões de clima tropical apresentam maiores teores de açúcar conforme apresentado em estudos realizados na região do Vale do Submédio São Francisco (RIBEIRO; LIMA; ALVES, 2012; LIMA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2016; PADILHA *et al.*, 2017). Os açúcares contribuem para a tipicidade e qualidade

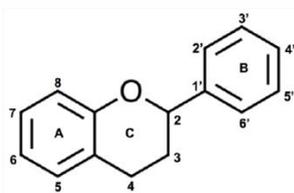
sensorial do suco de uva, estando relacionados ao aumento da volatilidade de compostos aromáticos no suco e em vinhos (JACKSON, 2008).

1.4.2 Compostos fenólicos

Os benefícios para a saúde inerentes ao consumo uva, de suco de uva e vinho são explicados pela presença dos compostos fenólicos. Os fenólicos constituem um dos mais numerosos e amplamente distribuídos grupos de produtos naturais no reino vegetal, incluindo não só uma ampla variedade de moléculas com uma estrutura de polifenóis (isto é, vários grupos hidroxila em anéis aromáticos) mas também moléculas com um anel fenólico, tais como ácidos fenólicos e álcoois fenólicos (TSAO, 2010).

Na uva, os fenólicos estão localizados na casca, polpa e semente e são divididos como não flavonoides (fenóis simples; ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinâmicos, fenóis voláteis e estilbenos) e flavonoides (flavonas, flavonóis, flavanonas, flavan-3-ol e antocianinas). Compostos não flavonoides são encontrados em uvas e derivados em baixas concentrações, com exceção dos ácidos hidroxicinâmicos. Já os flavonóides constituem uma porção significativa do material fenólico em uvas, sendo definidos como compostos polifenólicos C6-C3-C6, nos quais dois anéis de benzeno hidroxilados, A e B, são ligados por uma cadeia de três carbonos que faz parte de um anel C heterocíclico (Figura 3). De acordo com o estado de oxidação do anel C, estes compostos são divididos em classes estruturais que incluem flavonóis, flavan-3-ols (que incluem simples flavan-3-ols e suas formas poliméricas proantocianidinas) e antocianinas (CASTELLARIN *et al.*, 2012; KENNEDY; SAUCIER; GLORIES, 2006).

Figura 3. Estrutura do anel flavonoide e numeração.



Fonte: Teixeira *et al.* (2013).

Uvas e produtos derivados, como sucos e vinhos, estão entre os produtos com maior apelo funcional em virtude da grande quantidade de fenólicos e alto potencial antioxidante (MAJO *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2011; PADILHA *et al.*, 2016; PINHO *et al.*, 2012). Essas características são influenciadas por inúmeros fatores, como método de cultivo, variedade e maturação da uva, condições edafoclimáticas e condições de processamento (DHARMADHIKARI, 1994; GRANATO *et al.*, 2015; MARGRAF *et al.*, 2016; RECAMALES *et al.*, 2006). No entanto, vale ressaltar que cada composto fenólico possui um poder antioxidante diferente em função da sua estrutura química, o que significa que os compostos fenólicos presentes em maiores concentrações em uma amostra não necessariamente possuem maior potencial antioxidante (ALONSO *et al.*, 2002).

De acordo com Hogan *et al.* (2009), 100 g de uva fresca contém de 63 a 182 mg de compostos fenólicos, sendo os flavonoides responsáveis por 65 a 76% desses constituintes. Nas uvas vermelhas as antocianinas são o maior grupo de flavonoides. A maior parte dos fenólicos antioxidantes estão distribuídos na casca e semente das uvas. A casca concentra grande quantidade de antocianinas, catequinas e resveratrol, enquanto as procianidinas são em maior concentração nas sementes (CARERI *et al.*, 2003; KAMMERER *et al.*, 2004).

A concentração de antocianinas está associada as características genéticas das uvas, mas também são influenciados por fatores externos como condições climáticas, temperatura, luz e práticas culturais (HE; GIUSTI, 2010). A concentração total de antocianinas em diferentes cultivares de uvas *V. viniferas* reportado na literatura foi de: Jean (1359,6 mg kg⁻¹), Alfrocheiro (1827,6 mg kg⁻¹), Syrah (2297,6 mg kg⁻¹), Tinta Roriz (2603,0 mg kg⁻¹) e Touriga Nacional (5336,3mg kg⁻¹) (SILVA; QUEIROZ, 2016); Rufete (557,4 mg kg⁻¹), Tempranillo (1240,4 mg kg⁻¹) (ALCALDE-EON *et al.*, 2014).

O perfil de antocianinas de vinhos e sucos de uva varia de acordo com a cultivar utilizada bem como com a técnica de processamento (FULEKI; RICARDO-DA-SILVA, 2003). Os valores das antocianinas totais quantificadas em sucos de uvas de várias regiões vitícolas variaram de 5,9 a 268,85 mg L⁻¹, respectivamente (LIMA *et al.*, 2014; GRANATO *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016). Em vinhos, esses valores variam de 12,9 a 344,70 mg L⁻¹ (GRIS *et al.*, 2013; MULERO, PARDO; ZAFRILLA, 2010; PLAVSA *et al.*, 2012).

Geralmente, os flavanois predominam nas uvas principalmente na forma livre representados por (+) - catequina, (-) - epicatequina, e

galocatequinas, sendo a catequina o principal flavanol encontrado em uvas *Vitis labruscas* (JACKSON, 2008; PRIEUR *et al.*, 1994). Mattivi *et al.* (2009) mencionaram a epigallocatequina galato como um dos principais flavanois monomericos presentes em extratos de cascas de uvas *Vitis vinifera* como Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah, Pinot Noir, Teroldego e Marzemino. Estudos demonstraram associação positiva entre o consumo flavanóis e a redução de doenças crônicas (GOLLÜCKE; SOUZA; TAVARES, 2008; MANACH *et al.*, 2005).

Em relação aos ácidos fenólicos, de maneira geral, nas uvas e derivados *Vitis labrusca* L. há predominância dos ácidos p-cumárico, cafeico e gálico, enquanto nas uvas *Vitis viniferas* os ácidos caftárico e cutárico estão presentes em maior concentração (GRIS *et al.*, 2013; MONTEALEGRE *et al.*, 2006; NATIVIDADE *et al.*, 2013; NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010).

Em relação aos estilbenos, o resveratrol (3-4'-5-hidroxiestilbeno) é encontrado em diferentes concentrações na casca da uva, sementes, caule, broto, pecíolo, raiz e folha. Pode ser encontrado na forma de isômeros (cis ou trans-resveratrol), assim como na forma glicosilada (WANG *et al.*, 2016). Dani *et al.* (2007) obtiveram concentrações de trans-resveratrol variando de 0,08 a 0,21mg L⁻¹ em sucos de uva da cultivar Bordo produzidos com uvas cultivadas em sistema convencional e orgânico, respectivamente. Lima *et al.* (2014), avaliando sucos de uva produzidos com novas cultivares de uvas plantadas na região do Vale do Submédio São Francisco, encontraram valores de 0,40 a 1,10 mg L⁻¹ de *trans*-resveratrol. Em suco de uva orgânico, biodinâmico e convencional produzido no Brasil e na Europa, Granato *et al.* (2015) reportaram valores de 1,08 a 2,67 mg L⁻¹ para o *trans*-resveratrol em sucos de uva. Em estudos realizados em vinhos, os valores de *trans*-resveratrol variaram de 0,49 a 6,57 mg L⁻¹ Em vinhos Syrah produzidos em diferentes regiões do estado de Santa Catarina-SC (SARTOR *et al.*, 2017); 0,33 a 3,0 mg L⁻¹ para vinhos tintos de diferentes cultivares plantadas no VSF (PADILHA *et al.*, 2017); e 1,02-4,30 mg L⁻¹ vinhos da Argentina e Chile (GRANATO *et al.*, 2011).

1.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE UVAS, SUCOS DE UVAS E VINHOS

As espécies reativas de oxigênio (EROs), também chamadas de radicais livres, são moléculas liberadas pelo metabolismo do corpo que

apresentam um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita externa. Esta configuração faz das espécies reativas moléculas altamente instáveis, de meia-vida curta e quimicamente muito reativas. O mecanismo de geração das EROs ocorre geralmente no citoplasma, nas mitocôndrias ou membranas celulares, devido a fatores endógenos (respiração aeróbia, inflamação) ou exógenos (radiação ultravioleta, radiação gama, medicamentos, dieta) (GREEN, BRAND, MURPHY, 2004; HALLIWELL, 2006).

As principais espécies reativas de oxigênio distribuem-se entre radicalares - anião superóxido ($O_2^{\cdot -}$), hidroxilo (HO^{\cdot}), hidroperóxilo (HOO^{\cdot}) e o peróxilo (ROO^{\cdot}) - e não radicalares - peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singleto (O_2) e o ácido hipocloroso ($HClO$) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

O efeito benéfico dos radicais livres ocorre em baixas concentrações envolvendo funções biológicas como por exemplo na resposta imune a infecções. Nessas situações, ocorre um alto consumo de oxigênio que é então convertido em ânion superóxido e usado para eliminar bactérias e partículas engolfadas em um processo chamado fagocitose (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Já os efeitos nocivos sobre os sistemas biológicos têm sido relacionados a um grande número de doenças como aterosclerose (AL-AUBAIDY; JELINEK, 2014) e doença de Alzheimer (ROSINI *et al.*, 2014).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos leva ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos. O mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo induzido por radicais livres envolve (1) os mecanismos preventivos, (2) mecanismos de reparação, (3) mecanismos físicos de defesa e (4) defesas antioxidantes (SIES, 1993).

Os antioxidantes são substâncias que em baixas concentrações são capazes de prevenir ou retardar a oxidação de substratos oxidáveis. Os antioxidantes podem ser do tipo enzimáticos (ex.: superóxido desmutase, glutathione peroxidase, catalase) ou não enzimáticos (ácido ascórbico, tocoferol, glutathione, carotenoides, flavonoides, etc) e atuam (i) prevenindo a oxidação, (ii) suprimindo a formação de espécies reativas através da redução do H_2O_2 em O_2 e H_2O e do peróxido lipídico (LOO^{\cdot}) a hidróxido lipídico ($LOOH$) ou (iii) por ação queladora de íons metálicos como ferro e cobre (VALKO *et al.*, 2007).

Uvas, vinhos e sucos de uva são importantes fontes antioxidantes naturais, estando essa importância relacionada principalmente à presença de compostos fenólicos (LEEuw *et al.*, 2014; TOALDO *et*

al., 2015; PADILHA *et al.*, 2016; SAMOTICHA; WOJDYLO; GOLIS, 2017).

Em uvas, a atividade antioxidante aumenta com a maturação como consequência do aumento na concentração de compostos fenólicos, principalmente na casca. Condições de estresse também estimulam a biossíntese de fenólicos, podendo repercutir na atividade antioxidante de tecidos vegetais (GARRIDO *et al.*, 2016). Outros fatores que afetam a atividade antioxidante incluem condições climáticas (temperatura, intensidade de luz), tipo de solo e práticas culturais (RASTIJA; SREČNIK; MEDIC-SARIC, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2013; WANG; SUN; CHANG, 2015). Em sucos de uva, técnicas de processo como temperatura e tempo de maceração e uso de enzimas influenciam a composição fenólica e consequentemente a atividade antioxidante (CAPANOGLU *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2015).

Uma grande variedade de métodos *in vitro* é utilizada para avaliar a capacidade de eliminação de radicais e atividade antioxidante de sucos de uva e vinhos, tais como DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS (2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) e H₂O₂ (Hydrogen Peroxide Scavenging Activity). No entanto, é importante destacar que o resultado das medições da atividade antioxidante depende da técnica utilizada (CAMARGO *et al.*, 2014; GRANATO, KATAYAMA, CASTRO, 2011; GARAGUSO; NARDINI, 2015; LIMA *et al.*, 2014; PADILHA *et al.*, 2017). Além disso, estudos de atividade antioxidante realizados em uvas e derivados devem seguir a recomendação da Organização Internacional da Uva e Vinho (OIV) indica a utilização do método de captura de radicais livres com o 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (OIV, 2011).

A propriedade antioxidante de vinhos e sucos de uva está ligada à qualidade dos compostos fenólicos da uva, e a uva é uma das frutas com maiores concentrações de compostos fenólicos, principalmente os flavonoides (antocianinas, flavanóis e flavonóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos) e uma larga variedade de taninos (GRANATO *et al.*, 2015).

Granato *et al.* (2015) ao caracterizarem sucos de uva de diferentes regiões de origem, espécies, cultivares, sistemas de cultivo e condições de processo reportaram valores de até 27 mM TEAC L⁻¹ para atividade antioxidante medida por métodos de capturas de radicais (ABTS e DPPH). Já Padilha *et al.* (2017), estudando a capacidade de amostras de sucos de uva provenientes da região do Vale do São Francisco em

eliminar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) encontraram valores de 61,39 a 69,54 mM TEAC L⁻¹.

A atividade antioxidante, medida pelos métodos ABTS e DPPH, de vinhos tintos brasileiros varia de 1,2 mM TEAC L⁻¹, em vinhos elaborados na região Sul, a 30,7 mM TEAC L⁻¹, em vinhos elaborados na região Nordeste do país (GRIS *et al.*, 2012; PADILHA *et al.*, 2016).

1.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) – PARÂMETROS ANALÍTICOS DE VALIDAÇÃO

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC, do inglês *high-performance liquid chromatography*) é uma técnica analítica de separação de componentes de uma matriz, na qual a separação depende da distribuição molecular dos componentes da matriz em duas fases: fase móvel (FM), que neste tipo de cromatografia é um líquido e a fase estacionária (FE), que compreende uma coluna de separação, onde por meio da aplicação de pressões elevadas força-se a passagem do solvente (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2014; HARRIS, 2012).

Um sistema CLAE consiste em: um sistema de distribuição da fase móvel (reservatório dos reagentes e sistema de bombear), um injetor que pode ser automático ou não, a coluna onde se dá a separação dos analitos, e, opcionalmente um forno para poder controlar a temperatura da coluna, além do detector e do sistema de aquisição e tratamento de dados (HARRIS, 2012). Adicionalmente, os sistemas mais recentes de CLAE contêm também um sistema de degaseificação para remover gases dissolvidos nos solventes e que podem afetar o desempenho da separação dos componentes.

Em análise de alimentos, com os constantes avanços tecnológicos na produção, processamento, embalagem e armazenamento, é fundamental que os dados analíticos obtidos sejam confiáveis, pois resultados não confiáveis podem levar a falsas interpretações e prejuízos financeiros (PETERS; DRUMMER; MUSSHOF, 2007). Como garantia de que um método analítico a ser desenvolvido fornece informações confiáveis e passíveis de interpretação, ele deve se submeter a uma avaliação denominada validação.

A validação analítica é o processo de determinação de parâmetros de desempenho e confirmação de que um método atende requisitos de performance necessários à sua aplicação (MAGNUSSON; ORNEMARK, 2014), tendo como objetivo garantir que todas as medidas

futuras de análise de rotina sejam suficientes para encontrar um valor verdadeiro para a medida da substância presente. A validação deve ser realizada quando um método for desenvolvido, modificado ou quando for adaptado para outra amostra (GONZÁLEZ; HERRADOR, 2007).

A validação de métodos de análise de alimentos pode ser realizada utilizando diferentes guias e protocolos estabelecidos por órgãos nacionais ou internacionais. No Brasil, os principais documentos de referência são a RDC N° 166, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA (BRASIL, 2017), o DOQ-CGCRE-008 - Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos (INMETRO, 2016) e a Instrução Normativa 24 de 2009, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009). Além desses, são aceitos nacional e internacionalmente os protocolos EURACHEM (2014), ISO, AOAC (1998) e IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Para a realização da validação é necessário definir quais parâmetros de desempenho serão avaliados e isso dependerá de fatores como: o propósito para o qual o método se destina, a técnica escolhida e o protocolo de validação. É importante destacar que os principais protocolos de validação de métodos não estão harmonizados. No entanto, os parâmetros de desempenho normalmente avaliados são: especificidade e seletividade, precisão, exatidão, linearidade, limiares analíticos (limite de detecção e limite de quantificação) e robustez.

1.6.1 Especificidade e seletividade

A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Método específico é aquele que produz resposta para apenas um analito em meio de outros componentes, enquanto que um método seletivo produz respostas para vários analitos, distinguindo-os uns dos outros além de quantificá-los. O teste de especificidade pode ser realizado ao comparar as medidas de uma amostra fortificada e não fortificada que contenha os possíveis interferentes com uma solução da amostra padrão. A avaliação da seletividade é feita pela análise das amostras e materiais de referência pelo método em estudo e outros métodos validados, demonstrando a habilidade do método em estudo (EURACHEM, 2014; BRASIL, 2009; INMETRO, 2016).

1.6.2 Precisão e exatidão

Os erros de uma medida analítica são determinados pelos parâmetros precisão e exatidão. Um método preciso é aquele que apresenta concordância entre os resultados de uma série de medidas de uma mesma amostra. Sendo estas analisadas no mesmo dia, pelo mesmo analista e no mesmo laboratório (repetibilidade); em dias diferentes, com analistas diferentes (precisão intermediária); ou até em laboratórios diferentes (reprodutibilidade). A precisão é expressa em termos de desvio padrão ou coeficiente de variação (EURACHEM, 2014; INMETRO, 2016).

A exatidão de um método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão (INMETRO, 2016).

1.6.3 Linearidade

A linearidade demonstra que os resultados obtidos de sinal analítico estão diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra em uma faixa de concentração específica (INMETRO, 2016). Geralmente a linearidade é avaliada graficamente, utilizando curvas de calibração com um mínimo de cinco pontos, sendo utilizado o valor do coeficiente de correlação linear (R^2), para avaliar o grau de linearidade dos pontos experimentais, que deve ser próximo de 0,999, de forma a garantir o ajuste dos dados. A confirmação da linearidade deve ser realizada pela análise dos resíduos que ocorre por teste estatístico determinado pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) (EURACHEM, 2014; GONZÁLEZ; HERRADOR, 2007).

1.6.4 Limiares analíticos

O limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) é menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, com precisão aceitável em função do ruído do equipamento (BRASIL, 2017). O LOD é determinado utilizando soluções de concentrações conhecidas decrescente do analito, até o menor nível detectado.

O limite de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*) é a menor concentração de identificação do analito na amostra que pode ser quantificado com precisão e exatidão aceitável (BRASIL, 2017). Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exatidão e a precisão conseguidas são satisfatórias. Pode ser avaliado pelo método de relação sinal/ruído, percepção visual, estimativa a partir da cura analítica, estimativa pelo desvio padrão do branco, etc (BRASIL, 2017).

1.6.5 Robustez

A robustez de um método analítico é a capacidade do método em não ser afetado por pequenas variações nos parâmetros de execução do método. A robustez fornece uma indicação da confiança do método durante uma aplicação rotineira. O método é considerado robusto quando se verifica, utilizando do estudo da robustez, que a resposta do procedimento analítico não é influenciada ou é pouco influenciada por pequenas variações das condições experimentais. Do contrário, o método é não robusto e inadequado para as análises de rotina (EURACHEM, 2014). A robustez é um parâmetro opcional dentro dos estudos de validação, muitas vezes estando mais associado a estudos de otimização.

1.7 REFERÊNCIAS

AL-AUBAIDY, H. A.; JELINEK, H. F. Oxidative stress and triglycerides as predictors of subclinical atherosclerosis in prediabetes. *Redox report : communications in free radical research*, v. 19, n. 2, p. 87–91, 2014.

ALCALDE-EON, C. *et al.* Adding oenological tannin vs. overripe grapes: Effect on the phenolic composition of red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 34, p. 99–113, 2014.

ALI, K. *et al.* Metabolic constituents of grapevine and grape - derived products. *Phytochemistry Reviews*, v. 9, n. 3, p. 357 - 378, 2010.

ALONSO, A. M. *et al.* Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5832-5836. 2002.

ARNOUS, A.; MEYER, A. S. Discriminated release of phenolic substances from red wine grape skins (*Vitis vinifera* L.) by multicomponent enzymes treatment. *Biochemical Engineering Journal* 49, 68–77, 2010.

AQUARONE, E. *Biotecnologia industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. V.4, Série Biotecnologia Industrial, v. 4, 2001.

BOLIANI, A. C.; FRACARO, A. A.; CORRÊA, L. de S. *Uvas rústicas: cultivo e processamento em regiões tropicais*. Jales: Universitária Gráfica e Editora; 368 p. 2008.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, de 25 de julho de 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO/ SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA.

Instrução normativa número 24, de 14 de julho de 2009. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 22 jul 2009; Seção 1, p. 7-15

CAMARGO, U. A. ‘Isabel Precoce’- alternativa para a vitivinicultura brasileira. Comunicado Técnico N°. 54, 2004.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G. “BRS Cora” nova cultivar de uva para suco, adaptada a climas tropicais. Comunicado Técnico N°. 53, 2004.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; NACHTIGAL, J. C. “BRS Violeta” nova cultivar de uva para suco e vinho de mesa. Comunicado Técnico n. 63, 2005.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; RITSCHER, P. S. Novas cultivares brasileiras de uva. Bento Gonçalves. Embrapa Uva e Vinho, 64 p. 2010.

CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Advances in grape culture in Brazil. Revista Brasileira de Fruticultura, v. Volume esp, p. 144–149, 2011.

CAMARGO, U. A.; PEREIRA, G. E.; GUERRA, C. C. Wine grape cultivars adaptation and selection for tropical regions. Acta Horticulturae, v. 910, p. 121–129, 2011.

CAMARGO, A. C. *et al.* Low molecular weight phenolics of grapejuice and wine-making by-products: Antioxidant activities and inhibition of oxidation of human LDL-cholesterol and DNA strand breakage. Journal of agricultural and food chemistry, p.12159-12171, 2014.

CAMPOS, L. M. A. S. *et al.* Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*). Bioresource Technology, 99, 8413–8420. 2008.

CAPANOGLU, E. *et al.* Changes in polyphenol content during production of grape juice concentrate. Food Chemistry 139, 521–526,

2013.

CARERI, M. *et al.* Direct HPLC analysis of quercetin and trans-resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 18, p. 5226-5231, 2003.

CASTELLARIN, S.D. *et al.* Phenolics in Grape Berry and Key Antioxidants. In *The Biochemistry of the grape berry*; Gerós, H., Chaves, M., Delrot, S., Eds.; Bentham Science: Bussum, The Netherlands. 89–110p. 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos da Cromatografia*. Campinas: Editora Unicamp, SP. 5ª reimpressão, 2014.

DANI, C. *et al.* Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically or conventionally produced grapes. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, p. 2574-2580, 2007.

DHARMADHIKARI M: *Composition of grapes*. Vineyard Vintage View Mo State Univ., 3–8p. 1994.

EURACHEM GUIDE: *The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. Magnusson, B. and U. Örnemark (Ed.), 2014.

EYDURAN, S. P. *et al.* Sugars, organic acids, and phenolic compounds of ancient grape cultivars (*Vitis Vinifera* L.) from igdir province of eastern Turkey. *Biological Research*, v. 48, n. 1, p. 1–8, 2015.

FARHADI, K. *et al.* Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in West Azerbaijan province, Iran. *Food Chemistry*. 199, 847-855.

FULEKI, T.; RICARDO-DA-SILVA, J.M. Effects of cultivar and processing method on the contents of catechins and procyanidins in

grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (3), 640-646. 2003.

GALET, P. Grape varieties and rootstocks varieties. Paris: Oenoplurimédia, 315 p.1998.

GARAGUSO, I.; NARDINI, M. Polyphenols content, phenolics profile and antioxidant activity of organic red wines produced without sulfur dioxide/sulfites addition in comparison to conventional red wines. *Food Chemistry*, v. 179, p. 336–342, Feb. 2015.

GARRIDO, I. *et al.* The evolution of total phenolic compounds and antioxidant activities during ripening of grapes (*Vitis vinifera* L., cv. tempranillo) grown in semiarid region: Effects of cluster thinning and water deficit. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 11, 2016.

GIOVANINNI, E. Produção de uvas para vinho, suco e mesa. Renascença, 3ª ed., Porto Alegre, 386 p. 2008.

GIOVANNINI, E.; MANFROI, V. Viticultura e Enologia: Elaboração de grandes vinhos nos terroirs brasileiros. 1 ed. Bento Gonçalves: IFRS, 344p. 2009.

GOLLÜCKE, A. P. B.; SOUZA, J. C. S.; TAVARES, D. Q. (+)-Catechin and (-) epicatechin levels of concentrated and ready-to-drink grape juices through storage. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 43, n. 10, p.1855-1859, 2008.

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. A. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, n. 3, p. 227-238, 2007.

GRANATO, D.; KATAYAMA, F.C.U.; DE CASTRO, I.A. Phenolic composition of South American red wines classified according to their

antioxidant activity, retail price and sensory quality. *Food Chemistry*, v. 129, 366–373. 2011.

GRANATO, D. *et al.* Authentication of geographical origin and crop system of grape juices by phenolic compounds and antioxidant activity using chemometrics. *Journal of Food Science*, v. 80, n. 3, p. C584–C593, 2015.

GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*. 53, 110-8. 2004.

GRIS, E. F. *et al.* Phenolic profile and effect of regular consumption of Brazilian red wines on in vivo antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 31, n. 1, p. 31–40, Aug. 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants: redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, v. 141, n. 2, p. 312-332, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press: Oxford, 851p. 2007.

HARRIS, D. C. *Análise química quantitativa*, 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 898 p. 2012.

HE, J.; GIUSTI, M.M. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science Technology*, v.1, p.163-187, 2010.

HOGAN, S. *et al.* Antioxidant properties and bioactive components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Cabernet Franc (*Vitis vinifera*) wine grapes. *LWT – Food Science and Technology* 42, 1269–1274. 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola. Brasília: IBGE, 95 p. 2019.

IBRAF. Instituto Brasileiro de Frutas. Estatística: Comparativo das frutas processadas. 2017.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO, 31p. 2016.

JACKSON, R. S. Chemical constituents of grapes and wine. In: Wine Science: Principles and Applications. 3 ed. San Diego: Elsevier Inc. p270-331. 2008.

KAMMERER, D. *et al.* Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/ MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 4360–4367.2004.

KENNEDY, J. A.; SAUCIER, C.; GLORIES, Y. Grape and wine phenolics: History and perspective. American Journal of Enology and Viticulture, v. 57, n. 3, p. 239–248, 2006.

KISHINO, A.Y.; CARAMORI, P.H. Fatores climáticos e o desenvolvimento da videira. In: KISHINO, A.Y.; CARVALHO, S.L.C. de; ROBERTO, S.R. Viticultura tropical: o sistema de produção do Paraná. Londrina: IAPAR, 59-86 p. 2007.

LEÃO, P. C. de S.; SOARES, J. M. Implantação do Vinhedo. In: SOARES, J. M.; LEÃO, P. C. de S. A vitivinicultura no Semiárido brasileiro. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, Petrolina: Embrapa Semiárido, 756p. 2009.

LEEuw, R. *et al.* Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of Pinot Noir. Journal of Food Composition and Analysis, v. 36, n. 1–2, p. 40–50, 2014.

LIANG, Z. *et al.* Changes of Polyphenols, Sugars, and Organic Acid in

5 Vitis Genotypes during Berry Ripening. *Journal of Food Science*, v. 76, n. 9, p. 1231–1238, 2011.

LIMA, M. S. *et al.* Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. *Food Chemistry*, v. 161, p. 94–103, 2014.

LIMA, M. S. *et al.* Phenolic Compounds, Organic Acids and Antioxidant Activity of Grape Juices Produced in Industrial Scale by Different Processes of Maceration. *Food Chemistry*, v. 188, p. 384–392, 2015.

MAIA, J.D.G. *et al.* ‘BRS Vitória’— Nova cultivar de uva de mesa sem sementes com sabor especial e tolerante ao míldio. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. Comunicado técnico n. 126, 2012.

MACHADO, M. M. *et al.* Determination of polyphenol contents and antioxidant capacity of no-alcoholic red grape products (*Vitis labrusca*) from conventional and organic crops. *Química Nova*, v. 34, n. 5, p. 798–803, 2011.

MAGNUSSON, B.; ORNEMARK, U. *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2. ed. [s.l: s.n.].

MAJO, D. D. *et al.* The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chemistry*, v. 111, p. 45–49, 2008.

MANACH, C. *et al.* Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 81, n. 1, p. 230–242. 2005.

MANNS, D.C.; MANSFIELD, A.K. A core-shell column approach to a comprehensive high-performance liquid chromatography phenolic analysis of *Vitis vinifera* L. and interspecific hybrid grape juices, wines,

and other matrices following either solid phase extraction or direct injection. *Journal of Chromatography A*, 1251, 111–121.2012.

MATTIVI, F. *et al.* Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. v. 15, 27–35. 2009.

MARGRAF, T. *et al.* Effects of geographical origin, variety and farming system on the chemical markers and in vitro antioxidant capacity of Brazilian purple grape juices. *Food Research International*, v. 82, p. 145–155, 2016.

MONTEALEGRE, R.R *et al.* Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, n. 6–7, p. 687–693, 2006.

MOURA, M. S.B; TEIXEIRA, A.H.C; SOAREZ, J.M. Exigências Climáticas. In: SOARES, J. M.; LEÃO, P. C. de S. (Ed.). *A vitivinicultura no Semiárido brasileiro*. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, Petrolina: Embrapa Semiárido, 756p.2009.

MORVAI, M.; MOLNÁR-PERL, I. Simultaneous gas chromatographic quantitation of sugars and acids in citrus fruits, pears, bananas, grapes, apples and tomatoes. *Chromatographia*, v. 34, n. 9–10, p. 502–504, 1992.

MULERO, J.; PARDO, F.; ZAFRILLA, P. Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines. *Journal of Food Composition and Analysis* 23: 569-574. 2010.

NATIVIDADE, M. M. P. *et al.* Simultaneous analysis of 25 phenolic compounds in grape juice for HPLC: Method validation and characterization of São Francisco Valley samples. *Microchemical Journal*, v. 110, p. 665–674, 2013.

NIXDORF, S. L.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and

antioxidant capacity. *Analytica Chimica Acta*, v. 659, n. 1–2, p. 208–215, 2010.

OBON, J. M.; DIAZ-GARCIA, M. C.; CASTELLAR, M. R. Red fruit juice quality and authenticity control by HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 760–771. 2011.

ORGANISATION INTERNATIONALE DE LA VIGNE ET DU VIN – OIV. Compendium of International Methods of Analysis. Edition 2011, v. 1. Disponível em:
<http://www.oiv.int/oiv/info/frpublicationoiv#analysevin>

PADILHA, C.V,S *et al.* Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC / DAD : Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. *Food Chemistry*. v. 228, p. 106–115, 2017.

PADILHA, C.V,S *et al.* Phenolic compounds profile and antioxidant activity of commercial tropical red wines (*Vitis vinifera* L.) from São. Francisco Valley, Brazil. *J. Food Biochemistry*, v. 41, p.1–9, 2016.

PEDRO JR. M. J.; SENTELHAS, P. C. Clima e produção. In: *Uva: do plantio à produção, pós-colheita e mercado*. Editado por: Celso V. Pommer. – Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003.

PEREIRA, G.E. *et al.* Le poids des consommateurs sur évolution des vins: exemple de la Vallée du São Francisco, Brésil. In: Pérard, J., Perrot, M. (Org.). *Vin et civilisation. Les étapes de l'humanisation*. 1ed.Dijon: Centre Georges Chevrier, v. 9, p. 301-310, 2016.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOFF, F. Validation of new methods. *Forensic Science International*, v. 165, p. 216–224, 2007.

PINHO, C. *et al.* Assessing the anthocyanic composition of Port wines and musts and their free radical scavenging capacity. *Food Chemistry*, v. 131, p. 885–892, 2012.

PLAVŠA T. *et al.* The influence of skin maceration time on the phenolic composition and antioxidant activity of red wine Teran (*Vitis vinifera* L.). *Food Technol Biotechnology*. v. 50:152–158. 2012

POMMER, C.V. Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 109-294 p. 2003.

PRIEUR, C. *et al.* Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* 36, 781–784.1994.

RAMIREZ-LOPEZ, L. M *et al.* Simultaneous determination of phenolic compounds in Cynthiana grape (*Vitis aestivalis*) by high performance liquid chromatography–electrospray ionisation– mass spectrometry. *Food Chemistry*, 149, 15-24.2014

RASTIJA, V.; SREČNIK, G.; MEDIĆ-ŠARIĆ. Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins. *Food Chemistry*, v. 115, n. 1, p. 54–60, 2009.

RECAMALES, Á. F. *et al.* The effect of time and storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine. *Food Research International*, v. 39, n. 2, p. 220–229, 2006.

RIBÉREAU-GAYON, P.*et al.* Tratado de Enología: química del vino estabilización y tratamientos. 1ª. Ed. Buenos Aires: Hemisfério Sur, v.2, 537p. 2003.

RIBEIRO, T. P.; LIMA, M. A. C.; ALVES, R. E. Maturação e qualidade de uvas para suco em condições tropicais, nos primeiros ciclos de produção. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v.47, n.8, p.1057-1065, 2012.

RITSCHHEL, P. *et al.* ‘BRS Magna’ nova cultivar de uva para suco com ampla adaptação climática. *Comunicado Técnico* n. 125, 2012.

RITSCHHEL, P. *et al.* BRS Isis nova cultivar de uva de mesa vermelha, sem sementes e tolerante ao míldio. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. *Comunicado Técnico* n. 143, 2013.

RIBEIRO, T. P.; DE LIMA, M. A. C.; ALVES, R. E. Maturação e qualidade de uvas para suco em condições tropicais, nos primeiros ciclos de produção. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 47, n. 8, p. 1057–1065, 2012.

ROSINI, M. *et al.* Oxidative Stress in Alzheimer ' s Disease : Are We Connecting the dots?. *Journal of Medicinal Chemistry*, p. 11, 2014.

SAMOTICHA, J.; WOJDYLO, A.; GOLIS, T. Phenolic composition, physicochemical properties and antioxidant activity of interspecific hybrids of grapes growing in Poland. *Food Chemistry*, v. 215, p. 263–273, 2017.

SARTOR, S. *et al.* Particularities of Syrah wines from different growing regions of Southern Brazil: Grapevine phenology and bioactive compounds. *Journal of Food Science and Technology*, v. 54, 1414–1424. 2017.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SILVA, J. K. *et al.* Bioactive compounds of juices from two Brazilian grape cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 96, p. 1990-1996, 2016.

SILVA, L. R.; QUEIROZ, M. Bioactive compounds of red grapes from Dão region (Portugal): Evaluation of phenolic and organic profile. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 6, n. 4, p. 315–321, 2016.

SINGLETON, V. L. Oxygen with phenols and related reactions in muts, wines, and model systems: observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 38, p. 69-77, 1987.

SÔNIGO, O.R.; GARRIDO, L. da R.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, Circular técnica, 56, 25p. 2005.

TANG, X.L. *et al.* The cardioprotective effects of citric acid and L-malic acid on myocardial ischemia/reperfusion injury. Evidence based Complementary and Alternative Medicine. 11p. 2013

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 719P. 2004.

TEIXEIRA, A. H. C.; AZEVEDO, P. V. Zoneamento agroclimático para a videira europeia no estado de Pernambuco, Brasil. Revista Brasileira de Agrometeorologia, v. 4, n. 1, p. 139-145, 1996.

TEIXEIRA, A.H.C. 2010. Informações agrometeorológicas do pólo Petrolina, PE/ Juazeiro - 1963 a 2009. Petrolina: Embrapa Semiárido, 21p. (Embrapa Semiárido. Documentos, 233).

TEIXEIRA, A. H. C. Cultivo da videira – clima. Sistemas de Produção, n.1. Embrapa Semiárido. 2004.

TEIXEIRA, A.H.C *et al.* Berry phenolics of grapevine under challenging environments. International Journal of Molecular Sciences, v. 14, n. 9, p. 18711–18739, 2013.

TOALDO, I. M. *et al.* Bioactive potential of *Vitis labrusca* L. grape juices from the Southern Region of Brazil: Phenolic and elemental composition and effect on lipid peroxidation in healthy subjects. Food Chemistry, v. 173, p. 527–535, 2015.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. Pure Appl Chem. 2002; 74:835-55.

TONIETTO, J.; SOTÉS RUIZ, V.; GÓMEZ-MIGUEL, V. D. Clima, zonificación y tipicidad del vino en regiones vitivinícolas iberoamericanas. Madrid: CYTED, 411p. 2012.

TOSCANO, L. T. *et al.* Potential ergogenic activity of grape juice in runners. Applied Physiology, Nutrition & Metabolism, v. 40, n. 9, p. 899–906, 2015.

- TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. 2010.
- VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int.J Biochem Cell Biol.*, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.
- VIVC - Vitis International Variety Catalogue. Disponível em: <http://www.vivc.de/index.php?r=species%2Findex> . Acessado 22 jan 2017
- XU, C. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chemistry*, v. 119, n. 4, p. 1557–1565, 2010.
- WANG, R.; SUN, Q.; CHANG, Q. Soil types effect on grape and wine composition in Helan Mountain area f Ningxia. *PLoS ONE*, v. 10, n. 2, p. 1–12, 2015.
- WANG, J. *et al.* The Synthesis and Accumulation of Resveratrol Are Associated with Veraison and Abscisic Acid Concentration in Beihong (*Vitis vinifera* × *Vitis amurensis*) Berry Skin. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, n. November, p. 1605, 2016.

CAPÍTULO 2 - DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE FLAVONÓIDES E ÁCIDOS FENÓLICOS EM SUCOS E VINHOS DE UVAS POR RP-HPLC / DAD: VALIDAÇÃO DO MÉTODO E CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS COMERCIAIS DAS NOVAS VARIEDADES BRASILEIRAS DE UVA

Carla Valéria da Silva Padilha^{a, d}, Gabriela Aquino Miskinis^a,
Marcelo Eduardo Alves Olinda de Souza, Giuliano Elias Pereira^b,
Débora de Oliveira^c, Marilde Terezinha Bordignon Luiz^d, Marcos dos SantosLima^a

^aInstituto Federal do Sertão Pernambucano, Departamento de Tecnologia em Alimentos, Campus Petrolina, Rod. BR 407 Km 08, S/N, Jardim São Paulo, CEP 56314-520 Petrolina, PE, Brasil

^bEmpresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Semiárido/Uva e Vinho, Rodovia BR 428, Km 152, CP 23, CEP 56302-970 Petrolina, PE, Brasil

^cUniversidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Campus Trindade, Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil

^dUniversidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rod. Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, 88034-001 Florianópolis, SC, Brasil

Nota: O texto e dados discutidos neste capítulo foram reproduzidos ou adaptados da publicação de autoria de Carla V. S. Padilha, Gabriela A. Miskinis, Marcelo E.A.O Souza, Giuliano E. Pereira, Débora Oliveira, Marilde T. Bordignon-Luiz, Marcos S. Lima., disponível em Food Chemistry, v.228, p.106-115, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.01.137, reproduzido com permissão da Elsevier.

RESUMO

Um método para determinação rápida de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC), utilizando uma nova coluna de resolução rápida, foi validado e utilizado para caracterizar produtos comerciais produzidos com novas variedades brasileiras de uva do Nordeste do Brasil. A atividade antioxidante *in vitro* também foi medida. O método apresentou linearidade ($R > 0,9995$), boa precisão ($CV\% < 2,78$), recuperação (91,8 - 105,1%) e limites de detecção (0,04 - 0,85 mg L⁻¹) e quantificação (0,04 - 1,41 mg L⁻¹) de acordo com outros métodos previamente publicados com a diferença de um tempo de execução de apenas 25 minutos. Os resultados obtidos na caracterização das amostras diferiram para sucos e vinhos de outras regiões do mundo, principalmente devido aos altos valores de (-) - epigallocatequina e ácido *trans*-cafárico. Os produtos analisados apresentaram alta atividade antioxidante, principalmente as amostras de vinhos com valores superiores aos de vinhos de diferentes regiões do mundo.

Palavras-chave: compostos bioativos, atividade antioxidante, *Vitis labrusca* L., espécies reativas de oxigênio.

2.1 INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos são importantes metabólitos vegetais presentes nas uvas e derivados, como o vinho e os sucos. Essas substâncias estão relacionadas a características sensoriais, estabilidade química e associadas a diversos benefícios para a saúde dos consumidores desses produtos (GARRIDO; BORGES, 2013; CAMARGO *et al.*, 2014; TOALDO *et al.*, 2015). Em termos de quantidade, os principais fenólicos presentes nos vinhos e sucos pertencem às famílias de flavanóis, antocianinas e ácidos fenólicos (LEEuw *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2014; GRANATO *et al.*, 2015).

Os principais flavanóis encontrados em vinhos e sucos de uva são catequina, epicatequina, epigallocatequina e procianidinas B1, B2 e B3. Estes compostos estão associados ao paladar e a várias propriedades bioativas como atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, atividade antimicrobiana e anti-inflamatória (SCOLA *et al.*, 2010; LEEuw *et al.*, 2014; GRANATO *et al.*, 2016). As antocianinas são as principais substâncias responsáveis pela cor nos sucos de uva e vinhos, sendo as principais a malvidina, cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina e pelargonidina, cujas variedades *Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L. predominam nas formas de 3-monoglucosídeo e 3,5-diglucosídeo, respectivamente (NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010; GARRIDO; BORGES, 2013; LAMBRI *et al.*, 2015). Em produtos feitos de variedades híbridas (*Vitis vinifera* L. x *Vitis labrusca* L.) a presença de antocianinas ocorre em uma mistura de mono e diglicosídeos (LIMA *et al.*, 2014; GRANATO *et al.*, 2015). Os ácidos fenólicos são divididos em hidroxibenzóico (HBA) e hidroxicinâmico (HCA). Os principais ácidos HBA presentes nos sucos e vinhos são o protocatéico, vanílico, gálico e sirínico, e os principais HCA são p-cumárico, cafeico, ferúlico, cafárico, cutárico e fertárico (GARRIDO; BORGES, 2013; LEEuw *et al.*, 2014; TOALDO *et al.*, 2015; GRANATO *et al.*, 2016).

O Vale do Submédio do São Francisco (VSF), localizado no nordeste do Brasil, é uma região brasileira que tem investido na produção de sucos de uva com novas variedades brasileiras desenvolvidas para produzir sucos de alta qualidade, como a "Isabel Precoce" (*Vitis labrusca* L.) e os híbridos (*Vitis vinifera* L. x *Vitis labrusca* L.) "BRS Violeta", "BRS Cora" e "BRS Magna" (LIMA *et al.*, 2014), onde atualmente cinco empresas produzem cerca de 1,5 milhão de litros / ano de sucos comerciais com essas variedades. O suco de uva nesta região tem se destacado pela significativa concentração de compostos bioativos, alta

atividade antioxidante associada a compostos fenólicos, melhorando o efeito ergogênico em corredores recreacionais, atividade antioxidante *in vivo* e possível redução de marcadores inflamatórios associados ao seu consumo (NATIVIDADE *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2014; CAMARGO *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015; TOSCANO *et al.*, 2015). Considerando que o Brasil é um grande consumidor de vinhos de *Vitis labrusca* L. e híbridos, três empresas do VSF começaram a produzir vinhos com as novas variedades brasileiras. Até o momento não foram encontradas informações sobre a composição fenólica e potencial bioativo dos produtos desta região.

Nos últimos anos, métodos para determinação rápida de compostos fenólicos em suco de uva e vinho foram publicados. Na maioria dos estudos, esses compostos são analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (CLAE-FR) usando um tipo de coluna RP-C18 Core-Shell ou resolução rápida (RR) para separar compostos (MANNIS; MANSFIELD, 2012; DIAS, DAVID; DAVID, 2016; FONTANA, ANTONIOLLI; BOTTINI, 2016). Entretanto, não foram encontrados estudos descrevendo um método para determinação de compostos fenólicos em vinhos e sucos de uva utilizando uma coluna do tipo RP RP-C18 (100 x 4,6, 3,5 µm), sendo necessário realizar trabalhos para implementar este tipo de coluna em análise nestas matrizes como sendo uma opção para análises rápidas. A rápida separação de compostos em colunas de fase reversa diminui o tempo de execução dos métodos, o uso de solventes e lâmpadas de detectores de ultravioleta (UV), fotodiodos (DAD) e fluorescência (FD), minimizando o desgaste em vários componentes do sistema de HPLC.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi validar uma metodologia para determinação rápida de flavanóis, antocianinas e ácidos fenólicos em suco de uva e vinho por RP-HPLC / DAD utilizando uma nova coluna do tipo RR RP-C18 (100 x 4,6 mm, 3,5 µm) e depois aplicar o método validado para caracterizar amostras de suco de uva e vinhos comerciais produzidos com as novas variedades brasileiras de uva. Além disso, a atividade *in vitro* dos compostos estudados foi medida.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Padrões e reagentes

Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS) e 2,2-

difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O reagente Folin-Ciocalteu, álcool etílico, ácido fosfórico, fosfato de monopotássio e persulfato de potássio foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O metanol foi fornecido por J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). Água ultrapura obtida de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA) foi usada para preparar todas as soluções. Os padrões incluíram ácido gálico, ácido siríngico, ácido ρ -cumárico, ácido cafeico e ácido *trans*-cafárico, (+) - catequina, (-) - epicatequina galato, (-) - epigallocatequina, procianidina B1 e B2, cianidina 3,5-diglicosídeo, malvidina 3, 5-diglicosídeo, pelargonidina 3,5-diglicosídeo da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Malvidina 3-O-glicosídeo e peonidina 3-O-glicosídeo de Extrasintes (Genay, França).

2.2.2 Amostras

Para validar o método, foram analisadas amostras comerciais de suco de uva e vinho de novas cultivares de uvas brasileiras do VSF. A caracterização das amostras foi realizada pelo método previamente validado, onde foram coletados 8 produtos comerciais de indústrias local. Para cada amostra foram adquiridas 3 garrafas de diferentes lotes, totalizando 24 amostras. Os produtos comerciais correspondem a 5 rótulos de suco de uva, codificados como GJA, GJB, GJC, GJD e GJE e 3 de vinhos tintos, codificados como WF, WG, WH.

De acordo com as informações das indústrias, os sucos de uva foram elaborados com as uvas: Isabel Precoce e BRS Cora (amostras GJA e GJB); Isabel Precoce e BRS Magna (amostra GJC) e Isabel Precoce e BRS Violeta (amostras GJD e GJE). As uvas utilizadas na elaboração dos vinhos foram: Isabel Precoce e BRS Cora (amostras WF e WG) e Isabel Precoce e Bordô (amostra WH). Análises clássicas de pH, sólidos solúveis e acidez titulável foram realizadas para amostras de suco de uva. Valores variaram de 3,07 a 3,58 (pH); 16,3 a 21,9 ° Brix (sólidos solúveis); e 5,8 a 8,6 g L⁻¹ de equivalente tartárico (acidez titulável). As amostras de vinho variaram de 3,51-3,89 (pH) e 5,0-8,1 g L⁻¹ de equivalente tartárico (acidez titulável), respectivamente.

2.2.3 Instrumentos e condições

As análises foram realizadas utilizando um sistema Agilent 1260 Infinity LC (Santa Clara - EUA) equipado com bomba de solvente

quaternário modelo G1311C e degaseificador, compartimento de coluna termostaticado (G1316A), amostrador automático (G1329B) e detector de arranjo de diodos - DAD (G1315D). A coleta de dados e análises foram realizadas utilizando o software OpenLAB CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies, Santa Clara - EUA).

As condições cromatográficas utilizadas foram adaptadas da metodologia anteriormente descrita por Manns & Mansfield (2012). A detecção dos compostos foi realizada a 220 nm para (+) - catequina, (-) - epigallocatequina, (-) - epicatequina galato, procianidina B1 e procianidina B2; 280 nm para ácido gálico e ácido sirínico; 320 nm para ácido cafárico, ácido cafeico e ácido ρ -cumárico; e 520 nm para malvidina 3,5-diglicosídeo, cianidina 3,5-diglicosídeo, pelargonidina 3,5-diglicosídeo, peonidina 3-O-glicosídeo e malvidina 3-O-glicosídeo.

Os cromatogramas obtidos para as soluções padrão dos 15 compostos fenólicos estudados e seus respectivos tempos de retenção são apresentados na Figura 1. A coluna utilizada foi uma Zorbax Eclipse Plus RP-C18 (100 x 4,6 mm, 3,5 μm) (coluna de rápida resolução) e a pré-coluna foi Zorbax C18 (12,6 x 4,6 mm, 5 μm), ambas fabricadas pela Zorbax (EUA). A temperatura do forno foi mantida a 35 °C, o volume de injeção foi de 20 μL (suco de uva / vinho previamente diluído 500 μL + 1000 μL na fase A e filtração em membrana de 0,45 μm (Chromafil® Xtra, Macherey-Nagel - Alemanha)) a vazão foi de 0,8 mL min^{-1} . O gradiente utilizado na separação foi 0-5 min: 5% B; 5-14 min: 23% de B; 14-22 min: 26% de B; 22-25 min: 80% B, em que o solvente A foi uma solução 0,1M de ácido fosfórico (pH 2,0) e o solvente B foi acidificado com metanol com H_3PO_4 a 0,5%.

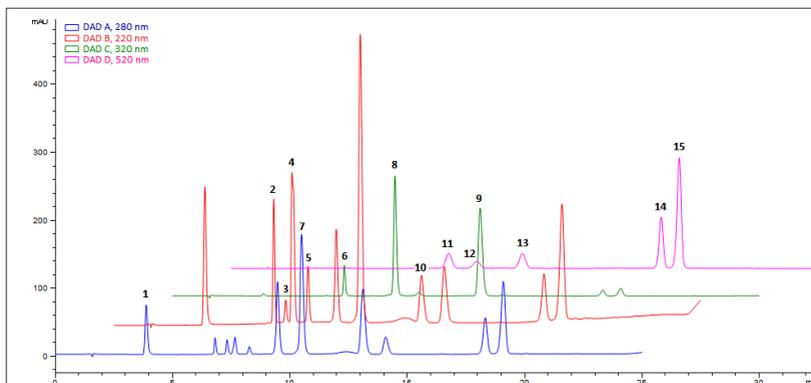
2.2.4 Validação do método

Os parâmetros de validação, segundo o guia de validação e controle de qualidade analítico publicado no Ministério da Agricultura do Brasil (BRASIL, 2011), utilizando ensaios com soluções padronizadas, amostras em branco e amostras enriquecidas, foram: linearidade, especificidade, precisão e exatidão da curva de calibração, recuperação e limites de detecção e quantificação.

2.2.4.1 Linearidade

Um método de calibração com padrão externo foi aplicado. Cinco soluções com diferentes concentrações de compostos fenólicos foram preparadas por diluições consecutivas na fase móvel A a partir de uma solução estoque. Curvas de calibração para concentração versus taxa de resposta foram plotadas para cada analito determinado a partir da análise de regressão usando o método dos mínimos quadrados.

Figura 1. Cromatogramas dos compostos fenólicos e seus respectivos tempos de retenção (RT). 1: ácido gálico (RT: 3,89); 2: procianidina B1 (RT: 6,81); 3: (-) - epigallocatequina (RT: 7,31); 4: (+) - catequina (RT: 7,65); 5. Procianidina B2 (RT: 8,26); 6. ácido t- caftárico (RT: 7.13); 7. ácido siríngico (RT: 10,48); 8. ácido p-cumarico (RT: 13,08); 9. ácido cafeico (RT: 9,46); 10. (-) – epicatequina galato (RT: 14,07); 11. Cianidina 3,5-diglicosídeo (RT: 9,28); 12. Pelargonidina 3,5-diglicosídeo (RT: 10,47); 13. Malvidina 3, 5-diglicósido (RT: 12,34); 14. Peonidina 3-O-glicosídeo (RT: 18,34); 15. Malvidina 3-O-glicosídeo (RT: 19,12).



2.2.4.2 Especificidade

Para avaliar a especificidade do método, foram injetadas amostras de vinho tinto e suco de uva. Os picos obtidos no cromatograma para os compostos examinados foram submetidos ao teste de limiar para avaliar a pureza do pico, estabelecendo o limite do fator de pureza ≥ 990 (fator de correspondência), com o software OpenLAB CDS 3D UV (Agilent

Technologies, EUA). O fator de correspondência representa o grau de similaridade entre os espectros. A comparação de dois espectros fornece o fator de correspondência, que foi definido como:

Fator de correspondência

$$= \frac{10^3 \times \left\{ \sum x \times y - \left(\frac{\sum x \times \sum y}{n} \right) \right\}^2}{\left\{ \sum x^2 - \left(\frac{\sum x \times \sum x}{n} \right) \right\} \times \left\{ \sum y^2 - \left(\frac{\sum y \times \sum y}{n} \right) \right\}}$$

Os valores x e y são a absorvância medida no primeiro e segundo espectro, respectivamente, no mesmo comprimento de onda; n é o número de pontos de dados e Σ a soma dos dados. Geralmente, valores acima de 990 indicam que os espectros são semelhantes. Valores entre 900 e 990 indicam alguma semelhança, e abaixo de 900 indicam que os espectros são diferentes (AGILENT, 2008).

2.2.4.3 Precisão e recuperação

A precisão foi avaliada pelo coeficiente de variação (CV%) obtido a partir dos resultados de seis injeções de suco de uva / vinho enriquecidos pela adição de padrões externos dos compostos estudados. O estudo da recuperação foi realizado adicionando a mesma amostra de suco de uva / vinho com soluções padrão dentro da faixa de concentrações. A recuperação foi calculada comparando os valores obtidos para cada composto em relação ao valor inicial contido na amostra.

2.2.4.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O LD e LQ foram obtidos considerando o método descrito por Hubaux & Vos (1970). Três padrões foram preparados em concentrações próximas ao LD estimado e analisados em triplicata. Uma curva analítica foi construída pela plotagem dos valores obtidos a partir da análise dos padrões versus os valores reais, obtendo-se a inclinação da curva, intercepto e coeficiente de correlação. O desvio padrão residual (RSD) foi calculado comparando os valores obtidos na análise dos valores reais. LD e LQ foram estabelecidos como 3 e 10 vezes o RSD, respectivamente, adicionados com o intercepto da curva.

2.2.5 Composição bioativa: fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais

O teor total de compostos fenólicos do vinho tinto e do suco de uva foi determinado em 765 nm após a reação com o reagente de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). O ácido gálico foi utilizado como padrão e as concentrações fenólicas nas amostras de vinho e suco foram expressas em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) / L de vinho / suco de uva.

O teor total de antocianinas monoméricas foi determinado pelo método diferencial de pH descrito por Giusti & Wrolstad (2001). As amostras foram diluídas com soluções tampão de KCl 0,025 M (pH 1,0) e CH₃COONa 0,4 M (pH 4,5) e medidas de absorvância foram realizadas a 520 e 700 nm, respectivamente. A concentração de antocianinas monoméricas totais foi expressa como equivalentes de malvidina-3-glicosídeo em mg L⁻¹.

2.2.6 Atividade antioxidante

Os ensaios antioxidantes *in vitro* foram realizados para determinar a capacidade de captura de radicais livres utilizando o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (KIM *et al.*, 2002) e radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)) (RE *et al.*, 1999) e pelo método peróxido de hidrogênio (RUCH *et al.*, 1989). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Um padrão analítico (Trolox) foi utilizado para construir as curvas de calibração (0,2 a 2,0 mM L⁻¹). Os resultados foram expressos como equivalentes Trolox por litro de produto (mM TEAC L⁻¹).

ABTS: O radical ABTS (1 mM) foi formado pela reação de 7 mM de ABTS em persulfato de potássio a 140 mM na ausência de luz durante 16 h. A solução foi então diluída em etanol até uma absorvância de 0,700 ± 0,05. A atividade de eliminação do radical ABTS das amostras foi determinada utilizando a taxa de decaimento na absorvância a 734 nm, determinada no tempo t = 0 min e no tempo t = 6 min após a adição das amostras.

DPPH: a atividade antioxidante das amostras pelo método DPPH foi determinada pela taxa de decaimento na absorvância a 517 nm. A solução do radical DPPH (1 mM) foi preparada em etanol e diluída para

uma absorvância de $0,900 \pm 0,05$. A absorvância da solução de DPPH foi determinada no tempo $t = 0$ min e 30 min após a adição da amostra.

Atividade de Captura de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2): Uma solução de $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio foi preparada em tampão fosfato (pH 7,4) e sua concentração foi determinada espectrofotometricamente a partir da absorção a 230 nm. As amostras de suco de uva e vinho tinto (0,4 mL) foram misturadas com solução de peróxido de hidrogênio (0,6 mL) e o volume final foi completado para 3 mL com o tampão fosfato. O valor de absorvância da mistura reacional foi registado a 230 nm e determinado 10 minutos mais tarde contra uma solução em branco contendo o tampão fosfato. A atividade de eliminação foi calculada com a equação:

$$\text{Atividade de captura do } H_2O_2 (\%) = [(ABS_{\text{Controle}} - ABS_{\text{Amostra}}) / (ABS_{\text{Controle}})] \times 100$$

Onde: ABS Controle é a absorvância do radical H_2O_2 + tampão fosfato e ABS Amostra é a absorvância do H_2O_2 + amostra ou Trolox. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.2.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS versão 17.0 para Windows (SPSS, Chicago, EUA). Os resultados obtidos na caracterização das amostras foram previamente avaliados em termos de normalidade, pelo teste de Shapiro-Wilk, e posteriormente submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com probabilidade de erro de 5% (GRANATO, CALADO, JARVIS, 2014).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Validação do método

Antes da validação do método, diferentes gradientes de eluição foram estudados para obter as melhores condições para a separação dos compostos na coluna utilizada.

2.3.1.1 Linearidade e especificidade

Os valores obtidos para o coeficiente de correlação (R) e fator de pureza dos picos são mostrados na Tabela 1. Os valores R para os 15 compostos fenólicos analisados variaram de 0,9995 a 1,0000 e demonstraram boas curvas de linearidade e calibração. Segundo Brasil (2011) os valores de R para curvas de calibração devem ser maiores que 0,99, o que confirma que a linearidade obtida neste trabalho para a resposta a padrões externos é adequada para a finalidade pretendida.

A especificidade é a capacidade de um método medir exatamente uma substância na presença de outros componentes que possam estar presentes na amostra, tais como impurezas, produtos de degradação e outros componentes da matriz (EUROCHEM, 2014). Neste método, a especificidade foi avaliada com o uso do teste de limiar utilizando o fator de pureza espectral (*match factor*) para os compostos estudados em matrizes reais, como mostrado na Figura 2 para um pico de epigallocatequina em suco de uva.

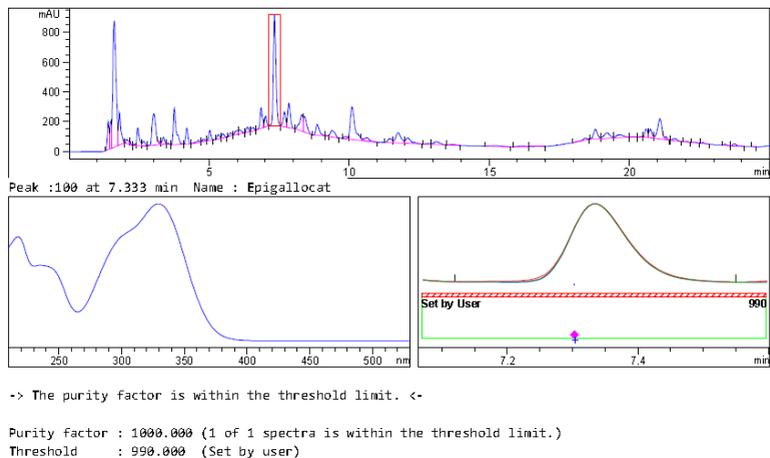
Os valores obtidos para o fator de pureza foram ≥ 990 para ácido siríngico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido caftárico, catequina, epicatequina galato, epigallocatequina, procianidina B2 e peonidina 3-glicosídeo (Tabela 1) e indicam que os picos obtidos para estes compostos são puros. Para a procianidina B1 e malvidina 3,5-diglicosídeo os valores do fator de pureza foram 955 e 909, respectivamente, e indicam que existe uma boa possibilidade de os picos obtidos para estes compostos serem puros. Os compostos ácido gálico e malvidina 3-glicosídeo obtiveram fatores de pureza menores que 900, o que sugere a possibilidade de existir interferência de outras substâncias no mesmo tempo de retenção.

Os resultados obtidos para a especificidade foram considerados adequados para os fins propostos, uma vez que na maioria dos picos obtidos para os compostos estudados obtiveram boa pureza espectral. Destaca-se também a boa separação obtida para análise simultânea dos 15 compostos fenólicos estudados numa corrida única de 25 minutos.

O método utilizado neste trabalho foi considerado rápido uma vez que em métodos de determinações de compostos fenólicos em sucos de uva e vinhos por RP-HPLC utilizando colunas clássicas tipo RP-C₁₈ (250 x 4.6 mm, 5 μ m) os tempos de corrida variam de 43 a 86 min (GÓMEZ-ALONSO, GARCIA-ROMERO, HERMOSIN-GUTIÉRREZ, 2007; OBÓN, DÍAZ-GARCÍA, CASTELLAR, 2011; RAMIREZ-LOPEZ *et al.*, 2014). E em métodos utilizando colunas RR (150 x 4.6 mm, 3 μ m) e

Core-Shell (100 x 4.6 mm, 2.6 μm) os tempos de corrida variaram de 14 a 55 minutos (TAROLA, MILANO, GIANETTA, 2007; NATIVIDADE *et al.*, 2013; MANNIS; MANFIELD, 2012).

Figura 2. Teste de limiar para verificação da pureza espectral do pico de (-) - epigalocatequina (DAD 220 nm) em uma corrida de suco de uva.



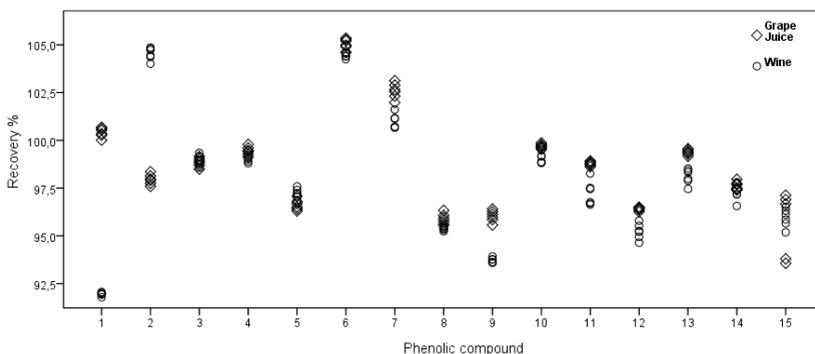
2.3.1.2 Precisão e recuperação

Os valores obtidos para a precisão (CV%) dos compostos analisados variaram de 0.09 a 2.78 para os sucos de uva e 0.11 a 0.66 para vinho tinto. Os valores de CV% obtidos para os 15 compostos fenólicos estudados foram menores que o limite máximo de 20% recomendado pela legislação brasileira para as faixas de concentração estudadas (BRASIL, 2011).

Os resultados obtidos para o percentual de recuperação dos compostos (RC%) nas amostras fortificadas estão apresentados na Figura 3. Os valores de RC% variaram entre 94.8 e 105.1 para matriz suco de uva e 91.8 e 104.5 para os vinhos tintos. Estes valores estão de acordo com os limites aceitáveis pela legislação brasileira que é de 90 a 107% (Brasil, 2011), e também foram semelhantes aos obtidos em diversos estudos que validaram metodologias para determinação de compostos fenólicos em vinhos e sucos de uva por RP-HPLC com detecção no ultravioleta (UV), arranjos diodos (DAD), fluorescência (FD) e espectro

de massas (MS) (TAROLA, MILANO, GIANETTA, 2007; NATIVIDADE *et al.*, 2013; DIAS, DAVID; DAVID, 2016).

Figura 3. Percentual de recuperação individual obtido para as seis repetições de amostras de sucos de uva e vinho tinto analisadas em condições de reprodutibilidade 1. 1. Ácido gálico; 2. Ácido siríngico; 3. Ácido ρ -cumárico; 4. Ácido cafeico; 5. Ácido t-caftárico; 6. (+) - Catequina; 7. (-) - Epicatequina galato; 8. (-) - Epigallocatequina; 9. Procianidina B1; 10. Procianidina B2; 11. Cianidina 3,5-diglicosídeo; 12. Malvidina 3,5-diglicosídeo; 13. Pelargonidina 3,5-diglicosídeo; 14. Peonidina 3-O-glicosídeo; 15. Malvidina 3-O-glicosídeo.



2.3.1.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Para obter os valores LD e LQ, os valores de desvio padrão dos resíduos (RSD) foram multiplicados por 3 e 10, respectivamente, e adicionados à intercepção da curva próxima ao LD estimado (HUBAUX; VOS, 1970).

Para os 15 compostos fenólicos estudados, o LD e LQ variaram de 0,04 a 0,85 mg L⁻¹ e 0,04 a 1,41 mg L⁻¹, respectivamente (Tabela 1). Os valores de LD e LQ obtidos neste estudo estão de acordo com os encontrados em outros estudos de validação para análise de compostos fenólicos em sucos e vinhos por HPLC-UV (TAROLA, MILANO, GIANETTA, 2007), HPLC-DAD (MANNES; MANSFIELD, 2011), HPLC-DAD-FD (NATIVIDADE *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015) e HPLC-DAD-MS (DAVID; DAVID, 2016), demonstrando que o método estudado apresenta boa sensibilidade para quantificar esses compostos.

Tabela 1: Resultados para os parâmetros de validação do método de determinação rápida de compostos fenólicos em vinhos e sucos de uva por RP-HPLC / DAD.

Compostos fenólicos	Faixa de calibração (mg L ⁻¹)	Curva de calibração	Coeficiente de correlação (r)		Precisão (CV%)		Especificidade (fator de pureza)	RSD	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
			Suco de uva	Vinho tinto	Suco de uva	Vinho tinto				
<i>Ácidos fenólicos</i>										
Ácido gálico	0,55 - 17,5	Y= 7,953X + 2,480	0,9995	0,25	0,12	872	0,0024	0,12	0,14	
Ácido siríngico	0,55 - 17,5	Y= 47,315X + 1,255	0,9999	0,28	0,31	1000	0,0028	0,11	0,13	
ácido p-cumárico	0,55 - 17,5	Y= 14,626X - 0,154	1,0000	0,24	0,27	1000	0,0025	0,10	0,12	
Ácido caféico	0,55 - 17,5	Y= 19,929X - 0,225	1,0000	0,23	0,24	1000	0,0025	0,10	0,12	
Ácido cateárico	0,55- 17,5	Y= 5,039X + 0,190	0,9999	0,29	0,27	1000	0,0010	0,09	0,10	
<i>Flavonols</i>										
(+)-Catequina	0,55- 17,5	Y= 24,639X + 0,705	0,9999	0,26	0,13	995	0,0008	0,06	0,07	
(-)- Epicatequina galato	0,55 - 17,5	Y= 9,072X + 0,352	0,9997	0,40	0,37	1000	0,0019	0,06	0,07	
(-)- Epigallocatequina	0,55 - 17,5	Y= 3,615X + 0,405	0,9995	0,29	0,11	1000	0,0014	0,04	0,05	
Procianidina B1	0,31 - 10,0	Y=37,953X - 1,980	0,9998	0,31	0,14	955	0,0025	0,10	0,12	
Procianidina B2	0,31 - 10,0	Y= 16,174X + 0,274	0,9998	0,12	0,27	1000	0,0003	0,04	0,04	
<i>Antocianinas</i>										
Cianidina 3,5-diglicosídeo	0,55 - 17,5	Y= 2,456X + 0,043	0,9999	0,11	0,66	743	0,0013	0,07	0,08	
Malvidina 3,5-diglicosídeo	0,55 - 17,5	Y= 0,507X - 0,018	1,0000	0,09	0,43	909	0,0045	0,24	0,28	
Pelargonidina 3,5-diglicosídeo	0,55 - 17,5	Y= 1,146X +0,053	0,9998	0,14	0,41	ND	0,0005	0,05	0,05	
Peonidina 3-O-glicosídeo	0,55- 17,5	Y= 8,557X - 0,200	1,0000	0,22	0,52	1000	0,0029	0,11	0,13	

Malvidina 3-O-
glicosideo

2,74 - 87,5 Y= 3,728X - 0,608 1,0000 2,78 0,50 972 0,0805 0,85 1,41

Os termos limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD) são usados para demonstrar a capacidade do método de quantificar / detectar baixas concentrações de uma substância (EURACHEM, 2014). Os valores de LD e LQ obtidos na validação deste método são considerados adequados para a finalidade pretendida, uma vez que eram menores que os valores mínimos normalmente relatados na literatura para caracterização de amostras de vinho e suco de uva (LIMA *et al.*, 2014; LEEUW *et al.*, 2014; TOALDO *et al.*, 2015; GRANATO *et al.*, 2015).

2.3.2 Caracterização de produtos comerciais produzidos com as novas variedades brasileiras de uva

2.3.2.1 Teor de fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais

Os resultados da determinação do teor de fenólicos totais em vinhos tintos e suco de uva produzidos com as novas cultivares brasileiras pelo método de Folin-Ciocalteu são apresentados na Tabela 2. O teor total de fenólicos variou de 2135 a 2647 mg L⁻¹ para os sucos de uvas e de 2003 a 4036 mg L⁻¹ para os vinhos tintos.

Os valores de fenólicos totais obtidos neste estudo estão de acordo com os citados no trabalho que avaliou 62 amostras de sucos de uva orgânicos e convencionais (*Vitis labrusca* L.) originários do sul do Brasil, cujos valores variaram de 1351 a 2712 mg L⁻¹ (MAGRAF *et al.*, 2016). Para vinhos tintos, os resultados são consistentes com os relatados na literatura para vinhos tintos comerciais de diferentes regiões do mundo (faixa de 282-3476 mg L⁻¹) (LEEUW *et al.*, 2014).

Os valores obtidos para as antocianinas monoméricas totais pelo método do pH-diferencial também são mostrados na Tabela 2. Para os sucos de uva os valores variaram de 88,4 a 370,8 mg L⁻¹. Para os vinhos tintos, os valores das antocianinas monoméricas variaram de 59,2 a 284,6 mg L⁻¹. As concentrações totais de antocianinas monoméricas obtidas nos sucos estão de acordo com o relatado na literatura para o suco de uva comercial produzido a partir de cultivares de *Vitis labrusca* L. em diferentes regiões do Brasil, cujos valores variaram de 74 a 424 mg L⁻¹ (MARGRAF *et al.*, 2016). Para os vinhos, os valores são consistentes com os relatados por Lima *et al.* (2011) para cultivar Bordô (*Vitis labrusca* L.) originária do Sul do estado do Paraná, sul do Brasil.

Tabela 2: Compostos fenólicos individuais de sucos de uvas e vinhos tintos comerciais de novas cultivares brasileiras (*Vitis labrusca* L. e híbridos) plantadas no Vale do São Francisco, no nordeste do Brasil.

Compostos fenólicos	Sucos de uva				Vinhos			
	GJA	GJB	GJC	GJD	GJE	WF	WG	WH
<i>Ácidos fenólicos</i>								
Ácido gálico	4,5 ± 0,4c	3,6 ± 2,9c	16,7 ± 3,5b	7,6 ± 1,2c	6,5 ± 1,0c	26,4 ± 1,1a	24,7 ± 1,0a	16,9 ± 2,6b
Ácido siríngico	1,1 ± 0,1c	1,9 ± 1,0c	5,1 ± 0,5a	5,6 ± 0,4a	2,5 ± 0,3b	2,1 ± 0,2ab	2,0 ± 0,1ab	1,1 ± 0,3c
Ácido p-cumárico	2,2 ± 0,1e	2,6 ± 2,0de	10,0 ± 3,2bc	7,2 ± 1,8cd	4,3 ± 0,1de	2,6 ± 0,1de	15,8 ± 0,1a	13,7 ± 2,8ab
Ácido caféico	3,1 ± 0,4d	5,1 ± 2,7cd	12,8 ± 1,7ab	14,9 ± 1,3a	6,7 ± 0,1bcd	3,6 ± 0,1d	18,8 ± 0,1a	11,7 ± 6,2abc
Ácido caftárico	274,9 ± 21,5abc	233,9 ± 179,4abc	365,5 ± 47,6a	343,0 ± 22,2ab	290,7 ± 0,3ab	6,6 ± 5,9d	167,4 ± 0,9bcd	91,3 ± 21,4cd
∑ Ácidos fenólicos	285,8 ± 22,5	247,1 ± 188,0	410,1 ± 56,5	378,4 ± 26,9	310,7 ± 1,8	41,3 ± 7,4	228,7 ± 2,2	134,7 ± 33,3
<i>Flavanóis</i>								
(+)-Catequina	9,4 ± 0,6b	9,1 ± 0,9b	15,0 ± 1,4b	7,4 ± 3,6b	13,6 ± 0,2b	9,8 ± 4,3b	12,8 ± 0,2b	24,5 ± 5,5a
(-)-Epicatequina galato	ND	0,9 ± 0,9a	ND	ND	0,7 ± 0,1a	3,3 ± 3,1a	ND	1,7 ± 0,9a
(-)-Epigallocatequina	275,1 ± 21,5ab	232,9 ± 176,9ab	368,2 ± 46,7a	349,1 ± 25,9a	284,4 ± 0,1ab	217,7 ± 5,1ab	265,1 ± 0,0ab	128,5 ± 27,0b
Procianidina B1	7,1 ± 0,0abc	4,4 ± 3,1c	9,9 ± 0,9ab	5,4 ± 2,5bc	4,2 ± 0,2bc	11,0 ± 0,3a	7,6 ± 0,0abc	6,9 ± 2,4abc

Tabela 2. (Continuação)

Compostos fenólicos	Sucos de uva						Vinhos		
	GJA	GJB	GJC	GJD	GJE	WF	WG	WH	
Procianidina B2	5,8 ± 0,1d	9,5 ± 3,8cd	17,0 ± 1,7ab	10,3 ± 4,9cd	8,9 ± 0,4d	29,3 ± 0,2a	23,6 ± 0,0ab	26,3 ± 4,3a	
Σ flavanols	297,4 ± 22,2	256,8 ± 185,6	410,1 ± 50,7	372,2 ± 36,9	311,8 ± 1,0	271,1 ± 13,0	309,1 ± 0,2	187,9 ± 40,1	
<i>Antocianinas</i>									
Cianidina 3,5-diglicosídeo	ND	12,8 ± 9,9bc	1,5 ± 0,5cd	4,2 ± 1,5bcd	25,1 ± 0,0a	0,8 ± 0,8d	6,0 ± 0,0bcd	13,2 ± 5,4b	
Malvidina 3,5-diglicosídeo	8,9 ± 0,5c	9,8 ± 1,2c	11,9 ± 1,5c	17,3 ± 5,1c	136,5 ± 0,0a	ND	12,2 ± 0,0c	53,7 ± 20,5b	
Pelargonidina 3,5-diglicosídeo	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Peonidina 3-O-glicosídeo	1,6 ± 0,2ab	1,5 ± 0,9ab	2,2 ± 0,9b	0,7 ± 0,1c	5,1 ± 0,0a	0,4 ± 0,1c	0,4 ± 0,0c	0,4 ± 0,1c	
Malvidina 3-O-glicosídeo	10,5 ± 1,3c	12,5 ± 3,8b	10,7 ± 3,0c	3,3 ± 0,6c	36,8 ± 0,0c	7,7 ± 0,8a	6,9 ± 0,0c	2,4 ± 0,0c	
Σ Antocianinas	21,0 ± 2,0	36,6 ± 15,8	26,3 ± 5,9	25,5 ± 7,3	203,5 ± 0,0	8,9 ± 1,7	25,5 ± 0,0	69,7 ± 26,0	
AMT [†]	88,4 ± 1,4c	177,9 ± 2,5bc	95,5 ± 32,1c	122,6 ± 58,0bc	370,8 ± 125,1a	59,2 ± 4,0c	201,0 ± 63,3bc	284,6 ± 120,8ab	
Fenólicos totais [§]	2507 ± 287bcd	2221 ± 256cde	2579 ± 150bc	2647 ± 287b	2135 ± 100de	4036 ± 133a	2607 ± 246bc	2003 ± 257e	

Valores em negrito referem-se à soma de cada coluna.

As médias seguidas das mesmas letras nas mesmas linhas não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

[†]AMT: Antocianinas monoméricas totais, quantificadas pela técnica de diferença de pH e expressas como equivalentes à malvidina 3-glicosídeo.

[§] Fenólicos totais medidos com Folin – Ciocalteu expressos em mg L⁻¹ equivalentes ao ácido gálico.

2.3.2.2 Ácidos fenólicos

Os resultados obtidos para os ácidos fenólicos são apresentados na Tabela 2. O total de ácidos fenólicos quantificados variou de 247,1 a 410,1 mg L⁻¹ para os sucos de uva, e de 41,3 a 228,7 mg L⁻¹ para os vinhos. Em relação aos ácidos fenólicos individuais, o ácido caftárico foi o principal composto presente, com valores variando de 233,9 a 365,5 mg L⁻¹ nas amostras de sucos de uva e de 6,6 a 167,4 mg L⁻¹ nos vinhos.

Outros estudos que caracterizaram ácidos fenólicos em sucos de uva e vinhos tintos de cultivares *V. labrusca* também mencionaram o ácido caftárico como sendo o principal ácido fenólico presente (NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010; TOALDO *et al.*, 2015; MAGRO *et al.*, 2016).

De acordo com Penna & Daut (2001) o ácido caftárico é facilmente oxidável durante as etapas de vinificação, principalmente nas fermentações, o que poderia explicar os menores valores encontrados nas amostras de vinhos em comparação com os sucos de uva.

Os valores de ácido caftárico obtido nas amostras de vinho estudadas (6,6 a 167 mg L⁻¹) estão de acordo com os mencionados por Nixdorf & Hermosín-Gutiérrez (2010) para vinhos da variedade Isabel (*Vitis labrusca*) produzidos no Sul do Brasil e com a faixa encontrada em vinhos (*Vitis vinifera* L.) de diversas cultivares clássicas como Cabernet Sauvignon, Merlot, Malbec e Pinot Noir elaborados em diversos países tradicionais na produção de vinhos como França, Argentina, Chile, Itália e Estados Unidos, cujo os valores variam de 23,1 a 105,6 mg L⁻¹ (LEEUEW *et al.*, 2014).

As amostras de suco de uva apresentaram valores de ácido caftárico (233,9 a 365,5 mg L⁻¹) superiores aos reportados na literatura para diversas amostras de sucos de uva (*Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L.) convencionais, orgânicos e biodinâmicos, originados do Sul e Sudeste do Brasil, Espanha e outros países da Europa, cujo os valores médios variaram de 6,0 a 222,9 mg L⁻¹ (MORENO-MONTORO *et al.*, 2014; GRANATO *et al.*, 2015; TOALDO *et al.*, 2015; MAGRO *et al.*, 2015), sugerindo que este composto possa ser um importante marcador químico para os sucos de uva das novas variedades brasileiras produzidos no Vale do Submédio São Francisco, Nordeste do Brasil. Ressalta-se ainda que em estudos que caracterizaram compostos fenólicos em sucos de uva produzidos no Nordeste do Brasil não foi avaliado a presença do ácido

caftárico (NATIVIDADE *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015).

Para os ácidos hidroxibenzóicos, gálico e siríngico, os valores médios nas amostras de sucos variam entre 3,6 a 16,7 e 1,1 a 5,6 mg L⁻¹, respectivamente. Nos vinhos os valores variaram de 1,1 a 2,1 e 16,9 a 26,4 mg L⁻¹ para os ácidos siríngico e gálico, respectivamente. Para os ácidos hidroxicinâmicos, caféico e *p*-cumárico, os valores médios nos sucos de uva variaram entre 3,1 a 14,9 e 2,2 a 10 mg L⁻¹, respectivamente. Nos vinhos os valores médios para os ácidos cafeico e *p*-cumárico variaram entre 3,6 a 18,8 e 2,6 a 15,8 mg L⁻¹, respectivamente.

Os valores obtidos para os ácidos gálico, siríngico, *p*-cumárico e cafeico nas amostras de sucos de uva e vinhos estudadas estão de acordo com os mencionados em diversas caracterizações de sucos de uva e vinhos elaborados com variedades *Vitis labrusca* clássicas como Isabel, Bordô e Concord (NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010; LIMA *et al.*, 2011; MAGRO *et al.*, 2016; TOALDO *et al.*, 2015; MARGRAF *et al.*, 2016) e com os valores anteriormente mencionados para sucos das novas variedades brasileiras de uva plantadas no Nordeste do Brasil (LIMA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015).

2.3.2.3 Flavonóis

Os flavanóis totais quantificados variaram de 256,8 a 410,1 mg L⁻¹ em suco de uva e 187,9 a 309,1 mg L⁻¹ em vinho tinto (Tabela 2). Entre os principais compostos quantificados individualmente, a epigallocatequina foi encontrada em concentrações que variaram de 275,1 a 368,2 mg L⁻¹ e 128,5 a 217,7 mg L⁻¹ para amostras em suco de uva e vinho tinto, respectivamente.

A epigallocatechin (PubChem CID: 72277) é um composto pouco estudado na uva e em produtos derivados, sendo normalmente caracterizado em chá verde (*Camellia sinensis* L.) (El-Shahawi *et al.*, 2012). Em produtos derivados da uva normalmente se quantifica a epigallocatequina galato, entretanto, a epigallocatequina é mencionada por Mattivi, Vrhovsek, Masuero & Trainotti (2009) como sendo um dos principais flavanóis monoméricos presentes em extratos de casca de uvas *Vitis vinifera* L. como Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah, Pinot Noir, Teroldego e Marzemino.

Os valores de epigallocatequina obtidos nas amostras de vinhos e e sucos de uva comerciais do VSF foram considerados altos pois

representaram entre 5,37 e 14,27% dos seus conteúdos fenólicos totais, respectivamente, evidenciando que este composto pode se tratar de um importante marcador químico que caracterize os produtos desta região.

Os valores de procianidina B2 nos sucos de uva variaram de 5,8 a 17,0 mg L⁻¹, e entre 23,6 a 29,3 mg L⁻¹ nos vinhos. Em relação a procianidina B1 os valores nas amostras de suco de uva (5,8 a 17 mg L⁻¹) foram menores que nos vinhos (23,6 a 29,3 mg L⁻¹). Para catequina os valores obtidos variaram de 7,4 a 15 mg L⁻¹ e 9,8 a 24,5 mg L⁻¹ nas amostras de sucos de uva e vinhos, respectivamente. Em relação a epicatequina galato os valores variaram de não detectado a 3,3 mg L⁻¹ em todas as amostras estudadas.

Os valores encontrados neste estudo para procianidina B1 e B2, catequina e epicatequina galato estão de acordo com a faixa de valores mencionada em diversos trabalhos que caracterizaram sucos de uva e vinhos tintos elaborados com cultivares *Vitis labrusca* clássicas como Isabel, Bordô e Concord no Sul e Sudeste do Brasil (LIMA *et al.*, 2011; GRANATO *et al.*, 2015; TOALDO *et al.*, 2015); estando também acordo com os valores anteriormente mencionados para sucos de uva das novas variedades de uvas brasileiras plantadas no Nordeste do Brasil (LIMA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015).

2.3.2.4 Antocianinas individuais

O total de antocianinas individuais quantificadas por HPLC variou de 8,9 a 203,5 mg L⁻¹ nas amostras de vinhos e sucos de uva analisadas (Tabela 2). Dentre as antocianinas estudadas as principais encontradas, em ordem decrescente, foram a malvidina 3,5-diglicosídeo, malvidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina 3,5-diglicosídeo, que apresentaram perfil heterogêneo nos produtos comerciais estudados, conforme anteriormente observado por Lima *et al.*, (2014) para sucos das novas variedades brasileiras de uva.

Para a malvidina 3,5-diglicosídeo os valores variaram de 8,9 a 136,5 mg L⁻¹ e <LD a 53,7 mg L⁻¹ nas amostras de sucos e vinhos, respectivamente. A malvidina-3-*O*-glicosídeo apresentou valores que variaram de 3,3 a 36,8 e 2,4 a 7,7 mg L⁻¹ nas amostras de suco de uva e vinho, respectivamente. Para a cianidina 3,5-diglicosídeo nos sucos de uva e vinhos a faixa de valores encontrada variou de <LD a 25,1 e 0,8 a 13,2 mg L⁻¹, respectivamente.

Os valores obtidos para antocianinas nos sucos de uva e vinhos comerciais estudados estão de acordo com a faixa de valores encontrada para vinhos e sucos produzidos com cultivares *V. labrusca* e híbridos originados do Brasil (NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010; LAGO-VANZELA *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2015; GRANATO *et al.*, 2015).

2.3.2.5 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante *in vitro* dos sucos de uva e vinhos foi medida pelos métodos de sequestro de radicais livres (DPPH e ABTS) e espécies reativas de oxigênio (H_2O_2), ambos expressos como equivalentes ao Trolox em milimols por litro de amostra (mM TEAC L⁻¹) (Figura 4).

Nas amostras de suco de uva a atividade antioxidante (AOX) medida por DPPH e ABTS variou de 10,03 a 14,38 e 12,47 a 18,13 mM TEAC L⁻¹, respectivamente. Nos vinhos tintos os valores variaram entre 10,89 a 18,28 e 17,65 a 29,21 mM TEAC L⁻¹ para DPPH e ABTS, respectivamente.

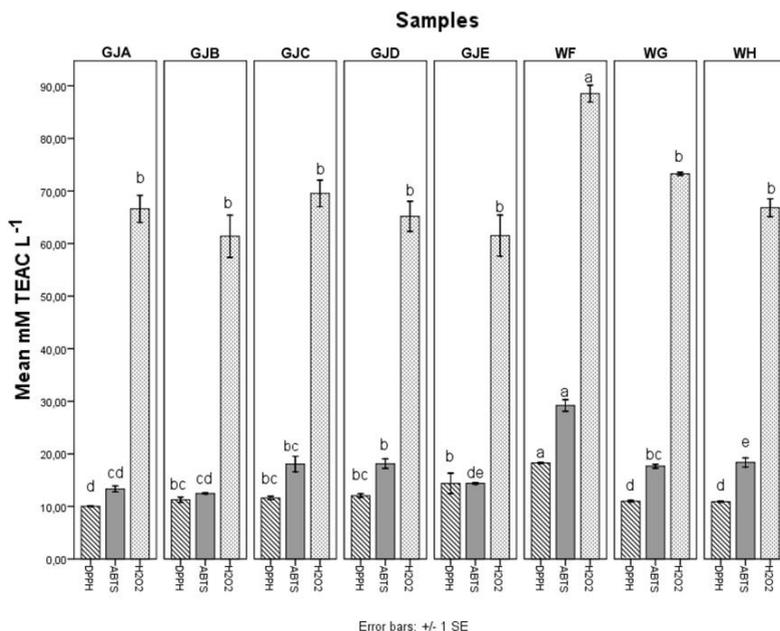
Os valores de AOX, obtidos por DPPH e ABTS, nas amostras de suco de uva estudadas estão de acordo com diversos trabalhos que caracterizaram sucos de uva de diferentes regiões de origem, espécies, cultivares, sistemas de cultivo e condições de processo, onde os valores de AOX normalmente chegam até 27 mM TEAC L⁻¹ (GRANATO *et al.*, 2016). Com exceções para sucos das novas variedades brasileiras de uva plantadas no Nordeste do Brasil e sucos (*Vitis labrusca* L.) originados de Santa Catarina – Sul do Brasil onde são mencionados valores de até 54,19 mM TEAC L⁻¹ para DPPH e ABTS (LIMA *et al.*, 2014; TOALDO *et al.*, 2015).

Em relação as amostras de vinhos estudadas os valores de AOX foram considerados altos, pois o maior valor de AOX (DPPH e ABTS) encontrado na literatura foi de 23,17 mM TEAC L⁻¹ em vinhos *Vitis vinifera* L. de Santa Catarina, Sul do Brasil, pelo método com ABTS (GRIS *et al.*, 2011). Em trabalho realizado por Leeuw *et al.* (2014) foram avaliadas 38 amostras de vinhos de cultivares clássicas como Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah, Pinot Noir e Malbec de países como França, Itália, Estados Unidos, Chile, Austrália e Argentina, onde os valores de AOX variaram de 3,71 a 7,67 mM TEAC L⁻¹ pelo método com DPPH. Em vinhos da cultivar Isabel (*Vitis labrusca* L.) produzidos nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul, Sul do Brasil, os valores de AOX

variaram 2,6 a 6,3 mM TEAC L⁻¹ medidos com DPPH (NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010), destacando as altas atividades antioxidantes obtidas nos vinhos comerciais analisados no presente estudo.

Uma grande variedade de métodos de medição da atividade antioxidante *in vitro* tem sido utilizado para caracterização de sucos de uva e vinhos. Além do DPPH e ABTS, métodos como Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC), ThioBarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) e Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) tem sido amplamente utilizados (GRANATO *et al.*, 2011; GRIS *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2014; GRANATO *et al.*, 2016). Poucos trabalhos encontrados na literatura mediram a atividade antioxidante de produtos derivados da uva por meio do método de sequestro de peróxido de hidrogênio.

Figura 4. Valores médios da atividade antioxidante de sucos de uva e vinhos produzidos a partir de novas cultivares de uva brasileiras plantadas no Vale do Submedio São Francisco, Brasil. Médias seguidas das mesmas letras as amostras não diferem de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.



A capacidade das amostras estudadas nesta pesquisa em eliminar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) está apresentada na Figura 4. A atividade sequestradora do peróxido de hidrogênio variou entre 66,81 a 88,52 e 61,39 a 69,54 mM TEAC L^{-1} nas amostras de vinhos e sucos de uva, respectivamente.

Camargo *et al.* (2014) avaliaram a atividade antioxidante de resíduos do processamento de sucos de uva (BRS Cora e Isabel Precoce) e vinhos (Syrah e Tempranillo) originados do Vale do Submédio São Francisco, Nordeste do Brasil, utilizando o método de sequestro de H_2O_2 e encontraram valores variando entre 143 a 167 e 43,2 a 75,8 mM TEAC kg^{-1} de massa seca para resíduos de sucos de uva e vinhos, respectivamente.

Espécies reativas de oxigênio (ROS) incluem radicais como superóxido anion ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical (HO^{\cdot}) and perhydroxyl radical (HOO^{\cdot}) and non-radical hydrogen peroxide (H_2O_2), e estão associadas a diversos mecanismos patológicos que contribuem com doenças como diabetes, câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (ROLEIRA *et al.*, 2015). É amplamente conhecido que alimentos ricos em compostos fenólicos, como sucos de uva e vinhos, normalmente estão associados a prevenção de diversas doenças em seres humanos onde a atividade antioxidante está relacionada a mecanismos de proteção, inclusive atuando na inibição de ROS (OROIAN; ESCRICHE, 2015; ROLEIRA *et al.*, 2015). Com base no exposto, existe a necessidade de realização de maiores estudos que correlacionem a atividade antioxidante *in vitro* pelo método de sequestro do radical H_2O_2 em sucos de uva e vinho com eventuais mecanismos de proteção à saúde de consumidores.

A atividade antioxidante H_2O_2 dos sucos e vinhos estudados foi considerada alta, sugerindo que produtos elaborados com as novas variedades brasileiras de uva do nordeste do Brasil possam ter uma grande habilidade na inibição de ROS.

2.4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos para os parâmetros de validação avaliados, o método de determinação rápida de 15 compostos fenólicos em vinhos e sucos por RP-HPLC-DAD utilizando uma nova coluna de resolução rápida do tipo RP- C_{18} (100×4.6mm, 3.5 μ m) se mostrou adequado para ser utilizado em pesquisas com essas matrizes. O método apresentou linearidade, precisão, recuperação e limites de detecção e

quantificação de acordo com outros métodos anteriormente publicados para a determinação de compostos fenólicos por RP-HPLC, com o diferencial de possuir um tempo de corrida de apenas 25 minutos.

A aplicabilidade do método validado foi verificada por meio da caracterização de compostos fenólicos em sucos de uva e vinhos comerciais de novas variedades brasileiras de uva, onde os resultados obtidos diferiu os produtos estudados de sucos e vinhos de outras regiões mundiais, principalmente por apresentarem altos valores de (-)-epigallocatequina e ácido *trans*-caftárico.

Em relação ao potencial bioativo, as amostras analisadas apresentaram alta atividade antioxidante, com destaque para as amostras de vinhos tintos cujo os valores encontrados foram maiores que em vinhos diversas regiões mundiais. A atividade antioxidante H_2O_2 dos sucos e vinhos estudados foi considerada alta, sugerindo que produtos elaborados com as novas variedades brasileiras de uva do nordeste do Brasil possam ter uma grande habilidade na inibição de ROS.

2.5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos e ao Instituto Federal do Sertão Pernambucano pelo apoio financeiro.

2.6 REFERÊNCIAS

AGILENT. Agilent ChemStation for LC 3D Systems: Understanding Your Spectra Module. Agilent Technologies, Inc., Ed. 06/08 Waldbronn, Germany, 46p. Accessable in: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2180-90024_spectra_ebook.pdf, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica: Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários. Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, 2011. Avaliable in: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Laboratorio/Guia-de-validacao-controle-de-qualidade-analitica.pdf

CAMARGO, A. C *et al.* Low molecular weight phenolics of grape juice and wine-making by-products: Antioxidant activities and inhibition of oxidation of human LDL-cholesterol and DNA strand breakage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (50), pp. 12159–12171, 2014.

DIAS, F. de S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Determination of Phenolic Acids and Quercetin in Brazilian Red Wines from Vale do São Francisco Region Using Liquid-Liquid Ultrasound-Assisted Extraction and HPLC-DAD-MS, 26(7), 1055–1059, 2016.

EL-SHAHAWI, M.S; HAMZA, A.; BAHAFFI, S.O.; AL-SIBAALI, A.A; ABDULJABBAR, T.N. Analysis of some selected catechins and caffeine in green tea by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* 134, 2268-2275, 2012.

EURACHEM GUIDE: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Available from <http://www.eurachem.org>

FONTANA, A. R.; ANTONIOLLI, A.; BOTTINI, R. Development of a high performance liquid chromatography method based on a core-shell

column approach for the rapid determination of multiclass polyphenols in grape pomaces. *Food Chemistry*, 192, 1–8, 2016.

GARRIDO, J.; BORGES, F. Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. *Food Research International*, 54(2), 1844–1858, 2013.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV–Visible spectroscopy. In *Current protocols in food analytical chemistry*. New York, USA: John Wiley and Sons Inc., 2001.

GRANATO, D.; CALADO, V.M.A.; JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. *Food Research International*, 55, 137-149, 2014.

GRANATO, D.; CARRAPEIRO, M. M.; FOGLIANO, V.; VAN RUTH, S. M. Effects of geographical origin, varietal and farming system on the chemical composition and functional properties of purple grape juices: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 52, 31–48, 2016.

GRANATO, D.; KATAYAMA, F. C. U.; CASTRO, I. A. Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. *Food Chemistry*, 129(2), 366–373, 2011.

GRANATO, D.; KOOT, A.; SCHNITZLER, E.; VAN RUTH, S. M. Authentication of geographical origin and crop system of grape juices by phenolic compounds and antioxidant activity using chemometrics. *Journal of Food Science*, 80(3), C584–C593, 2015.

GRIS, E. F. *et al.* Proanthocyanidin profile and antioxidant capacity of Brazilian *Vitis vinifera* red wines. *Food Chemistry*, 126(1), 213–220, 2011.

HUBAUX, A.; VOS, G. Decision and detection limits for linear calibration curves. *Analytical Chemistry*, 42, 849-855, 1970.

KIM, Y. K.; GUO, Q.; PACKER, L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicology*, 172(2), 149–156, 2002.

LAGO-VANZELA, E. S. *et al.* Chromatic characteristics and color-related phenolic composition of Brazilian young red wines made from the hybrid grape cultivar BRS Violeta (“BRS Rúbea”×“IAC 1398-21”). *Food Research International*, 54(1), 33–43, 2013.

LAMBRI, M. *et al.* Influence of different berry thermal treatment conditions, grape anthocyanin profile, and skin hardness on the extraction of anthocyanin compounds in the colored grape juice production. *Food Research International*, 77, 584–590, 2015.

LEEuw, R. *et al.* Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of Pinot Noir. *Journal of Food Composition and Analysis*, 36(1-2), 40–50, 2014.

LIMA, D. B. *et al.* Evaluation of phenolic compounds content and in vitro antioxidant activity of red wines produced from *Vitis labrusca* grapes, 31(3), 793–800, 2011.

LIMA, M. D. S. *et al.* Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. *Food Chemistry*, 161, 94–103, 2014.

LIMA, M.S. *et al.* Phenolic Compounds, Organic Acids and Antioxidant Activity of Grape Juices Produced in Industrial Scale by Different Processes of Maceration. *Food Chemistry*, 188, 384–392, 2015.

MAGRO, L. *et al.* identification of bioactive compounds from *vitis labrusca* l. variety concord grape juice treated with commercial enzymes: improved yield and quality parameters. *Food and Bioprocess Technology*, 9(2), 365–377, 2016.

MANNs, D. C.; MANSFIELD, A. K. A core-shell column approach to a comprehensive high-performance liquid chromatography phenolic

analysis of *Vitis vinifera* L. and interspecific hybrid grape juices, wines, and other matrices following either solid phase extraction or direct injection. *Journal of Chromatography A*, 1251, 111–121, 2012.

MARGRAF, T. *et al.* Effects of geographical origin, variety and farming system on the chemical markers and in vitro antioxidant capacity of Brazilian purple grape juices. *Food Research International*, 82, 145–155, 2016.

MATTIVI, F.; VRHOVSEK, U.; MASUERO, D.; TRAINOTTI, D. Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15(1), 27–35, 2009.

MORENO-MONTORO, M. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant activity of Spanish commercial grape juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 38, 19–26, 2015.

NATIVIDADE, M. M. P. *et al.* Simultaneous analysis of 25 phenolic compounds in grape juice for HPLC: Method validation and characterization of São Francisco Valley samples. *Microchemical Journal*, 110, 665–674, 2013.

NIXDORF, S. L.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity. *Analytica Chimica Acta*, 659(1-2), 208–215, 2010.

ÒBON, J. M.; DÍAZ-GARCIA, M. C.; CASTELLAR, M. R. Red fruit juice quality and authenticity control by HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(6), 760–771, 2011.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10–36, 2015.

PENNA, N. G.; DAUDT, C. E.; HENRIQUES, J.A.P. Comportamento de ésteres hidroxicinâmicos durante a vinificação de vinhos brancos, (1), 983–989, 2001.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231–1237, 1999.

ROLEIRA, F. M. F. *et al.* Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chemistry*, 183, 235–258, 2015.

RUCH, R.J.; CHENG, S.J.; KLAUNIG, J.E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogen* 10, 1003– 1008, 1989.

SILVA, J. K. *et al.* Bioactive compounds of juices from two Brazilian grape cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. v. 96, p. 1990-1996, 2015.

SCOLA, G. *et al.* Flavan-3-ol compounds from wine wastes with in vitro and in vivo antioxidant activity. *Nutrients*, 2(10), 1048–1059, 2010.

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

TAROLA, A. M.; MILANO, F.; GIANNETTI, V. Simultaneous Determination of Phenolic Compounds in Red Wines by HPLC-UV. *Analytical Letters*, 40(12), 2433–2445, 2007.

TOALDO, I. M. *et al.* Bioactive potential of *Vitis labrusca* L. grape juices from the Southern Region of Brazil: Phenolic and elemental composition and effect on lipid peroxidation in healthy subjects. *Food Chemistry*, 173, 527–535, 2015.

TOSCANO, L. T. *et al.* Potential ergogenic activity of grape juice in runners. *Applied Physiology, Nutrition & Metabolism*, 40(9), 899–906, 2015.

**CAPÍTULO 3 - NOVAS VARIEDADES BRASILEIRAS DE UVAS
DE MESA (BRS ISIS E BRS VITÓRIA) CULTIVADAS NO
NORDESTE DO BRASIL: COMPOSIÇÃO BIOATIVA E
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

RESUMO

Este trabalho representa o primeiro estudo de caracterização de compostos fenólicos individuais e potencial antioxidante em novas uvas brasileiras sem sementes (BRS Isis e BRS Vitória) cultivadas na região do Vale do São Francisco, Nordeste do Brasil. A composição fenólica foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (RP-HPLC / DAD). A atividade antioxidante foi estimada por métodos de sequestro radicais livres. Um total de 27 compostos fenólicos foram quantificados, incluindo 8 antocianinas, 6 flavanóis, 3 flavonóis, 2 flavanonas, 6 ácidos fenólicos e 2 estilbenos. Para a cultivar BRS Isis flavanols, os flavonóis e os estilbenos foram as classes predominantes. A cultivar BRS Vitória se destacou pela alta concentração de antocianinas, flavononas e ácidos fenólicos. Assim, dados obtidos sobre a composição fenólica de BRS Isis e BRS Vitória indicaram que estas cultivares são bem situadas, baseadas nos teores dos compostos fenólicos, quando comparadas a variedades mundialmente conhecidas. As uvas apresentaram alta atividade antioxidante, especialmente a uva BRS Vitória, em comparação com uvas de mesa de outras regiões do mundo. Esses dados representam informações que podem ser úteis para avaliar essas variedades como fontes de compostos bioativos.

Palavras-chave: uvas de mesa sem sementes, flavanóis, ácidos fenólicos, antocianinas, RP-HPLC / DAD

3.1 INTRODUÇÃO

A uva é uma das principais culturas do mundo, com uma produção anual de mais de 75 milhões de toneladas, das quais cerca de 35% são utilizadas para consumo *in natura* (OIV, 2016). A produção de uvas de mesa inclui uvas viníferas, labruscas e híbridos podendo ter ou não ter sementes (PROTAS; CAMARGO, 2011).

O Brasil ocupa a quarta posição mundial na produção de uvas de mesa, com uma área colhida de 80 mil hectares e uma produção estimada em um milhão de toneladas, destacando-se como um dos principais exportadores dessa fruta para o mercado internacional (MDCI, 2017). A região do Vale do Submédio São Francisco (VSF), localizada no Nordeste do Brasil, se destaca como a única região brasileira que possui certificação de indicação de procedência para uva de mesa, sendo responsável por 95% da uva de mesa exportada pelo Brasil (MAPA, 2017). Os principais mercados compradores e consumidores da uva de mesa do VSF são Estados Unidos, Canadá e a Europa (MDIC, 2019). Na região do VSF a colheita da uva pode acontecer em todos os meses do ano, devido a alta temperatura média anual, intensa radiação solar e disponibilidade de água para a irrigação (TONIETTO; PEREIRA, 2011). Com isso, os produtores aproveitam as melhores janelas de exportação para realizar suas colheitas e abastecer o mercado mundial na entressafra de países tradicionais na produção de uva de mesa como o Chile.

As principais cultivares comerciais de uva de mesa plantadas no VSF são as *Vitis vinifera* Thompson Seedless, Crimson Seedless, Itália (Muscat), Superior Seedless (Sugraone) e Red Globe. No entanto, essas cultivares apresentam dificuldades de adaptação às condições tropicais do Vale do Submédio São Francisco, apresentando baixa produtividade e irregularidade em safras consecutivas, baixa fertilidade de gemas, desgrane elevado, susceptibilidade a doenças e dificuldade na obtenção de coloração adequada nas bagas (LEÃO; SOAREZ; RODRIGUES, 2009). Devido a essas dificuldades, produtores locais têm optado pelo cultivo de novas variedades de uvas de mesa desenvolvidas em outros países como Arra 15[®], Midnight Beauty[®], Sable Seedless[®] e Scarllota Seedless[®], resultando no custo de produção devido aos *royalties* pagos pelos produtores para produção e comercialização dessas uvas.

As dificuldades encontradas com as cultivares protegidas, desenvolvidas com melhoramento genético, e a demanda do mercado por novos produtos levaram a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) a investir no desenvolvimento de novas variedades

brasileiras de uvas adaptadas as condições climáticas de regiões subtropicais e tropicais, como o VSF. Até abril de 2019, 19 cultivares uvas híbridas (*Vitis vinifera* x *Vitis labrusca*) foram lançadas no Brasil, das quais 9 são uvas de mesa voltadas para o consumo *in natura* (EMBRAPA, 2019). Entre as novas variedades de uva desenvolvidas no Brasil estão os híbridos ‘BRS Isis’ e ‘BRS Vitória’ (BRS Linda x CNPUV 681-29 [‘Arkansas 1976 x CNPUV 147-3’ (‘Niagara Branca’ x ‘Vênus’)]), que são cultivadas comercialmente na região do VSF desde o ano de 2014.

A ‘BRS Isis’ é uma variedade de ciclo tardio (116 a 145 dias), com produtividade média é de 26 t/ha/safra. Seus cachos são de tamanho médio, suas bagas são grandes, de cor vermelha, sabor neutro agradável e sem sementes. Apresenta resistente ao míldio, principal doença da videira no Brasil (RITSCHER *et al.*, 2013). A ‘BRS Vitória’ é uma uva negra (preta-azulada), com alta fertilidade de gemas e tolerância ao míldio (Plasmopara vitícola). Seus cachos são levemente compactos, bagas esféricas e pequenas, sabor que remete a framboesa e casca grossa, responsável por conferir a uva uma leve crocância (MAIA *et al.*, 2014).

Diversos fatores exercem influência sob as propriedades físicas e composição química de uvas de mesa, entre eles condições climáticas, tipos de solo, práticas culturais e variedade da uva (BAIANO; TERRACONE, 2011). Dentre os compostos encontrados nas uvas, a presença de compostos fenólicos é importante tanto pela qualidade organoléptica (como cor ou amargor), como também pelos vários efeitos biológicos benéficos à saúde humana, destacadamente a atividade antioxidante (CARRIERI *et al.*, 2013; FERNANDEZ; BARONA, 2016; TOALDO *et al.*, 2015). Sendo as uvas de mesa sem semente as muito apreciadas pelos consumidores devido a facilidade no consumo.

O objetivo desse estudo foi caracterizar duas novas variedades brasileiras de uva de mesa sem semente (*Vitis vinifera* x *Vitis labrusca*) cultivadas no Vale do Submédio São Francisco, Nordeste do Brasil, em relação ao perfil fenólicos bioativos e atividade antioxidante *in vitro*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Reagentes químicos, padrões e solventes

Os reagentes 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromato-2-ácido carboxílico (Trolox) e metanol foram

adquiridos da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). O reagente Folin-Ciocalteu, álcool etílico, ácido fosfórico, fosfato monopotássico, persulfato de potássio, ácido acético e ácido sulfúrico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Germany). Os padrões de ácido málico, cítrico, succínico, láctico, acético e tartárico foram obtidos da Vetec chemistry Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). Ácido gálico, ácido siríngico, ácido p-cumárico, ácido caféico, ácido trans-caftárico, ácido clorogênico, (+)-catequina, (-)- epigalocatequina galato, (-)- epigalocatequina, procianidina B1, procianidina B2, quercetina 3-glicosídeo, rutina, cianidina 3,5-diglicosídeo, malvidina 3,5-diglicosídeo, pelargonidina 3,5-diglicosídeo, naringenina, hesperidina, glicose e frutose da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Malvidina 3-O-glicosídeo, delphinidina 3-glicosídeo, peonidina 3-O-glicosídeo, cianidina 3-O-glicosídeo, pelargonidina 3-O-glicosídeo, (-)-epicatequina e caempferol-3-O-glicosídeo obtidos da Extrasynthese (Genay, France). Trans-Resveratrol e cis-Resveratrol foram obtidos da Cayman Chemical Company (Michigan, EUA).

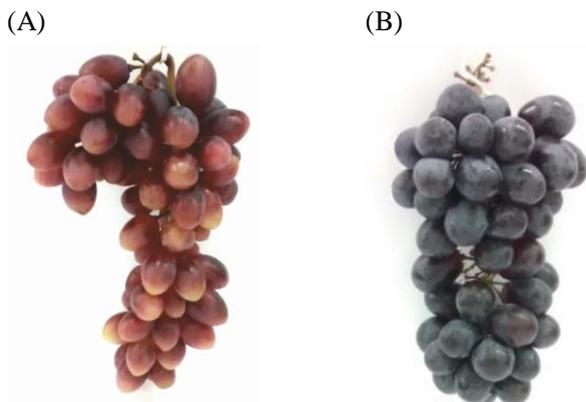
3.2.2 Amostras

Duas novas variedades híbridas, BRS Isis (uva vermelha) e BRS Vitória (uva preta), desenvolvidas no Brasil e resultantes do cruzamento entre BRS Linda x CNPUV 681-29 [Arkansas 1976 x CNPUV 147-3 ('White Niagara' x 'Venus')] foram utilizados neste estudo (Figura 1).

As uvas foram obtidas das safras de primeiro semestre de 2016 de vinhedos comerciais localizado na região de Petrolina (Pernambuco, Brasil) que fica a $9^{\circ} 23' 39''$ S e $40^{\circ} 30' 35''$ W e 350 m acima do nível do mar. A região está localizada na zona do clima tropical semiárido, com temperatura anual de 26° C, altos níveis de radiação solar e precipitação total anual de aproximadamente 550 mm concentrada entre novembro e abril.

As amostras foram coletadas aleatoriamente em seus respectivos tempos de maturação. Cada amostra de uva consistiu de 50 cachos escolhidos aleatoriamente de 50 diferentes videiras. Após a transferência para o laboratório, um conjunto de 200 bagas por cultivar foi amostrado aleatoriamente de diferentes grupos em diferentes níveis (partes superior, média e inferior de cada grupo).

Figura 1: Cachos das uvas BRS Isis (A) e BRS Vitória (B).



3.2.3 Preparação de extratos

Três repetições de aproximadamente 30 g de uvas para cada amostra foram pesadas e homogeneizadas em um equipamento Ultraturrax (IKA, Alemanha) por 1 min após a adição de 120 ml de solução extratora (50: 48,5: 1,5, metanol: água: ácido acético) seguindo o método descrito por Barcia *et al.* (2014) com modificações. Os extratos foram centrifugados a 3000 g por 5 min em centrífuga EEQ-9004 (Edutec, Brasil). O sobrenadante foi filtrado (papel de filtro Whatman n ° 1) e utilizado para análise. Este procedimento foi realizado em triplicata.

3.2.4 Fenólicos totais e atividade antioxidante *in vitro*

Os extratos obtidos a partir das uvas *in natura* foram analisados em espectrofotômetro UV-Visível modelo UV 2000A (Instrutherm, Brasil). Todas as análises foram realizadas em triplicada.

A concentração total de compostos fenólicos nos extratos de uvas foi estimada pelo método de Folin Ciocalteu (SINGLENTON; ROSSI, 1965). A reação foi preparada misturando 100 μL de extrato de uva, 7900 μL de água destilada e 500 μL de Folin-Ciocalteu. Após 3 min, 150 μL de carbonato de sódio a 20% foram adicionados. A mistura foi incubada no escuro a temperatura ambiente durante 2 horas. A absorbância foi

então medida a 765 nm. O ácido gálico foi utilizado como padrão e os resultados foram expressos em mg kg⁻¹ de uvas equivalentes de ácido gálico (GAE) usando uma curva de calibração na faixa de 0 a 500 mg/L.

A capacidade antioxidante *in vitro* das amostras de uva foi determinada pelo método de eliminação de radicais livres ABTS (2,20-azinobis- (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)) (RE *et al.*, 1999) e DPPH (2,2 - difenil-1-picrilhidrazil) (KIM *et al.*, 2002). O padrão analítico Trolox foi usado para construir as curvas de calibração e os resultados foram expressos como equivalentes de Trolox por kg de uva (mM TEAC kg⁻¹).

Para realização dos métodos de capturas de radicais livres, as amostras foram diluídas com solução extratora até a obtenção da inibição dos radicais DPPH e ABTS entre 20 e 80%. Soluções de radicais DPPH e ABTS a 1 mmol foram preparadas em etanol e diluídas até uma absorbância de $0,900 \pm 0,050$ ($\lambda = 734$ nm) e $0,700 \pm 0,050$ ($\lambda = 517$ nm), respectivamente. As absorbâncias foram determinadas antes e após a adição das amostras. No método DPPH, a absorbância foi medida nos tempos $t = 0$ e $t = 30$ min após a adição da amostra. No método ABTS, a absorbância foi determinada nos tempos $t = 0$ e $t = 6$ min após a adição da amostra.

3.2.5 Perfil fenólico

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), Agilent 1260 Infinity LC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) equipado com bomba de solvente (modelo G1311C), degaseificador, amostrador automático (modelo G1329B), compartimento de coluna termostaticado (modelo G1316A) e Detector de Arranjo de Diodo (DAD) (modelo G1315D). A separação cromatográfica dos compostos fenólicos foi realizada em uma coluna Zorbax Eclipse Plus RP-C18 (100 × 4,6 mm, 3,5 μm) e na pré-coluna Zorbax C18 (12,6 × 4,6 mm, 5 μm). A temperatura da coluna foi ajustada a 35 °C. As aquisições de dados foram realizadas usando o software OpenLAB CDS ChemStation Edition™ (Agilent Technologies).

O método de Padilha *et al.* (2017), com adaptações descritas por Dutra *et al.* (2018), foi utilizado para quantificar os compostos fenólicos. Os extratos de uva foram filtrados em filtros de polipropileno de 0,45 μm (Chromafil® Xtra, Macherey-Nagel - Alemanha) e depois injetados (20 μL). As fases móveis foram compostas por água acidificada com ácido

fosfórico 0,1 M (pH = 2,0, fase A) e metanol acidificado com ácido fosfórico a 0,5% (fase B); foi utilizado um fluxo de 0,8 mL.min⁻¹. A eluição foi completada em 33 minutos utilizando um gradiente: 0-5 min: 5% de B; 5-14 min: 23% de B; 14-30 min: 50% de B; 30-33 min: 80% B (retorno das condições iniciais).

3.2.6 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS for Windows, Evaluation Edition - 17.0.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Perfil fenólico

O perfil fenólico das novas cultivares brasileiras de uvas de mesa estão apresentados na Tabela 1.

A concentração de fenólicos totais nas amostras estudadas variou de 132 a 1123 e 399 a 1497 mg kg⁻¹ para as uvas BRS Isis e BRS Vitória, respectivamente (Tabela 1). É conhecido que a concentração de fenólicos das uvas depende de diversos fatores, entre eles, em função da variedade (ORAK, 2007; DU *et al.*, 2012). De maneira geral, uvas tintas muito pigmentadas, como ocorre com a cultivar BRS Vitória, contém cascas extremamente ricas em antocianinas (BAIANO *et al.*, 2011; KATALINIC *et al.*, 2010).

A concentração fenólica das novas variedades brasileiras de uvas de mesa está de acordo com os valores observados em diversas variedades produzidas na China (1158 a 1321 mg 100g⁻¹) (DU *et al.*, 2012), Itália (81 a 355 mg kg⁻¹) (CARRIERI *et al.*, 2013) e Tunísia (0,73 a 80,93 mg kg⁻¹) (HARBI *et al.*, 2013).

Como observado nas Tabelas 1, 27 compostos fenólicos pertencentes a família dos flavonóides, ácidos fenólicos e estilbenos foram quantificados. As cultivares BRS Isis e BRS Vitória apresentaram diferentes perfis fenólicos e concentrações de cada composto nas diferentes safras.

Para os flavonóides analisados nas amostras estudadas foram quantificadas 7 antocianinas, 6 flavonóis, 3 flavanois e 1 flavonona. A soma total dos flavonóides, ácidos fenólicos e estilbenos quantificados por HPLC representou entre 30,8 e 59,8% e 18,2 e 58,63 % dos fenólicos das uvas BRS Isis e BRS Vitória, respectivamente, o que sugere uma caracterização expressiva do conteúdo bioativo destas novas variedades.

3.3.2.1 Flavanols

O perfil de flavanols das uvas BRS Isis e BRS Vitória colhidas em duas safras está apresentado na Tabela 1. O total de flavanóis quantificados nas safras estudadas variou de 2,94 a 153,37 mg kg⁻¹ para a cv. BRS Isis e 8,46 a 35,48 mg kg⁻¹ para a cv. BRS Vitória, nas safras de 2016 e 2018. As uvas colhidas na safra 2016 apresentaram maior concentração de flavanols em comparação com as uvas colhidas na safra 2018. A “BRS Isis” se destacou quanto ao teor de epicatequina, catequina e procianidina B2 (88,44, 32,03 e 18,52 mg kg⁻¹, respectivamente), enquanto a cv. BRS Vitória se destacou no teor de procianidina B1 e catequina (11,59 e 11,16 mg kg⁻¹, respectivamente).

Os valores obtidos de catequina e epicatequina na cv. BRS Isis representam aproximadamente 2,85 e 7,87% da concentração compostos fenólicos totais nesta uva colhida em 2016, respectivamente. Carrieri *et al.* (2013), em estudo com 12 cultivares de uvas de mesa plantadas na Itália, inclusive as clássicas Crimson e Red Globe, mostraram que os valores de catequina e epicatequina em relação a concentração dos compostos fenólicos totais variaram de 1,47 a 7,26% e 0,15 a 1,14%, respectivamente. Com isso, considera-se que a cultivar BRS Isis se destaca em relação a cultivares de uvas tradicionais (*V. vinifera*) com alto valor de catequina e epicatequina. Diversos estudos tem evidenciado que flavanóis como catequina, epicatequina e procianidinas estão relacionados com diversos efeitos benéficos a saúde o que destaca a importância de se caracterizar estes compostos em novas variedades de uvas de mesa.

3.3.2.2 Antocianinas

Em uvas híbridas o perfil antociânico pode se dar por mistura de mono e diglicosídeos de malvidina. Com isso, foram quantificadas sete antocianinas, sendo cinco na forma monomérica (malvidina 3-O-

glicosídeo, cianidina 3-O-glicosídeo, delphinidina 3-O-glicosídeo, peonidina 3-O-glicosídeo e pelargonidina 3-O-glicosídeo) e duas antocianinas na forma glicosilada (malvidina 3,5-diglicosídeo e cianidina 3,5-diglicosídeo) (Tabela 1).

Apesar das diferenças observadas na concentração de cada antocianina, as amostras analisadas apresentaram um perfil similar, sendo que as uvas colhidas na safra 2018 apresentaram maior concentração de antocianinas em comparação com as uvas colhidas na safra 2016.

O perfil de antocianinas foi predominante de formas diglicosiladas, representando entre 71% (safra 2016) e 73% (safra 2018) para a BRS Isis e 64 % (safra 2016) e 38% (safra 2018) para a BRS Vitória do total de antocianinas quantificadas. Malvidina 3,5-diglicosídeo foi a antocianina encontrada em maior concentração, onde os valores variaram de 14,90 a 26,64 mg kg⁻¹ para a BRS Isis e de 19,58 a 54,80 mg kg⁻¹ para a BRS Vitória. Esses resultados evidenciam a predominância de características de *Vitis labrusca* L nas novas variedades brasileiras de uva de mesa. De acordo com Ribereau-Gayon *et al.* (2003) no cruzamento entre espécies *Vitis labrusca* L. x *Vitis vinifera* L. para obtenção de híbridos, a *V. labrusca* exerce o caráter dominante no perfil antociânico, o que explica a predominância da malvidina 3,5 diglicosídeo.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os relatados por diversos autores para uvas *Vitis labrusca* L.e híbridos utilizadas na elaboração de sucos e vinhos, nas quais predomina antocianinas na forma diglicosídeo (BARCIA *et al.*, 2014; NATIVIDADE *et al.*, 2013; TOALDO *et al.*, 2015). Em uvas tintas clássicas de mesa, comercializadas no mercado internacional, como a Crimson, Red Globe, Flame e Napoleon, predominam a presença de peonidina 3-glicosídeo > cianidina 3-glicosídeo > malvidina 3-glicosídeo com valores variando de 6,6 a 65,4 mg kg⁻¹ (CANTOS *et al.*, 2002). Entretanto se destaca que estas variedades são todas *Vitis vinifera* L.

A concentração e o perfil antociânico de uvas de mesa são importantes por contribuírem para características sensoriais como a cor, que é um dos principais atributos de aceitação de uvas de mesa por consumidores (MASCARENHAS *et al.*, 2010). Além de possuírem diversas atividades biológicas *in vivo* e *in vitro*, como atividade antioxidante (BAŞKAN *et al.*, 2015), anti-inflamatória (KUNTZ *et al.*, 2014), doenças cardiovasculares (JENNINGS *et al.*, 2012), obesidade (BENN *et al.*, 2014) e atuarem protegendo o organismo contra os efeitos do câncer (SIGNORELLI *et al.*, 2015).

Tabela 1. Concentração (mg kg⁻¹ de uva) de compostos fenólicos quantificados em uvas de mesa sem sementes.

Flavonoides	Safrá 2016		Safrá 2018	
	BRS Isis	BRS Vitória	BRS Isis	BRS Vitória
<i>Flavanols</i>				
(+)-Catequina	32,03 ± 0,82	11,16 ± 0,32	2,94 ± 0,24	ND
(-)-Epicatequina	88,44 ± 0,21	4,28 ± 1,14	ND	ND
(-)- Epicatequina galato	2,70 ± 0,14	2,97 ± 0,19	ND	4,74 ± 0,33
(-)-Epigallocatequina galato	1,45 ± 0,22	1,55 ± 0,14	ND	1,15 ± 0,20
Procianidina B1	10,23 ± 0,73	11,59 ± 0,44	ND	0,98 ± 0,11
Procianidina B2	18,52 ± 0,91	3,93 ± 0,14	ND	1,59 ± 0,22
∑ <i>flavanols</i>	153,37 ± 3,03	35,48 ± 2,37	2,94 ± 0,24	8,46 ± 0,86
<i>Antocianinas</i>				
Malvidina 3- <i>O</i> -glicosídeo	2,11 ± 0,00	3,80 ± 0,02	6,27 ± 2,54	38,28 ± 4,58
Cianidina 3- <i>O</i> -glicosídeo	1,25 ± 0,01	2,56 ± 0,02	1,48 ± 0,18	13,84 ± 1,95
Delfinidina 3- <i>O</i> -glicosídeo	1,32 ± 0,02	1,74 ± 0,01	1,08 ± 0,08	14,72 ± 1,29
Peonidina 3- <i>O</i> -glicosídeo	0,67 ± 0,01	1,80 ± 0,01	1,81 ± 0,05	10,60 ± 1,73
Pelargonidina 3- <i>O</i> -glicosídeo	1,00 ± 0,02	1,51 ± 0,01	2,06 ± 0,06	19,24 ± 2,47
Malvidina 3,5-diglicosídeo	14,90 ± 0,08	19,58 ± 0,01	26,64 ± 0,91	54,80 ± 6,67
Cianidina 3,5-diglicosídeo	1,00 ± 0,00	0,70 ± 0,01	ND	3,49 ± 0,81
Pelargonidina 3,5-diglicosídeo	ND	ND	ND	ND
∑ <i>antocianinas</i>	22,25 ± 0,14	31,69 ± 0,09	39,34 ± 3,82	154,97 ± 19,5
<i>Flavonols</i>				
Rutina	0,69 ± 0,17	1,29 ± 0,02	ND	ND
Quecetina 3-glicosídeo	18,65 ± 4,15	8,65 ± 0,15	1,32 ± 0,05	1,98 ± 0,37
Caempferol 3- <i>O</i> -glicosídeo	1,49 ± 0,43	0,63 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,51 ± 0,17
∑ <i>flavonols</i>	20,83 ± 4,75	10,57 ± 0,18	1,54 ± 0,06	2,49 ± 0,54
<i>Flavononas</i>				
Hesperidina	ND	ND	ND	ND
Naringenina	0,95 ± 0,16	9,54 ± 0,40	ND	6,96 ± 1,02
∑ <i>flavononas</i>	0,95 ± 0,16	9,54 ± 0,40	-	6,96 ± 1,02

Tabela 1. (Continuação)

Flavonoides	Safrá 2016		Safrá 2018	
	BRS Isis	BRS Vitória	BRS Isis	BRS Vitória
<i>Ácidos fenólicos</i>				
Ácido gálico	1,87 ± 0,24	0,89 ± 0,03	ND	ND
Ácido siríngico	ND	ND	ND	ND
Ácido <i>p</i> -cumárico	ND	ND	ND	ND
Ácido caféico	ND	ND	ND	0,97 ± 0,16
Ácido <i>trans</i> -Caftárico	138,06 ± 22,27	169,09 ± 7,63	33,68 ± 1,54	29,36 ± 2,05
Ácido clorogênico	5,34 ± 0,62	12,73 ± 0,63	1,44 ± 0,22	2,81 ± 0,21
∑ <i>Ácidos fenólicos</i>	145,27 ± 23,13	182,71 ± 8,29	35,12 ± 1,76	33,14 ± 2,42
<i>Estilbenos</i>				
<i>trans</i> -Resveratrol	3,12 ± 0,68	1,45 ± 0,03	ND	ND
<i>cis</i> -Resveratrol	0,37 ± 0,00	0,70 ± 0,01	ND	ND
∑ <i>estilbenos</i>	3,49 ± 0,68	2,15 ± 0,04	-	-
<i>Fenólicos totais (mg kg⁻¹ de uva)</i>	1122,7 ± 48,36	1497,0 ± 22,71	132,0 ± 12,87	399,0 ± 66,62

3.3.3.3 Flavonols

O total de flavonols quantificado na cv. BRS Isis variou de 1,54 a 20,83 mg kg⁻¹ de uva fresca e de 2,49 a 10,57 mg kg⁻¹ de uva fresca na cv. BRS Vitória (Tabela 1), sendo superior nas uvas colhidas na safra 2016. A quercetina 3-glicosídeo foi o flavonol mais abundante nas uvas frescas estudadas, chegando a representar 89% e 82% do total de flavonóis quantificados nas uvas BRS Isis e BRS Vitória, respectivamente. O perfil de flavonols é fortemente dependente da variedade de uva, mas em geral quercetina-3-O-glicosídeo é o composto predominante (SAMOTICHA *et al.*, 2017; SERRATOSA *et al.*, 2014; ZHU; ZHANG; LU, 2012).

3.3.3.4 Flavanonas

A hesperidina não foi detectada em nenhuma das amostras estudadas. Os valores médios de naringenina variou de ND a 0,95 mg kg⁻¹ na BRS Isis e de 6,96 a a 9,54 mg kg⁻¹ na BRS Vitória (Tabela 1).

Estudos de caracterização de flavononas em uvas são escassos na literatura, no entanto esses compostos são vastamente quantificados em frutas cítricas. Os valores de naringenin encontrados na cv. BRS Vitória foram maiores que o reportado por Nogata *et al.* (2006) em laranja (cv. Morita Navel). Em sucos cítricos são mencionados valores que chegam 17,75 ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Com base nisto, evidencia-se a importância de se estudar melhor este composto em uvas e derivados.

A naringenina é uma flavonona encontrada principalmente em toranja e laranja (ERLUND, 2004). Estudos mostraram que a naringenina possui efeitos protetores contra a peroxidação lipídica, possuindo efeito antioxidante (CAVIA-SAIZ *et al.*, 2010; SHIMODA *et al.*, 2010) e anti-inflamatório (BODET *et al.*, 2008). A naringenina também tem sido apontada como um composto com propriedades úteis ao tratamento e prevenção do câncer (PERIYASAMY *et al.*, 2015), doenças cardiovasculares (CHANET *et al.*, 2012), osteoporose (JIANNONG *et al.*, 2015) e doença de Alzheimer (GHOFRANI *et al.*, 2015).

3.3.3.5 Ácidos fenólicos

Os valores obtidos para ácidos fenólicos estão apresentados na Tabela 1. O total de ácidos quantificados variou de 35,12 a 145,27 mg kg^{-1} para a cultivar BRS Isis e de 33,14 a 182,71 mg kg^{-1} para a cultivar BRS Vitória. Os ácidos siríngico e *p*-cumárico não foram detectados nas cultivares estudadas. O ácido fenólico encontrado em maior concentração foi o ácido caftárico, com valores médios entre 33,68 a 138,06 mg kg^{-1} na cv. BRS Isis e entre 29,36 a 169,09 mg kg^{-1} na cv. BRS Vitória. Outros estudos que caracterizaram ácidos fenólicos em uvas de mesa (LAGO-VANZELA *et al.*, 2011), sucos de uvas (MAGRO *et al.*, 2016; PADILHA *et al.*, 2017) e vinhos (LEEuw *et al.*, 2014) mencionaram o ácido *trans*-caftárico como o ácido fenólico predominante nestes produtos.

3.3.3.6 Estilbenos

Neste trabalho foram quantificados o *trans* e o *cis*-resveratrol (Tabela 1). A concentração total do resveratrol variou de ND a 2,15 mg kg^{-1} para a cv. BRS Vitória e de ND a 3,49 mg kg^{-1} para a cv. BRS Isis. O *trans*-resveratrol foi encontrado em maior quantidade nas uvas colhidas na safra de 2016, com valores médios de 3,12 mg kg^{-1} na cultivar BRS Isis e 1,45 mg kg^{-1} na cultivar BRS Vitória.

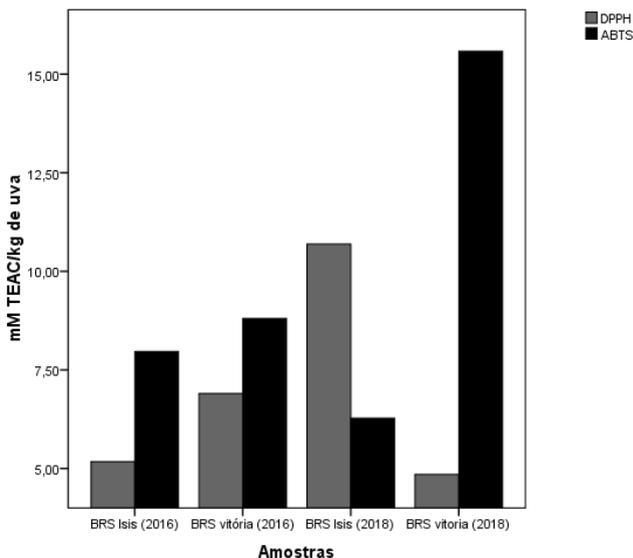
Valores de *trans*-resveratrol na ordem de 3,91 mg kg⁻¹ também é mencionado na casca da uva de mesa BRS Morena (LAGO-VANZELA *et al.*, 2011), uma das novas variedades brasileiras.

A quantificação do resveratrol tem se tornado um parâmetro qualitativo importante para uvas de mesa, devido aos vários efeitos benéficos para a saúde humana que tem sido descrito para esse composto. Dentre eles, destacam-se: atividade anticancerígena, cardioproteção, atividade antioxidante, inibição de plaquetas e atividade anti-inflamatória (BAVARESCO *et al.*, 2012).

3.3.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante *in vitro* das uvas (Figura 2), medida por métodos de sequestro de radicais livres com DPPH e ABTS, foi expressa em equivalentes em milimols de Trolox por quilograma de uva (mM TEAC kg⁻¹).

Figura 2. Capacidade antioxidante das uvas BRS Isis e BRS Vitória avaliadas pelos métodos DPPH e ABTS (mM Trolox (TEAC) kg⁻¹ de uva).



Para o DPPH se obteve os valores médios de 4,86 a 5,17 mM TEAC kg⁻¹ na uva BRS Isis e de 6,90 a 10,10 mM TEAC kg⁻¹ na uva BRS Vitória. No método com ABTS a atividade antioxidante média variou de 6,13 a 7,97 mM TEAC kg⁻¹ para BRS Isis e 8,8 a 16,27 mM TEAC kg⁻¹ para a BRS Vitória. Estes valores foram considerados altos, pois Samoticha, Wojdyło e Golis (2017), estudando cultivares híbridas vermelhas plantadas na Polônia, encontraram valores variando de 12 a 38 µM TEAC 100 g⁻¹ de matéria seca. Eyduran *et al.* (2015), em estudo com novas cultivares de uvas de mesa plantadas na Turquia, obtiveram valores de 3,60 a 9,09 µmol TEAC g⁻¹.

3.4 CONCLUSÃO

As novas cultivares brasileiras de uvas de mesa estudadas (BRS Isis e BRS Vitória) apresentam teores bioativos atrativos quando comparadas às cultivares clássicas mundiais. Por serem cultivares híbridos, contêm compostos bioativos que não são encontrados em cultivares clássicas (*V. vinifera*), como as antocianinas diglicosiladas. Além disso, essas uvas representam uma alternativa para a diversificação de cultivares e estão disponíveis gratuitamente para a produção de uvas de mesa.

3.5 REFERÊNCIAS

- BAIANO, A.; TERRACONE, C. Varietal Differences among the Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Seven Table Grape Cultivars Grown in the South of Italy Based on Chemometrics 9815–9826. 2011.
- BARCIA, M.T. *et al.* Phenolic composition of grape and winemaking by-products of Brazilian hybrid cultivars BRS Violeta and BRS Lorena. *Food Chem.* 159, 95–105. 2014
- BAŞKAN, K.S. *et al.* Assessment of the contributions of anthocyanins to the total antioxidant capacities of plant foods. *Eur. Food Res. Technol.* 241, 529–541. 2015.
- BAVARESCO, L. *et al.* Effects of Elicitors, Viticultural Factors, and Enological Practices on Resveratrol and Stilbenes in Grapevine and Wine. *Mini- Reviews in Medicinal Chemistry.*12:1366-81. 2012.
- BENN, T. *et al.* Polyphenol-rich blackcurrant extract prevents inflammation in diet-induced obese mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(10), 1019–1025. 2014
- BODET, C. *et al.* Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and ex vivo human whole-blood models. *Journal of Periodontal Research.*, 43, n.4, p.400-407. 2008.
- CAMARGO, A. C. *et al.* Low molecular weight phenolics of grapejuice and wine-making by-products: Antioxidant activities and inhibition of oxidation of human LDL-cholesterol and DNA strand breakage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2014.
- CANTOS, E.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Varietal Differences among the Polyphenol Profiles of Seven Table Grape Cultivars Studied by LC – DAD – MS – MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5691–5696. 2002.

CARRIERI, C. *et al.* Antithrombotic activity of 12 table grape varieties. Relationship with polyphenolic profile. *Food Chem.* 140, 647–653.2013.

CAVIA-SAIZ, M. *et al.* Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: A comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, n. 7, p. 1238–1244.2010.

CHANET, A. *et al.* Citrus flavanones: What is their role in cardiovascular protection? *J. Agric. Food Chem.* 60, 8809–8822.2012.

DU, B. *et al.* Phenolic content and antioxidant activity of wine grapes and table grapes. *J. Med. Plants Res.* 6, 3381–3387.2012.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em <https://www.embrapa.br/en/uva-e-vinho/programa-ucas-do-brasil>. Acessado em 2 de abril de 2019

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24, n. 10, p. 851–874.2004.

EYDURAN, S.P. *et al.* Sugars, organic acids, and phenolic compounds of ancient grape cultivars (*Vitis Vinifera* L.) from igdir province of eastern Turkey. *Biol. Res.* 48, 1–8. 2015.

FERNANDEZ, M. L.; BARONA, J. Grapes and Atherosclerosis. In: Pezzuto, J.M. *Grapes and Health*. Springer International Publishing Switzerland. 2016.

GHOFRANI, S. *et al.* Naringenin improves learning and memory in an Alzheimer's disease rat model: Insights into the underlying mechanisms. *Eur J Pharmacol*, 764, p. 195–201. 2015.

HARBI, M. *et al.* Sugars and total phenolics contents in different fractions of Autochthonous grape varieties grown in Tunisia. *Food*. 7(1): 13-16. 2013.

JENNINGS, A. *et al.* Higher anthocyanin intake is associated with lower arterial stiffness and central blood pressure in women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 96(4), 781–788. 2012.

JIANNONG, W. *et al.* Effect of naringenin in Qianggu capsule on population pharmacokinetics in Chinese women with primary osteoporosis. *Journal of traditional Chinese medicine*, 35, n. 2, p. 141–153, 2015

KATALINIĆ, V. *et al.* Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chem.* 119, 715–723.2010

KIM, Y. K.; GUO, Q.; PACKER, L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicology*, 172(2), 149–156. 2002.

KUNTZ, S. *et al.* Anthocyanins from fruit juices improve the antioxidant status of healthy young female volunteers without affecting anti-inflammatory parameters: results from the randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over ANTHONIA (ANTHOCyanins in Nutrition Investigation Alliance) study. *Br. J. Nutr.* 112, 925–36. 2014.

LAGO-VANZELA, E.S. *et al.* Phenolic composition of the edible parts (flesh and skin) of Bordô grape (*Vitis labrusca*) using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 59, 13136–13146. 2011.

LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M.; RODRIGES, B. L. Principais cultivares. In: Soares, J. M.; Leão, P. C. de S (Eds.) *A vitivinicultura no Semiárido brasileiro*. Petrolina, PE: Embrapa Semiárido, p. 149-214. 2009.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages,

natural colorants, and wines by the ph differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International* v.88, n.5, p. 1269-1278, 2005.

LEEUW, R. *et al.* Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of Pinot Noir. *J. Food Compos. Anal.* 36, 40–50. 2014.

MAIA, J.D.G.; RITSCHER, P.; CAMARGO, U.A.; SOUZA, R.T.; FAJARDO, V.T.; NAVES, R.L.; GIRARDI, C. ‘BRS Vitória’— Nova cultivar de uva de mesa sem sementes com sabor especial e tolerante ao míldio. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. Comunicado técnico n. 126, 2012.

MAGRO, L. *et al.* Identification of Bioactive Compounds From *Vitis labrusca* L. Variety Concord Grape Juice Treated With Commercial Enzymes: Improved Yield and Quality Parameters. *Food Bioprocess Technol.* 9, 365–377. 2016

MASCARENHAS, R.J. *et al.* Avaliação sensorial de uvas de mesa produzidas no Vale do São Francisco e comercializadas em João Pessoa - PB. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 32, n. 4, 2010.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR (MDIC). *Balança Comercial Brasileira: dados consolidados*. Brasília, 2017.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). *Culturas: Uva*. Brasília. Disponível: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/uva> Accessed 7 feb 2019

NATIVIDADE, M. M. P. *et al.* Simultaneous analysis of 25 phenolic compounds in grape juice for HPLC: Method validation and characterization of São Francisco Valley samples. *Microchemical Journal* 110, 665–674, 2013.

NOGATA, Y. *et al.* Flavonoid Composition of Fruit Tissues of Citrus Species. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 178–192. 2006.

ORGANISATION INTERNATIONALE DE LA VIGNE ET DU VIN – OIV. Disponible in: www.oiv.int/public/medias/4911/fao-oiv-grapes-report-flyer.pdf Accessed: 7 feb 2017

ORAK, H.H. Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 111, 235–241. 2007.

PADILHA, C.V.S. *et al.* Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. *Food Chem.* 228, 106–115. 2016.

PADILHA, C.V.S. *et al.* Phenolic compounds profile and antioxidant activity of commercial tropical red wines (*Vitis vinifera* L.) from São Francisco Valley, Brazil. *J. Food Biochem.* 1–9. 2016.

PERIYASAMY, K. *et al.* Antitumor efficacy of tangeretin by targeting the oxidative stress mediated on 7,12-dimethylbenz(a) anthracene-induced proliferative breast cancer in Sprague-Dawley rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 75, n. 2, p. 263–272. 2015.

PROTAS, J. F. S.; Camargo, U. A. *Vitivinicultura brasileira: panorama setorial de 2010 / - Brasília, DF: SEBRAE; Bento Gonçalves: IBRAVIN: Embrapa Uva e Vinho.* 2011.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237. 1999.

RIBÉREAU-GAYON, P. *et al.* *Tratado de Enología: química del vino estabilización y tratamientos.* 1ª. Ed. Buenos Aires: Hemisfério Sur, V.2, 537p. 2003.

RITSCHHEL, P. *et al.* BRS Isis nova cultivar de uva de mesa vermelha, sem sementes e tolerante ao míldio. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e

Vinho. Comunicado Técnico n. 143. 2013.

RUCH, R.J.; CHENG, S.; KLAUNIG, J.E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from chinese green tea. *Carcinogenesis* 10, 1003–1008. 1989.

SAMOTICHA, J.; WOJDYŁO, A.; GOLIS, T. Phenolic composition, physicochemical properties and antioxidant activity of interspecific hybrids of grapes growing in Poland. *Food Chem.* 215, 263–273. 2017.

SERRATOSA, M.P. *et al.* Chemical and morphological characterization of Chardonnay and Gewurztraminer grapes and changes during chamber-drying under controlled conditions. *Food Chem.* 159, 128–136.2014.

SIGNORELLI, P. *et al.* Natural grape extracts regulate colon cancer cells malignancy. *Nutrition and Cancer-an International Journal*, 67(3), 494–503. 2015.

SHIMODA, K. *et al.* Biotransformation of naringin and naringenin by cultured *Eucalyptus perriniana* cells. *Phytochemistry*, 71, n. 2–3, p. 201–205. 2010.

TOALDO, I. M. *et al.* Bioactive potential of *Vitis labrusca* L. grape juices from the Southern Region of Brazil: Phenolic and elemental composition and effect on lipid peroxidation in healthy subjects. *Food Chemistry*, v. 173, p. 527–535, 2015.

TONIETTO, J.; PEREIRA, G. E. The development of the viticulture for a high quality tropical wine production in the world. In: *International Symposium of the Group of International Experts of Vitivinicultural Systems for Cooperation*, 17., Asti. Proceedings. Asti: Le Progrès Agricole et Viticole, p. 25-28. 2011.

ZHU, L.; ZHANG, Y.; LU, J., Phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and originations. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 34. 2012.

CAPÍTULO 4 – EFEITOS DA COLHEITA SUCESSIVA NO MESMO ANO SOBRE A QUALIDADE E COMPOSTOS BIOATIVOS DE UVAS E SUCOS NA VITICULTURA TROPICAL SEMIÁRIDA

Carla Valéria da Silva Padilha^{1,2}, Marcos dos Santos Lima²,
Isabela Maia Toaldo¹, Giuliano Elias Pereira³, Marilde Terezinha
Bordignon-Luiz^{1*}

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rod. Admar Gonzaga 1346, Itacorubi – 88034-001, Florianópolis, SC, Brazil. E-mail: carla_padilha@outlook.com; isabela.toaldo@ufsc.br; marilde.bordignon@ufsc.br

²Instituto Federal do Sertão Pernambucano, Departamento de Tecnologia em Alimentos, Campus Petrolina, Rod. BR 407 Km 08, S/N, Jardim São Paulo -56314-520, Petrolina, PE, Brazil. E-mail: marcos.santos@ifsertao-pe.edu.br

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Semiárido/Uva e Vinho, Rod. BR 428, Km 152, 56302-970, Petrolina, PE, Brazil. E-mail: giuliano.pereira@embrapa.br

Nota: O texto e dados discutidos neste capítulo foram reproduzidos ou adaptados da publicação de autoria de Carla V. S. Padilha, Marcos dos Santos Lima, Isabela Maia Toaldo, Giuliano E. Pereira, Marilde T. Bordignon-Luiz, disponível em Food Chemistry, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125170>, reproduzido com permissão da Elsevier.

RESUMO

Os parâmetros tecnológicos e polifenólicos de uvas para processamento de suco, obtidos a partir da colheita sucessiva, foram estudados na vitivinicultura semiárida tropical. As uvas vermelhas “BRS Violeta” e “Isabel Precoce” foram colhidas no mesmo ano e analisadas com base em uma abordagem multivariada que incluiu variações climáticas. As uvas foram marcadas por variações nos compostos flavonóides, particularmente antocianinas. As temperaturas, radiação global, velocidade do ar e taxas de evapotranspiração foram associadas com maior acúmulo de compostos bioativos em uvas e sucos. As temperaturas em fevereiro foram associadas à maior atividade antioxidante das cascas de uva, enquanto as maiores amplitudes térmicas em agosto e novembro favoreceram o acúmulo de antocianinas em até 564 mg kg⁻¹. Flavanóis e procianidinas foram mais abundantes nas sementes quando a amplitude térmica máxima foi de 13,8 ° C. Estes resultados apontam informações úteis sobre períodos apropriados para a colheita de uvas com alto conteúdo bioativo em áreas tropicais.

Palavras-chave: Vale do São Francisco; condições climáticas; uvas brasileiras; perfil polifenólico; atividade antioxidante.

4.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de frutas do mundo e a uva é a quarta fruta mais produzida no país (OCDE-FAO, 2015). Embora o cultivo da uva no Brasil seja recente quando comparado aos países produtores tradicionais, há um potencial diversificado na viticultura devido às diferentes condições ambientais do país, cujas áreas de produção da uva são caracterizadas por diferentes tipos de clima, como clima temperado, subtropical e tropical (CAMARGO, TONIETTO, HOFFMANN, 2011). Nas regiões sul e sudestes do país, caracterizadas por climas temperado e subtropical, se tem apenas uma safra de uva por ano, assim como ocorre nas tradicionais regiões produtoras de uva do mundo. Por outro lado, a viticultura tropical semiárida praticada na região do Vale do Submédio São Francisco (VSF), localizada no nordeste do país, possibilita que a colheita das uvas seja realizada em todos os meses do ano (CAMARGO, TONIETTO, HOFFMANN, 2011; TONIETTO, RUIZ, GÓMEZ-MIGUEL, 2012).

O VSF está localizado entre os paralelos 8 e 9° S e 40 a 42° W e é caracterizado por condições climáticas únicas com baixas taxas de precipitação anual (cerca de 540 mm por ano) concentradas entre novembro e abril, ar relativamente seco (67% umidade), alta insolação com valores mais elevados no período de agosto a novembro (8,7 horas por dia) e temperatura média anual de 26 °C com mínima de abril a setembro (18,2 - 22,2 °C) e máxima de outubro a março (29,6 - 34 °C) (TEIXEIRA, 2010). Estas condições são responsáveis pela diferenciação no comportamento fisiológico da videira, pois a ausência de baixas temperaturas e a constante exposição ao sol fazem com que a planta se desenvolva durante todo o ano, o que possibilita a poda de produção que, junto com a irrigação do rio São Francisco, permite planejamento da colheita da uva ao longo do ano (TEIXEIRA et al., 2013; PADILHA et al., 2017). Além da produção de uvas de mesa e vinhos finos (*Vitis vinifera* L.) na região, variedades híbridas de uvas e *Vitis labrusca* L. são cultivadas para a produção de sucos de uva de alta qualidade (COELHO et al., 2018, DUTRA et al., 2018).

A potencialidade de uma região para a adaptação e produção da videira é fortemente dependente do clima que interage com outros componentes do meio ambiente, como variedade de uva, solo e técnicas agrônomicas (SILVA et al., 2019). Recentemente muitos esforços têm sido concentrados na combinação de práticas ambientais e de viticultura

para melhorar a qualidade e o potencial bioativo das uvas produzidas, sendo importantes para conseguir derivados de uva de alta qualidade e sustentabilidade, bem como para identificar *terroirs* e estabelecer melhores práticas agrícolas. Estudos anteriores que tratavam do manejo da uva e sua contribuição para a qualidade ou para as características fitoquímicas de sucos de uva e vinhos usavam principalmente uvas de uma única colheita anual devido às características climáticas das regiões (XU et al., 2011; ACUÑA-AVILA et al., 2016; SARTOR et al., 2017).

Uma maneira de medir a influência de fatores exógenos, como as condições climáticas da região e os sistemas de cultivo sobre a qualidade e tipicidade de uvas e derivados de uva, é a utilização de ferramentas quimiométricas e análise multivariada (GRANATO et al., 2015a). Essas técnicas permitem a diferenciação das regiões de origem em função de marcadores químicos como compostos fenólicos ou atividade antioxidante (GRANATO et al., 2015b; MARGRAF et al., 2016). A avaliação das características da uva em relação às condições climáticas de uma região é de grande importância para a melhoria da qualidade da bebida obtida a partir desta fruta. Mesmo em regiões tropicais, onde há pouca variabilidade climática anual, os fatores que influenciam o cultivo da uva, particularmente a colheita sucessiva, podem ser determinantes da qualidade das uvas e sucos de uva. No presente estudo, foram avaliados os efeitos de sucessivos períodos de colheita durante o mesmo ano na qualidade de uvas e sucos de uva de uma viticultura tropical semiárida. As variedades de uvas vermelhas BRS Violeta (uva híbrida) e Isabel Precoce (*V. labrusca*) foram colhidas em quatro meses para estudar os efeitos sobre os parâmetros físico-químicos, ácidos orgânicos, açúcares, composição polifenólica e atividade antioxidante. Estas uvas são abundantes na região do VSF e foram escolhidas por sua importância para a produção de suco de uva. A qualidade dos sucos de uva produzidos em um processo industrial também foi avaliada. Adicionalmente, os dados químicos foram estudados usando técnicas quimiométricas para avaliar a influência de fatores climáticos. Essa abordagem proporcionou a possibilidade de estudar o potencial bioativo das uvas, bem como as mudanças químicas em resposta às condições ambientais, que se aplicam nas indústrias de uva e vinho.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Reagentes e padrões

Os seguintes reagentes foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha): álcool etílico, ácido fosfórico e sulfúrico, fosfato monopotássico, persulfato de potássio, peróxido de hidrogênio e Folin-Ciocalteu. Sobre os padrões para curvas de calibração, a (-) - epicatequina, 3-O-glicosídeo de caempferol e as antocianinas 3-O-monoglicosídeo (delfinidina, peonidina, cianidina e pelargonidina), foram obtidos da Extrasynthese (Genay, França). Os estilbenos (trans-resveratrol e cis-resveratrol) foram obtidos da Cayman Chemical Company (Michigan, EUA). Hesperidina, naringenina, (+) - catequina, (-) - epigallocatequina, (-) – epigallocatequina galato, procianidina B1 e B2, rutina, quercetina 3-glicosídeo, glicose, frutose, malvidina 3,5-diglicosídeo, cianidina 3,5-diglicosídeo, pelargonidina 3,5-diglicosídeo, ácido caféico, ácido clorogênico, ácido *trans*-cafárico, ácido ρ -cumárico, ácido siríngico, ácido gálico, 6-hidroxi-2,5,7,8-tetramethylchromate-2-ácido carboxílico (Trolox), ácido 2-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) e metanol foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os ácidos orgânicos tartárico, málico, láctico, cítrico e acético foram obtidos da Química Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). A água utilizada para a fase móvel foi purificada através do sistema Milli-Q Water Purification (Millipore, Bedford, MA, EUA).

4.2.2. Amostras de uva e época de colheita

Duas variedades de uvas foram utilizadas neste estudo: o híbrido BRS Violeta (BRS Rubra x IAC 1398-21) e Isabel Precoce (*V. labrusca*), designadas no estudo como BV e IP, respectivamente. As uvas foram cultivadas em dois vinhedos comerciais da Fazenda Sasaki - Cooperativa Agrícola Nova Aliança (COANA), localizada em Juazeiro, Bahia, Brasil (09 ° 24'42 "S e 40 ° 29'55" W, 370 m acima do nível do mar). A idade média das plantas foi de 6 anos e as plantas foram enxertadas no porta-enxerto IAC 766, plantadas no campo com 3,0 e 2,0 m de espaçamento entre linhas e plantas, respectivamente, irrigadas por microaspersão e conduzidas em sistema latada. Ambas as variedades foram cultivadas usando as mesmas práticas agrônômicas.

O vinhedo comercial foi dividido para realizar dois conjuntos de experimentos com ambas as variedades de uva, a fim de ter duas colheitas sucessivas em diferentes períodos no mesmo ano. No primeiro vinhedo, foram realizadas duas podas, em outubro de 2015 e abril de 2016, e a colheita ocorreu em fevereiro e agosto de 2016. No segundo vinhedo, as videiras foram podadas em janeiro e julho de 2016, sendo a colheita realizada em nos meses de maio e novembro de 2016. As datas de colheita foram determinadas a partir dos parâmetros de maturação industrial (pH, teor de sólidos solúveis, acidez titulável).

Os dados meteorológicos, no período correspondente aos ciclos de avaliação, foram fornecidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Semiárido), obtida a partir da estação meteorológica automática localizada em Juazeiro, Bahia - Brasil. Os parâmetros meteorológicos coletados foram: temperatura máxima e mínima do ar ($^{\circ}\text{C}$), radiação solar global (MJ m^{-2}), umidade relativa (%), velocidade do vento (m s^{-1}), precipitação (mm) e evapotranspiração (mm) (Tabela 1).

4.2.3. Parâmetros de maturidade física e tecnológica

O diâmetro e o peso médio das amostras de uva foram determinados usando 150 bagas para cada variedade de uva. Um paquímetro digital foi usado para determinar o diâmetro. O peso médio das bagas foi obtido dividindo a massa total pelo número de bagas pesadas. O mosto resultante do esmagamento das amostras foi analisado quanto ao teor de sólidos solúveis, pH e acidez titulável (g L^{-1} ácido tartárico) de acordo com a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV, 2011). Um refratômetro digital HI 96801 (Hanna®, Woonsocket, EUA) foi utilizado para medir o conteúdo de sólidos solúveis totais e as medições de pH foram realizadas com um potenciômetro pH Analyzer (Tecnal®, São Paulo, Brasil).

4.2.4. Preparação dos extratos de sementes e casca das uvas

Extratos de semente de uva e casca de uva foram preparados em triplicata com 50 bagas de cada variedade de uva coletada nos quatro períodos de colheita. As sementes e cascas foram removidas manualmente das bagas e os extratos foram preparados separadamente

por maceração manual com 100 mL de uma mistura de metanol: água: ácido acético (50: 48,5: 1,5, v / v / v). Os extratos foram filtrados através de um filtro de papel Whatman número 1 e centrifugados (Eduotec®, Curitiba, Brasil) a 3.000 g por 5 min (BARCIA et al., 2014). O sobrenadante coletado foi utilizado para as determinações espectrofotométricas e cromatográficas.

Tabela 1. Parâmetros climáticos durante o ciclo de colheita das uvas BRS Violeta e Isabel Precoce em quatro meses distintos do mesmo ano.

Colheita da uva	Temperatura (°C)		Amplitude térmica (°C)	Umidade Relativa (%)			Radiação Global (MJ)	Velocidade do vento (m/s)	Precipitação pluviométrica (mm)	Evapotranspiração (mm)	
	Máxima	Média		Mínima	Máxima	Média					Mínima
Fevereiro	35,43	28,27	22,4	13,1	82,7	64,6	34,0	26,4	27,61	2,3	5,8
Maior	34,0	27,3	21,5	12,5	89,2	71,6	40,4	21,0	2,32	0,1	5,2
Agosto	32,3	25,2	19,0	13,3	90,7	72,4	37,6	18,9	2,78	0,0	4,7
Novembro	34,5	27,1	20,7	13,8	83,4	64,2	31,9	22,6	2,81	0,3	6,1

4.2.5. Suco de uva

Os sucos de uva foram elaborados na unidade fabril pertencente à Cooperativa Agrícola Nova Aliança (COANA), localizada no Projeto Irrigação Senador Nilo Coelho, Núcleo 02 Lote 551, Petrolina - PE – Brasil conforme a metodologia descrita por Lima *et al.* (2014). Para cada mês de colheita, foram processados 3000 kg de uvas, em mistura, na proporção 80% Isabel Precoce e 20% BRS Violeta, resultando em dois mil litros de suco, obtidos por extração a quente com adição de pectinase Endozym® Pectofruit PR (Spindal –Pascal Biotech, França) na dose 3,0 mL 100 kg⁻¹ de uva, numa linha de processo fabricada pela empresa JAPA® (Rio Grande do Sul, Brasil). Para realização das análises foram coletadas da linha de envase três garrafas de suco de uva (1L) produzidos nos diferentes meses de colheita, totalizando 12 garrafas.

4.2.6. Análises cromatográficas

Um sistema de HPLC Agilent 1260 Infinity de fase reversa (Santa Clara, CA, EUA) com detector de arranjo de diodos (DAD) e detector de índice de refração (RID) foi usado para determinar os ácidos orgânicos, açúcares e compostos fenólicos. Os dados foram processados usando o software OpenLAB CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies, Santa Clara - EUA).

A análise de ácidos orgânicos e açúcares nos sucos de uva foi realizada utilizando a metodologia descrita por Coelho *et al.* (2018). A coluna utilizada foi a de troca iônica Agilent Hi-Plex H (300 x 7,7 mm) com partículas internas de 8,0 micrômetros protegidas por uma coluna de proteção PL Hi-Plex H (5x3 mm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). A temperatura do compartimento da coluna foi mantida a 70°C e a célula de fluxo RID a 50°C. O fluxo utilizado foi de 0,5 mL min⁻¹ com tempo de execução de 20 minutos. A fase foi H₂SO₄ 0,004 mol L⁻¹ em água ultrapura.

A análise quantitativa dos compostos fenólicos nos sucos de uva e extratos de sementes e casca seguiu o método de Padilha *et al.* (2017) adaptado por Dutra *et al.* (2018). A coluna e pré-coluna utilizadas foram Zorbax Eclipse Plus RP-C18 (100 × 4,6 mm, 3,5 μm) e Zorbax C18 (12,6 × 4,6 mm, 5 μm), respectivamente (Zorbax, EUA). Como fases móveis se utilizou uma solução de ácido fosfórico 0,1 M, pH = 2,0 (A) e metanol acidificado com 0,5% de mistura de H₃PO₄ (B). O fluxo da fase

volume de injeção foi de 0,8 mL / min a 35 ° C e 20 µL da amostra, respectivamente. As amostras foram previamente diluídas em fase A e filtradas em membrana de 0,45 µm (Millex Millipore, Barueri, SP, Brasil). O gradiente utilizado na separação foi de 0 a 5 min: 5% B; 5 a 14 min: 23% de B; 14 a 30 min: 50% de B; 30-33 min: 80% B. A detecção dos compostos foi feita a 220, 280, 320, 360 e 520 nm, e a identificação e quantificação por comparação com padrões externos.

4.2.7 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada por meio de quatro diferentes ensaios: o sequestro de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (KIM, GUO, PACKER, 2002); sequestro de radicais ABTS (2,20-azinobis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)) (RE *et al.*, 1999), método de sequestro de peróxido de hidrogênio (RUCH, CHENG, KLAUNIG, 1989) e capacidade de redução do Folin-Ciocalteu (FC) (SINGLETON; ROSSI, 1965). . Estas análises foram realizadas utilizando um espectrômetro UV-Visible UV 2000A (Instrutherm, Brasil).

Para a realização dos métodos, as amostras foram diluídas com solução extratora (semente e extrato de pele) e água (suco de uva) até obter a inibição dos radicais DPPH e ABTS entre 20 e 80%. Soluções de DPPH e ABTS de radical a 1 mmol foram preparadas em etanol e diluídas para uma absorvência de $0,900 \pm 0,050$ ($\lambda = 734$ nm) e $0,700 \pm 0,050$ ($\lambda = 517$ nm), respectivamente. As absorbâncias foram determinadas antes e após a adição de amostras usando um espectrofotômetro. No método DPPH, a absorbância foi medida no tempo $t = 0$ e $t = 30$ min após a adição da amostra. No método ABTS, a absorbância foi determinada no tempo $t = 0$ e $t = 6$ min após a adição da amostra. Para avaliar a atividade antioxidante pelo método de eliminação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma solução de $0,4$ mol L^{-1} de peróxido de hidrogênio foi preparada em tampão fosfato (pH 7,4) e sua concentração foi determinada espectrofotometricamente a partir da absorção a 230 nm. A solução de peróxido de hidrogênio foi misturada com a amostra e tampão fosfato. O valor de absorbância da mistura reacional foi determinado 10 minutos mais tarde contra uma solução em branco contendo o tampão fosfato. Para avaliar a atividade antioxidante das amostras pelo método de Folin-Ciocalteu, uma alíquota de 7,9 mL de água destilada e 100 µL de amostras diluídas foram adicionadas a 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 min, 1,5 mL de solução de carbonato de sódio (20% m / v) foi

adicionado ao sistema. Este sistema foi incubado no escuro temperatura ambiente durante 120 min e a absorbância da mistura foi determinada a 765 nm.

Para os métodos DPPH, ABTS e H_2O_2 , os resultados foram calculados usando uma curva de calibração do Trolox (0,2-2,0 mM TEAC L⁻¹) e foram expressos como equivalentes de Trolox (μ M TE). Para o método FC, os resultados foram calculados usando uma curva de calibração de ácido gálico (25-500 mg L⁻¹) e foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (mg GAE).

4.2.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software estatístico SPSS (versão 17.0; Chicago, EUA). Estatísticas univariadas por Análise de Variância (one-way ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$) foram utilizadas para avaliar as características das variedades de uva e sucos de uva colhidas nos diferentes meses em relação aos parâmetros físico, físico-químico e bioativo. A estatística multivariada foi realizada usando análise de componentes principais (PCA) com pré-tratamento dos dados para normalização e escalonamento.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Parâmetros de maturidade física e tecnológica

A Tabela 2 mostra as características físico-químicas das uvas obtidas nas safras de fevereiro, maio, agosto e novembro do mesmo ano. Os resultados para o tamanho e peso das bagas mostraram que as uvas BV apresentaram bagas menores (13,9 a 14,8 mm e 2,0 a 2,3 g, respectivamente) quando comparadas às uvas IP (14,2 a 16,8 mm e 2,3 a 2,9 g, respectivamente) e que ambas tiveram poucas variações nesses parâmetros em diferentes meses do ano. O pH variou significativamente de 3,24 a 3,41 na variedade IP e 3,44 a 3,70 na variedade BV e algumas variações foram observadas entre os meses de colheita.

O conteúdo de sólidos solúveis variou de 18,1 a 23,4 °Brix para uvas BV e de 18,6 a 23,8 °Brix para uvas IP, enquanto a acidez titulável variou de 0,50 a 1,02 (% p/v como ácido tartárico) para as variedades. A relação SST / AT variou de 30,2 a 37,5 para uvas BV e de 23,3 para 31,0 para uvas IP. Estes valores estão de acordo com a legislação brasileira

para a colheita de uvas e foram comparativamente maiores na colheita de uvas em maio.

As uvas colhidas em agosto apresentaram os maiores valores de acidez titulável (0,74 e 1,02 g 100 mL⁻¹ para BV e IP, respectivamente). A menor acidez titulável foi encontrada para as uvas BV colhidas em fevereiro (0,50 g 100 mL⁻¹), enquanto para uvas IP o menor valor foi encontrado nas amostras colhidas em maio (0,67 g 100 mL⁻¹). Em geral, as amostras obtidas nos últimos meses do ano (agosto e novembro) apresentaram valores mais elevados de sólidos solúveis e acidez titulável. Isso é consistente com o estudo de Ribeiro et al. (2012) que relataram que as uvas Isabel Precoce e BRS Magna cultivadas na região do VSF apresentaram maior teor de sólidos solúveis quando colhidas em novembro.

4.3.2 Perfil de compostos fenólicos e atividade antioxidante *in vitro* de cascas e sementes das uvas

O perfil polifenólico e a atividade antioxidante nos extratos de casca e semente das uvas BRS Violeta e Isabel Precoce colhidas em diferentes períodos do mesmo ano são mostrados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Flavonóis, antocianinas, ácidos fenólicos, flavanonas, estilbenos, catequinas e procianidinas estavam entre as substâncias polifenólicas encontradas nos extratos de uva.

As antocianinas foram quantificadas em extratos de casca, sendo os polifenóis mais abundantes nestas amostras com concentrações totais variando de 704,2 a 5643,8 mg kg⁻¹, seguidos pelos flavonóis (20,0 a 1383,2 mg kg⁻¹) e ácidos fenólicos (46,8 a 1076,9 mg kg⁻¹), flavanonas (16,5 a 480,7 mg kg⁻¹), estilbenos (2,9 a 456,9 mg kg⁻¹) e flavonóis (10,5 a 77,1 mg kg⁻¹). Os extratos das sementes apresentaram as maiores concentrações de flavanóis (2147,3 a 4757,6 mg kg⁻¹) e as menores concentrações de ácidos fenólicos (12,1 a 100,2 mg kg⁻¹), flavonóis (1,3 a 36,4 mg kg⁻¹) e naringenina (3,5 a 7,2 mg kg⁻¹) (Tabela 4). A predominância de antocianinas nas cascas e de monômeros e dímeros de flavanóis nos extratos de sementes era esperada, uma vez que esses polifenóis são os principais constituintes fenólicos de cascas e sementes de uva vermelha (LORRAIN et al., 2013).

A atividade antioxidante variou entre as amostras de uva e os meses de colheita e foi dependente do método analítico. Os valores foram elevados nos extratos de sementes e variaram até 213,89 e 653,32 µmol

TE g⁻¹ quando utilizados os métodos ABTS e H₂O₂, respectivamente. A capacidade redutora de Folin-Ciocalteu variou de 15,35 a 32,31 mg GAE g⁻¹ nessas amostras. A atividade antioxidante das cascas de uva variou até 161,81 no método ABTS e até 1175,1 µmol TE g⁻¹ no método H₂O₂. O maior valor para a capacidade redutora de extratos de casca de Folin-Ciocalteu foi de 28,64 mg GAE g⁻¹. A alta atividade antioxidante encontrada nas amostras ao utilizar o método H₂O₂ sugere que tanto as uvas BV quanto as IP possuem potencial inibitório contra espécies reativas de oxigênio (ERO). Sabe-se que a capacidade antioxidante está relacionada aos mecanismos de proteção, incluindo a inibição das ERO associadas a diversas condições patológicas que levam a doenças como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (PANDEY; RIZVI, 2009; TOALDO et al., 2016). A alta atividade antioxidante das sementes de uva é explicada principalmente pela predominância de flavanóis e procianidinas. Esses polifenóis exercem uma forte atividade antioxidante que é ainda maior que a das antocianinas, que são mais abundantes nas cascas (MUSELIK et al., 2007).

As uvas BV apresentaram composição fenólica semelhante durante os quatro meses de colheita, o que não foi o caso da variedade IP. É importante ressaltar que a BRS Violeta é um híbrido obtido através de melhoramento genético utilizando vários cruzamentos e pode ter adquirido maior estabilidade frente às variações climáticas. Esta variedade foi desenvolvida para cultivo em áreas tropicais, como o Vale do São Francisco (CAMARGO, MAIA, NACHTIGAL, 2005). A variedade Isabel Precoce é uma mutação somática espontânea da variedade tradicional Isabel (LIMA et al., 2014). Algumas variações foram encontradas para a composição fenólica das uvas ao longo das sucessivas colheitas. Alterações específicas nos níveis de concentração de muitos tipos de compostos fenólicos são apresentadas abaixo.

4.3.2.1 Ácidos fenólicos

A soma dos ácidos fenólicos quantificados em cascas de amostras de IP variou de 46,8 a 1076,9 mg kg⁻¹ para as uvas colhidas em maio e fevereiro, respectivamente (Tabela 3). O período de colheita influenciou ($p < 0,05$) seus níveis em cascas de ambas as variedades, com as maiores concentrações observadas em fevereiro e as menores em maio. O ácido *trans*-cafártaro foi o principal ácido fenólico encontrado nas cascas das uvas IP (39,2-965,9 mg kg⁻¹) e BV (84,3-385,7 mg kg⁻¹), seguido pelo

Tabela 2. Parâmetros de qualidade das uvas colhidas em quatro meses do ano.

Parâmetros	Mês de colheita											
	Fevereiro			Maio			Agosto			Novembro		
	BV	IP		BV	IP		BV	IP		BV	IP	
<i>Físicos</i>												
Peso de baga (g)	2,1 ± 0,3	2,6 ± 0,4		2,3 ± 0,3	2,6 ± 0,4		2,2 ± 0,3	2,3 ± 0,4		2,0 ± 0,4	2,9 ± 0,4	
Tamanho de baga (mm)	13,9 ± 1,1	14,2 ± 1,0		14,3 ± 1,1	16,0 ± 1,1		14,8 ± 0,9	15,8 ± 1,2		13,9 ± 1,1	16,8 ± 1,2	
<i>Físico-químicos</i>												
pH	3,70 ± 0,01a	3,28 ± 0,01e		3,59 ± 0,00b	3,41 ± 0,04c		3,62 ± 0,01b	3,34 ± 0,01d		3,44 ± 0,03c	3,24 ± 0,05e	
SS(°Brix)	18,1 ± 0,1 g	18,6 ± 0,0 f		19,9 ± 0,2 e	20,7 ± 0,1 d		22,3 ± 0,3 c	23,8 ± 0,3 a		23,4 ± 0,1 b	22,6 ± 0,1 c	
AT (g 100 mL ⁻¹)	0,50 ± 0,00g	0,78 ± 0,01c		0,53 ± 0,00f	0,67 ± 0,01e		0,74 ± 0,01d	1,02 ± 0,01a		0,68 ± 0,01e	0,80 ± 0,01b	
SS/AT	36,1 ± 0,1 b	24,0 ± 0,1 g		37,5 ± 0,0 a	31,0 ± 0,2 d		30,2 ± 0,2 e	23,3 ± 0,4 g		34,1 ± 0,1 c	28,4 ± 0,4 f	

BV: BRS Violeta; IP: Isabel Precoce; AT: acidez titulável; SS: sólidos solúveis.

ácido siríngico para a variedade BV (60,4-127,0 mg kg⁻¹) e ácido clorogênico para a variedade IP (2,6-76,1 mg kg⁻¹).

O ácido fenólico *p*-cumárico não foi detectado em cascas de uva, independentemente do período de colheita. Estudos com vinhos da região do VSF descreveram o *trans*-cafárico como o ácido fenólico predominante (PADILHA et al., 2017; DUTRA et al., 2019). Entre os polifenóis não flavonóides, os ácidos fenólicos são os principais compostos em uvas e bebidas de uva (LORRAIN et al., 2013).

As concentrações de ácidos fenólicos nas sementes variaram de 12,1 a 100,2 mg kg⁻¹ nas uvas BV colhidas em fevereiro e novembro, respectivamente (Tabela 4). Os meses de colheita influenciaram ($p < 0,05$) suas concentrações nas sementes de uva, principalmente para as uvas colhidas em novembro, que apresentaram as maiores concentrações desses compostos, com exceção do ácido *p*-cumárico. O ácido siríngico foi o principal ácido fenólico nas amostras e foi encontrado em concentrações que variaram de 4,4 a 37,8 mg kg⁻¹. As sementes de BV apresentaram maiores teores de ácidos fenólicos quando comparadas com as sementes da variedade IP, independentemente do período de colheita.

Notavelmente, para a maioria dos compostos, suas concentrações aumentaram nos últimos meses do ano (colheitas em agosto e novembro) e isso foi observado para ambas as variedades de uvas.

4.3.2.2 Estilbenos

Os estilbenos *cis* e *trans*-resveratrol foram encontrados apenas nas cascas de uvas em concentrações de até 456,9 mg kg⁻¹ em uvas BV colhidas em maio (Tabela 3). Suas concentrações variaram muito ($p < 0,05$) entre os períodos de colheita, sendo os maiores níveis observados em maio e novembro para as variedades BV e IP, respectivamente.

O isômero *cis*-resveratrol foi detectado apenas no último mês de colheita em uvas IP. Esses resultados confirmam que não apenas a variedade da uva, mas também fatores exógenos, como as condições climáticas variáveis dos períodos de colheita, influenciam muito a composição dos estilbenos nas uvas.

Diversos estudos sugeriram que aumentos nas concentrações desses polifenóis estão associados a condições de estresse na videira (WANG et al., 2010; ACUÑA-ÁVILA et al., 2016; SARTOR et al., 2017).

Tabela 3. Composição fenólica (mg kg⁻¹ de peso fresco) e atividade antioxidante dos extratos de cascas obtidos das uvas BRS Violeta e Isabel Precoce em quatro meses do mesmo ano[§]

Parâmetros	Mês de colheita							
	Fevereiro		Maio		Agosto		Novembro	
	BV	IP	BV	IP	BV	IP	BV	IP
Ácidos fenólicos								
Ácido <i>trans</i> -Cafairico	293,5 ± 0,9 c	965,9 ± 0,5 a	84,3 ± 0,3 f	39,2 ± 0,1 g	143,7 ± 1,6 e	182,4 ± 4,2 d	385,7 ± 2,4 b	176,4 ± 0,4 d
Ácido siríngico	127,0 ± 1,7 a	10,6 ± 0,1 e	73,9 ± 0,0 c	2,3 ± 0,0 f	117,0 ± 0,3 b	5,0 ± 0,1 f	60,4 ± 1,6 d	5,3 ± 0,4 f
Ácido clorogênico	91,85 ± 0,8 a	76,1 ± 0,1 b	13,4 ± 0,4 f	2,6 ± 0,3 g	35,3 ± 0,0 d	19,5 ± 0,4 e	41,5 ± 0,6 c	12,4 ± 0,1 f
Ácido caféico	39,3 ± 3,0 a	10,2 ± 0,0 d	19,9 ± 0,4 c	2,7 ± 0,0 e	24,6 ± 0,1 b	6,1 ± 0,1 de	19,1 ± 0,1 c	5,8 ± 0,1 e
Ácido gálico	24,4 ± 2,0 a	14,1 ± 0,1 b	ND	ND	4,2 ± 0,0 d	ND	8,1 ± 0,5c	ND
Ácido <i>p</i> -cumárico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Σ ácidos fenólicos	576,05 ± 8,4	1076,9 ± 0,8	191,5 ± 0,11	46,8 ± 0,4	324,8 ± 2,0	213,0 ± 4,8	514,8 ± 5,2	199,9 ± 0,1
Estilbenos								
Cis-resveratrol	353,5 ± 1,3 c	ND	439,5 ± 0,8 a	ND	381,9 ± 12,4 b	ND	331,7 ± 2,1 d	15,4 ± 0,1 e
Trans-resveratrol	8,3 ± 0,6 d	13,2 ± 0,2 c	17,4 ± 0,1 a	2,9 ± 0,0 f	6,5 ± 0,0 e	5,7 ± 0,0 e	16,1 ± 0,5 b	12,3 ± 0,1 c
Σ estilbenos	361,8 ± 1,9	13,2 ± 0,2	456,9 ± 0,9	2,9 ± 0,0	388,4 ± 12,4	5,7 ± 0,0	347,8 ± 2,6	27,7 ± 0,2
Flavonóis								
(+)-Catequina	10,4 ± 2,0 b	9,8 ± 0,1 b	10,1 ± 0,1 b	4,0 ± 0,6 c	12,7 ± 0,2 b	5,5 ± 0,6 c	48,9 ± 2,1 a	11,9 ± 0,0 b
(-)-Epicatequina	371,8 ± 7,0 c	14,5 ± 0,2 e	387,0 ± 0,1 b	6,9 ± 0,1 e	408,6 ± 0,5 a	11,5 ± 0,6 e	317,8 ± 0,2 d	5,4 ± 0,2 e
(-)-Epicatequina galato	ND	34,4 ± 0,1 a	28,1 ± 0,1 b	2,1 ± 0,1 c	ND	ND	28,1 ± 2,1 b	3,1 ± 0,1 c
(-)-Epigallocatequina galato	99,1 ± 4,1 b	9,4 ± 0,4 e	79,7 ± 0,1 c	2,2 ± 0,0 f	132,8 ± 0,2 a	3,7 ± 0,1 ef	68,8 ± 0,3 d	5,0 ± 0,1 ef
Procianidina B1	16,5 ± 0,7 a	8,6 ± 0,1 d	7,1 ± 0,1 e	3,0 ± 0,0 f	6,2 ± 0,2 e	3,9 ± 0,1 f	14,2 ± 0,2 b	11,4 ± 0,0 c
Procianidina B2	885,4 ± 2,3 a	5,5 ± 0,2 f	742,5 ± 1,2 b	1,8 ± 0,0 f	662,7 ± 0,8 d	3,9 ± 0,2 f	731,4 ± 1,4 c	24,2 ± 0,2 e
Σ flavanóis	1383,2 ± 16,1	82,2 ± 0,11	1254,5 ± 1,7	20,0 ± 0,8	1223,0 ± 1,9	28,5 ± 1,6	1209,2 ± 6,3	61,0 ± 0,6
Flavonóis								
Quercetina 3-glicosídeo	15,1 ± 0,8 d	64,0 ± 0,1 a	33,9 ± 0,6 b	16,1 ± 0,1 cd	17,0 ± 0,1 c	0,8 ± 0,0 e	1,8 ± 0,1 e	1,4 ± 0,1 e
Rutina	6,3 ± 1,1 b	1,0 ± 0,0 c	10,8 ± 0,1 a	0,4 ± 0,0 b	11,5 ± 0,2 a	5,7 ± 0,0 b	9,9 ± 1,1 a	7,1 ± 0,1 b
Caempferol 3- <i>O</i> -glicosídeo	ND	7,2 ± 0,2 d	ND	1,7 ± 0,0 f	48,6 ± 0,1 a	4,0 ± 0,1 a	46,4 ± 0,3 b	7,9 ± 0,2 c
Σ flavonóis	21,4 ± 1,9	72,2 ± 0,3	44,7 ± 0,7	18,2 ± 0,1	77,1 ± 0,4	10,5 ± 0,1	58,1 ± 1,5	16,4 ± 0,4
Flavononas								
Naringenina	161,5 ± 9,3 d	18,3 ± 0,0 e	368,5 ± 1,6 b	18,7 ± 0,0 e	419,1 ± 0,9 a	26,0 ± 0,1 e	241,5 ± 0,8 c	16,5 ± 0,1 e
Hesperidina	52,9 ± 1,9 c	ND	65,5 ± 1,8 a	ND	61,6 ± 0,4b	27,2 ± 0,2 d	ND	ND
Σ flavononas	214,4 ± 11,2	18,3 ± 0,0	434,0 ± 3,4	18,7 ± 0,0	480,7 ± 1,3	53,2 ± 0,3	241,5 ± 0,8	16,5 ± 0,3,1

Tabela 3. (Continuação)

Parâmetros	Mês de colheita											
	Fevereiro			Maio			Agosto			Novembro		
	BV	IP	BV	BV	IP	IP	BV	BV	IP	IP	BV	IP
Antocianinas												
Malvidina 3-O- glicosídeo	ND	1483,0 ± 0,9 a	105,9 ± 0,2 e	468,6 ± 0,7 d	104,7 ± 0,2 e	1032,1 ± 0,9b	ND	877,7 ± 0,3c				
Delfinidina 3-O- glicosídeo	144,8 ± 9,8 c	79,0 ± 0,4 e	219,2 ± 0,6 b	13,1 ± 0,1 g	382,6 ± 1,9 a	26,8 ± 0,4 fg	120,9 ± 0,9 d	33,0 ± 0,6 f				
Peonidina 3-O- glicosídeo	ND	214,5 ± 1,3 a	20,4 ± 0,4 e	55,5 ± 0,0 d	17,5 ± 0,0 f	115,7 ± 0,6 b	ND	113,1 ± 0,7 c				
Malvidina 3,5-di glicosídeo	2527,7 ± 7,6 c	515,3 ± 1,8 e	3035,3 ± 1,4 b	167,0 ± 0,8 g	4278,8 ± 51,3 a	275,2 ± 0,1 f	1900,5 ± 1,8 d	329,9 ± 1,3 f				
Cianidina 3,5-di glicosídeo	599,1 ± 2,4 b	11,8 ± 0,1 e	506,8 ± 1,1 c	ND	860,2 ± 0,1 a	ND	418,0 ± 1,6 d	9,8 ± 0,2 e				
Pelargonidina 3,5-di glicosídeo	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND				
Σ antocianinas	3271,6 ± 19,8	2303,6 ± 4,5	3887,6 ± 3,7	704,2 ± 1,6	5643,8 ± 53,5	1449,8 ± 2,0	2439,4 ± 4,3	1363,5 ± 3,1				
Atividade antioxidante												
DPPH (µM TE g ⁻¹)	113,39 ± 3,6a	46,80 ± 2,8d	90,14 ± 0,8b	35,47 ± 0,6e	89,39 ± 1,2b	16,44 ± 0,4g	75,62 ± 3,4c	23,34 ± 1,3f				
ABTS (µM TE g ⁻¹)	161,81 ± 5,4a	47,60 ± 2,7d	97,85 ± 1,9c	6,87 ± 0,4f	98,70 ± 3,3c	19,33 ± 0,4ef	114,30 ± 12,7 b	26,98 ± 2,9e				
H ₂ O ₂ (µM TE g ⁻¹)	593,02 ± 0,4c	280,29 ± 1,9e	532,65 ± 0,2d	193,81 ± 1,2f	790,73 ± 19,2b	149,83 ± 1,5g	1175,1 ± 9,9a	614,58 ± 9,9c				
Folin Ciocalteu (mg GAE g ⁻¹)	28,64 ± 0,7a	14,3 ± 1,4d	21,86 ± 1,7b	2,82 ± 0,3e	23,59 ± 0,6b	4,47 ± 0,2e	18,12 ± 1,1c	3,39 ± 0,3e				

§ Os dados representam os valores médios para cada amostra ± desvio padrão (n = 3), Médias seguidas por uma letra diferente na mesma linha foram significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (p < 0,05), BV, BRS Violeta; IP, Isabel Precoce; ND, não detectado.

O *cis*-resveratrol estava presente em altas concentrações (331,7 a 439,5 mg kg⁻¹) em todas as amostras de BV. Estudos anteriores sobre sucos produzidos na região do VSF relataram a prevalência desse composto em uvas BRS Violeta (DUTRA et al., 2018). Sabe-se que o resveratrol é mais abundante e estável na configuração *trans*, pois este é o principal produto final gerado na biossíntese do resveratrol. No entanto, a isomerização *trans-cis* ocorre quando o *trans*-resveratrol é exposto à radiação solar ou ultravioleta (MORENO, CASTRO, FALQUÉ, 2008). Isso pode sugerir que as altas concentrações de *cis*-resveratrol encontradas nas amostras podem estar associadas à alta radiação (18,9-26,4 MJ) observada durante os períodos de colheita (Tabela 1).

4.3.2.3 Flavanois, proantocianidinas, flavonols e flavononas

As concentrações de flavonóides monoméricos e seus dímeros (proantocianidinas) diferiram muito entre as variedades de uvas e períodos de colheita. As concentrações de flavanóis variaram de 20,0 a 1383,2 mg kg⁻¹ em cascas (Tabela 3) e de 2147,3 a 4757,6 mg kg⁻¹ em sementes (Tabela 4). As uvas colhidas em novembro mostraram os mais altos níveis de flavanóis.

Catequina, epicatequina e procianidinas foram os polifenóis predominantes nas sementes e os flavanóis mais abundantes nas cascas de ambas as variedades. Suas concentrações foram variavelmente afetadas ($p < 0,05$) ao longo dos períodos de colheita. Outros estudos também relataram procianidinas, catequina e epicatequina como os principais flavonóides presentes nas uvas (GARCIA-JARES et al., 2015; LIU et al., 2018).

Rutina, quercetina 3-glicosídeo e caempferol 3-*O*-glicosídeo foram os flavonóis encontrados nas amostras. Suas concentrações totais variaram de 10,5 a 77,1 mg kg⁻¹ em cascas de uvas IP e BV, respectivamente, e de 1,3 a 36,4 mg kg⁻¹ em sementes de uvas BV. A presença de flavonóis e suas concentrações variaram significativamente entre as uvas e entre os períodos de colheita. As uvas da BV colhidas em novembro apresentaram as maiores concentrações de flavonóis, com uma soma total de 94,5 mg kg⁻¹, considerando cascas e sementes. Um alto teor de caempferol foi encontrado na casca (até 46,4 mg kg⁻¹), enquanto as sementes tinham até 27,2 mg kg⁻¹ de quercetina nessas amostras.

Tabela 4. Composição fenólica (mg kg⁻¹ de peso fresco) e atividade antioxidante de extratos de sementes obtidos das uvas BRS Violeta e Isabel Precoce colhidas em quatro meses do mesmo ano.

Parâmetros	Mês de colheita							
	Fevereiro		Maio		Agosto		Novembro	
	BV	IP	BV	IP	BV	IP	BV	IP
Ácidos fenólicos								
Ácido <i>trans</i> -cáttarico	ND	10,0 ± 0,1c	ND	ND	5,9 ± 0,0 d	ND	35,6 ± 0,0 a	18,6 ± 0,4 b
Ácido siríngico	4,4 ± 1,4 f	14,0 ± 0,1 d	11,2 ± 0,4 e	15,5 ± 0,0 d	14,7 ± 0,1 d	22,9 ± 0,1 c	28,5 ± 0,2 b	37,8 ± 0,1 a
Ácido clorogênico	3,2 ± 0,1 e	5,6 ± 0,0 b	ND	ND	3,2 ± 0,0 e	3,9 ± 0,1 d	6,7 ± 0,1 a	5,4 ± 0,1 c
Ácido caféico	ND	ND	ND	ND	2,0 ± 0,1 c	ND	3,2 ± 0,1 a	2,4 ± 0,1 b
Ácido galico	4,50 ± 1,1 g	12,5 ± 0,0 d	20,7 ± 0,1 c	13,9 ± 0,0 d	10,0 ± 0,0 e	7,5 ± 0,0 f	26,2 ± 0,2 b	28,1 ± 0,3 a
Ácido <i>p</i> -cumárico	ND	ND	ND	ND	8,2 ± 0,1	ND	ND	ND
Σ ácidos fenólicos	12,1 ± 2,6	42,1 ± 0,2	31,9 ± 0,5	29,4 ± 0,0	44,0 ± 0,3	34,3 ± 0,2	100,2 ± 0,6	92,3 ± 1,0
Estilbenos								
<i>Cis</i> -resveratrol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Trans</i> -resveratrol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Σ estilbenos	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonóis								
(+)-Catequina	2316,3 ± 6,6 c	969,3 ± 13,1 g	2879,3 ± 7,7 b	1011,3 ± 0,1f	1598,1 ± 1,4 d	1008,7 ± 5,0 f	2931,0 ± 1,1 a	1499,6 ± 0,4 e
(-)-Epicatequina	884,9 ± 16,5 e	1590,9 ± 50,3b	1025,9 ± 6,2 d	786,1 ± 0,5 f	713,5 ± 3,2 f	1109,8 ± 3,3 c	1184,6 ± 0,4 c	1868,2 ± 0,4 a
(-)-Epicatequina galato	54,2 ± 2,4 b	154,9 ± 0,3 a	ND	ND	33,0 ± 0,1 c	57,6 ± 0,3 b	5,7 ± 0,1 d	7,0 ± 0,1 d
(-)-Epigallocatequina galato	16,6 ± 0,6 d	49,9 ± 0,6a	38,2 ± 0,8 b	26,9 ± 0,3 c	28,5 ± 0,2 c	40,4 ± 0,5 b	17,4 ± 0,2 d	50,5 ± 0,9 a
Procianidina B1	163,2 ± 3,4 e	188,4 ± 0,6 d	229,8 ± 3,1 b	103,9 ± 1,2 g	113,0 ± 1,4 f	119,0 ± 0,8 f	260,0 ± 0,2 a	195,6 ± 0,1 c
Procianidina B2	193,4 ± 3,8 f	407,2 ± 2,1b	349,5 ± 5,9 c	219,1 ± 1,3 e	195,7 ± 1,4 f	288,0 ± 1,9 d	358,9 ± 1,1 c	473,2 ± 1,1 a
Σ flavanóis	3628,6 ± 33,3	3360,6 ± 67,0	4522,7 ± 23,7	2147,3 ± 3,4	2681,8 ± 7,7	2623,5 ± 11,8	4757,6 ± 3,1	4094,1 ± 3,0
Flavonóis								
Quercetina 3-glicosídeo	4,9 ± 1,1 c	3,2 ± 0,1d	6,0 ± 0,0 c	1,7 ± 0,0 d	ND	2,2 ± 0,0 d	27,2 ± 0,2 a	14,0 ± 0,3b
Rutina	3,1 ± 0,8 e	11,3 ± 0,0 a	5,1 ± 0,1 d	4,9 ± 0,1 d	ND	6,1 ± 0,0 cd	6,9 ± 0,1 c	9,4 ± 0,3 b
Caempferol 3- <i>O</i> -glicosídeo	1,40 ± 0,3 ab	1,3 ± 0,0ab	2,1 ± 0,6 ab	2,1 ± 0,0 b	1,3 ± 0,1 b	1,6 ± 0,1 ab	2,3 ± 0,0 a	1,4 ± 0,1 ab
Σ flavonóis	9,4 ± 2,2	15,8 ± 0,1	13,2 ± 0,7	7,8 ± 0,1	1,3 ± 0,1	9,9 ± 0,1	36,4 ± 0,3	24,8 ± 0,7
Flavononas								
Naringenina	3,5 ± 0,4	ND	ND	ND	ND	ND	7,2 ± 0,1	5,7 ± 0,1
Hesperidina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Σ flavononas	3,5 ± 0,4	-	-	-	-	-	7,2 ± 0,1	5,7 ± 0,1

Tabela 4. (Continuação)

Parâmetros	Mês de colheita											
	Fevereiro			Maio			Agosto			Novembro		
	BV	IP	BV	IP	BV	IP	BV	IP	BV	IP	BV	IP
Atividade antioxidante												
DPPH ($\mu\text{M TE g}^{-1}$)	172,98 \pm 19,7bc	204,69 \pm 15,7ab	212,41 \pm 7,0a	170,25 \pm 19,0c	101,61 \pm 8,4d	149,51 \pm 4,3c	145,08 \pm 2,9c	161,30 \pm 4,3c				
ABTS ($\mu\text{M TE g}^{-1}$)	198,47 \pm 19,7ab	196,83 \pm 19,4ab	149,45 \pm 0,5cd	213,89 \pm 9,9a	99,27 \pm 4,8e	120,26 \pm 2,3de	156,09 \pm 3,6c	172,88 \pm 9,2bc				
H ₂ O ₂ ($\mu\text{M TE g}^{-1}$)	525,61 \pm 0,8d	576,26 \pm 0,8c	609,61 \pm 0,2b	469,83 \pm 2,4e	454,12 \pm 1,3f	577,99 \pm 1,4c	653,32 \pm 8,4a	652,95 \pm 5,4a				
Folin Ciocalteu (mg GAE g ⁻¹)	23,77 \pm 0,5c	24,94 \pm 0,4bc	32,31 \pm 0,1a	20,87 \pm 0,7d	15,35 \pm 0,3e	20,27 \pm 1,3d	27,27 \pm 0,9b	30,32 \pm 1,9a				

§ Os dados representam os valores médios para cada amostra \pm desvio padrão (n = 3), Médias seguidas por uma letra diferente na mesma linha foram significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (p < 0,05), BV, BRS Violeta; IP, Isabel Precoce; ND, não detectado.

Para as uvas IP, observou-se que fevereiro foi o mês mais favorável para a produção de flavonóis, quando os níveis de quercetina atingiram 64 mg kg^{-1} nas cascas e os teores de rutina foram de até $11,3 \text{ mg kg}^{-1}$ nas sementes. Os níveis de concentração de flavonóis encontrados nas amostras podem estar relacionados ao estresse causado pela alta radiação solar observada na região estudada. Segundo Flamini et al. (2013), os flavonóis estão presentes principalmente na casca da uva, atuando efetivamente como fotoprotetores, absorvendo a radiação ultravioleta, principalmente UV-A e UV-B. Além disso, a quantidade de flavonóis também é influenciada pelo tamanho e espessura da fruta, o que pode explicar as concentrações mais elevadas desses polifenóis encontrados para as uvas BV (Tabela 2).

A flavanona naringenina foi identificada em extratos de casca de ambas as variedades de uva, enquanto esteve quase ausente nas sementes. Para ambas as uvas BV e IP, as concentrações de naringenina foram maiores em relação à hesperidina, que não foi detectada nas sementes. Para a variedade IP, a hesperidina foi encontrada apenas em uvas colhidas em agosto ($27,2 \text{ mg kg}^{-1}$). Isso é consistente com o estudo de Dutra et al. (2018) que relataram concentrações de hesperidina e naringenina em sucos de uva e vinhos de até $4,93$ e $5,64 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

Concentrações totais de flavanonas em cascas de uva variaram entre $16,5 \text{ mg kg}^{-1}$ em novembro e $480,7 \text{ mg kg}^{-1}$ em agosto. Embora alguns estudos relatem a atividade antioxidante das flavanonas, este grupo de compostos fenólicos não é comumente estudado em uvas, por serem mais abundantes em frutas cítricas (DOMÍNGUEZ, 2016).

4.3.2.4 Antocianinas

Cinco antocianinas (3-O-glicosídeos e 3,5-diglicosídeos) foram quantificadas nos extratos de casca das uvas estudadas (Tabela 3). A malvidina, nas formas 3,5-diglicosídeo e 3-O-monoglicosídeo, foi a principal antocianina nas uvas BV e IP, e seus níveis representaram até 78,1% e 71,2% do total de antocianinas encontradas nessas uvas, respectivamente. Pelargonidina diglicosídeo não foi detectada nas amostras, independentemente do período de colheita. Diferenças estatísticas foram observadas entre os períodos de colheita em relação às antocianinas. As amostras coletadas em agosto apresentaram as maiores concentrações de antocianinas em cascas de uvas BV, com concentração

total de 5643,8 mg kg⁻¹. Para as amostras de IP, as maiores concentrações foram observadas em fevereiro (2303,6 mg kg⁻¹). As menores concentrações totais de antocianinas foram observadas em novembro (2439,4 mg kg⁻¹ para BV) e maio (704,2 mg kg⁻¹ para IP). Em conjunto, essas variações nas concentrações de antocianinas indicam grande influência de fatores exógenos durante os períodos de colheita. Além da influência da variedade de uva. Sabe-se que fatores como alta luminosidade e temperaturas amenas são importantes para a síntese e acúmulo de antocianinas na baga. De fato, temperaturas em torno de 35 °C estão associadas a dificuldades na síntese de antocianinas pela planta, bem como à ativação de enzimas oxidativas que levam à degradação desses compostos (HE et al., 2010).

Os níveis de concentração de todas as antocianinas foram significativamente menores no último mês de colheita (novembro). Naquele mês, os monoglicósidos malvidina e peonidina não foram detectados nas uvas BV. Além disso, as concentrações desses compostos diminuíram em cascas de uvas IP durante os períodos de colheita. Assim, os resultados apontaram comportamentos específicos dessas uvas em relação às concentrações e perfis de antocianinas. É importante ressaltar que na região do VSF as uvas BRS Violeta e Isabel Precoce são utilizadas na produção de suco de uva pela mistura dessas variedades, sendo que a primeira é utilizada para proporcionar uma melhor característica de coloração. Os resultados mostraram que a colheita em agosto levou à obtenção de uvas mais ricas em antocianinas. Este mês apresentou as menores temperaturas e a menor evapotranspiração, o que corrobora a importância de temperaturas amenas para a síntese e acúmulo de antocianinas.

4.3.3 Associação entre colheita sucessiva e composição polifenólica

Os dados das características polifenólicas e antioxidantes das sementes de uva e cascas foram utilizados para explorar os efeitos dos períodos de colheita na qualidade da uva e composição bioativa através de análise multivariada. A Análise de Componentes Principais (ACP) para as amostras de cascas de uva (Fig. 1) e de sementes de uva (Fig. 2) são apresentados.

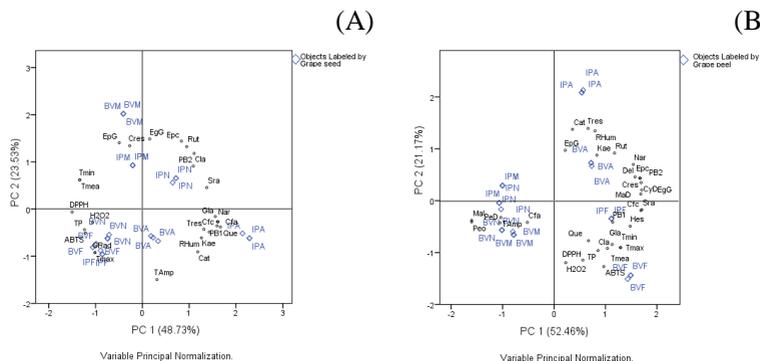
O conjunto de dados das cascas de uva foi representado nos dois primeiros componentes principais (PC1 x PC2) que explicaram 73,6% da variabilidade total dos dados.

O PC1 representou a variabilidade máxima (52,46%) e representou uma clara separação de acordo com o mês de colheita e a composição dos polifenóis. As uvas colhidas em fevereiro e agosto (PC1 > 0) foram separadas no eixo CP1 das colheitas em maio e novembro (PC1 < 0) e associadas à maioria dos fenólicos individuais. Isso reflete o alto peso dessas variáveis, período de colheita e composição fenólica, na explicação dos dados originais. As principais variáveis de contribuição no primeiro componente principal (loading > 0,70) foram as seguintes: ácido siríngico (Sra: 0,985), epigallocatequina galato (EgG: 0,985), cianidina (CyD: 0,977), ácido cafeico (Cfc: 0,974), malvidina 3,5-diglicosídeo (MaD: 0,973), *cis*-resveratrol (Cres: 0,965), epicatequina (Epc: 0,965), procianidina B2 (PB2: 0,964), delphinidina 3-O-glicosídeo (Del: 0,910), naringenina (Nar: 0,890), hesperidina (Hes: 0,855), temperatura máxima (Tmax: 0,747), temperatura média (Tmea: 0,747), temperatura mínima (Tmin: 0,747) e radiação global (Grad: 0,747). O PC2 explicou 21,17% da variabilidade total e as variáveis com maior contribuição foram *trans*-resveratrol (Tres: 0,804), catequina (Cat: 0,794), umidade relativa (Rhum: 0,776) e atividade antioxidante (ABTS: -0,733).

A análise do PCA dos dados das sementes de uva revelou que 72,3% da variação total foi representada pelos dois principais componentes principais. O PC1 explicou 48,73% da variabilidade dos dados, enquanto 23,53% foram explicados pelo PC2. As variáveis com maior contribuição (loading > 0,70) no primeiro componente foram quercetina 3-glicosídeo (Que: 0,949), ácido caféico (Cfc: 0,918), naringenina (Nar: 0,915), ácido caftárico (Cfa: 0,915), procianidina B1 (PB1: 0,907), ácido gálico (Gla: 0,887), caempferol 3-O-glicosídeo (Kae: 0,813), ácido siríngico (Sra: 0,783), *trans*-resveratrol (Tres; 0,748) e umidade relativa (Rhum: 0,718). Estes foram fortemente associados com as uvas BRS Violeta e Isabel Precoce colhidas em agosto.

Por outro lado, a atividade antioxidante medida pelos métodos DPPH (-0,854) e Folin Ciocalteu (-0,703) e as temperaturas mínima e média (Tmin e Tmea: -0,761) tiveram forte contribuição no PC1, o que significa que as variáveis foram mais associadas com as uvas IP e BV colhidas em maio, quando a menor amplitude térmica e a menor radiação foram registradas (Tabela 1). No entanto, a abordagem multivariada revelou que, de forma variável, todos os fatores endógenos e exógenos envolvidos na composição e qualidade da uva podem ser mais ou menos influenciados pela colheita sucessiva, particularmente devido às variações climáticas que ocorrem durante os meses do ano.

Figura 1. Análise de Componentes Principais (PCA) usando os resultados para compostos fenólicos, atividade antioxidante e parâmetros climáticos para cascas de uvas (A) e sementes (B) colhidas nos meses de fevereiro, maio, agosto e novembro de 2016.



Cfa- Ácido cafárico; Sra- Ácido Siringico; Cla- Ácido clorogênico; Cfc- Ácido Caféico; Gla- Ácido Gálico; Cres-*cis*-resveratrol; Tres-*trans*-resveratrol; Cat-Catequina; Epc-epicatequina; EpG – Epicatequina galato; EgG- Epigallocatequina galato; PB1-Procyanidina B1; PB2-Procyanidina B2; Que-queretina 3-glicosídeo; Rut-Rutina; Kae-kaempferol 3-O-glicosídeo; Nar-Naringenina; Hes-Hesperidina; Mal-Malvidina 3-O-glicosídeo; Del-Delfinidina 3-O-glicosídeo; Peo-Peonidina 3-O-glicosídeo; MaD-Malvidina 3,5-diglicosídeo; CyD-Cianidina 3,5-diglicosídeo; PeD- Pelargonidina 3,5-diglicosídeo; TP-Polifenóis Total; Tmean - Temperatura Média; Tmax- Temperatura máxima, Tmin- Temperatura Mínima; Tamp - amplitude térmica; Grad- radiação global; RHum - umidade relativa média.

4.3.4 Composição fenólica e atividade antioxidante de sucos de uva

O perfil fenólico e a atividade antioxidante dos sucos de uva elaborados a partir das variedades BRS Violeta e Isabel Precoce são mostrados na Tabela 5. Em geral, observou-se que o mês de colheita teve influência sobre o teor bioativo dos sucos de uva. Os polifenóis epicatequina, procianidina B2, cianidina 3,5-diglucosídeo, ácido cafárico e malvidina glicosídeos foram os fenólicos mais abundantes e suas concentrações foram afetadas ($p < 0,05$) pelo período de colheita. Os ácidos málico e tartárico foram os ácidos orgânicos predominantes,

enquanto a frutose e a glicose foram os principais açúcares encontrados nas amostras de suco.

Os sucos produzidos a partir das uvas colhidas em agosto apresentaram as maiores concentrações de ácidos orgânicos, o que é consistente com o aumento da acidez desses sucos. O mesmo foi observado para as concentrações de açúcares, compostos fenólicos e atividade antioxidante que foram significativamente maiores para uvas e sucos obtidos naquele mês. Estes resultados corroboram os resultados da caracterização química das amostras de uva e confirmam que a composição do suco de uva depende da variedade da uva e de suas condições de cultivo. De fato, a qualidade das bebidas à base de uva está relacionada às características da uva que são grandemente influenciadas por fatores endógenos e exógenos (RIZZON, MANFROI, MENEGUZZO, 1998).

Neste estudo observamos que, mesmo em uma região de baixa variabilidade climática anual como a região do VSF, a colheita sucessiva durante o mesmo ano levou a uvas e sucos com diferentes teores de compostos bioativos e atividade antioxidante. Os principais marcadores fenólicos encontrados nas amostras de uva e sucos foram o ácido *trans*-caftárico, procianidina B2, malvidina 3,5-diglicosídeo e *cis*-resveratrol. Estes também foram relatados em outros sucos de uva produzidos naquela região (DUTRA et al., 2018, LIMA et al., 2015). Digno de nota, as antocianinas malvidina 3,5-diglicosídeo e malvidina 3-O-glicosídeo têm sido relatadas como marcadores fenólicos de sucos de uva brasileiros e europeus, respectivamente (GRANATO et al., 2015a).

Os dados representam os valores médios para cada amostra \pm desvio padrão ($n = 3$); Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$); Acidez titulável expressa em equivalentes de ácido tartárico; TE, equivalentes Trolox; GAE, equivalentes de ácido gálico; ND, não detectado.

Tabela 5. Parâmetros físico-químicos, ácidos orgânicos, açúcares, composição polifenólica e atividade antioxidante dos sucos de uva das uvas BRS Violeta e Isabel Precoce.

Parâmetros	Período de colheita			
	Fevereiro	Maio	Agosto	Novembro
Físico-químicos				
pH	3,4 ± 0,0 ^b	3,5 ± 0,0 ^a	3,4 ± 0,0 ^b	3,3 ± 0,0 ^c
Sólidos solúveis totais (°Brix)	17,7 ± 0,0 ^d	21,3 ± 0,2 ^c	23,9 ± 0,1 ^a	22,0 ± 0,4 ^b
Acidez titulável (g 100 mL ⁻¹)	0,7 ± 0,0 ^c	0,8 ± 0,0 ^b	1,1 ± 0,0 ^a	0,8 ± 0,1 ^b
Ácidos orgânicos (g L⁻¹)				
Ácido tartárico	3,1 ± 0,1 ^a	2,4 ± 0,57 ^a	3,2 ± 0,59 ^a	2,2 ± 0,24 ^a
Ácido málico	2,93 ± 0,04 ^c	3,17 ± 0,02 ^b	3,9 ± 0,00 ^a	2,8 ± 0,04 ^d
Ácido cítrico	0,26 ± 0,01 ^b	0,29 ± 0,00 ^b	0,08 ± 0,07 ^c	0,49 ± 0,01 ^a
Ácido succínico	0,50 ± 0,03 ^a	0,54 ± 0,00 ^a	0,60 ± 0,01 ^a	0,54 ± 0,00 ^a
Ácido acético	ND	ND	ND	ND
Ácido láctico	ND	ND	ND	ND
∑ ácido orgânico quantificado	6,8 ± 0,2	6,4 ± 0,59	7,8 ± 0,67	6,0 ± 0,29
Açúcares (g L⁻¹)				
Maltose	0,10 ± 0,01 ^b	0,09 ± 0,02 ^b	0,14 ± 0,00 ^a	0,1 ± 0,00 ^b
Glicose	71,44 ± 4,76 ^b	90,43 ± 0,43 ^a	96,64 ± 0,43 ^a	95,01 ± 0,33 ^a
Frutose	80,11 ± 0,28 ^d	92,16 ± 0,00 ^c	98,22 ± 0,45 ^a	95,24 ± 0,23 ^b
Ramnose	ND	ND	ND	ND
∑ açúcares quantificados	151,7 ± 5,05	182,7 ± 0,45	195,0 ± 0,88	190,4 ± 0,56
Compostos fenólicos (mg L⁻¹)				
Flavanols				
(+)-Catequina	11,3 ± 0,1 ^b	10,3 ± 0,0 ^b	44,6 ± 0,1 ^a	11,3 ± 2,0 ^b
(-)-Epicatequina	14,6 ± 0,2 ^d	21,2 ± 0,0 ^b	49,8 ± 0,1 ^a	18,3 ± 0,7 ^c
(-)- Epicatequina galato	1,5 ± 0,0 ^b	0,8 ± 0,0 ^c	2,3 ± 0,1 ^a	ND
(-)- Epigallocatequina galato	4,0 ± 0,1 ^c	5,4 ± 0,0 ^b	10,4 ± 0,0 ^a	5,6 ± 0,1 ^b
Procianidina B1	3,6 ± 0,1 ^c	3,0 ± 0,1 ^c	10,8 ± 0,1 ^a	5,3 ± 0,4 ^b
Procianidina B2	24,1 ± 1,1 ^c	22,9 ± 0,1 ^c	48,0 ± 0,2 ^a	27,3 ± 0,6 ^b
∑ Flavanols quantificadas	59,1 ± 1,6	156,2 ± 0,2	165,9 ± 0,6	67,8 ± 3,8
Flavonols				
Quercetina 3-glicosídeo	9,4 ± 0,0 ^a	2,4 ± 0,0 ^c	9,0 ± 0,0 ^a	4,3 ± 0,3 ^b
Rutina	0,1 ± 0,0 ^c	0,8 ± 0,0 ^b	0,1 ± 0,0 ^c	1,0 ± 0,1 ^a
Caempferol 3-O-glicosídeo	0,9 ± 0,0 ^c	ND	1,2 ± 0,0 ^b	2,0 ± 0,1 ^a
∑ Flavonols	9,5 ± 0,0	3,2 ± 0,0	9,1 ± 0,0	5,3 ± 0,4
Flavanonas				
Hesperidina	ND	ND	7,1 ± 0,2 ^a	1,6 ± 2,2 ^b
Naringenina	3,0 ± 0,0 ^d	5,2 ± 0,0 ^b	14,3 ± 0,0 ^a	4,7 ± 0,1 ^c

Tabela 5. (Continuação)

Parâmetros	Período de colheita			
	Fevereiro	Maio	Agosto	Novembro
∑ Flavanonas quantificadas	3,0 ± 0,0	5,2 ± 0,0	21,4 ± 0,2	6,3 ± 2,3
<i>Antocianinas</i>				
Cianidina 3,5-diglicosídeo	12,8 ± 0,0 ^c	17,7 ± 0,1 ^b	41,5 ± 0,1 ^a	16,9 ± 0,8 ^b
Malvidina 3,5-diglicosídeo	77,7 ± 1,7 ^c	103,0 ± 0,3 ^b	256,2 ± 1,3 ^a	99,1 ± 3,7 ^b
Pelargonidina 3,5-diglicosídeo	ND	ND	ND	ND
Peonidina 3- <i>O</i> -glicosídeo	9,4 ± 0,1 ^b	3,9 ± 0,0 ^d	12,6 ± 0,0 ^a	6,8 ± 0,2 ^c
Malvidina 3- <i>O</i> -glicosídeo	61,1 ± 0,7 ^b	26,9 ± 0,1 ^d	99,6 ± 0,1 ^a	47,4 ± 1,6 ^c
Delfinidina 3- <i>O</i> -glicosídeo	6,9 ± 0,0 ^b	6,2 ± 0,1 ^c	19,2 ± 0,0 ^a	6,3 ± 0,3 ^{bc}
∑ Antocianinas quantificadas	167,9 ± 2,5	157,7 ± 0,6	429,1 ± 1,5	176,5 ± 6,6
<i>Ácidos fenólicos</i>				
Ácido gálico	8,2 ± 0,1 ^a	5,4 ± 0,0 ^c	8,1 ± 0,0 ^a	7,0 ± 0,1 ^b
Ácido siríngico	5,5 ± 0,1 ^c	6,1 ± 0,1 ^b	12,7 ± 0,0 ^a	6,4 ± 0,1 ^b
Ácido <i>p</i> -Cumárico	4,7 ± 0,1 ^b	3,1 ± 0,1 ^b	8,9 ± 0,2 ^a	4,3 ± 0,9 ^b
Ácido Caféico	4,9 ± 0,2 ^c	4,5 ± 0,0 ^c	9,7 ± 0,1 ^a	5,6 ± 0,1 ^b
Ácido Caftárico	192,8 ± 6,0 ^b	205 ± 0,5 ^b	330,9 ± 0,6 ^a	344,1 ± 35,3 ^a
Ácido Clorogênico	17,6 ± 0,6 ^b	15,9 ± 0,0 ^b	27,0 ± 0,0 ^a	26,3 ± 2,6 ^a
∑ ácidos fenólicos	233,7 ± 7,1	240,0 ± 0,7	397,3 ± 0,9	393,7 ± 39,1
<i>Estilbenos</i>				
<i>trans</i> -Resveratrol	1,8 ± 0,0 ^a	0,5 ± 0,0 ^d	1,7 ± 0,0 ^b	0,9 ± 0,0 ^c
<i>cis</i> -Resveratrol	5,7 ± 0,4 ^c	9,1 ± 1,8 ^{bc}	16,8 ± 0,2 ^a	11,3 ± 0,2 ^b
∑ Estilbenos quantificados	7,5 ± 0,4	9,6 ± 1,8	18,5 ± 0,2	12,2 ± 0,2
Atividade antioxidante (mM TEAC L⁻¹)				
DPPH (mmol TE L ⁻¹)	7,9 ± 0,3 ^{bc}	9,8 ± 0,2 ^b	26,2 ± 2,0 ^a	6,6 ± 0,2 ^c
ABTS (mmol TE L ⁻¹)	8,0 ± 0,6 ^c	14,5 ± 0,4 ^b	27,3 ± 1,3 ^a	11,6 ± 0,2 ^c
H ₂ O ₂ (mmol TE L ⁻¹)	32,9 ± 0,3 ^c	52,7 ± 0,2 ^b	142,2 ± 1,3 ^a	51,5 ± 0,9 ^b
	2249,1 ±	2146,9 ±	4935,5 ±	1905,3 ±
Folin Ciocalteu (mg GAE L ⁻¹)	46,8 ^b	14,2 ^b	112,6 ^a	147,0 ^c

4.4 CONCLUSÃO

Seguindo estudo anterior, elucidando a qualidade fenólica dos sucos de uva produzidos em uma região tropical semiárida (LIMA et al., 2015), identificamos os efeitos da colheita sucessiva na composição da uva, influenciada por condições climáticas específicas, que têm impacto na qualidade do suco. A variedade e os fatores climáticos exerceram uma influência significativa na qualidade e composição das uvas, conforme

demonstrado pela análise multivariada. As uvas Isabel Precoce e BRS Violeta apresentaram perfis polifenólicos semelhantes com atividade antioxidante comparável, enquanto as uvas colhidas em fevereiro e agosto tiveram o maior acúmulo de polifenóis. Isto foi especialmente observado para antocianinas e flavanóis. As temperaturas, a radiação global, a velocidade do ar e a taxa de evapotranspiração foram as principais variáveis climáticas associadas ao maior acúmulo de compostos bioativos nas amostras, todas influenciando o período de colheita. As informações fornecidas neste estudo sobre a relação entre a composição bioativa das variedades de uva e as variações climáticas podem auxiliar os produtores de uva na produção de uvas e sucos de uva com alto conteúdo bioativo em áreas semiáridas e tropicais.

4.5 AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código Financeiro 001. Os autores agradecem os apoios financeiros e técnicos do Instituto Federal do Sertão Pernambucano e da Cooperativa Agrícola Nova Aliança (COANA).

4.6 REFERENCIAS

- ACUÑA-AVILA, P. E. et al. Relationship between the elemental composition of grapeyards and bioactive compounds in the Cabernet Sauvignon grapes *Vitis vinifera* harvested in Mexico, 203, 79–85, 2016.
- BARCIA, M. T. *et al.* Phenolic composition of grape and winemaking by-products of Brazilian hybrid cultivars BRS Violeta and BRS Lorena. *Food Chemistry*, 159, 95–105, 2014.
- CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Advances in grape culture in Brazil. *Bras. Frutic.*, special volume, p. 144–149, 2011.
- CAMARGO, A. C. et al. Low molecular weight phenolics of grape juice and wine-making by-products: Antioxidant activities and inhibition of oxidation of human LDL-cholesterol and DNA strand breakage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (50), 12159-12171, 2014.
- COELHO, E. M. *et al.* Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 66, 160-167, d
- DOMÍNGUEZ, M. T. Flavonoides extraídos de la cascara de naranja tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) y su aplicación como antioxidante natural en el aceite vegetal sacha inchi (*Plukenetia volubilis*), *Scientia Agropecuaria*, 7(4), 419–431, 2016.
- DUTRA, M.C.P. *et al.* Integrated analyses of phenolic compounds and minerals of Brazilian organic and conventional grape juices and wines: Validation of a method for determination of Cu, Fe and Mn. *Food Chemistry*, 269, 157-165.
- FLAMINI, R. *et al.* Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: Anthocyanins, stilbenes and flavonols. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 19651–19669, 2013.

- GARCIA-JARES, C. *et al.* Antioxidant White Grape Seed Phenolics: Pressurized Liquid Extracts from Different Varieties, 737–749, 2015.
- GRANATO, D. *et al.* Authentication of geographical origin and crop system of grape juices by phenolic compounds and antioxidant activity using chemometrics. *Journal of Food Science*, 80(3), C584–C593, 2015a.
- GRANATO, D. *et al.* Characterization of Conventional, Biodynamic, and Organic Purple Grape Juices by Chemical Markers, Antioxidant Capacity, and Instrumental Taste Profile. *Journal of Food Science*, 80, C55–C65, 2015b.
- HE, F. *et al.* Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules*, 15(12), 9057–9091, 2010.
- KIM, Y. K.; GUO, Q.; PACKER, L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicology*, 172(2), 149–156, 2002.
- LIMA, M. D. S. *et al.* Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. *Food Chemistry*, 161, 94–103, 2014.
- LIU, Y. *et al.* Effect of Training Systems on Accumulation of Flavan-3-ols in Cabernet Sauvignon Grape Seeds at the North Foot of Mt . Tianshan, 39(1), 35–46, 2018.
- LORRAIN, B.; KY, I.; PECHAMAT, L.; TEISSEDRE, P. Evolution of Analysis of Polyphenols from Grapes, Wines, and Extracts, 1076–1100, 2013.
- MARGRAF, T. *et al.* Effects of geographical origin, variety and farming system on the chemical markers and in vitro antioxidant capacity of Brazilian purple grape juices. *Food Research International*, 82, 145–155, 2016.
- MORENO, A.; CASTRO, M.; FALQUÉ, E. Evolution of trans- and cis-resveratrol content in red grapes (*Vitis vinifera* L. cv Mencía, Albarello

and Merenzao) during ripening. *European Food Research and Technology*, v.227, p.667-674, 2008.

MUSELÍK, J. et al. Measurement of Antioxidant Activity of Wine Catechins, Procyanidins, Anthocyanins and Pyranoanthocyanins. *Internacional Journal of Molecular Sciences*, 8, 797–809, 2007.

OCDE/FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, *OECD-FAO Agricultural Outlook 2015*, OECD Publishing, Paris.

OIV – Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. *Recueil des methods internationaux d'analyse des vins et des mouts*, edition 2011. 8th Assemblée Générale, 21 June 2010, Paris.

PADILHA, C. V. DA S. *et al.* Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC / DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. *Food Chemistry*, 228, 106–115, 2017.

PANDEY, K.B., RIZVI, S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2, 270-278.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237, 1997.

RIBEIRO, T. P.; DE LIMA, M. A. C.; ALVES, R. E. Maturação e qualidade de uvas para suco em condições tropicais, nos primeiros ciclos de produção. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(8), 1057–1065, 2012.

RIZZON, L. A., MANFROI, V., MENEGUZZO, J. *Elaboração de suco de uva na propriedade vitícola*. (1st ed.). Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 1998.

RUCH, R. J., CHENG, S. JUN, & KLAUNIG, J. E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10, 1003–1008. 1989.

SARTOR, S. *et al.* Particularities of Syrah wines from different growing regions of Southern Brazil: grapevine phenology and bioactive compounds. *J Food Sci Technol*, 54(May), 1414–1424, 2017.

SILVA, M.J.R. *et al.* Grape juices produced from new hybrid varieties grown on Brazilian rootstocks – Bioactive compounds, organic acids and antioxidant capacity. *Food Chemistry*. 289, 714-722.2019

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolyb- dic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticul- ture* 16, 144–158, 1965.

TEIXEIRA, A.H.C. Informações agrometeorológicas do Pólo Petrolina, PE/ Juazeiro - 1963 a 2009. Petrolina: Embrapa Semiárido (Embrapa Semiárido. Documentos, 233), 21, 2010.

TEIXEIRA, A.; EIRAS-DIAS, J.; CASTELLARIN, S. D.; GERÓS, H. Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18711–18739, 2013.

TOALDO, I.M. *et al.* Resveratrol improves TNF- α -induced endothelial dysfunction in a coculture model of a Caco-2 with an endothelial cell line. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 36, 21–30. 2016.

XU, C.; ZHANG, Y.; CAO, L.; LU, J. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chemistry*, 119(4), 1557–1565, 2010.

WANG W. *et al.* Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. *Plant Physiol. Biochem.* 48 142–152, 2010. 10.1016/j.plaphy.2009.12.002

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As condições climáticas da região do Vale do São Francisco, aliada a irrigação, poda, uso de cultivares e porta-enxertos adaptados permitem que a colheita das uvas seja programada para qualquer mês do ano, influenciando diretamente na qualidade dessa fruta.

A composição química e bioativa de uvas, sucos e vinhos da região do Vale do São Francisco foram investigadas com o objetivo de apresentar o potencial bioativo das novas variedades de uvas plantadas em uma região semiárida. Pela primeira vez, foram avaliadas sucessivas safras de uvas colhidas no mesmo ano e o efeito do clima na qualidade de uvas e sucos de uvas.

Para tal, inicialmente foi realizada validação de método cromatográfico para determinação de 15 compostos fenólicos em derivados de uvas por RP-HPLC-DAD utilizando uma nova coluna de resolução rápida. O método apresentou-se linear, preciso e rápido, com valores de recuperação e CV nos intervalos recomendados pelos guias de validação.

Após a validação do método analítico, amostras de uvas e sucos de uvas puderam ser analisadas para verificar a composição fenólica nos produtos estudados. As uvas analisadas apresentaram teores bioativos atrativos quando comparadas às cultivares clássicas mundiais. Por serem cultivares híbridos, contêm compostos bioativos que não são encontrados em cultivares clássicas (*V. vinífera* L.), como as antocianinas diglicosiladas. Além disso, essas uvas representam uma alternativa para a diversificação de cultivares e estão disponíveis gratuitamente para a produção de uvas de mesa.

Neste estudo também ficou evidenciado que mesmo numa região de pouca variabilidade climática anual como no SFV, as sucessivas colheitas realizadas ao longo do ano são influenciadas por parâmetros climáticos e propiciam uvas e sucos com diferentes valores e perfis de compostos bioativos e atividade antioxidante. Fatores como temperaturas, radiação global, velocidade do ar e taxa de evapotranspiração foram as principais variáveis climáticas associadas a um maior acúmulo de compostos bioativos na uva e suco, onde os meses de fevereiro e agosto foram os meses com melhores resultados em relação a estes fotoquímicos.