

Vívian Maria Burin

**Caracterização de clones da variedade Cabernet Sauvignon:
uvas e vinhos de São Joaquim, Santa Catarina**

Florianópolis-SC
2010

Vívian Maria Burin

**Caracterização de clones da variedade Cabernet Sauvignon:
uvas e vinhos de São Joaquim, Santa Catarina**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito final à obtenção do título de
Mestre em Ciências dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Marilde T. Bordignon Luiz

Florianópolis-SC
2010

Caracterização de clones da variedade Cabernet Sauvignon: uvas e vinhos de São Joaquim, Santa Catarina

Por

Vívian Maria Burin

Dissertação aprovada como requisito final para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos pela comissão formada por:

Presidente:

Prof. Dra. Marilde T. Bordignon-Luiz (UFSC)

Membro:

Dr. Jean Pierre Rosier (Epagri)

Membro:

Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva (UFSC)

Membro:

Prof. Dra. Roseane Fett (UFSC)

Membro:

Dra. Léa Luzia Freitas Costa (LACEN)

Coordenadora:

Prof. Dra. Renata Dias de Mello Castanho Amboni (UFSC)

Florianópolis, maio de 2010.

Agradecimentos

À Deus acima de tudo.

À minha família, meus pais, Ivo e Eloides, meus irmãos João, Rafael e Diogo que sempre me apoiaram em tudo, principalmente à minha mãe, por todo incentivo, acreditando sempre na minha capacidade, pois sem ela não estaria aqui.

Ao meu namorado Tanes, por estar sempre ao meu lado.

Agradeço muito à minha orientadora, Profa. Dra. Marilde T. Bordignon Luiz, por todas as oportunidades que me concedeu durante todo o período de graduação assim como neste Mestrado, pelo apoio e confiança na realização de todos os trabalhos que participei no laboratório, e pela orientação e dedicação na realização deste trabalho. Muito Obrigada por acreditar em mim!

Sincero agradecimento ao Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva pela paciência, apoio, cooperação e aos ensinamentos para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Jean Pierre Rosier, pela realização das microvinificações e orientação prestada durante este trabalho.

À Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina - Epagri, e principalmente ao Dr. Hamilton Justino Vieira por conceder os dados climáticos.

À Leônidas Ferraz e Alceu Muller por ceder parte do vinhedo para realização deste trabalho.

Agradeço a Luciane por toda a ajuda prestada e paciência no esclarecimento das minhas dúvidas.

Meu sincero agradecimento, Dra. Léa Luzia Freitas Costa, por toda confiança depositada e apoio para realização deste trabalho. Parte deste trabalho eu devo a você!

Aos amigos, antigos e atuais, do laboratório de Bioquímica de Alimentos: Eliana, Leila, Cony, Estela, Lídia, Vinícius, Priscilla, Nayla, Stefany, Isabela, Maria Clara, Luana, Gabriela e Luciana, pela ajuda prestada na realização deste trabalho e por todos os momentos de descontração.

Agradeço muito a duas pessoas muito especiais que me acolheram neste laboratório, compartilharam seus conhecimentos e me inspiraram para realização deste mestrado: Leila e Eliana muito obrigada por tudo.

Agradeço as minhas amigas Priscilla e Ana pelo companherismo e amizade desde a primeira fase da graduação até os dias de hoje e pelo apoio durante todo este trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida para realização desta pesquisa e ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos pela oportunidade.

Resumo

BURIN, Vívian Maria. Caracterização de clones da variedade Cabernet Sauvignon: uvas e vinhos de São Joaquim, Santa Catarina. 2010. 158p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-SC.

A uva Cabernet Sauvignon, apresenta diferentes clones, que são classificados de acordo com seu potencial produtivo. Dentre estes clones pode-se destacar os clones 169 e 685, ambos de origem Francesa que são classificados em distintos grupos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar dois clones, 169 e 685, da uva Cabernet Sauvignon procedentes da região de São Joaquim do Estado de Santa Catarina, Brasil, e validar uma metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação simultânea dos principais compostos fenólicos. Os vinhos produzidos com os clones 169 e 685, safra 2008, foram caracterizados quanto aos parâmetros físico-químicos, compostos fenólicos totais, compostos fenólicos individuais flavonóides e não-flavonóides, ácidos orgânicos e atividade antioxidante. Também foi avaliado a evolução dos principais compostos fenólicos e da atividade antioxidante dos vinhos durante 11 meses de guarda em garrafa. As uvas dos clones 169 e 685, safra 2009, foram avaliadas quanto ao ciclo fenológico, evolução do período de maturação, componentes de rendimento e área foliar. Os resultados demonstraram que a metodologia desenvolvida para quantificar os principais compostos fenólicos presentes no vinho apresentou excelente precisão, exatidão, limites de detecção e recuperação (80-120 %), assim como demonstrou separação satisfatória de todos os compostos avaliados, podendo ser utilizada para diferenciar amostras de vinho. Os vinhos produzidos com os clones 169 e 685 apresentaram diferenças significativas em relação aos compostos fenólicos, sendo que através de análises multivariadas, como análise de Cluster e Análise de Componentes Principais, foi possível separar e classificar os vinhos de acordo com o clone. O clone 169 apresentou maior correlação com os polifenóis enquanto o clone 685 foi correlacionado com os parâmetros de cor, principalmente com as antocianinas, esta mesma correlação também foi observada para as amostras de uvas. As uvas dos clones 169 e 685 apresentaram semelhança na duração do ciclo fenológico e requerimento térmico (graus-dias), durante a safra 2009, apresentando boa maturação tecnológica e fenólica. Os clones apresentaram diferenças significativas em relação as componentes de rendimento, área foliar assim como no teor de polifenóis e antocianinas. Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que os vinhos apresentaram as características particulares de acordo com o clone que foram produzidos.

Palavras-chave: clones, uva e vinho Cabernet Sauvignon, compostos fenólicos, atividade antioxidante, maturação, validação.

Abstract

BURIN, Vívian Maria. Characterization of Cabernet Sauvignon clones: grapes and wine from São Joaquim, Santa Catarina State. 2010. 158p. Dissertation (Master's in Food Science). Federal University of Santa Catarina. Florianópolis – SC.

Cabernet sauvignon grapes display a range of different clones, which are classified according to their productive potential. Notable among these clones are numbers 169 and 685, both of French origin, which can be classified into two distinct groups. The aim of this work was to characterize these two clones of Cabernet Sauvignon grapes, grown in São Joaquim, Santa Catarina State, Brazil, and develop and validate a methodology employing reversed-phase high-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of five phenolic compounds in the red wine produced from them. The wines of the 2008 vintage were characterized according to their physical-chemical parameters, total phenolic compounds, individual flavonoid and non-flavonoid phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity. The evolution of the main phenolic compounds and antioxidant activity during ageing in the bottle was investigated. Grapes of the clones 169 and 685 of the 2009 vintage were analyzed in relation to their phenological cycles, ripening, compound yields and leaf area. The results showed that the methodology developed to quantify the main phenolic compounds in red wine showed excellent precision, accuracy and detection limits, with good recoveries (80–120%), and provided satisfactory separation of all compounds evaluated. This method can thus be used to characterize and differentiate wine samples. Wines produced with clones 169 and 685 showed significant differences in terms of phenolic compounds, and using multivariate analysis techniques, such as cluster and principal component analyses, it was possible to differentiate the two wine clones. Clone 169 showed a higher correlation with phenolic compounds and clone 685 was correlated with color parameters, mainly anthocyanins. The grapes had similar phenological cycles and heat summation requirements during 2009, showing a good technological and phenolic maturation. The clones showed significant differences regarding the component yield, leaf area, and polyphenol and anthocyanin content. Based on the results of this study it can be concluded that these wines showed distinct characteristics according to the clone from which they were produced.

Keywords: clone, Cabernet Sauvignon grapes and wine, phenolic compounds, antioxidant activity, maturation, validation.

Lista de Abreviaturas

ABTS = 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido
AC = antocianinas copigmentadas
AF = área foliar
AM = antocianinas monoméricas
AMT = antocianinas monoméricas totais
ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP = antocianinas poliméricas
ATT = acidez titulável total
CAF = ácido cafeico
CAT = catequina
CUM = ácido *p*-cumárico
CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência
DAD = arranjo de diodos
DELF = delphinidina 3-glicosídeo
DPR = desvio padrão relativo
DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
ET = éster tartárico
FLV = flavonol
FER = ácido ferrúlico
g = grama
GAE = ácido gálico
GD = graus-dias
IC = intensidade da cor
IH = índice heliotérmico
IM = índice de maturação
INMETRO = Instituto Nacional de Metrologia
Kg = quilograma
LOD = limite de detecção
L = litro
LOQ = limite de quantificação
MALV = malvidina 3-glicosídeo

mg = miligrama
mL = mililitro
MM = massa molar
nd = não detectado
OD = orto-difenóis
PEON = peonidina 3-glicosídeo
PI = padrão interno
PNP = polifenóis não-polimerizados
PP = polifenóis polimerizados
PT = polifenóis totais
QUER = quercetina
R = coeficiente de correlação
 R^2 = coeficiente de determinação
TC = tonalidade da cor
SST = sólidos solúveis totais
TPTZ = 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina sulfônico
UV-Vis = ultravioleta-visível
 ϵ = coeficiente de absorvidade molar
 μL = microlitro

Lista de figuras

Capítulo 1

- Figura 1.** Diferentes fases fenológicas de desenvolvimento do ciclo vegetativo da videira. 1) período de repouso – gema dormente; 2) ponta verde; 3) folhas separadas; 4) inflorescência; 5) botões florais separados; 6) floração; 7) frutificação; 8) início da maturação; 9) maturação plena. 22
- Figura 2.** Desenvolvimento da baga de uva durante o período da maturação. 23
- Figura 3.** Alterações na composição química durante a maturação da uva. 24
- Figura 4.** Uva Cabernet Sauvignon, safra 2009, procedente de um vinhedo localizado em São Joaquim-SC. 26
- Figura 5.** Estrutura geral dos não-flavonoides mais encontrados em uvas e vinhos: (A) derivados do ácido cinâmico; (B) derivados do ácido benzóico; (C) estilbenos. 34
- Figura 6.** Estrutura do cation flavílium. 36
- Figura 7.** Estrutura geral de um flavonol e suas agliconas indicando a substituição dos radicais. 38
- Figura 8.** Estrutura geral dos flavanois: (A) flavan 3-óis; (B) proantocianidinas e os principais derivados indicando a substituição dos radicais. 39
- Figura 9.** Equilíbrio entre as várias formas de antocianinas no vinho. 41
- Figura 10.** Estrutura química das piroantocianinas: (a) Visitina A; (b) Visitina B. 42
- Figura 11.** Representação das principais alterações que ocorrem com os compostos fenólicos (A= antocianinas; T = taninos) durante o envelhecimento do vinho. Y: produto das antocianinas degradadas; A-T: combinação entre antocianinas e taninos; T-P: combinação polissacarídeo-tanino ou proteína-tanino; TC: tanino condensado; Td: tanino degradado; ppo: polifenoloxidase. 45
- Figura 12.** Representação das unidades de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE): a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector; f) registrador. 50

Capítulo 2

- Figura 1.** Cromatograma da solução padrão contendo todos os compostos fenólicos em vinho sintético após otimização das condições cromatográficas (1) catequina; (2) ácido cafeico; (3) ácido *p*-cumárico; (4) ácido ferrúlico; (5) morin; (6) quercetina. 63

Capítulo 3

- Figura 1.** Curvas de fermentação para os clones da variedade Cabernet Sauvignon, local A e B, safra 2008. 83
- Figura 2.** Cromatograma típico de solução padrão dos ácidos orgânicos. (1) ácido tartárico; (2) ácido málico; (3) ácido lático; (4) ácido cítrico; (5) ácido succínico. 84
- Figura 3.** Separação Cromatográfica dos compostos fenólicos presentes nos vinho Cabernet Sauvignon, safra 2008, determinados em comprimentos de onda específicos para cada composto. A) 280 nm; B) 360 nm; C) 520 nm. (1) ácido gálico; (2) catequina; (3) ácido cafeico; (4) ácido *p*-cumárico; (5) ácido ferrúlico; (6) quercetina; (7) trans-resveratrol; (8) delphinidina 3-glicosídeo; (9) peonidina 3-glicosídeo; (10) malvidina 3-glicosídeo. 89
- Figura 4.** Atividade antioxidante através dos métodos DPPH, ABTS e FRAP (mM TEAC) para vinhos de dois clones da variedade Cabernet Sauvignon, 685 e 169, locais A e B, safra 2008. Os resultados são expressos como a média \pm desvio padrão; colunas com diferentes letras em uma mesma amostra indicam diferença significativa entre os métodos ($p < 0,05$). 93
- Figura 5.** Evolução dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante (DPPH e ABTS) durante o tempo de guarda em garrafa (11 meses) dos vinhos produzidos com os clones 685 e 169 da variedade Cabernet Sauvignon, local A, safra 2008: PT, polifenóis totais; PP, polifenóis polimerizados; PNP, polifenóis não-polimerizados; OD, ortodifenóis; ET, éster tartárico; FL, flavonol; GAE, ácido gálico; CAF, ácido cafeico; FER, ácido ferrúlico; CUM, ácido *p*-cumárico; CAT, catequina; QUER, quercetina; MALV, malvidina 3-glicosídeo; DELF, delphinidina 3-glicosídeo; PEON, peonidina 3-glicosídeo; AMT, antocianinas monoméricas totais; AM, antocianinas monoméricas (%); AC, antocianinas copigmentadas (%); AP, antocianinas poliméricas (%); DPPH, (1,1-difenil-2-picrilhidrazil); ABTS, (ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico). 96

Figura 6.	Análise de Componentes Principais (ACP) utilizando os resultados da atividade antioxidante (ABTS, DPPH e FRAP) e dos compostos fenólicos para os vinhos Cabernet Sauvignon produzidos com os clones 685 e 169 provenientes de dois locais (A e B), safra 2008. Compostos fenólicos determinados por cromatografia líquida: QUER: quercetina; GAE: ácido gálico; CUM: ácido <i>p</i> -cumárico; CAT: catequina; CAF: ácido cafeico; RES: resveratrol; FER: ácido ferúlico; DELF: delfinidina 3-glicosídeo; MALV: malvidina 3-glicosídeo, PEON: peonidina 3-glicosídeo. PT: polifenóis totais; AMT: antocianinas monoméricas totais.	105
Figura 7.	Dendograma de análise de cluster utilizando o teor dos compostos fenólicos totais, individuais determinado por CLAE e atividade antioxidante, para os vinhos Cabernet Sauvignon, produzidos com os clones 169 e 685, locais A e B, safra 2008.	106
Capítulo 4		
Figura 1.	Valores médios mensais de precipitação (mm) e umidade relativa do ar (%), durante o ciclo 2009, para a Região de São Joaquim-SC.	119
Figura 2.	Requerimento térmico (Graus-Dias – base 10°C) para os períodos das principais fases fenológicas: Brotação à Floração, Floração à Frutificação, Frutificação ao Início da Maturação e do Início da Maturação até a Colheita, dos clones 169 e 685 da variedade Cabernet Sauvignon, safra 2009.	120
Figura 3.	Somatório do Índice Heliotérmico acumulado durante as principais fases fenológicas para os clones 169 e 685 da variedade Cabernet Sauvignon, safra 2009.	122
Figura 4.	Duração dos eventos fenológicos, a partir da brotação, para os clones 685 e 169 da uva Cabernet Sauvignon, safra 2009.	123
Figura 5.	Evolução do pH, acidez total titulável (ATT), sólidos solúveis totais (SST, °Brix), índice de maturação (IM), polifenóis totais (PT) e antocianinas monoméricas totais (AMT) de dois clones da uva Cabernet Sauvignon: clone 169 (—■—) clone 685 (—◇—), safra 2009.	128

Figura 6. Evolução do conteúdo de ácidos orgânicos após o início da maturação até a colheita das uvas Cabernet Sauvignon, safra 2009, local A, clones 169 e 685. Ácido tartárico (—□—); ácido málico (—○—); ácido cítrico (—▷—); ácido succínico (—×—). 132

Figura 7. Análise de Componentes Principais realizada com os resultados significativos da composição das uvas na colheita dos dois clones da uva Cabernet Sauvignon, 169 e 685, safra 2009. ATT, acidez total titulável; SST, sólidos solúveis totais; Abs420, absorvância em 420 nm; Abs520, absorvância em 520 nm; AcM, ácido málico; AcL, ácido láctico; AcS, ácido succínico; AcT, ácido tartárico; IM, índice de maturação; IC, intensidade da cor; AMT, antocianinas monoméricas totais; PT, polifenóis totais. 135

Lista de tabelas

Capítulo 1

Tabela 1.	Principais antocianidinas (agliconas) presentes em uvas <i>Vitis vinifera</i> .	37
------------------	---	----

Capítulo 2

Tabela 1.	Condições cromatográficas para a determinação dos compostos fenólicos em vinhos tintos.	61
------------------	---	----

Tabela 2.	Identificação dos compostos, equação regressão linear, incluindo o coeficiente de determinação (R^2) e a faixa de trabalho da curva de calibração ($n=6$), limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).	64
------------------	---	----

Tabela 3.	Determinação da exatidão do método expresso como recuperação (%) das amostras de vinho sintético e vinho tinto adicionados de 3 diferentes concentrações de solução padrão.	65
------------------	---	----

Tabela 4.	Precisão do método de acordo com o tempo de retenção (t_R) e concentração média dos compostos fenólicos (mg L^{-1}) na amostra de vinho.	67
------------------	---	----

Tabela 5.	Concentração média (mg L^{-1}) dos principais compostos fenólicos em vinhos comerciais.	68
------------------	--	----

Capítulo 3

Tabela 1.	Parâmetros enológicos clássicos determinados nas uvas e nos vinhos jovens dos clones da variedade Cabernet Sauvignon, safra 2008.	82
------------------	---	----

Tabela 2.	Características analíticas do método para quantificação de ácidos orgânicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.	84
------------------	---	----

Tabela 3.	Concentração de ácidos orgânicos (g/L) dos vinhos Cabernet Sauvignon, clones 169 e 685, vinhedos A e B.	85
------------------	--	----

Tabela 4.	Concentração dos compostos fenólicos totais e parâmetros de cor dos vinhos jovens de Cabernet Sauvignon, clone 169 e 685, locais A e B.	86
------------------	---	----

Tabela 5.	Parâmetros de validação dos métodos para quantificação dos compostos fenólicos.	88
------------------	---	----

Tabela 6.	Determinação dos compostos fenólicos flavonóides e não-flavonóides (mg/L) nos vinhos Cabernet Sauvignon, clones 169 e 685, locais A e B.	91
------------------	---	----

Tabela 7.	Alterações dos compostos fenólicos (%) avaliados durante o envelhecimento do vinho, clone 685 e 169, safra 2008, no período de 11 meses. Valores positivos (+) indicam a porcentagem de aumento dos compostos e valores negativos (-) indicam a porcentagem de diminuição.	99
------------------	--	----

Capítulo 4

Tabela 1.	Datas do início da ocorrência das fases fenológicas dos dois clones da variedade Cabernet Sauvignon, safra 2009.	123
Tabela 2.	Caracterização dos clones 685 e 169 da uva Cabernet sauvignon, safra 2009, procedente da região de São Joaquim, SC.	125
Tabela 3.	Resultado das análises realizadas para os dois clones, 685 e 169, da uva Cabernet Sauvignon no período da colheita, safra 2009.	129

Sumário

Introdução	17
Capítulo 1: Revisão Bibliográfica	19
1 Vitivinicultura no Brasil e no Estado de Santa Catarina	20
2 Fenologia e Maturação da uva	21
3 Uva e o vinho Cabernet Sauvignon	26
3.1 Clones da uva Cabernet Sauvignon	28
4 Principais compostos presentes em uvas e vinhos	29
4.1 Açúcares totais	29
4.2 Álcoois	30
4.3 Ácidos orgânicos	31
4.4 Compostos fenólicos da uva e do vinho	32
5 A cor dos vinhos	40
6 Alterações dos compostos fenólicos: barril e garrafa	43
7 Atividade antioxidante	46
8 Métodos analíticos para caracterização da cor e dos compostos presentes na uva e no vinho	48
8.1 Espectrofotometria	48
8.2 Cromatografia	49
Capítulo 2: Desenvolvimento e validação de método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa para simultânea determinação de compostos fenólicos em vinho tinto	53
Capítulo 3: Vinhos Cabernet Sauvignon produzidos com dois clones, caracterização e evolução durante o envelhecimento em garrafa	69
Capítulo 4: Caracterização e diferenciação de dois clones da variedade Cabernet Sauvignon quanto ao ciclo fenológico e evolução da maturação	109
Conclusões Gerais	137
Referencias Bibliográficas	138

Introdução

No Sul do Brasil, a viticultura está concentrada principalmente nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina que são responsáveis por aproximadamente 95 % da produção nacional. O Estado de Santa Catarina apresenta 3 regiões vitivinícolas distintas denominadas de Região Tradicional, Nova Região e Super Nova região ou de Altitude. Nesta última, destaca-se São Joaquim, no planalto Serrano, localizada em altitudes entre 900 e 1400 m, apresenta condições climáticas consideradas únicas em todo o território nacional.

O Estado de Santa Catarina vem nos últimos anos investido em novas tecnologias para elaboração de vinhos finos. Por isto, tem se verificado a implantação de vinhedos de variedade *Vitis vinifera*, com destaque para a variedade Cabernet Sauvignon. A uva Cabernet Sauvignon, apresenta uma gama de clones, os quais são classificados de acordo com seu potencial produtivo. A seleção clonal tem permitido expressivos ganhos na viticultura, tanto em quantidade como em qualidade de produção. Para ser considerado um clone, este deve apresentar alguma característica diferente do organismo de origem, assim como dos outros clones. Clones de mesma variedade de uva apresentam características particulares que são desejáveis, como por exemplo, na composição fenólica, aromática, características físicas e químicas das uvas, sendo estas transmitidas aos respectivos vinhos.

Os fatores ambientais, como o solo e o clima, influenciam fortemente na qualidade das uvas e conseqüentemente no vinho. A videira é influenciada por diversos elementos meteorológicos do clima, dentre eles temperaturas, chuvas, radiação solar, ventos e umidade do ar, por isto, considera-se o clima como elemento importante na definição das potencialidades de cada região. Deve-se considerar que as condições climáticas anuais exercem influência preponderante na qualidade da uva, sendo que cada safra apresenta peculiaridades específicas. Assim, para uma mesma variedade de uva, ou para diferentes clones de mesma variedade, as condições climáticas do período de maturação da uva podem antecipar ou retardar a colheita, influenciando nas concentrações de açúcar e de ácidos orgânicos, no teor de compostos fenólicos e voláteis da uva.

Dentre os principais compostos presentes nas uvas, estão os compostos fenólicos flavonóides e não-flavonóides, que constituem um dos mais importantes parâmetros de qualidade dos vinhos, pois contribuem para suas características organolépticas (cor,

adstringência e *flavor*), assim como são considerados importantes compostos bio-ativos (atividade antimicrobiana, antiinflamatória e antioxidante). Sua concentração depende principalmente dos fatores vitícolas e do meio ambiente, como o estágio de maturação, condições climáticas e do solo. Além disto, a composição química de um vinho é fortemente influenciada pelo clone da uva que foi utilizado, pois estes apresentam distintas características físicas e químicas.

Muitos trabalhos são realizados com intuito de correlacionar as características químicas de uvas e vinhos entre as diferentes variedades, no entanto há poucos trabalhos na literatura sobre a caracterização e diferenciação de clones de mesma variedade de uva cultivadas em mesmo local. O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar e diferenciar uvas Cabernet Sauvignon, clones 169 e 685, e os vinhos produzidos com estas uvas, procedentes de um vinhedo localizado na região de São Joaquim, Santa Catarina, Brasil.

Este trabalho foi dividido em 4 Capítulos, sendo que o Capítulo 1 apresenta uma revisão bibliográfica sobre a viticultura no Estado de Santa Catarina, uva e vinho Cabernet Sauvignon, fenologia e parâmetros climáticos, principais compostos fenólicos flavonóides e não-flavonóides, atividade antioxidante e sobre as principais reações que ocorrem durante o envelhecimento do vinho. No Capítulo 2 está descrito uma validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência que foi desenvolvida para determinar os principais compostos fenólicos do vinho. O Capítulo 3 apresenta a caracterização dos clones 169 e 685 da uva Cabernet Sauvignon e dos respectivos vinhos, safra 2008, quanto aos parâmetros físico-químicos, composição fenólica, atividade antioxidante, ácidos orgânicos, assim como a caracterização da evolução dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante dos vinhos durante o envelhecimento em garrafa. O Capítulo 4 apresenta a caracterização das uvas Cabernet Sauvignon, clones 169 e 685, safra 2009, quanto ao ciclo fenológico e evolução da composição química durante o período de maturação.

Capítulo 1

Revisão Bibliográfica

Revisão bibliográfica

1 Vitivinicultura no Brasil e no Estado de Santa Catarina

O Brasil pertence ao chamado novo mundo vitícola cuja base de produção são variedades importadas dos tradicionais países produtores de vinho. A viticultura brasileira iniciou com a colonização portuguesa no século XVI, mas somente a partir da segunda metade do século XIX, com a imigração italiana, que se configuraram muitas das tradicionais regiões vitivinícolas atuais, como a Serra Gaúcha no Rio Grande do Sul e o Vale do Rio do Peixe no Estado de Santa Catarina. A viticultura representa uma atividade econômica recente no Brasil, quando comparada aos tradicionais países produtores da Europa, especialmente no que se refere aos vinhos finos. Somente a partir da década de 70 a viticultura brasileira teve grande evolução, marcada por significativo aumento da área cultivada com variedades viníferas, sendo que a indústria vinícola passou a utilizar tecnologias mais modernas na elaboração do vinho, incrementando a qualidade dos produtos (BRDE, 2008).

O Brasil, atualmente, ocupa a 19^o posição em relação a produção de uvas tanto em quantidade com em área plantada, como também na produção de vinhos. O Brasil apresenta 12 regiões produtoras de uvas para vinificação, sendo que às regiões vitícolas do Estado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, concentram a expressiva maioria da produção de vinho e mosto de uva, o que representa aproximadamente 95% da produção nacional (MELLO, 2009).

A viticultura catarinense apresentou um acréscimo de 16 % na produção de uvas no ano de 2009, com expressão econômica principalmente na Região do Vale do Rio do Peixe. Esta região é responsável por cerca de 80 % da produção de uva e vinho no Estado, sendo o segundo maior fabricante nacional de vinhos e mostos (MELLO, 2009). A produção de uva neste Estado, até meados de 1998, constituía-se basicamente de uvas de origem americana e híbrida, sendo que a utilização deste tipo de uva destinava-se, principalmente, para a elaboração de vinhos para consumo corrente e para a produção de suco de uva. No entanto, a partir de 1998, têm-se verificado a instalação de parreiras de variedades de *Vitis vinifera*, com destaque para a variedade Cabernet Sauvignon. Representa uma das variedades com maior demanda para implantação de

novos vinhedos que se destina principalmente para à elaboração de vinho de guarda, o qual requer amadurecimento e envelhecimento (RIZZON; MIELE, 2002).

Santa Catarina apresenta três regiões vitivinícolas definidas, denominadas de Região Tradicional que ocupa duas áreas distintas no Estado, o Vale do Rio do Peixe, e a região Carbonífera no Sul do Estado; a segunda região é denominada de Nova Região, e a terceira região é definida como Super Nova ou de Altitude que abrange o Planalto Serrano, com destaque para São Joaquim (ROSIER et al., 2004). A região de São Joaquim está localizada em altitude entre 900 e 1400 m, difere-se de outras regiões de vinhos finos do Brasil, sobretudo, por apresentar clima vitícola mais frio em relação às demais regiões brasileiras produtoras de vinhos finos. De modo geral apresenta diversas condições mesoclimáticas, que podem ser favoráveis para a maturação de variedades de uvas em épocas mais tardias. Em consequência do regime térmico, a duração do período da brotação à colheita das uvas é maior em São Joaquim, quando comparado com outras regiões vitícolas brasileiras. Estas condições climáticas consideradas únicas em todo o território nacional possibilitam a elaboração de vinhos com coloração e aromas intensos (BRIGHENTI; TONIETTO, 2004).

2 Fenologia e Maturação da uva

A fenologia pode ser definida como o ramo da ecologia que estuda os fenômenos periódicos dos seres vivos e as suas relações com as condições ambientais. Na viticultura a fenologia desempenha importante função, pois permite a caracterização da duração das fases do desenvolvimento da videira em relação ao clima, sendo utilizada, principalmente, para interpretar como as diferentes regiões climáticas interagem com a cultura (SILVA et al., 2006). Assim a caracterização das exigências térmicas da videira mediante o conceito de graus-dias é utilizada por diversos autores sendo um método eficiente para avaliar a duração do ciclo, a produção, a qualidade do produto e prever a data da colheita (PEDRO-JÚNIOR; SENTELHAS; MARTINS, 1994; MCCARTHY, 1997).

A Figura 1 apresenta 9 fases do desenvolvimento da videira, que representam as principais fases fenológicas para as variedades de *Vitis vinifera*.

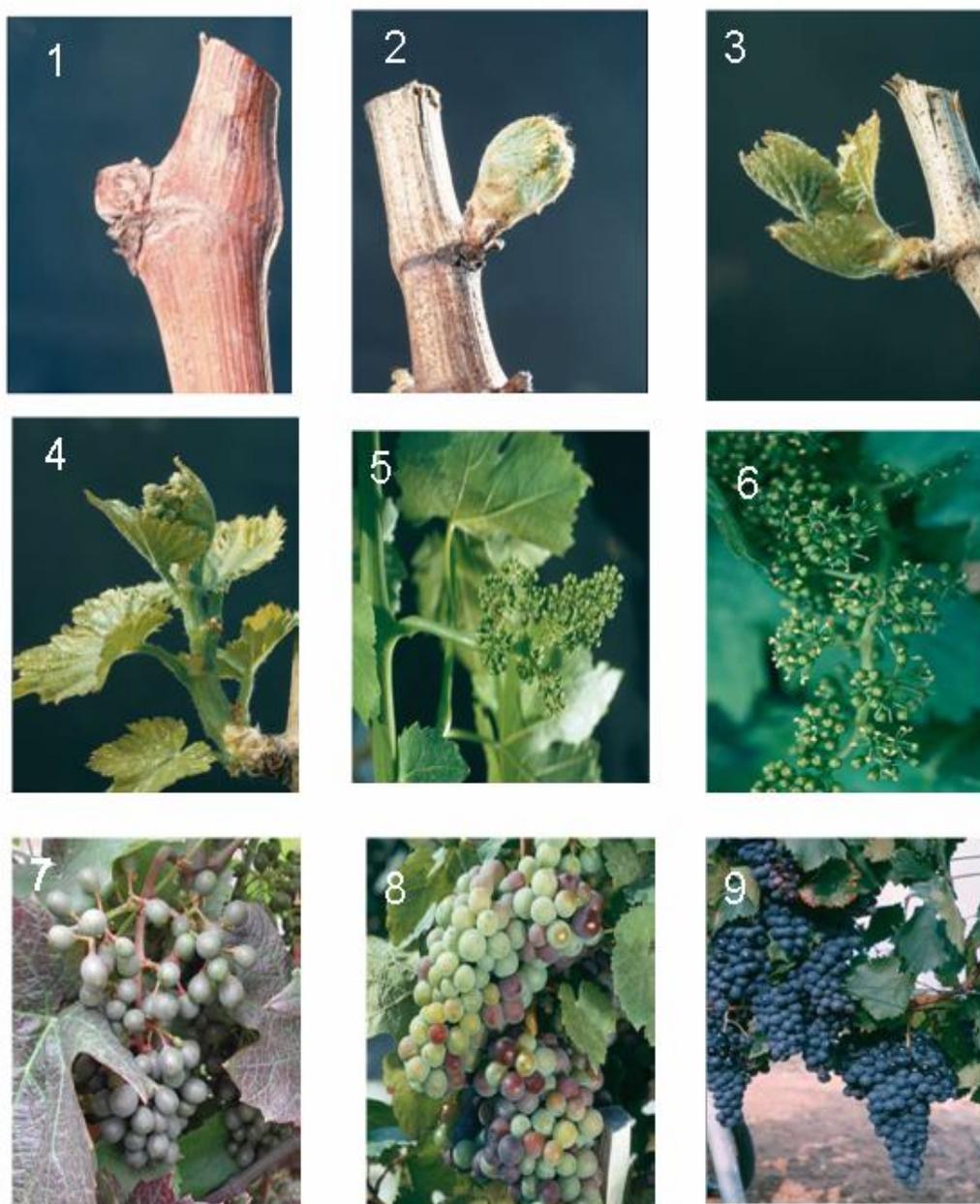


Figura 1. Diferentes fases fenológicas de desenvolvimento do ciclo vegetativo da videira. 1) período de repouso – gema dormente; 2) ponta verde; 3) folhas separadas; 4) inflorescência; 5) botões florais separados; 6) floração; 7) frutificação; 8) início da maturação; 9) maturação plena (autor).

O período de repouso das videiras (Figura 1) inicia entre o final do outono e início do inverno, é caracterizado pela paralisação da multiplicação celular e queda das folhas. Este período de dormência é revertido pelas baixas temperaturas, iniciando a brotação, que ocorre devido à mobilização das reservas acumuladas pela planta, reiniciando as atividades fisiológicas. O processo de desenvolvimento das gemas tornando as pontas verdes visíveis é seguido pelo aparecimento das folhas e pelo processo de florescimento, que é influenciado pelas temperaturas e incidência de chuvas. Após a fertilização das flores, inicia-se o desenvolvimento dos frutos, o qual requer forte demanda de nutrientes. Neste período ocorre o fechamento do cacho e o aumento do tamanho das bagas devido a expansão celular. O último período que caracteriza a maturação das uvas inicia com a mudança de coloração das uvas tintas, ocorrendo a síntese de vários compostos químicos e estende-se até a colheita da fruta, quando a maturação plena é atingida (JACKSON, 2000).

A maturação das uvas abrange o período que vai da mudança de cor até a colheita, normalmente com duração de 30 a 80 dias, dependendo da variedade de uva e da região de cultivo (AMORIM et al., 2006). Durante este período o desenvolvimento da baga é dividido em três fases (Figura 2), caracterizado por duas curvas sigmóides denominadas de fase I e III, com um período intermediário plano entre elas, representando a fase II (COOMBE, 1973).

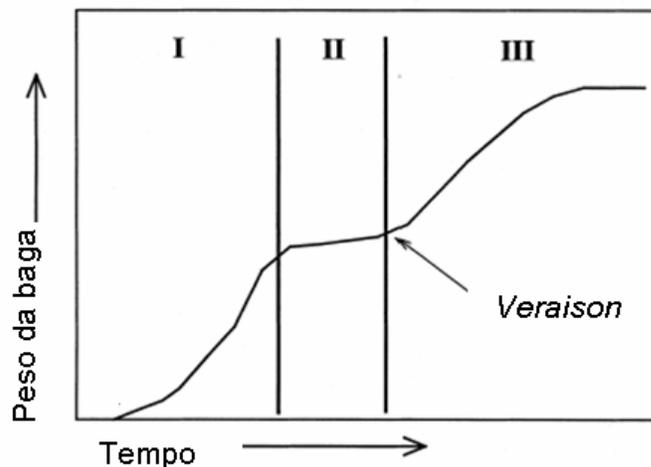


Figura 2. Desenvolvimento da baga de uva durante o período da maturação (KENNEDY; MATTHEWS; WATERHOUSE, 2000).

A fase I é caracterizada pelo aumento do pericarpo com conseqüente expansão do volume da baya, assim como pelo aumento do número de sementes, que atingem seu tamanho final neste estágio. Há alta taxa de fotossíntese devido a presença da clorofila no fruto. No início da fase II ocorre pequena mudança do tamanho da baya, o embrião da semente se desenvolve com conseqüente endurecimento da camada que recobre a semente. Este período é marcado por altos teores de ácidos nos frutos. O último período, fase III, é a última fase de crescimento do fruto, e o início deste período é denominado de *veraison* (mudança de coloração das bagas de uva), e ocorrem inúmeras alterações nas bagas das uvas (KENNEDY; MATTHEWS; WATERHOUSE, 2000). Estas alterações nas bagas refletem em modificações na sua composição (Figura 3). Dentre estas modificações, pode-se citar aumento de volume e amolecimento da baya, acúmulo de açúcares (glicose e frutose), diminuição pronunciada da acidez, aumento do pH, desaparecimento da clorofila e conseqüente acúmulo de pigmentos corantes na casca das uvas tintas (antocianinas), síntese de substâncias aromáticas e a modificação do sabor (MOTA et al., 2006; LE MOIGNE et al., 2008).

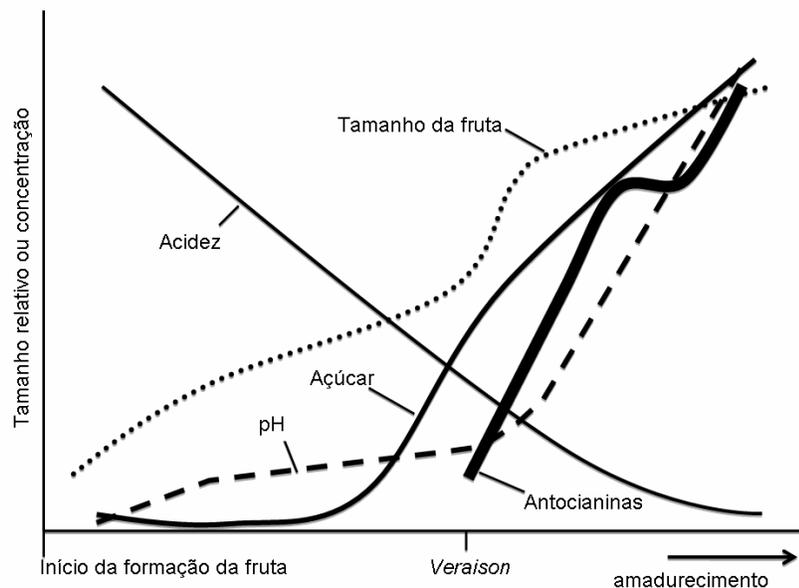


Figura 3. Alterações na composição química durante a maturação da uva (WATSON, 2003).

Diferentes critérios são utilizados para a determinação do ponto ideal da colheita da uva, pois o estágio da maturação no qual esta é colhida condiciona a qualidade e o produtos que serão obtidos. LeMoigne, Symoneaux e Jourjon (2008) dividiram a maturação da uva em três tipos: maturação tecnológica, fenólica e aromática. A maturação tecnológica corresponde ao estágio em que o acúmulo de açúcar na polpa é máximo, a acidez é baixa e a relação açúcar/acidez é alta (ROBREDO et al., 1991). A maturação fenólica é definida como o estágio em que as cascas apresentam concentrações máximas de antocianinas e a concentração de taninos na semente tem baixa contribuição para o teor de taninos totais (ROBREDO et al., 1991; KENNEDY; SAUCIER; GLORIES, 2006). A maturação aromática corresponde a diminuição das notas vegetais (SCHNEIDER et al., 2002). No entanto, a maturidade tecnológica e a fenólica são mais utilizadas como indicador para monitorar o período de maturação da uva (ROBREDO et al., 1991).

Os fatores ambientais, como o solo e o clima, influenciam fortemente na qualidade das uvas e conseqüentemente na do vinho. A videira é influenciada por diversos elementos meteorológicos do clima, dentre eles temperaturas, chuvas, radiação solar, ventos e umidade do ar, por isto, considera-se o clima como elemento importante na definição das potencialidades das regiões (DELOIRE et al., 2005). Ele interage com os demais componentes do meio natural, em particular com o solo, assim como com as diferentes variedades de uva e com as técnicas agrônômicas aplicada na videira (LEÃO; SILVA, 2003). Na viticultura, consideram-se três escalas climáticas: macroclima, mesoclima e microclima. O macroclima ou clima regional corresponde ao clima médio ocorrente num território relativamente grande, exigindo, para sua caracterização, dados de um conjunto de postos meteorológicos, durante longo período de tempo (geralmente 30 anos), sendo influenciado pela posição geográfica (latitude, longitude e altitude). O mesoclima que representa o clima local corresponde a uma situação particular do macroclima. Normalmente, é possível caracterizar um mesoclima através dos dados de uma estação meteorológica, permitindo avaliar as possibilidades da cultura da uva. Em regiões vitícolas, trata-se normalmente, de áreas pequenas, podendo fazer referência, por exemplo, à situações bastante particulares do ponto de vista de exposição, declividade ou altitude. O microclima refere-se às condições climáticas de uma superfície pequena, como por exemplo, dentro de um vinhedo, descrevendo o clima

medido na cultura com a utilização de aparelhos colocados sobre a planta (TONIETTO; MANDELI, 2009).

Deve-se considerar que as condições climáticas anuais exercem influência preponderante na qualidade da uva, sendo que cada safra apresenta peculiaridades específicas. Assim, para uma mesma variedade, ou para diferentes clones de mesma variedade de uva, as condições climáticas do período de maturação da uva podem antecipar ou retardar a colheita, influenciando nas concentrações de açúcares e de ácidos orgânicos, no teor de compostos fenólicos e voláteis da uva (RIZZON; MIELLE, 2006).

3 Uva e o vinho Cabernet Sauvignon

A uva Cabernet Sauvignon (Figura 4) é considerada uma das variedades viníferas de maior prestígio no mundo, é originária de Bordeaux na França e começou a ser conhecida por volta do final do século XVIII e início do século XIX. Estudos sobre a origem desta variedade indicam que, provavelmente, seja resultante do cruzamento espontâneo, das variedades Cabernet Franc e Sauvignon Blanc também originárias de Bordeaux (BOWERS; MEREDITH, 1997). Esta variedade foi introduzida no Brasil em 1921, mas somente depois da década de 80 seu plantio foi incrementado nos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, e atualmente apresenta-se difundida na maior parte dos países vitivinícolas.



Figura 4. Uva Cabernet Sauvignon, safra 2009, procedente de um vinhedo localizado em São Joaquim-SC (acervo pessoal).

A variedade Cabernet Sauvignon caracteriza-se por apresentar brotação e maturação tardia, sendo relativamente vigorosa, com ramos novos de porte ereto, de média produção e elevada qualidade para vinificação. Apresenta cachos soltos, de formato cônico, com tamanho médio. A baga de formato esférico apresenta uma espessa película de coloração azul escura acentuada, sendo que a baga não se desprende facilmente da ráquis e geralmente apresenta gosto herbáceo ou vegetal (RIZZON; MIELE, 2002). Atualmente é uma das variedades de *Vitis vinifera* com maior demanda para a implantação de novos vinhedos.

O vinho Cabernet Sauvignon é mundialmente reconhecido pelo seu caráter varietal e destina-se a elaboração de vinho tinto de guarda. Caracteriza-se por apresentar cor vermelha com reflexos violáceos acentuados, riqueza em taninos e complexidade de aroma e buquê. Sensorialmente o vinho necessita de certo período de amadurecimento e envelhecimento, a fim de torná-lo macio e suave. Em relação ao mosto, este apresenta bom teor de açúcar e acidez titulável adequada para a produção de vinho tinto, o qual se caracteriza por apresentar teores elevados de álcoois superiores (RIZZON; MIELE, 2002).

A uva e o vinho Cabernet Sauvignon produzidos no Estado de Santa Catarina, Brasil, foram estudados quanto à influência de diferentes sistemas de condução sobre a maturação da uva (FALCÃO et al., 2008a), da altitude do vinhedo e do mesoclima na maturação da uva, assim como a influência da altitude do vinhedo sob caracterização da fração volátil dos vinhos (FALCÃO et al., 2007; FALCÃO et al., 2008b). Em relação a composição aromática, foi observado que o local e a altitude apresentam influência significativa na qualidade e quantidade de aromas nos vinhos. O aroma vegetal ou herbáceo, caracterizado pela nota de pimentão verde, representado pelo composto 2-metoxi-3-isobutilpirazina (IBMP) foi predominante nos vinhos de maior altitude (aproximadamente 1300 m), enquanto que nos vinhos com altitude em torno de 960 m predominou as notas frutadas, representadas pela β -damascenona, que possivelmente foi a responsável em mascarar o aroma vegetal do IBMP (FALCÃO et al., 2008c). No entanto, não há registros na literatura sobre a caracterização e diferenciação de diferentes clones da uva Cabernet Sauvignon, cultivadas na região de São Joaquim, Santa Catarina, e dos respectivos vinhos, quanto a composição química e atividade antioxidante.

3.1 Clones da variedade Cabernet Sauvignon

A seleção clonal tem permitido expressivos ganhos na viticultura, tanto em quantidade como em qualidade de produção. No caso específico das variedades da espécie *Vitis vinifera*, os clones são selecionados sob o ponto de vista sanitário e genético, buscando isenção das principais viroses que atacam a videira, baseando-se na origem policlonal, e na sensibilidade da espécie à ocorrência e mutações somáticas espontâneas. Na França, a seleção clonal iniciou em 1960, a qual é realizada através de duas etapas: seleção sanitária e agrônômica. A seleção sanitária tem como objetivo aumentar a resistência da videira frente a ação de parasitas e vírus; enquanto que na seleção agrônômica os clones são avaliados em relação ao potencial tecnológico e as características produtivas e qualitativas para a certificação (ENTAV, 2010).

Inicialmente a seleção orienta-se principalmente pelas diferenças na morfologia e no potencial produtivo das plantas. Considerando o potencial genético da planta há muitos fatores que podem influenciar significativamente o potencial produtivo e a qualidade, como por exemplo, a localização geográfica, o clima, a composição do solo, o regime hídrico, o porta enxerto, o sistema de condução e a safra (PELSY, 2010). Por isto clones cultivados em diferentes locais, podem apresentar características produtivas e enológicas distintas.

Para ser considerado um clone, este deve apresentar alguma característica diferente da planta matriz, assim como dos outros clones, mesmo que estas diferenças sejam muito pequenas. Cabe ressaltar que as diferenças observadas entre os clones de uma mesma variedade costumam ser muito menores que aquelas entre duas variedades, no entanto estas diferenças podem ser muito importantes para a viticultura. Clones podem diferir em relação ao tempo de duração do ciclo fenológico ou de cada fase fenológica, na produtividade, na qualidade dos frutos, entre outros aspectos, assim como diferentes clones apresentam a habilidade de produzir vinhos com distintas características organolépticas. Muitos estudos são realizados para diferenciar clones de uma mesma variedade de uva, e tem demonstrado que há diferenças entre os clones tanto em relação a qualidade produtiva, componentes de rendimento das uvas, quanto nos parâmetros físico-químicos, compostos fenólicos flavonóides e não-flavonóides e também na composição aromática (GÓMEZ-PLAZA; GIL-MUÑOZ; MARTÍNEZ-

CUTILLAS, 2000; ALONZO; BLANCO; MARTÍNEZ-RODRIGUEZ, 2004; ZAMUS; MARTÍNEZ; VILANOVA, 2007).

A variedade Cabernet Sauvignon, apresenta 19 distintos clones de seleção francesa todos devidamente registrados. Estes clones atendem às diferentes exigências de produção, e no caso específico da seleção clonal francesa, são divididos em 4 grupos (A, B, C e D) de acordo com o seu potencial produtivo. Dentre os vários clones da Cabernet Sauvignon, pode-se citar os clones 169 e 685. O clone 169 tem origem de Gironde na França (1972), é classificado no grupo A, o qual é caracterizado por produção limitada e baixa, apresenta baixa fertilidade, produz cachos com peso médio, com bom teor de açúcares e origina vinhos equilibrados com taninos redondos. O clone 685 foi originado nos Pirineus, na França (1980), está classificado no grupo B, sendo caracterizado por uma produtividade que varia de média a superior, a fertilidade é média, produz cachos de peso médio com alto potencial de açúcares, originando vinhos muito equilibrados (ENTAV, 2010).

4 Principais compostos presentes em uvas e vinhos

4.1 Açúcares totais

Os açúcares são a categoria de carboidratos distinguíveis devido a presença de muitos grupos hidroxilas e um grupo cetona ou aldeído. Os açúcares são produzidos durante a fotossíntese nos vegetais, sendo que em uvas os principais açúcares são a glicose e frutose. No início da maturação há o predomínio da glicose, mas a medida que a maturação avança a relação glicose/frutose diminui, atingindo um ponto que o teor dos dois açúcares se equivalem. Também podem ocorrer diferentes tipos de açúcares em uvas, porém em quantidades significativamente menores. A sacarose raramente é encontrada em variedades da espécie *Vitis vinifera*, no entanto pode estar presente em até 10 % dos frutos de outras espécies de uva (*Vitis labrusca*, *bourquina*, entre outras). A sacarose, se natural ou adicionada, é enzimaticamente hidrolisada em glicose e frutose durante a fermentação. As uvas contem ainda pequena quantidade de açúcares não fermentescíveis sendo estes encontrados também nos vinhos. Esses açúcares são as

pentoses, principalmente arabinose e xilose (JACKSON, 2000; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

O conteúdo de açúcar nas uvas depende, principalmente, da espécie, da variedade e do grau de maturação. As variedades *Vitis vinifera*, geralmente produzem 20 % ou mais de açúcares na maturação, enquanto que outras espécies, como *Vitis labrusca* e *rotundifolia*, produzem uma quantidade menor, requerendo a adição de açúcar exógeno para se obter o conteúdo mínimo de 10-12 % de álcool. O teor de açúcares nas uvas é caracterizado como sólidos solúveis totais (SST), sendo que o método mais comum para a determinação de SST é através da refratometria do mosto expresso em °Brix. Durante a fermentação alcoólica as leveduras utilizam a glicose e a frutose como fonte de energia, no entanto, há a preferência por glicose, gerando no final da fermentação resíduos de frutose (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

4.2 Álcoois

O conteúdo alcoólico de um vinho influencia na sua estabilidade, assim como nas propriedades sensoriais, pois são responsáveis por influenciar no ‘corpo’ do vinho e no sabor. Dentre os álcoois produzidos durante a fermentação, o etanol é o que apresenta maior importância para o vinho, no entanto há outros que também contribuem significativamente nas propriedades sensoriais, como o glicerol, álcoois superiores e o metanol (ZOECKLEIN et al., 1995).

A produção de etanol pelas leveduras é dependente do teor de oxigênio disponível no meio e da disponibilidade de açúcares. No entanto a maioria das leveduras são inibidas quando a concentração de álcool é superior a 14 %. O metanol que é um produto tóxico para a saúde humana, é encontrado em baixa concentração nos vinhos *Vitis vinifera*, pois é originado a partir da degradação enzimática das substâncias pécnicas, e a uva apresenta baixa concentração de pectina. O glicerol é um subproduto da fermentação alcoólica, sendo produzido e acumulado pelas leveduras em resposta ao estresse osmótico do meio, e contribui para as características sensoriais do vinho. Em relação aos álcoois superiores apresentam como principal função contribuir para as características sensoriais, sendo que sua formação está diretamente relacionada às práticas enológicas, como por exemplo, altas temperaturas durante o processo de

fermentação e presença de oxigênio (JACKSON, 2000; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

4.3 Ácidos orgânicos

O perfil e a concentração dos níveis de ácidos orgânicos, principalmente os ácidos tartárico, málico e lático são importantes parâmetros de qualidade para as uvas, mostos e vinhos durante o processamento e no produto final. De modo geral, durante o processo de fermentação e envelhecimento do vinho, os ácidos estão envolvidos em reações que determinam a formação de ésteres, os quais influenciam o aroma do vinho. O conteúdo de ácido orgânico em mostos e vinhos influencia não somente o balanço de *flavor*, aroma e cor, mas também a estabilidade química e o pH do meio, refletindo na qualidade final do vinho (ROMERO; MUÑOZ, 1993).

O conteúdo de ácidos orgânicos na uva varia de acordo com as condições climáticas, solo, variedade da uva, localização do vinhedo, como também com as práticas agronômicas. Nas uvas os ácidos orgânicos predominantes são o málico e o tartárico sendo que o succínico e o cítrico estão em menor concentração. Em relação ao vinho, estão presentes os ácidos provenientes da uva (ácidos tartárico, málico e cítrico) e aqueles originados durante os processos de fermentação (ácidos succínico, lático e acético) (VILJAKAINEN; LAAKSO, 2000).

O ácido tartárico é o principal ácido presente nas uvas, encontrado em um pequeno número de espécies vegetais. Caracteriza-se por ser um ácido forte, por isto interfere diretamente no pH do vinho, sendo resistente a respiração oxidativa. O ácido málico natural da uva é o isômero L(-), é considerado um ácido fraco e pouco resistente a respiração oxidativa. Na videira a síntese de ácido málico resulta de uma reação secundária da fotossíntese, ocorrendo principalmente nas folhas da videira, no entanto também é sintetizado no grão em formação até o início da fase de maturação (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). No início da maturação é encontrado o maior teor de ácido málico nas uvas, sendo que a partir do *veraison*, observa-se que as reações de degradação são superiores as de síntese, determinando na redução da sua concentração até o período da colheita. No entanto, as diferentes variedades de uva apresentam distinta capacidade de acumular ou degradar o ácido málico, o que é dependente, principalmente, da temperatura local. Ao contrário do ácido málico, a concentração do

tartárico não declina marcadamente durante o período de maturação, sendo este metabolizado por poucos microrganismos.

O monitoramento da evolução do conteúdo de ácido tartárico e málico durante o período de maturação é um importante parâmetro de qualidade da uva, sendo amplamente utilizada a razão ácido tartárico/ácido málico como um indicativo do grau de maturação da uva, contribuindo para definir o momento de sua colheita (RIZZON; SGANZELA, 2007).

No vinho, o monitoramento do conteúdo dos ácidos orgânicos é de grande utilidade para verificar a evolução da acidez durante o processo de vinificação. No decorrer da fermentação o ácido tartárico tem sua concentração diminuída pela precipitação sob a forma de cristais de bitartrato de potássio. A concentração de ácido málico também diminui, podendo ser transformado em etanol ou em ácido láctico durante a fermentação malolática (LAMIKANRA; INYANG; LEONG, 1995).

Dentre os ácidos produzidos durante a fermentação, o ácido acético é o principal constituinte da acidez volátil, mas há outros ácidos que também contribuem, como por exemplo, os ácidos butírico e fórmico. O ácido acético é originado do acetaldeído e sua presença é comum em baixas concentrações no vinho. Níveis elevados deste ácido são indicativos de contaminações no vinho por bactérias acéticas. O ácido láctico é originado a partir do ácido málico, produzido durante a fermentação malolática, a qual tem como benefício fornecer ao vinho maior maciez. Traços de ácido succínico são encontrados em todos os vinhos, o qual é oriundo do metabolismo das leveduras e sua presença está relacionada com a acidez total e com o enriquecimento no sabor e aroma do vinho durante o envelhecimento (VILJAKAINEN; LAAKSO, 2000; ZOTOU; LOUKOU; KARAVA, 2004).

4.4 Compostos fenólicos da uva e do vinho

Os compostos fenólicos são constituintes fundamentais dos vegetais, presentes principalmente em plantas, raízes e frutas. São definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Na uva estes compostos são principalmente encontrados nas cascas e sementes, sendo que o conteúdo na polpa é muito pequeno. Sua concentração depende da variedade da uva e é influenciada pelos fatores vitícolas e do meio ambiente, como o

estágio de maturação, condições climáticas e solo. No vinho são produzidos pelo metabolismo das leveduras, extraídos da polpa, casca e semente das uvas durante o período de maceração assim como são oriundos da madeira durante envelhecimento em barrica (MAZZA, 1995; GÓMEZ-ALONSO; GARCÍA-ROMERO; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2007).

Os compostos fenólicos constituem um dos mais importantes parâmetros de qualidade dos vinhos, pois contribuem para suas características organolépticas (cor, adstringência e *flavor*), assim como são considerados importantes compostos bio-ativos (atividade antimicrobiana, antiinflamatória e antioxidante) (MAZZA; MINIATI, 1993; SIGLETARY et al., 2003). Há dois grupos distintos de compostos fenólicos presentes nas uvas e no vinho: não-flavonóides e flavonóides.

Não-flavonóides

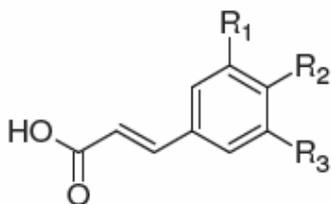
Os compostos não-flavonóides presentes em uvas e vinhos são denominados de ácidos cinâmico e benzóico (ácidos fenólicos) e estilbenos, ao qual pertence o resveratrol (Figura 5).

Nas uvas e no vinho o mais comum não-flavonóide é o ácido hidroxicinâmico, que se encontra na casca e polpa, sendo que no vinho tinto, os derivados do ácido cinâmico mais comuns são os ácidos ferrúlico, *p*-cumárico e o cafeico (Figura 5A) (SPÁCIL; NOVÀKOVÁ; SOLIDH, 2008). Estes compostos estão comumente esterificados em açúcares, álcoois e aos ácidos orgânicos. As formas livres destes ácidos não são encontradas nas uvas, podendo ser detectadas no início do processo de maceração, devido a ocorrência de reações enzimáticas hidrolíticas. A principal função destes compostos é a participação nas reações de oxidação que conduzem ao acastanhamento de mostos e vinhos e nas reações com as antocianinas, agindo como copigmentos (SINGLETON, 1987; JACKSON, 2000).

Dentre os ácidos derivados do ácido benzóico presentes na uva e no vinho destacam-se os ácidos siríngico, vanílico e em maior quantidade o ácido gálico (Figura 5B), sendo este último o único que pode ser também extraído da polpa das uvas. Em menor concentração há outros ácidos benzóicos como o protocatéico e o gentísico. Encontram-se nas uvas na forma de éster e durante o processamento do vinho são lentamente hidrolizados, apresentando-se na forma de compostos livres. Vinhos que passam por envelhecimento em barricas apresentam elevados níveis de derivados

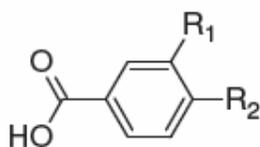
hidroxibenzoicos, principalmente do ácido elágico. Estes compostos não exercem influência direta no *flavour* dos vinhos, mas estão relacionados no aparecimento de fenóis voláteis com conseqüentes alterações aromáticas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

(A)



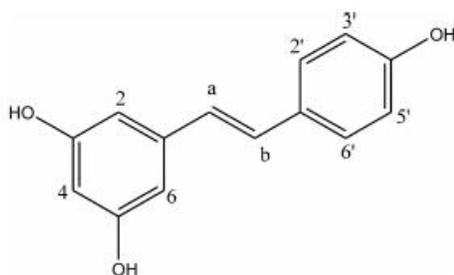
<i>Derivados cinâmicos</i>	R_1	R_2	R_3
Ácido <i>p</i> -cumárico	H	OH	H
Ácido cafeico	OH	OH	H
Ácido ferúlico	OCH ₃	OH	OCH ₃

(B)

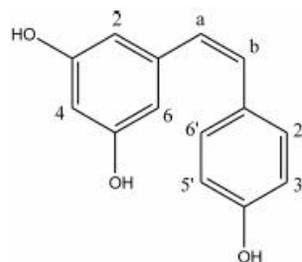


<i>Derivados Benzóicos</i>	R_1	R_2
Ácido gálico	OH	OH
Ácido vanílico	OCH ₃	H
Ácido siríngico	OCH ₃	OCH ₃

(C)



trans-resveratrol



cis-resveratrol

Figura 5. Estrutura geral dos não-flavonoides mais encontrados em uvas e vinhos: (A) derivados do ácido cinâmico; (B) derivados do ácido benzóico; (C) estilbenos (SPÁCIL; NOVÀKOVÁ; SOLIDH, 2008).

Em relação aos estilbenos, o resveratrol (3-4'-5-hidroxiestilbeno) (Figura 5C) é o composto majoritário presente tanto nas uvas como no vinho, principalmente em vinhos tintos. Pode ser encontrado na forma de dois isômeros: *cis* ou *trans*-resveratrol, assim como na forma glicosilada. A forma *trans* é a predominante nas uvas, localizada nas cascas, sendo que a forma *cis* não está naturalmente presente em uvas, no entanto pode ser produzida por irradiação UV, assim como pode ser encontrado na maioria dos vinho devido às técnicas aplicadas para vinificação (MONAGAS et al., 2005). Estudos demonstram que o *trans*-resveratrol é sintetizado nas uvas em resposta as infecções microbianas ou ao estresse, no entanto, também é originado após tratamento químico, como a aplicação de herbicidas, assim como pela exposição a luz ultravioleta. (CANTOS et al., 2003; CLARE; SKURRAY; SHALLIKER, 2005). O conteúdo de resveratrol pode variar de acordo com a variedade da uva, fatores climáticos, assim como pelas práticas agrícolas utilizadas (CHO et al., 2006; MORENO; CASTRO; FALQUÉ, 2008). No vinho os níveis de resveratrol são influenciados pelas técnicas de vinificação, como por exemplo, o tempo de maceração e também durante o envelhecimento do vinho (BURNS et al., 2001; STERVBO; VANG; BONNESEN, 2007). Pesquisadores evidenciaram que o resveratrol exerce efetiva atividade antioxidante na saúde humana (FRANKEL; WATERHOUSE; TEISSEDE, 1995).

Flavonóides

Os flavonóides são compostos fenólicos que se caracterizam por um esqueleto básico e comum C6-C3-C6. A estrutura base consiste em dois anéis aromáticos ligados por um anel pirano. Podem ocorrer na forma livre, glicosilada ou acilada. Os flavonóides mais comuns presentes em vinhos tintos são as antocianinas, flavanóis e flavonóis, diferenciados pelo grau de insaturação e oxidação, sendo estes responsáveis pelas características de cor e estrutura dos vinhos (ZOECKLEIN et al., 1995; SPACIL; NOVÀKOVÁ; SOLIDH, 2008).

Antocianinas

As antocianinas são compostos que pertencem à família dos flavonóides e são responsáveis pela enorme diversidade de cores das flores e dos frutos (Figura 6) (DANGLES; WIGAND; BROUILLARD, 1992). Geralmente estão localizadas nos

vacúolos epidérmicos das células vegetais; podem ser encontradas em frutas, flores, raízes, hastes, folhas e sementes (SAONA-RODRIGUEZ; GIUSTI; WROLSTAD, 1998).

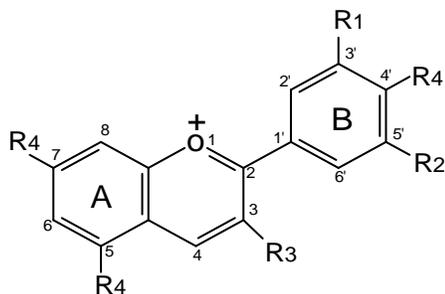


Figura 6. Estrutura do cátion flavílium (MAZZA; MINIATI, 1993).

São substâncias polidroxi e polimetoxi derivadas do cátion *flavílium* e glicosídeos de antocianidinas, sendo normalmente glicosiladas nas posições 3 e 5. Elas diferem do restante do grupo dos flavonóides por absorverem fortemente na região visível do espectro e pela capacidade de formar estruturas ressonantes através da variação do pH (MAZZA; MINIATI, 1993).

Os precursores da biossíntese das antocianinas são os flavonóis-3,4-cis-dióis ou leucoantocianidinas. É conhecido que a biossíntese das antocianinas da videira segue a formação de chalcona → flavonona → dihidroflavonol → antocianidina → antocianina (MAZZA; MINIATI, 1993). Diversos fatores agem interferindo na biossíntese das antocianinas, entre eles as condições climáticas, luz, temperatura, tipo de solo e as práticas agrícolas aplicadas (ROGGERO; COEN; RAGONNET, 1986).

Antocianinas das uvas são baseadas em cinco agliconas que diferem entre si pelos radicais de substituição no anel B (Tabela 1). Em sua forma glicosilada, ocorrem exclusivamente como 3-glicosídeos nas variedades de *vinifera*, e como 3,5-diglicosídeos em espécies americanas (*V. riparia*, *V. Rupprestris*, entre outras) e em variedades híbridas (HEREDIA et al., 1998; GIUSTI; SAONA-RODRIGUEZ; WROLSTAD, 1999). Nesta forma glicosilada, apresentam maior estabilidade. Somente as antocianinas monoglicosídicas e aciladas têm sido identificadas em uvas e vinhos de variedades de *Vitis vinifera* (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). As principais antocianinas presentes em uvas Cabernet Sauvignon são delfinidina 3-glicosídeo, petunidina 3-glicosídeo e em maior concentração a malvidina 3-glicosídeo

(SOMAATMADJA; POWERS, 1963; BURNS et al., 2002). A concentração de antocianinas nas uvas pode diferir daquela presente no respectivo vinho, o que pode ser atribuído, principalmente, aos fatores enológicos, como o processo de maceração e extração dos pigmentos (REVILLA et al., 2001).

Tabela 1. Principais antocianidinas (agliconas) presentes em uvas *Vitis vinifera*.

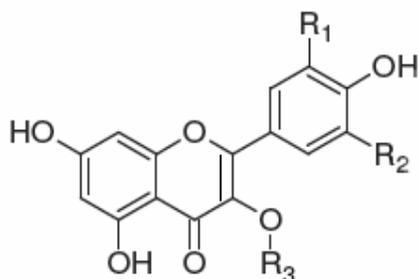
<i>Antocianidina</i>	R_1	R_2
Pelargonidina	H	H
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OCH ₃	H
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Fonte: Mazza e Miniati (1993).

Além da função de colorir, também apresentam outras funções nas plantas como proteção da radiação UV, defesa contra patógenos e polinização (MARTENS et al., 2003). As antocianinas também apresentam efeitos benéficos à saúde como atividade antioxidante (RIVERO-PÉREZ; MUÑIZ; GONZALÉZ-SANJOSÉ, 2007), anticarcinogênica (KONG et al., 2003), inibição da oxidação lipoprotéica e da agregação plaquetária (GHISELLI et al., 1998), e proteção contra doenças cardiovasculares (FALCHI et al., 2006). Considerando todos esses efeitos benéficos, nos últimos anos o interesse por antocianinas aumentou consideravelmente devido a aparente ausência de toxicidade, às suas propriedades funcionais associadas e também porque esses pigmentos são ambientalmente seguros (KAPADIA et al., 1997).

Flavonóis

Os flavonóis são compostos oriundos da biossíntese dos flavonóides, caracterizados pela presença de uma insaturação no anel heterocíclico e um grupamento hidroxila na posição 3 (Figura 7). Nas uvas encontram-se na forma de glicosídeos, principalmente nas cascas, no entanto, por serem susceptíveis a hidrólise, nos vinhos encontram-se na forma livre (agliconas).



<i>Flavonol</i>	<i>R₁</i>	<i>R₂</i>	<i>R₃</i>
Quercetina	OH	H	H
Mircetina	OH	OH	H
Campferol	H	H	H

Figura 7. Estrutura geral de um flavonol e suas agliconas indicando a substituição dos radicais (BOOTS; HAENEN; BAST, 2008).

São predominantemente sintetizados nas cascas das uvas, sendo que o principal flavonol reportado em uvas é a quercetina encontrada em maior concentração, no entanto em vinhos tintos pode-se destacar além da quercetina, o campferol e a mircetina (MATTIVI et al., 2006; FANG et al., 2007). Pesquisas afirmam que vinhos Cabernet Sauvignon contem maior concentração de flavonóis que outras variedades *Vitis vinifera* (MCDONALD et al., 1998).

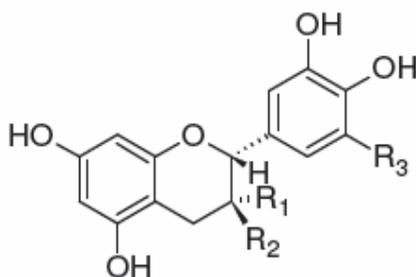
Embora seja uma família minoritária nas uvas, os flavonóis podem ter um papel importante na evolução da cor dos vinhos tintos através de processos de co-pigmentação com as antocianinas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Estudos demonstram que a quercetina presente no vinho, desempenha atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro*, o que conseqüentemente reflete em efeitos benéficos à saúde (EDWARDS et al., 2007; BOOTS; HAENEN; BAST, 2008).

Flavanóis

Os flavanóis presentes nas uvas são representados principalmente por flavan 3-óis e proantocianidinas. O primeiro grupo encontra-se, principalmente, na forma livre representado por (+)-catequina e (-)-epicatequina (Figura 8A), sendo que nas uvas a catequina está presente em maior concentração. Estes compostos são extraídos das cascas e sementes da uva e durante o processo de vinificação e envelhecimento do vinho sofrem transformações estruturais através de reações de oxidação e condensação que influenciam na adstringência e cor dos vinhos (MATEUS et al., 2003).

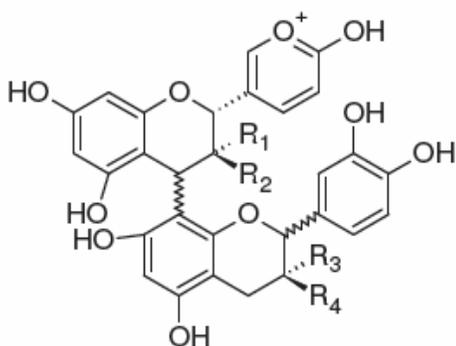
O segundo grupo referente às proantocianidinas (Figura 8B), também denominadas de taninos condensados, é representado pelas procianidinas que são oligômeros e polímeros de catequina e epicatequina. Nos vinhos tintos a procianidina majoritária é a B1 (CIMINO et al., 2007). No vinho apresentam propriedades químicas diversas, como quelantes de metais, capacidade de complexação com macromoléculas que reflete na clarificação e estabilização do vinho. Além disto, apresentam importantes propriedade farmacológicas como atividade antioxidante, antiinflamatória e anticarcinogênica (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

(A)



<i>Flavan 3-ol</i>	R_1	R_2	R_3
(+)-Catequina	H	OH	H
(-)-Epicatequina	OH	H	H

(B)



<i>Procianidinas</i>	R_1	R_2	R_3	R_4
B1	OH	H	H	OH
B2	OH	H	OH	H
B3	H	OH	H	OH
B4	H	OH	OH	H

Figura 8. Estrutura geral dos flavanois: (A) flavan 3-ol; (B) proantocianidinas e os principais derivados indicando a substituição dos radicais (SPACIL; NOVÀKOVÁ; SOLIDH, 2008).

Devido aos múltiplos fatores que afetam a extração dos polifenóis, não é surpreendente que o conteúdo de compostos fenólicos apresenta grande variação entre as diferentes variedades, ou entre a uva e o respectivo vinho, que outros constituintes. Em adição, estes compostos também são marcados por alterações qualitativas na sua estrutura durante o envelhecimento quando comparado aos outros constituintes do vinho.

5 A cor dos vinhos

A cor é um dos principais parâmetros de qualidade dos vinhos e exerce forte influência na aceitabilidade pelo consumidor. Fornece informações dos possíveis defeitos, da idade e da evolução do vinho durante a estocagem (PÉREZ-MAGARIÑO; GONZÁLEZ-SAN JOSÉ, 2002). A cor dos vinhos está intimamente relacionada com os compostos fenólicos presentes, principalmente as antocianinas, que são extraídos da casca das uvas durante a maceração e transferidos para o mosto (SOMERS; EVANS, 1977; GÓMEZ-PLAZA; GIL-MUÑOZ, MARTÍNEZ-CUTILLAS, 2000).

A cor dos vinhos sofre influência de muitos parâmetros, tais como, a variedade da uva, as técnicas de vinificação principalmente devido às diferenças existentes nas condições de extração, e das numerosas reações que ocorrem a partir do início do processamento da uva (AUW et al., 1996). Além disto, a cor é influenciada pelo pH, atividade enzimática, presença de dióxido de enxofre, concentração de oxigênio e temperatura do meio (GLORIES, 1984; DALLAS; RICARDO-DA-SILVA; LAUREANO, 1996). Dentre estes fatores, o pH e o dióxido de enxofre exercem importantes efeitos a ser considerados (Figura 9).

Em vinhos jovens as antocianinas ocorrem predominantemente como um dinâmico equilíbrio entre 4 formas moleculares: cation flavilium, chalcona, base quinoidal, pseudobase carbinol. O baixo pH do vinho contribui para a existência em maior proporção do cation flavilium, conferindo coloração vermelha, assim como impede a hidrólise das antocianinas em suas respectivas agliconas. Também, a presença de altas concentrações no meio de dióxido de enxofre exerce irreversível branqueamento das antocianinas com conseqüente perda da cor do vinho (RIBÉREAU-GAYON et a., 2006).

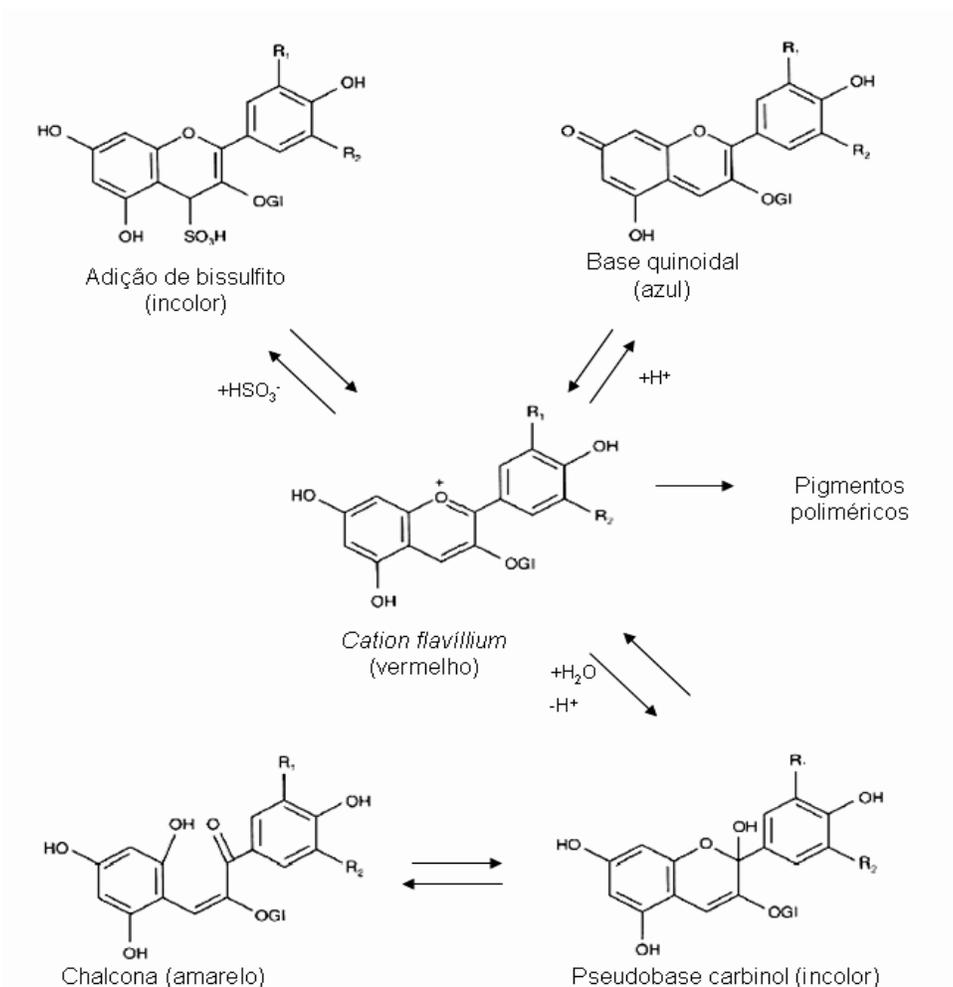


Figura 9. Equilíbrio entre as várias formas de antocianinas presentes no vinho (RIBERÉAU-GAYON et al., 2006).

As antocianinas em uvas *Vitis vinifera* existem exclusivamente na forma de monômeros. No entanto, durante as primeiras etapas dos processos de vinificação ocorre, através de reações químicas, a formação de complexos entre antocianinas monoméricas e um cofator, também conhecido como copigmento (compostos não coloridos). A copigmentação resulta, geralmente, em um aumento na absorvância, seguido ou não de um deslocamento no comprimento de onda de máxima absorção do pigmento. A copigmentação tem importância crítica no entendimento da relação entre a composição da uva e a cor do vinho, na variação da cor e concentração de pigmento, bem como, em todas as reações envolvendo as antocianinas durante o envelhecimento do vinho. Antocianinas copigmentadas apresentam maior estabilidade no vinho devido

repelir a água e conseqüentemente impedir o ataque nucleofílico (AUBERT; DANGLES; AMIOT, 2001; BOULTON, 2001). No entanto, Gutiérrez, Lorenzo e Espinosa (2005) demonstraram que a porcentagem de antocianinas copigmentadas diminui consideravelmente ao longo do tempo de guarda do vinho.

A associação entre os pigmentos e copigmentos, envolvem glicosídios de antocianinas, ácidos fenólicos, flavonóis, flavanois e fenóis voláteis. Várias são as formas de complexação dos pigmentos antocianínicos com outros componentes presentes nos vinhos, sendo os taninos considerados os melhores copigmentos existentes. Essencialmente, as reações envolvem taninos condensados e antocianinas através de associações não-covalentes. Os efeitos na coloração do vinho dependem da natureza e da concentração do pigmento e co-pigmento, da razão entre eles, do pH, como também do conteúdo de etanol (FULCRAND et al., 1998; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

As mudanças progressivas da cor são inevitáveis devido à reatividade dos constituintes fenólicos, por isto, a evolução da cor durante o tempo de guarda dos vinhos é atribuída às alterações progressivas dos compostos fenólicos, principalmente as antocianinas. Outro mecanismo envolvido na estabilização da cor dos vinhos é através da reação direta entre as antocianinas e subprodutos como o acetaldeído, ácido pirúvico e vinilfenóis, originando pigmentos chamados de piroantocianinas (Figura 10), que são produtos de cicloadição. Estes compostos são altamente resistentes e estáveis frente a ação do dióxido de enxofre. As piroantocianinas contribuem principalmente para a tonalidade alaranjada dos vinhos, que é característica de vinhos envelhecidos (RENTZSCH; SCHWARZ; WINTERHALTER, 2007).

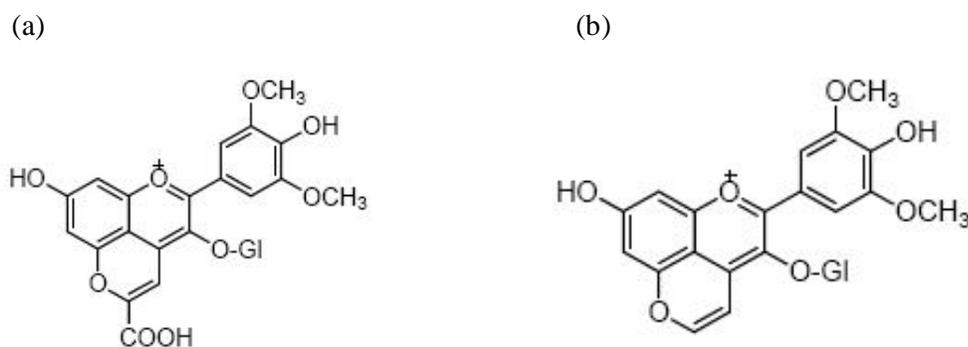


Figura 10. Estrutura química das piroantocianinas: (a) Visitina A; (b) Visitina B (RENTZSCH; SCHWARZ; WINTERHALTER, 2007).

Durante o tempo de guarda do vinho as antocianinas sofrem reações de condensação que resultam fundamentalmente da reação direta entre proantocianidinas e antocianinas originando compostos sem cor; e também reações mediadas com o acetaldeído entre antocianina e flavonol, o que origina pigmentos poliméricos (escuros) (REMY et al., 2000). A formação destes pigmentos derivados das antocianinas são considerados as causas das alterações da cor inicial vermelho brilhante dos vinhos tintos jovens para vermelho tijolo, característico de vinhos envelhecidos o que se refere à diminuição das antocianinas monoméricas e a um aumento nos pigmentos poliméricos (ALCALDE-EON et al., 2006; RIVAS et al., 2006). Segundo Gómez-Cordovés e González-SanJosé (1995) as alterações que ocorrem nos vinhos são mais intensas durante o envelhecimento em madeira (reações de oxidação) devido a maior presença do oxigênio do que durante o envelhecimento na garrafa.

Durante o tempo de envelhecimento do vinho as reações de oxidação conduzem a uma diminuição da concentração de antocianinas livres, principalmente de cianidina, petunidina e delphinidina, que são degradadas em alguns meses, no entanto a malvidina pode permanecer presente no vinho durante dois ou três anos (GLORIES, 1978). Por isto, devido a sensibilidade das antocianinas livres para as reações irreversíveis de degradação, é preferível que ocorra estas reações de polimerização durante o tempo de maturação do vinho, com intuito de conferir maior proteção da sua coloração (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

6 Alterações dos compostos fenólicos: barril e garrafa

O envelhecimento de um vinho pode ser caracterizado pelo desenvolvimento equilibrado de vários compostos responsáveis pela cor, aroma e flavor. No entanto a velocidade com que estas modificações ocorrem é diferente para cada amostra de vinho, dependendo tanto de condições externas, incluindo os fenômenos oxidativos (O_2 e SO_2), temperatura e tempo, como também da composição do vinho, como a concentração de polifenóis, e a razão entre pigmentos e taninos. A duração do processo de envelhecimento do vinho é altamente variável e depende da origem deste vinho, da variedade e da qualidade das uvas.

A Figura 11 demonstra as reações que ocorrem durante o tempo de envelhecimento, seja em barril como na garrafa, e que alteram a composição do vinho, refletindo na cor, aroma e sabor. Dentre estas reações destacam-se: a oxidação, reações mediadas pela temperatura, e aquelas que ocorrem devido o tempo de armazenamento.

A oxidação é promovida por vários fatores: aeração do vinho durante envelhecimento em barril; introdução controlada de oxigênio; e pela presença de compostos oriundos da madeira, como por exemplo, os taninos elágicos. Estas reações são desejáveis para intensificar e estabilizar a cor e suavizar o sabor, no entanto devem ser estritamente controladas, pois podem causar deterioração irreversível no vinho. Ocorrem com maior intensidade quando o vinho é envelhecido em barril. O excesso de oxigênio pode causar quebra oxidativa das antocianinas, desenvolvimento da coloração laranja e oxidação do ácido tartárico originando compostos de cor amarela. Todas estas reações dependem da concentração relativa de taninos e antocianinas, assim como do tipo de tanino presente (RIBEREAU-GAYON et al., 2006).

A temperatura também é um fator importante para o desenvolvimento de reações que refletem na mudança da cor dos vinho. Quando é utilizado temperatura acima de 20°C pode desencadear a formação de compostos através da quebra das procianidinas que irão formar complexos alterando a coloração do vinho, além disto, promove a degradação das antocianinas (SOMERS; EVANS, 1986; GÓMEZ-PLAZA et al., 2000).

Durante o tempo de envelhecimento em garrafa, que representa um meio impermeável ao oxigênio, inicialmente, ocorrem reações de oxidação no vinho, que são muito leves. No entanto, as principais transformações independem da oxidação, com destaque para aquelas que envolvem a condensação de antocianinas (desencadeando a cor vermelho-alaranjado) e polimerização de taninos. A temperatura alta durante o envelhecimento também favorece estas reações e é responsável por acelerar o envelhecimento (DALLAS; LAUREANO, 1994; WANG; RACE; SHRIKHANDE, 2003).

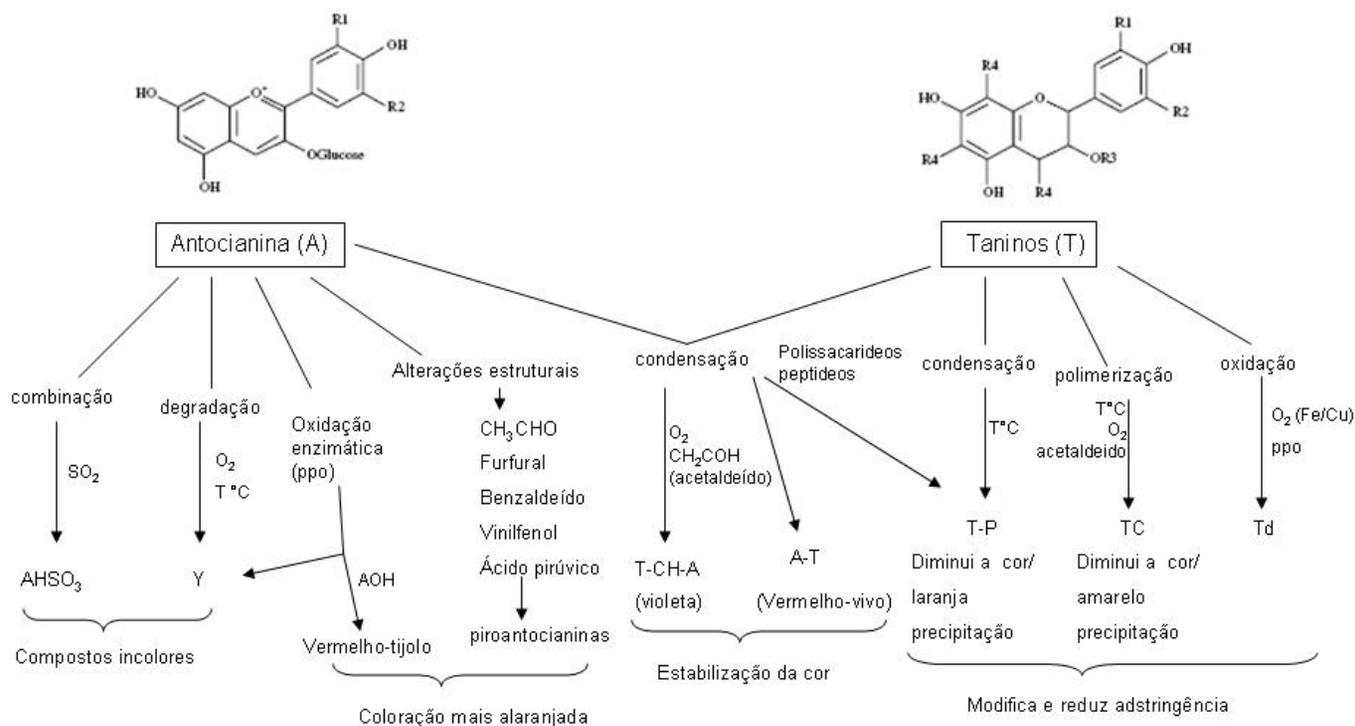


Figura 11. Representação das principais alterações que ocorrem com os compostos fenólicos (A= antocianinas; T = taninos) durante o envelhecimento do vinho. Y: produto das antocianinas degradadas; A-T: combinação entre antocianinas e taninos; T-P: combinação polissacarídeo-tanino ou proteína-tanino; TC: tanino condensado; Td: tanino degradado; ppo: polifenoloxidase (RIBEREAU-GAYON et al., 2006).

7 Atividade antioxidante

As reações de oxidação nos sistemas biológicos induzem a formação de radicais livres no organismo. Estes compostos, devido sua estrutura química, são altamente reativos, agindo sob muitas moléculas biológicas do organismo, como os lipídios, carboidratos, proteínas e o DNA. Estas espécies promovem reações de oxidação podendo danificar membranas e conteúdos celulares, sendo associados a doenças degenerativas, cardiovasculares assim como inflamações crônicas (CHEUNG; CHEUNG; OOI, 2003).

Com o intuito de identificar substância que apresentam efeitos protetores, pesquisas evidenciaram que os compostos fenólicos, presentes em frutas e vegetais, apresentam alta capacidade antioxidante. As uvas são ricas em compostos fenólicos, como por exemplo, os flavonóides (catequina, epicatequina, quercetina, antocianinas) e o resveratol, os quais são principalmente encontrados em produtos derivados de uvas tintas (FULEKI; RICARDO-DA-SILVA, 2003). Os compostos fenólicos das uvas têm merecido atenção não somente devido ao seu importante papel na elaboração de produtos derivados da uva, mas também pelos seus potenciais efeitos benéficos à saúde. Estes efeitos benéficos estão relacionados com propriedades bioquímicas e farmacológicas, incluindo atividades antioxidante *in vivo* (WANG et al., 2006) e *in vitro* (FERNÁNDEZ-PACHÓN; VILLAÑO; GARCÍA-PARRILLA, 2004; CIMINO et al., 2007), propriedades antiinflamatória, anticarcinogências e proteção contra doenças cardiovasculares (FRANKEL et al., 1998; SIGLETARY et al., 2003).

Estudos têm demonstrado que os compostos fenólicos apresentam propriedades antioxidantes e exercem, portanto, um efeito protetor contra os danos oxidativos das células (LOPEZ-VELEZ; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; DEL VALLE-RIBES, 2003). O efeito antioxidante destes compostos ocorre por agirem como seqüestradores das espécies reativas de oxigênio (“scavengers”) e também como quelantes de cátions divalentes (HANASAKI; OGAWA; FUKUI, 1994). Acredita-se que atuem como bons “scavengers” por reagir rapidamente com o radical livre e estabilizá-lo pela doação de um átomo de hidrogênio ao radical hidroxil, assim como doadores deste elemento ao radical superóxido (PARK et al., 2003).

O consumo de vinho, especialmente tinto, está associado à prevenção de algumas doenças. Estudos epidemiológicos demonstram que o efeito do consumo de

alimentos e bebidas ricos em compostos fenólicos sobre a prevenção de doenças como câncer (KONG et al., 2003) e doenças cardiovasculares (LAPIDOT et al., 1999) é bastante significativo; isto ocorre devido ao potencial químico em proteger da oxidação a lipoproteína de baixa densidade em humanos, diminuindo assim o risco de doenças como aterosclerose (LAZZÉ et al., 2003), além de reduzir os danos ao DNA e a produção de radicais livres pelo organismo (PARK et al., 2003).

A atividade antioxidante dos polifenóis é dependente da sua estrutura química. Para os ácidos fenólicos a atividade antioxidante depende do número e posição de grupos hidroxilas em relação ao grupo carboxila, assim como da natureza da glicosilação destes grupos. Ácidos monohidroxibenzóicos com o grupo OH ligado na posição *meta* apresentam efetiva atividade antioxidante, o que não é verificado para as posições *orto* e *para*. A capacidade antioxidante aumenta com o aumento do grau de hidroxilação, no entanto, substituição do grupo hidroxila nas posições 3 e 5 por metoxilas, reduz esta atividade. Os compostos flavonóides apresentam a capacidade antioxidante relacionada principalmente, com as substituições no anel B e C. Estes compostos apresentam maior capacidade antioxidante conforme aumenta o grau de hidroxilação do anel B, assim como quando possuem ligações duplas entre C₂ e C₃ combinado com grupo OH na posição 3 do anel C (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Diferentes técnicas são empregadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*. Dentre as técnicas amplamente utilizadas estão os métodos ABTS (ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e FRAP. Os dois primeiros métodos são baseados na captura de radicais livres, enquanto o método FRAP tem como princípio a capacidade de redução do ferro. Todos são classificados como não competitivos em que o antioxidante interage com a espécie reativa, sendo que a capacidade antioxidante é monitorada pela quantificação da espécie reativa (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

8 Métodos analíticos para caracterização da cor e dos compostos presentes na uva e no vinho

As técnicas analíticas são importantes ferramentas para monitorar a qualidade de uvas e vinhos. As diferentes técnicas usadas podem influenciar no resultado obtido. Dentre os métodos mais utilizados para quantificar estes compostos presentes em uva e vinho estão as técnicas espectrofotométricas e de cromatografia líquida.

8.1 Espectrofotometria

As técnicas para a determinação dos compostos presentes em uvas e vinho utilizando espectrofotometria são amplamente utilizadas devido sua facilidade, simplicidade e rapidez e podem ser realizadas por leitura direta da absorbância ou através da reação seletiva de reagentes que fornecem produtos coloridos. As medidas espectrofotométricas fornecem a estimativa da concentração de um grupo de compostos, não fornecendo detalhes do composto individual. A quantificação dos compostos é realizada com base na quantidade de luz absorvida pela amostra em determinado comprimento de onda. Os resultados podem ser expressos como índice quando utilizado somente os valores de absorbância, ou determinados através de uma curva de calibração quando for utilizada solução padrão. Para as amostras de uva e vinho, são determinadas por espectrofotometria, principalmente, o conteúdo total das famílias dos compostos fenólicos, antocianinas totais e as frações poliméricas, monoméricas e copigmentadas, intensidade e a tonalidade da cor (GÓMEZ-CORDOVÉS; GONZALEZ-SANJOSÉ, 1995; LEVENGOOD; BOULTON, 2004).

Além das medidas de absorbância, a cor de um vinho também pode ser determinada por colorimetria. Neste método é utilizado um sistema de coordenadas denominado de CIElab. Através deste sistema a cor é descrita em 3 dimensões no espaço: L^* , a^* , b^* . O eixo vertical L^* , representa a medidas de luminosidade da amostra, variando de opaco (zero) à completamente branco (100). A coordenada a^* correlaciona a intensidade de vermelho ($+a^*$) e verde ($-a^*$) e a coordenada b^* o amarelo ($+b^*$) e azul ($-b^*$). O sistema CIElab é amplamente utilizado para caracterizar a cor dos vinhos e acompanhar sua evolução ao longo do tempo (PÉREZ-MARGARIÑO; GONZÁLES-SANJOSÉ, 2002).

8.2 Cromatografia

A necessidade de técnicas com a habilidade de separar e analisar amostras complexas como uva e vinho, tem motivado constante inovação na área da cromatografia, sendo que a técnica de cromatografia líquida, disponível desde 1969, tem se destacado e impulsionado ao desenvolvimento e validação de novas metodologias (LANÇAS, 1993).

A análise individual dos compostos presentes no vinho, como por exemplo, compostos fenólicos flavonóides e não-flavonóides e os ácido orgânicos, são realizadas por muitos pesquisadores através cromatografia líquida (CLAE). Para análises por CLAE os detectores mais comuns são: o detector espectrofotométrico de absorção no ultravioleta-visível (UV-VIS), detector por Arranjo de Diodos (DAD) e detector por Fluorescência (FL), no entanto, devido as diferentes estruturas dos compostos presentes em uvas e vinho, os detectores mais utilizados são UV-Vis ou DAD, que monitoram a absorbância dos compostos tanto na região do visível quanto do ultravioleta. No entanto, o DAD apresenta como principais vantagens realizar a detecção em múltiplos comprimentos de onda e a identificação da pureza do pico (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

A Cromatografia Líquida de Alta Performance ou Eficiência é um método físico-químico de separação. A amostra a ser analisada apresenta-se em solução, e os constituintes a serem separados são chamados de solutos. A separação resulta de um equilíbrio de distribuição do soluto entre duas fases: uma fase fixa sólida que se apresenta com líquido polar ou apolar ligado, chamada de fase estacionária, recheada no interior de uma coluna, e uma fase móvel que atravessa a fase fixa contida na coluna. Assim a fase móvel proveniente de um reservatório de solvente é bombeada constantemente através da coluna cromatográfica para arrastar os analitos de interesse. A análise se inicia pela introdução da amostra, em solução, por meio de uma válvula de injeção. Assim, esta solução injetada é empurrada para a coluna cromatográfica pela fase móvel. A separação se produz na coluna. Os compostos separados são observados sob forma de picos na saída da coluna por um detector apropriado (LEITE, 2002). A Figura 12 esquematiza os componentes de um cromatógrafo líquido.

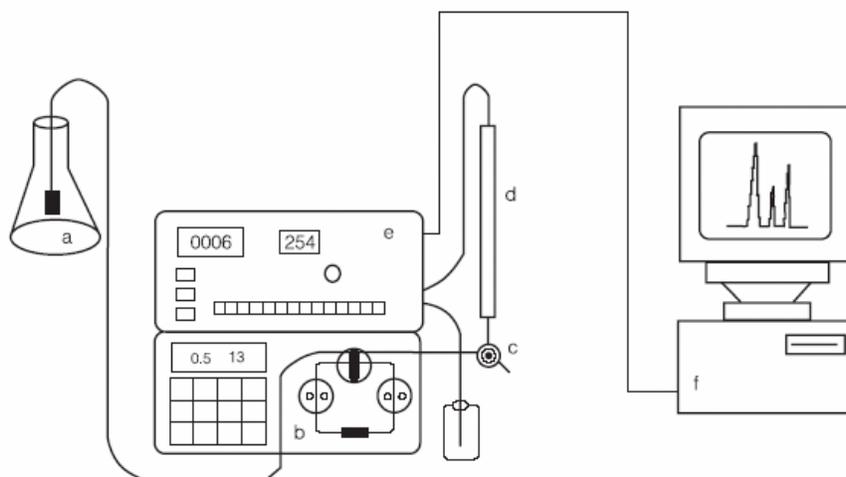


Figura 12. Representação das unidades de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE): a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector; f) registrador (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Há duas formas para eluir o solvente sobre a fase estacionária, utilizando modo isocrático ou modo gradiente. O primeiro consiste em realizar a separação cromatográfica com apenas uma composição de eluente, o qual tem sido muito aplicado para a quantificação de ácidos orgânicos em uvas e vinhos (ESCOBAL et al., 1998). A eluição utilizando a forma de gradiente realiza a separação cromatográfica com uma composição variável do eluente, mas para isto, é necessário o sistema apresentar de 2 a 4 bombas. Este modo é utilizado para separar compostos de polaridade diferentes, sendo amplamente aplicado para a separação e quantificação de compostos fenólicos flavonóides e não-flavonóides (MONAGAS; GÓMEZ-CORDOVÉS; BARTOLOMÉ, 2006).

Diversas pesquisas têm utilizado a cromatografia líquida para determinar os principais compostos presentes em uvas e vinhos, monitorando a evolução destes ao longo do tempo, com objetivo de obter maior controle de qualidade durante a produção do vinho. Também, é amplamente utilizada para caracterizar amostras procedentes de diferentes locais, assim como diferenciar clones de uma mesma variedade de uva. Estas aplicações são possíveis devido a alta sensibilidade de detecção do CLAE (De BEER et al., 2005; MONAGAS; GÓMEZ-CORDOVÉS; BARTOLOMÉ, 2006).

Após a detecção dos compostos por CLAE, a quantificação dos analitos é realizada através da correlação entre o sinal emitido pelo detector e a concentração do

composto de interesse. Dentre os sistemas mais utilizados para a quantificação destacam-se a padronização externa e interna. O método de padronização externa compara a área da substância a ser quantificada na amostra com áreas obtidas com soluções de concentração conhecidas preparadas a partir de um padrão. Os padrões são preparados, separadamente, em concentrações conhecidas, obtêm-se os cromatogramas correspondentes, e relacionam-se as áreas obtidas com a concentração, construindo uma curva de padronização. A padronização interna consiste na preparação das soluções padrão de concentração conhecida da substância de interesse, às quais se adiciona a mesma quantidade de um composto conhecido chamado padrão interno. Esta forma de quantificação é recomendada quando alta precisão é necessária porque o padrão interno (PI) é submetido às mesmas condições da substância de interesse durante a corrida cromatográfica. O padrão interno deve ser escolhido dentro de alguns requisitos: o composto escolhido preferivelmente, não deve estar presente na matriz que será analisada, deve eluir da coluna separado de todos os outros compostos presentes na amostra, deve ser estável nas condições de análise e a quantidade injetada deve ser suficientemente estável para permitir a estocagem por um tempo adequado (RIBANI et al., 2004). A padronização interna é muito utilizada para amostras de alta complexidade como, por exemplo, o vinho.

Na literatura há muitas metodologias descritas para a quantificação por cromatografia líquida dos compostos presentes em uva e vinho. No entanto, para que um método seja considerado confiável e seguro é necessário que este tenha sido validado (LEITE, 2002). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO) os parâmetros que devem ser determinados para verificar o desempenho analítico com conseqüente validação incluem: 1) seletividade, que avalia a capacidade do método em determinar as substâncias em exame na presença de outros compostos em uma matriz complexa. Além disto, garante que o pico da resposta seja exclusivamente do composto de interesse; 2) linearidade, que corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais a concentração da substância, dentro de determinada faixa de trabalho; 3) faixa de trabalho, representa o resultado superior e inferior do analito em exame; 4) precisão, tem como objetivo avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas, expressa como desvio padrão relativo; 5) exatidão, refere-se a

concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro, sendo expressa como porcentagem de recuperação; 6) limite de detecção e quantificação, representam a menor quantidade de um analito que pode ser detectada e quantificada, respectivamente, sob as condições experimentais estabelecidas; 6) robustez, mede a sensibilidade do método frente a pequenas variações (RIBANI et al., 2004).

Capítulo 2

**Desenvolvimento e validação de método analítico por
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase
reversa para simultânea determinação de compostos
fenólicos em vinho tinto**

Desenvolvimento e validação de método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa para simultânea determinação de compostos fenólicos em vinho tinto

Resumo

Uma metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa foi desenvolvida e validada para determinação simultânea de cinco compostos fenólicos em vinho tinto. A separação cromatográfica foi realizada em coluna C18, com fase móvel consistindo de água acidificada com ácido acético (pH 2,6) (solvente A) e 20 % solvente A e 80 % de acetonitrila (solvente B). Os parâmetros de validação incluíram seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão, utilizando padronização interna. Todas as curvas de calibração foram lineares ($R^2 > 0,999$) para a faixa de trabalho, foi obtida ótima precisão ($RSD < 2,6 \%$) e as recuperações para todos os compostos variaram de 80 – 120 %. Este método foi aplicado em amostras de vinho tinto do Estado de Santa Catarina, Brasil, e foi observada ótima separação dos compostos fenólicos nestes vinhos.

Palavras-chave: conteúdo fenólico; parâmetros de validação, vinho tinto.

1 Introdução

Os compostos fenólicos constituem um dos mais importantes parâmetros de qualidade do vinho, pois eles contribuem para as características organolépticas, principalmente, cor, adstringência e amargor (SHAHIDI; NACZK, 1995; BOULTON, 2001; LESSCHAEVE; NOBLE, 2005; GÓMEZ-ALONSO; GARCÍA-ROMERO; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2007). Os polifenóis dos vinhos podem ser divididos em dois grupos: compostos não-flavonóides e flavonóides, sendo que no primeiro grupo, também denominado de ácidos fenólicos, destacam-se os ácidos hidroxicinâmicos como, por exemplo, os ácidos cafeico, *p*-cumárico e ferrúlico, e no segundo grupo estão antocianinas, flavonóis, como a quercetina e os flavanois com destaque para a catequina (GÓMEZ-ALONSO; GARCÍA-ROMERO; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2007; SPACIL; NOVÁKOVÁ; SOLICH, 2008). O tipo e a concentração dos compostos fenólicos no vinho são influenciados principalmente pela variedade da uva, diferentes práticas vitícolas e pelas técnicas enológicas utilizadas (RODRIGUES-DELGADO et al., 2002; MATEJÍČEK et al., 2005). De acordo com diversos estudos epidemiológicos, os compostos fenólicos apresentam efeitos positivos para a saúde humana, devido diminuir a incidência de doenças coronárias, reduzir a agregação plaquetária (BURNS et al., 2000), exercer atividade antioxidante, comprovada em estudos *in vivo* (WANG et al., 2006) e *in vitro* (FERNÁNDEZ-PACHÓN et al., 2004; CIMINO et al., 2007), assim como por exercer proteção anticarcinogênica (FRANKEL et al., 1998; SIGLETARY et al., 2003).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação analítica, comumente utilizada, pois apresenta alta resolução e fácil automação, necessitando de mínima preparação de amostra. Alguns dos compostos fenólicos encontrados nos vinhos mostram características de absorbância na região do UV-Vis, sendo que os cromatogramas obtidos em 280 nm são amplamente utilizados para estudar os compostos fenólicos, pois a absorção neste comprimento de onda é adequada para detectar a maioria destes compostos (BRAVO et al., 2006). Assim, colunas de fase reversa C18, sistema de solventes binários contendo água acidificada e solvente orgânico polar (acetoneitrila e metanol) e a detecção na região UV-Vis são utilizados e constituem uma ferramenta crucial e confiável para a análise dos compostos fenólicos (LEE, 2000).

Devido ao grande número, e as variações estruturais dos compostos fenólicos presentes em alimentos, procedimentos analíticos para determinar polifenóis individuais tem sido relativamente difíceis e complicados. A complexidade da composição fenólica do vinho induz ao desenvolvimento de vários métodos por cromatografia líquida de alta eficiência, a fim de obter diferentes grupos de compostos fenólicos com propriedades químicas específicas em uma única corrida cromatográfica. A maior parte das pesquisas tem utilizado cromatografia líquida para a identificação e determinação dos polifenóis no vinho (REVILLA; RYAN, 2000; LÓPEZ et al., 2001; GÓMEZ-ALONSO; GARCÍA-ROMERO; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2007; MUÑOZ et al., 2008; SPACIL; NOVÁKOVÁ; SOLICH, 2008; De QUIRÓS; LANGE-YUSTY; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, 2009), no entanto, há uma necessidade para o desenvolvimento de métodos que permitam a detecção simultânea dos principais fenólicos presentes nos vinhos em uma única corrida cromatográfica, com o intuito de diminuir o tempo de análise necessário.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método para a identificação e quantificação dos principais compostos fenólicos flavonóides e não-flavonóides em vinho tinto, usando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV-Vis. Este foi otimizado e cuidadosamente validado através da avaliação da seletividade, linearidade, faixa de trabalho, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação.

2 Material e Métodos

2.1 Reagentes químicos e soluções padrões

Acetonitrila usada foi grau HPLC fornecida pela Merck (Darmstadt, Germany), e os ácidos acético e tartárico, etanol e ácido clorídrico eram reagentes de grau analítico. A água usada na análise foi obtida do sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, MA). Todos os solventes utilizados como fase móvel foram previamente filtrados em membrana com poros de 0,45 μm (Millipore) e degaseificados antes do uso.

Padrões de (+)catequina, ácido *p*-cumárico e morin (2',3,4',5,7-Penthydroxyflavone) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), quercetina, ácido ferrúlico e ácido cafeico foram obtidos da Fluka (Steinheim, Germany). Todos os reagentes apresentaram pureza maior que 95%.

Individual solução estoque de cada padrão (1000 mg/L) foi preparada, sob sistema de nitrogênio pela dissolução do analito em metanol e acondicionado sob proteção da luz a -18 °C. Foi preparada uma solução estoque através da mistura de todas as soluções padrões (150 mg/L) dissolvidos em vinho sintético (solução hidroalcoólica 5 g/L, ácido tartárico 12 % v/v de etanol e pH 3,2). O vinho sintético foi utilizado com a intenção de evitar interferência na separação cromatográfica e na resposta de detecção. As soluções de trabalho e de calibração foram preparadas também em vinho sintético pela diluição da solução estoque contendo a mistura dos padrões, em concentrações que variaram de 0,3 to 150 mg/L. Solução de morin foi preparada em vinho sintético (16,2 mg/L) e foi utilizado como padrão interno (PI) e adicionado na solução de trabalho e de calibração. O oxigênio foi eliminado de todas as soluções através de corrente de nitrogênio para evitar a decomposição de todos os compostos e esta foi estocada no escuro com temperatura de 4 °C.

2.2 Amostras de vinho

Para a validação da metodologia foi utilizada amostra de vinho tinto Cabernet Sauvignon, safra 2008, oriundos do Estado de Santa Catarina, Brasil. Para a avaliação desta metodologia analítica foi utilizada amostra de vinhos comerciais: Cabernet Sauvignon, Syrah e Touriga Nacional, produzidos no Brasil. Os vinhos foram filtrados em membrana PTFE modificada com poros de 0,45 µm e 13,0 mm de diâmetro (Millipore) e injetados diretamente no CLAE.

2.3 Análises por CLAE

A análise cromatografica foi realizada utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu (Kyoto, Japan), equipado com um degaseificador a vácuo (DGU-14A), bomba quaternária (LC-10AT), detector UV-Vis (SPD-10AV) e com injetor manual com capacidade de 20 µL. O Software é um CASS-VP (ver. 6,1) e foi usado para

controlar o sistema de gradiente, o detector UV-vis e para a aquisição dos dados. Coluna de fase reversa C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 μ m de tamanho de partícula) (Hichrom, Europe) foi utilizada. Para anteceder a coluna analítica foi usada uma coluna de guarda C18 (4,6 mm x 12,5 mm, 5 μ m de tamanho de partícula) (Hichrom, Europe), a fim de evitar que resíduos não solúveis da amostra contaminem a coluna. A área dos picos foi determinada em comprimento de onda de 280 nm para todos os compostos fenólicos. A temperatura ambiente foi controlada e mantida em 20 °C \pm 1.

Determinação da composição do solvente, gradiente de eluição e fluxo de solvente

A fase móvel consistiu de água Milli-Q com pH ajustado para 2,6 com ácido acético como solvente A e 20% da solução A com 80% de acetonitrila como solvente B. Para determinar as condições inicial e final do gradiente, a composição dos solventes A e B foram determinadas utilizando uma eluição de gradiente exploratória. Primeiramente, aumentou-se linearmente 0 a 100 % o solvente B com fluxo de 1,2 mL/min no tempo total de corrida de 45 e 60 minutos. Utilizando estas condições foi injetado 20 μ L da amostra de vinho, e observou-se o tempo de retenção (t_R) do primeiro e último pico na corrida cromatográfica, nos dois tempos analisados, sendo estes utilizados para calcular a concentração inicial e final do solvente B. O mesmo procedimento foi realizado com o solvente A a fim de determinar o melhor gradiente para a eluição dos compostos. Foram testados uma série de gradientes a fim de obter a melhor separação dos picos cromatográficos.

Foram testadas 3 taxas de fluxo para a fase móvel: 0,8, 1,2 e 1,5 mL/min em diferentes proporções e tempos dos solventes A e B, para determinar o melhor fluxo do solvente. As verificações foram realizadas com injeção de 20 μ L da amostra de vinho, para analisar o efeito na resolução dos picos cromatográficos.

A identificação dos compostos foi realizada injetando separadamente as soluções padrões individuais para cada composto e também com a injeção da solução estoque contendo a mistura de todos os padrões. Foi determinado para cada composto, a resolução do pico e o tempo de retenção. Quando todos os padrões foram eluídos com boa resolução, foi realizada uma corrida cromatográfica com a amostra de vinho Cabernet Sauvignon com adição da solução padrão para verificar exata identificação de todos os compostos, assim como a ordem de eluição.

2.4 Validação da metodologia por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Após as condições de gradiente ser determinada no cromatógrafo líquido, utilizando fase reversa, os testes de validação foram realizados para seletividade, linearidade, faixa de trabalho, exatidão, precisão, e limites de detecção e quantificação (ICH, 1994).

Determinação da seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando os cromatogramas do vinho sintético com aqueles do vinho sintético adicionado de solução padrão contendo todos os compostos.

Determinação da linearidade e da faixa de trabalho

Solução padrão intermediária foi preparada em vinho sintético através da diluição da solução estoque com concentração de 150 mg/L para todos os compostos. As soluções de trabalho utilizadas para a curva de calibração de cada composto foram preparadas em triplicata e avaliadas pela injeção de 20 µL. Curvas de calibração para cada composto foram construídas separadamente considerando a área do pico (eixo-y) *versus* a concentração (eixo-x). Todas as curvas foram construídas utilizando o método de padronização interna. A curva de calibração foi avaliada por regressão linear e coeficiente de determinação o qual demonstram a linearidade do método na faixa de trabalho estudada.

Determinação dos limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados com base no desvio padrão da resposta do branco (vinho sintético) e na inclinação da curva de calibração para cada composto. O branco foi injetado 7 vezes consecutivas. Os limites foram expressos como:

$$\text{LOD} = 3.3 \times s/S$$

$$\text{LOQ} = 10 \times s/S$$

sendo, s: desvio padrão da resposta; S: inclinação da curva de calibração.

Determinação da exatidão

A exatidão foi determinada através de ensaio de recuperação (%) com a adição de solução padrão na amostra de vinho tinto e em vinho sintético. Foi adicionada solução padrão contendo mistura de todos os padrões em três diferentes concentrações: 1,0, 15,0 e 30,0 mg/L. As análises foram realizadas em triplicata, totalizando 9 injeções para cada amostra.

Determinação da precisão

A precisão foi avaliada através do método de precisão intermediária, em mesmo dia, em que foram realizadas 7 injeções da amostra de vinho e expresso na forma de desvio padrão relativo (DPR).

2.5 Identificação e quantificação de compostos fenólicos em vinho tinto

Os compostos fenólicos dos vinhos Cabernet Sauvignon, Syrah e Touriga Nacional, procedentes do Estado de Santa Catarina, Brasil, foram identificados por comparação do tempo de retenção nos espectros UV-vis com aqueles obtidos através de injeção de solução padrão em iguais condições. A área do pico foi usada para a quantificação utilizando padronização interna. Os vinhos foram injetados no volume de 20 μ L em triplicata. Os valores foram expressos como mg/L.

2.6 Análise estatística

O programa STATISTICA v. 6.0 (2001) (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) foi usado para realizar as análises de variancia (ANOVA) dos resultados obtidos, e para obter a inclinação da reta e os interceptos das curvas de calibração calculados pela equações de regressão linear, obter os coeficientes de determinação (R^2) e calcular o desvio padrão relativo (DPR).

3. Resultados e Discussão

3.1 Otimização do método cromatográfico

O desenvolvimento de único gradiente líquido para análise de vários compostos fenólicos constitui uma interessante e rápida solução para o estudo da presença dos principais polifenóis presentes no vinho focado na sua caracterização. A Tabela 1 demonstra os parâmetros instrumentais ótimos para a determinação cromatográfica dos compostos fenólicos no vinho. Para a otimização destas condições cromatográficas foram testadas diferentes fases móveis, diferentes programas de eluição do gradiente, assim como diferentes fluxos dos solventes.

Tabela 1. Condições cromatográficas para a determinação dos compostos fenólicos em vinhos tintos.

Condições cromatográficas	
Volume de injeção	20 µL
Coluna de guarda	C18, coluna de fase reversa, 4,6 x 12,5 mm, partículas de 5 µm
Coluna analítica	C18, coluna de fase reversa, 4,6 x 250 mm, partículas de 5 µm
Fase móvel	A (ácido acético em água, pH 2,65) B (20 % da solução A e 80 % de acetonitrila) <i>Primeiro segmento:</i> 0.01-35 min: 0-30 % B <i>Segundo segmento:</i> 35-40 min: 30-50 % B <i>Terceiro segmento:</i> 40-45 min: 50-100 % B <i>Conditionamento:</i> 45-60 min: 100-0 % B
Fluxo do solvente	1,2 mL/min
Temperatura da sala	20 °C ± 1
Comprimento de onda para detecção	280 nm

A composição da fase móvel foi preparada de acordo com o descrito por Villaño et al. (2006), no entanto, a fim de obter a melhor eficiência na separação foram testados dois solventes orgânicos: metanol e acetonitrila, assim como, os ácidos acético e fosfórico para diminuir o pH do meio. De acordo com a literatura, os compostos fenólicos presentes nas uvas e no vinho apresentam melhor separação quando a fase móvel é acidificada (pH próximo a 2,5), isto porque a adição de ácido na fase móvel impede a dissociação iônica na coluna (VILLANO et al., 2006; GARCÍA-FALCÃO et al., 2007; MUÑOZ et al., 2008). Combinações de metanol:água e acetonitrila:água foram verificadas, e foi observado que o uso de acetonitrila conferiu melhor resolução e separação dos picos cromatográficos, em menor tempo de corrida. Em relação ao ácido, verificou-se que o ácido acético apresentou melhor eficiência na separação dos compostos. Com base nestes resultados, os solventes escolhidos como ótimo foram: água e acetonitrila acidificados com ácido acético (pH 2,6).

Através da injeção da solução padrão contendo todos os compostos fenólicos avaliados, foi determinado o tempo total da corrida cromatográfica. Foram testados os tempos de 45 e 60 minutos e foi observado ser necessário um tempo de 60 minutos para que todos os compostos fenólicos de interesse sejam visualizados no cromatograma. O gradiente de eluição também foi otimizado para conferir a melhor resolução entre os picos. Foram testados diferentes proporções dos solventes A e B, no decorrer de 60 minutos, utilizando 2 e 3 segmentos. Observou ser necessário o uso de 3 segmentos para o gradiente de eluição, para evitar a co-eluição entre os compostos. O primeiro segmento (0 para 30 % de acetonitrila) permitiu a eluição da catequina e dos ácidos hidroxicinâmicos (ácidos cafeico, *p*-cumárico e ferrúlico). O segundo gradiente preparou para a eluição do morin (PI) e da quercetina, ambos eluídos no terceiro gradiente, quando atingiu 100 % de solvente orgânico. Todos os compostos foram eluídos até 45 minutos, e os 15 minutos finais foram utilizados para re-condicionar a coluna preparando-a para uma nova corrida cromatográfica. Em relação às classes dos fenólicos analisadas neste método observou-se que a ordem de eluição foi a seguinte: flavonol seguido dos ácidos hidroxicinâmicos e por último a classe dos flavanois. A Figura 1 demonstra a separação dos 5 compostos fenólicos juntamente com o padrão interno usado para identificar e quantificar os polifenóis no vinho, sendo que este novo método mostra-se capaz de determinar os compostos aqui estipulados com picos bem distintos e com boa resolução.

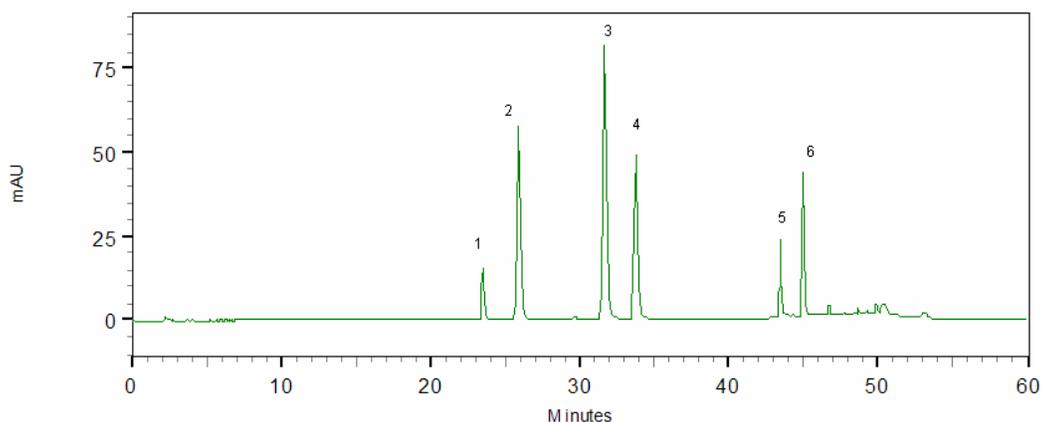


Figura 1. Cromatograma da solução padrão contendo todos os compostos fenólicos em vinho sintético após a otimização das condições cromatográficas: (1) catequina; (2) ácido cafeico; (3) ácido *p*-cumárico; (4) ácido ferrúlico; (5) morin; (6) quercetina.

3.2 Método de validação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Determinação da seletividade

A seletividade do método foi avaliada considerando o formato do pico, o tempo de retenção e a pureza do espectro cromatográfico, a fim de detectar possíveis interferentes. Não foi detectado nenhum pico interferente no cromatograma do branco (vinho sintético) nos tempos de retenção específico para cada composto analisado, sendo que a pureza dos picos, comparando a solução padrão e a amostra de vinho, foi maior que 99 %.

Determinação da linearidade e faixa de trabalho

As curvas de calibração foram construídas com 6 pontos, em triplicata, para cada composto fenólico, utilizando o método de padronização interna (solução de morin, 16,2 mg/L). Os resultados da análise de regressão e a variação linear da curva estão demonstrados na Tabela 2. As curvas de calibração mostraram-se lineares na faixa de trabalho estudada. Pode-se observar que todos os compostos apresentaram coeficiente de determinação (R^2) maior que 0,999, indicando um excelente ajuste dos compostos

fenólicos ao modelo, dentro da faixa de trabalho (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Tabela 2. Identificação dos compostos, equação regressão linear, incluindo o coeficiente de determinação (R^2) e a faixa de trabalho da curva de calibração (n=6), limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).

Compostos	Equação de regressão	R^2	Faixa de trabalho*	LOD*	LOQ*
Catequina	$y = 0,7488x + 0,0502$	0,9992	0,3-150	0,04	0,12
Ácido cafeico	$y = 3,3608x + 0,2287$	0,9991	0,3-75	0,02	0,06
Ácido <i>p</i> -cumárico	$y = 4,9013x + 0,3672$	0,9998	0,3-30	0,08	0,24
Ácido ferrúlico	$y = 2,9768x + 0,2145$	0,9998	0,3-30	0,04	0,13
Quercetina	$y = 1,5904x + 0,0477$	0,9991	0,3-75	0,05	0,15

* expresso em mg/L

Determinação dos limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) estão representados na Tabela 2. LOD apresentou variação 0,02 a 0,08 mg/L, enquanto LOQ variou de 0,06 a 0,15 mg/L, e pode-se observar que os valores de LOD foram em média 3 vezes menor que o LOQ. Estes valores estão de acordo com limites obtidos por outros pesquisadores, para análise de fenólicos em uva e produtos derivados, (GARCÍA-FALCÓN, et al., 2007; NAVE; CABRITA; COSTA, 2007; De QUIRÓS; LANGE-YUSTY; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, 2009), o que indica que o método proposto é sensível o suficiente para determinar estes compostos em vinho tinto.

Determinação da exatidão

A exatidão do método foi avaliada pela adição de solução padrão, contendo os compostos fenólicos (catequina, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferrúlico, morin (PI) and quercetina) em concentração conhecida, dentro da faixa de trabalho, em vinho sintético (solução utilizada para construção das curvas de calibração) e também em amostra real de vinho tinto e assim calculado a recuperação (%) (Tabela 3).

Tabela 3. Determinação da exatidão do método expresso como recuperação (%) das amostras de vinho sintético e vinho tinto adicionados de 3 diferentes concentrações de solução padrão.

Compostos	Vinho sintético			Vinho tinto		
	1,0 mg/L	15,0 mg/L	30,0 mg/L	1,0 mg/L	15,0 mg/L	30,0 mg/L
1	108,94 ± 10,93	88,20 ± 0,33	97,54 ± 0,82	93,09 ± 2,44	119,88 ± 1,26	95,76 ± 1,06
2	117,61 ± 0,03	104,51 ± 0,53	96,63 ± 0,62	98,88 ± 2,30	118,35 ± 2,42	109,29 ± 0,97
3	118,22 ± 0,54	110,84 ± 0,39	96,17 ± 0,21	108,11 ± 2,02	117,61 ± 4,06	93,93 ± 0,90
4	116,22 ± 0,89	106,87 ± 0,36	96,56 ± 0,44	119,20 ± 2,30	115,78 ± 1,18	100,19 ± 1,03
5	100,15 ± 0,07	86,70 ± 0,59	101,60 ± 0,35	93,15 ± 2,10	84,17 ± 2,09	81,34 ± 0,72

Identificação dos compostos fenólicos: (1) catequina; (2) ácido cafeico; (3) ácido *p*-cumárico; (4) ácido ferrúlico; (5) quercetina.
 Resultados expressos como: recuperação (%) ± DPR (%)

Com este propósito, as concentrações de solução padrão adicionadas no vinho sintético e vinho tinto foram: 1,0, 15,0 e 30,0 mg/L. A recuperação (%) foi calculada através das curvas de padronização interna. No vinho sintético o cálculo de recuperação foi como a razão [(concentração encontrada / concentração de polifenóis adicionada) x 100]; e a recuperação (%) para a amostra real de vinhos tinto foi a razão [(concentração dos compostos fenólicos encontrados na amostra após adição de padrão *minus* concentração de fenólicos naturalmente encontrado na amostra) / concentração de polifenóis adicionada x 100]. As recuperações para os compostos fenólicos variaram entre 86 a 118 % para o vinho sintético e de 81 a 119 % para amostra de vinho tinto, o qual está de acordo com outras pesquisas para quantificação destes polifenóis (SLADKOVSKÝ; SOLICH; URBÁNEK, 2004; GARCÍA-FALCÓN et al., 2007; MUÑOZ et al., 2008). Estes valores demonstram que os padrões dos fenólicos aplicados no vinho sintético comportaram-se de similar maneira que nas amostras de vinho tinto, apresentando a variação da recuperação entre 80 a 120 %, indicando que este método é aceitável para quantificação destes compostos na matriz real.

Determinação da precisão

A precisão desta metodologia foi, calculada com base no tempo de retenção e na concentração média dos compostos fenólicos e expressa como porcentagem de desvio padrão relativo (DPR) (Tabela 4). Os baixos valores obtidos neste estudo, 0,4 a 0,79 % e 1,31 a 2,68 % para tempo de retenção e concentração média, respectivamente, foram considerados ser suficientes para quantificar compostos fenólicos em vinho já que este é considerado ser uma matriz de alta complexidade. A variação do DPR encontrado neste método está de acordo com outras pesquisas para validação de metodologia analítica para detecção simultânea de macroelementos (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; GARCÍA-FALCÓN et al., 2007; MUÑOZ-MUÑOZ et al., 2008; FRANCISCO; RESURRECCION, 2009).

Tabela 4. Precisão do método de acordo com o tempo de retenção (t_R) e concentração média dos compostos fenólicos (mg/L) na amostra de vinho.

Compostos	t_R min (DP)	DPR (%)	Concentração média (DP)	DPR (%)
1	22,20 (0,13)	0,59	31,27 (0,41)	1,31
2	24,59 (0,10)	0,43	11,76 (0,2)	1,70
3	30,32 (0,15)	0,50	3,51 (0,09)	2,54
4	32,74 (0,26)	0,79	0,30 (0,008)	2,68
5	44,99 (0,12)	0,26	6,95 (0,18)	2,59

(1) catequina; (2) ácido cafeico; (3) ácido *p*-cumárico; (4) ácido ferrúlico; (5) quercetina.

DPR: desvio padrão relativo.

3.3 Aplicação do método e quantificação dos compostos fenólicos em vinho tinto

O método proposto foi aplicado para analisar compostos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos) em 3 amostras de vinhos tintos comerciais brasileiros: Cabernet Sauvignon, Syrah e Touriga Nacional (Tabela 5). As três variedades diferiram significativamente ($p < 0,05$) em relação a composição dos compostos analisados. Catequina foi o fenólico predominante em todos os vinhos, o que é excelente para os vinhos brasileiros, pois de acordo com De Quirós, Lange-Yusty e López-Hernández (2009) entre os polifenóis presentes no vinho, a catequina apresenta importante atividade antioxidante. O vinho Cabernet Sauvignon apresentou maior conteúdo de flavonóides (catequina e quercetina) que Syrah e Touriga Nacional. De maneira geral, os resultados encontrados para os compostos fenólicos nos vinhos brasileiros, quantificados por CLAE, estão de acordo e muitas vezes são superiores aqueles encontrados por outros pesquisadores, sendo que estas diferenças no conteúdo total dos vinhos podem ser atribuídas a origem geográfica, pois o conteúdo destes compostos é dependente dos fatores edafoclimáticos (GOLDBERG et al., 1996; GÓMEZ-ALONSO; GARCÍA-ROMERO; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2007; RASTIJA; SRECNİK; SARIC, 2009).

Tabela 5. Concentração média (mg/L) dos principais compostos fenólicos em vinhos comerciais.

Compostos	Cabernet Sauvignon	Syrah	Touriga Nacional
Catequina	50,42 ± 0,62 ^a	31,27 ± 0,40 ^b	22,34 ± 0,29 ^c
Ácido cafeico	7,16 ± 0,38 ^a	11,76 ± 0,20 ^b	19,88 ± 0,81 ^c
Ácido <i>p</i> -cumárico	1,50 ± 0,05 ^a	3,51 ± 0,09 ^b	5,08 ± 0,12 ^c
Ácido ferrúlico	0,11 ± 0,02 ^a	0,31 ± 0,01 ^b	1,99 ± 0,06 ^c
Quercetina	15,35 ± 0,96 ^a	6,95 ± 0,18 ^b	9,06 ± 0,21 ^c

Média ± desvio padrão. As análises foram realizadas em triplicata. Letras diferentes em mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras.

4 Conclusão

No presente trabalho uma metodologia para determinação simultânea através de cromatografia líquida de alta eficiência, fase reversa, de 5 representativos compostos fenólicos em vinho tinto, foi desenvolvida e validada. O método proposto apresentou as seguintes vantagens: a amostra pode ser diretamente injetada sem consumir tempo na preparação de amostra ou prévio fracionamento; exibiu excelente precisão, exatidão e limites de detecção como também excelente recuperação (80-120 %) para os fenólicos presentes nos vinhos. O método cromatográfico mostrou separação satisfatória dos padrões e sob as mesmas condições a separação dos compostos em amostras reais. Assim, este método pode ser usado para determinar os compostos fenólicos em diferentes amostras de vinho, como também caracterizar e diferenciar estas amostras. Finalmente, os resultados nos permitem sugerir a aplicação deste método no controle de qualidade de laboratórios em indústrias interessadas em conseguir informações sobre os principais compostos fenólicos e caracterizar as amostras de vinho.

Capítulo 3

Vinhos Cabernet Sauvignon produzidos com dois clones, caracterização e evolução durante o envelhecimento em garrafa

Vinhos Cabernet Sauvignon produzidos com dois clones, caracterização e evolução durante o envelhecimento em garrafa

Resumo

Os compostos fenólicos apresentam importante papel na qualidade da uva e do vinho, assim como são responsáveis por exercer efeitos benéficos à saúde, devido sua capacidade antioxidante. Além destes, os ácidos orgânicos também influenciam na qualidade do vinho. Vinhos produzidos com diferentes clones de uma mesma variedade de uva apresentam diferenças significativas em relação a sua composição química. A composição altera continuamente durante todo o período de estocagem do vinho. O objetivo deste trabalho foi caracterizar e diferenciar vinhos Cabernet Sauvignon, safra 2008, produzidos com dois clones quanto a composição química e avaliar a evolução dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante durante seu envelhecimento em garrafa. As uvas foram procedentes de um vinhedo localizado na região de São Joaquim-SC, analisadas no período da colheita quanto as características físico-químicas, polifenóis e parâmetros de cor. Todos os vinhos foram produzidos sob iguais condições de microvinificação e analisados quanto a composição fenólica, utilizando espectrofotometria e cromatografia líquida e atividade antioxidante através de três métodos (DPPH, ABTS e FRAP). Os vinhos foram avaliados durante 11 meses de envelhecimento em garrafa em relação a composição química e atividade antioxidante. Foram observados haver diferença significativa entre os clones 685 e 169 tanto para as uvas Cabernet Sauvignon como também para os respectivos vinhos, em relação as famílias de compostos fenólicos determinadas neste estudo. As uvas e os vinhos apresentaram características particulares de acordo com o clone, no clone 169 predominou o teor de polifenóis enquanto o clone 685 o conteúdo de antocianinas e parâmetros de cor. Os vinhos apresentaram alta atividade antioxidante, para os três métodos avaliados, o vinho produzido com o clone 169 foi o que demonstrou maiores valores. Dentre os três métodos os maiores resultados foram obtidos com o método ABTS. Análise de Componentes Principais demonstrou a correlação de cada clone com as variáveis analisadas e juntamente com a Análise de Cluster foi observada separação e agrupamento das amostras de vinho de acordo com o clone. Estes resultados levam a conclusão que os principais compostos fenólicos determinados neste trabalho podem ser utilizados como ferramenta para a classificação e discriminação dos diferentes clones. Durante o tempo de guarda dos vinhos, a evolução dos compostos fenólicos foi similar entre os vinhos produzidos com os dois clones, evidenciando que as alterações ocorridas foram unicamente devido ao tempo de guarda, pois as amostras de vinho foram submetidas as mesmas condições ambientais.

Palavras-chave: vinhos Cabernet Sauvignon, clones, atividade antioxidante, compostos fenólicos, tempo de guarda.

1 Introdução

Os compostos fenólicos apresentam importante papel na qualidade da uva e do vinho, pois contribuem para as propriedades sensoriais como cor, adstringência e amargor (BOULTON, 2001). Os polifenóis presentes no vinho podem ser classificados em dois grupos: compostos não-flavonóides (ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos e seus derivados e os estilbenos) que participam das reações de oxidação que conduzem ao acastanhamento dos mostos e vinhos (SINGLETON, 1987; CRAVERO; DI STEFANO, 1990) e compostos flavonóides (antocianinas, flavonois e flavanois) que contribuem para a cor dos vinhos, sendo que as antocianinas são os principais pigmentos dos vinhos tintos (MATEUS et al., 2003). Os ácidos fenólicos e os flavonois são os principais responsáveis pela adstringência e amargor dos vinhos, enquanto os ácidos hidroxicinâmicos e flavanois, juntamente com flavonois atuam como copigmentos das antocianinas participando da estabilização da cor dos vinhos tintos (RIBICHAUD; NOBLE, 1990; EIRO; HEINONEN, 2002). Além destas funções, a estrutura química dos polifenóis, principalmente flavonóides e estilbenos (resveratrol), torna-os aptos para agir como antioxidante, capturando e neutralizando radicais livres. Assim, como consequência, o conteúdo fenólico dos vinhos é extensivamente estudado, principalmente por proporcionar efeitos benéficos a saúde, que além da atividade antioxidante, também apresentam efeitos antiinflamatórios, anticarcinogênicos, entre outros (FRANKEL et al., 1998; BURNS et al., 2000; SIGLETARY et al., 2003, CIMINO et al., 2007).

Além dos compostos fenólicos, os ácidos orgânicos estão entre os compostos que representam uma fração significativa no vinho. Estes compostos no vinho são originários tanto da uva (ácidos tartárico, málico e cítrico), como também são produzidos durante o processo de fermentação (ácidos láctico, acético e succínico). Dentre estes, os principais ácidos presentes nos vinhos são os ácidos tartárico, málico e cítrico (MATO; SUÁREZ-LUQUE; HUIDOBRO, 2007). A concentração e a natureza dos ácidos orgânicos em uvas e vinhos influenciam não somente no *flavour*, mas também na estabilidade química e no pH, e consequentemente interferem na qualidade do vinho (ESTEVEES et al., 2004). De acordo com Silva et al. (2004) os ácidos orgânicos também apresentam significativa atividade antioxidante.

Muitos fatores influenciam na composição química do vinho, tais como a variedade da uva, o grau de maturação da uva no período da colheita, as condições edafoclimáticas, assim como as práticas culturais e tecnológicas (MAZZA, et al. 1999; PÉREZ-MAGARIÑO; GONZÁLEZ-SAN JOSE, 2004), interferindo na qualidade final do vinho. Além disto, estudos têm demonstrado que diferentes clones de uma mesma variedade de uva também apresentam diferenças significativas em relação a sua composição química, o qual foi comprovado que determinados clones apresentam a capacidade de produzir vinhos com distintas características de cor, perfil aromático e conteúdo fenólico (GÓMEZ-PLAZA; GIL-MUÑOZ; MARTÍNEZ-CUTILLAS, 2000; ZAMUZ; MARTÍNEZ; VILANOVA, 2007; BOTELHO; MENDES-FAIA; CLÍMACO, 2008). A seleção clonal tem permitido expressivos ganhos na viticultura, por possibilitar a exploração de uma importante fonte de variabilidade genética, acarretando em características particulares para as uvas e vinhos.

A estabilidade do vinho durante a estocagem é conhecida ser dependente da sua composição química. No entanto, a composição dos vinhos altera continuamente durante o período de estocagem principalmente devido a fatores como temperatura, luminosidade, posição da garrafa, conteúdo de oxigênio e o tempo de estocagem. Estas alterações apresentam intensidades variadas e complexas, podendo interferir no aroma, na cor, assim como na composição fenólica do vinho (RECAMALES et al., 2006; HERNANZ et al., 2009). Além disto, a concentração dos compostos fenólicos individuais, copigmentos, acetaldeído e metabólitos das leveduras, como também o pH, temperatura, a presença de oxigênio e dióxido de enxofre, entre outros, são fatores que interferem no progresso das reações químicas envolvendo os polifenóis durante o envelhecimento do vinho (SOMERS; EVANS, 1977; ROMERO; BAKKER, 2000; ÁLVAREZ et al., 2006). A maior parte dos compostos fenólicos são altamente instáveis e são rapidamente transformados em vários pigmentos, sendo que diferentes tipos de reações ocorrem durante o processo de envelhecimento dos vinhos, principalmente as reações de oxidação, polimerização e copigmentação (MONAGAS; GÓMEZ-CORDOVÉS; BARTOLOMÉ, 2006; ALCALDE-EON et al., 2006).

Informações conflitantes em relação ao efeito do envelhecimento na atividade antioxidante dos vinhos tintos são publicadas na literatura. Autores afirmam que durante a estocagem, as reações de oxidação envolvendo os compostos fenólicos deveriam, presumivelmente, conduzir a alterações a nível da capacidade antioxidante do vinho,

como uma consequência das alterações do equilíbrio redox (LANDRAULT et al., 2001; De BEER et al., 2005). No entanto há pesquisas indicando não haver nenhuma alteração significativa no poder antioxidante durante o tempo de guarda (ROGINSKY et al., 2006; RIVERO-PÉREZ et al., 2008).

Muitos estudos têm sido conduzidos para estabelecer a evolução das diferentes famílias de compostos fenólicos durante o envelhecimento dos vinhos, tanto em barrica quanto na garrafa. No entanto, são raros os estudos dispostos na literatura a respeito do comportamento destes compostos durante o tempo de guarda de vinhos produzidos com diferentes clones de uma variedade de uva, como a Cabernet Sauvignon. O objetivo deste trabalho foi caracterizar e diferenciar vinhos Cabernet Sauvignon produzidos com dois clones quanto a composição química e avaliar a evolução dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante durante seu envelhecimento em garrafa.

2 Material e Métodos

2.1 Área experimental e amostras de uva

O experimento foi realizado em um vinhedo situado na região de São Joaquim no Estado de Santa Catarina, Brasil (latitude 28° 15', longitude 49° 50' e altitude de 1260 m). Neste vinhedo dois locais foram demarcados para o presente experimento designados de local A e B, com distância média entre eles de 300 metros e com altitudes semelhantes. Em cada local foram avaliados 2 clones da uva Cabernet Sauvignon, 685 e 169, safra 2008, designados como: A-685; A-169; B-685 e B-169. As plantas apresentavam similaridade na idade (3 anos), conduzidas sob mesmo porta-enxerto Paulsen 1103 (*V. berlandierli* Planch x *V. rupestris* Scheele) e sistema de condução Manjedoura (V-System), com espaçamento entre fileiras x plantas de 3,0 x 1,5 m. Foram previamente marcadas 12 plantas, aleatoriamente, em 4 fileiras centrais, para cada local.

De acordo com o Sistema de Classificação Multicritério (TONIETTO; CARBONNEAU, 2004) o clima da região de São Joaquim-SC é classificado como 'Frio, de noites Frias e Úmido'. Esta classificação é baseada no índice Heliotérmico de Huglin (IH), de aproximadamente 1500; índice de Frio Noturno (IF): 12,1 °C

(desenvolvido como um indicador da temperatura noturna durante a maturação); e Índice de Seca (IS) de aproximadamente 200 mm, correspondente ao balanço de água no solo.

O solo desta região é classificado como Inceptisol, localizado em solo basáltico, material de origem extrusiva e rochas vulcânicas. Caracteriza-se por ser bem drenado, solo de consistência macia e friável, apresenta alta capacidade de retenção de água. A coloração varia de ‘cinza a cinza-escuro’. Os solos apresentam boa fertilidade, sendo que estas características tornam possível o cultivo de variedade *Vitis vinifera* em São Joaquim-SC (FALCÃO et al., 2008a).

2.2 Microvinificação

Todos os vinhos foram produzidos sob iguais condições de microvinificação realizada na EPAGRI (Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina), em Videira, SC, Brasil. Foi preparado para cada amostra duas replicatas da fermentação dos vinhos. As uvas foram separadas dos cachos e mantidas em um tanque de aço inoxidável com capacidade de 20 L. O período de maceração foi de 10 dias, com duas remontagens diárias a 22 °C. O mosto foi separado das partes sólidas e transferido para um tanque de aço inoxidável com capacidade de 13 L. Antes de iniciar a fermentação alcoólica, foram adicionados no mosto um agente sulfitante comercial (20 g/100 Kg de mosto, correspondendo a 10 mg/L de SO₂ livre) (Noxitan, Pascal Biotech, Paris), cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (20 g/100 Kg) (Fermol Rouge, Pascal Biotech) e enzimas comerciais com atividade pectinolítica (2-4 g/hL) (Pectinex SPL/Ultra, Pascal Biotech). O consumo de ácido málico pelas bactérias lácticas ocorreu espontaneamente dentro de 20-25 dias. Após a fermentação alcoólica os vinhos foram mantidos a -4°C durante 10 dias, foi adicionado Noxitan (em média 35 mg/L de SO₂ livre) e então, eles foram engarrafados.

2.3 Reagentes químicos

Padrões de resveratrol, catequina, ácido gálico, ácido *p*-cumárico e morin (2',3,4',5,7-penthydroxyflavone) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), quercetina, ácido ferrúlico e ácido cafeico foram obtidos da Fluka (Steinheim,

Germany). Padrões das antocianinas (malvidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-glicosídeo e peonidina-3-glicosídeo) foram obtidos da Extrassíntese (Genay, França). Os ácidos tartárico, málico, láctico, cítrico e succínico foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Todos os reagentes apresentaram pureza maior que 95%. O reagente Folin-Ciocalteu foi obtido da Fluka (Steinheim, Germany). Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromato-2-ácido carboxílico, 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) e 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Acetonitrila e metanol de grau HPLC foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany), acetato de etila, etanol, ácido acético e clorídrico e outros reagentes apresentavam grau analítico. Foi utilizado água de qualidade Milli-Q obtida através do sistema de purificação Millipore (Bedford, MA). Todas as soluções foram filtradas em membranas com 0,45 μm de diâmetro (Millipore) e degaseificada antes do uso.

2.4 Análise das uvas

As uvas, safra 2008, foram coletadas no período da colheita e imediatamente acondicionadas em caixas térmicas, transportadas para o laboratório de Bioquímica de Alimentos, do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Santa Catarina. Foram determinadas as componentes de rendimento como: peso de cachos e bagas e número de bagas por cada cacho. Para as análises físico-químicas: pH, acidez total (g de ácido tartárico por 100 mL de mosto), sólido solúvel total ($^{\circ}\text{Brix}$) e índice de maturação (acidez total / $^{\circ}\text{Brix}$) (OIV, 1990), foi preparado um mosto das uvas, obtido a partir do esmagamento, utilizando 30 bagas em triplicata (90 bagas).

Para as análises de antocianinas monoméricas totais (AMT), polifenóis totais (PT) e medida da cor, foi preparado um extrato metanólico das uvas, utilizando 30 bagas de uvas em triplicata (90 bagas) previamente lavadas, sendo as cascas separadas da polpa, pesadas para a preparação do extrato. O extrato foi preparado pela maceração das cascas durante 24 horas sob abrigo da luz a $4,0 \pm 1^{\circ}\text{C}$ utilizando como solvente extrator metanol/HCl 1% (LEES; FRANCIS, 1972). A quantificação das AMT foi realizada através do método de pH diferencial utilizando $\epsilon = 28000$ e $\text{MM} = 529$, de acordo com Giusti e Wrolstad (2001) e expresso em mg de malvidina 3-glicosídeo/100

g de casca fresca. O conteúdo de PT foi determinado através do método de Folin-Ciocalteu, com leituras de absorvância em 760 nm e expresso em mg ácido gálico/100 g de casca fresca (SINGLETON; ROSSI, 1965). A intensidade da cor (IC) foi determinada por espectrofotometria UV-VIS com leituras de absorvância em 420, 520 e 620 nm (GLORIES, 1984).

2.5 Análise dos vinhos

Os vinhos, safra 2008, produzidos com os clones 169 e 685 da variedade Cabernet Sauvignon, locais A e B, foram analisados entre 6 e 8 meses após a microvinificação. Todas as análises foram realizadas em triplicata com três repetições para cada amostra de vinho.

2.5.1 Análises Físico-químicas

As análises físico-químicas realizadas foram pH (pH meter 220 MP Metler-Toledo), acidez total (g/L ácido tartárico), acidez volátil (g/L ácido acético) e teor alcoólico (ebuliometria) de acordo com a OIV (1990).

2.5.2 Determinação do conteúdo total das famílias de polifenóis

Os vinhos foram analisados por espectrofotômetro UV-VIS (Hitachi U 2010, CA, USA) quanto aos polifenóis totais (PT) (mg/L ácido gálico), polifenóis não-polimerizados (PNP) (mg/L catequina), polifenóis polimerizados (PP) (mg/L catequina), orto-difenóis (OD) (mg/L catequina), éster tartárico (ET) (mg/L ácido cafeico) e flavonol (FLV) (mg/L quercetina). PT foram determinados utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965); PNP foi realizado através de reação com a vanilina e o PP através da diferença entre o teor de polifenóis totais expresso em catequina dos polifenóis não-polimerizados (PARONETTO, 1977); OD foram determinados utilizando o reativo de Arnow (FLANZY; AUBERT, 1969); éster tartárico e flavonol foram determinados de acordo com Glories (1978).

2.5.3 Parâmetros de cor

A cor foi determinada utilizando dois métodos: medida da absorvância espectrofotométrica do vinho em 420, 520 e 620 nm (GLORIES, 1984), realizada diretamente em cubeta de 1 mm, utilizada para determinar a intensidade da cor (IC): $A_{420} + A_{520} + A_{620}$; e a tonalidade da cor (TC): A_{420}/A_{520} .

A cor também foi determinada utilizando os parâmetros do sistema CIElab obtidos por colorimetria (Minolta Chromo Meter CR-400). Os parâmetros observados foram as coordenadas a^* (índice cromático vermelho/verde), b^* (índice cromático amarelo/azul), L^* (luminosidade). C^* (cromaticidade) foi calculado através da seguinte equação: $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$.

O conteúdo de antocianinas monoméricas, poliméricas e copigmentadas nas amostras de vinhos foram determinados de acordo com Levengood e Boulton (2004). O método consiste nos efeitos colorimétricos do SO_2 e acetaldeído sob as formas das antocianinas. Neste processo, em uma amostra de 2 mL de vinho foi adicionado 20 μ L de acetaldeído 20 % (v/v) e submetida a agitação e posteriormente repouso por 45 minutos no escuro (A^{acet}). Uma segunda amostra de 2 mL de vinho foi adicionada de 160 μ L de solução de SO_2 10 % (m/v) homogeneizada e deixado em repouso durante 10 minutos (A^{SO_2}). A absorvância para cada amostra foi medida em 520 nm utilizando cubeta de 1mm. Foi determinada a absorvância direta da amostra de vinho em 520 nm (A^{vinho}). Para o cálculo foram utilizadas as equações abaixo, e as absorvâncias corrigindo para cubetas de 1 cm:

$$\text{Antocianinas copigmentadas} = A^{acet} - A^{vinho} \quad (1)$$

$$\text{Antocianinas monoméricas} = A^{vinho} - A^{SO_2} \quad (2)$$

$$\text{Antocianinas poliméricas} = A^{acet} - A^{vinho} \quad (3)$$

O teor de antocianinas monoméricas totais (AMT) foi determinado através do método do pH diferencial (GIUSTI; WROLSTAD, 2001), utilizando-se dois sistemas: tampão cloreto de potássio (pH 1,0) e tampão acetato de sódio (pH 4,5). Os valores de absorvância foram medidos em espectrofotômetro de absorção UV-Visível no

comprimento de onda de máxima absorção e a 700 nm. A concentração foi expressa em malvidina-3-glicosídeo (massa molecular de 529 e absorvidade molar de 28000).

2.5.4 Determinação Cromatográfica

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência, Shimadzu (Kyoto, Japan), equipado com desgaseificador (DGU-14A), bomba quaternária (LC-10AT), detector UV-vis (SPD-10AV) e injetor manual de 20 μ L, com software CLASS-VP (ver 6.1). A coluna (4,6 mm x 250 mm, 5 μ m tamanho de partícula) e pré-coluna (4,6 mm x 12,5 mm) C18 fase reversa (Hichrom, Europe).

Para as análises de polifenóis, resveratrol e antocianinas, as amostras de vinho foram filtradas em filtro de membrana PTFE modificado com poro de 0,45 μ m e 13 mm de diâmetro (Millipore) e injetadas diretamente no cromatógrafo líquido. Para análise dos ácidos orgânicos as amostras de vinho foram filtradas em membrana 0,45 μ m PTFE modificada (Millipore) e diluídas em água ultra-pura (Milli-Q) (1:10) e posteriormente injetadas no sistema cromatográfico.

A identificação de cada composto foi realizada pela comparação do tempo de retenção e espectro dos picos UV-vis das amostras de vinho com aqueles obtidos pela injeção dos padrões. Para todas as análises cromatográficas foram determinados os seguintes parâmetros analíticos: coeficiente de determinação (R^2), os limites de determinação (LOD) e quantificação (LOQ) e a recuperação (%) (ICH, 1994).

Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos: tartárico, málico, láctico, cítrico e succínico foram diluídos separadamente em água ultra-pura (Milli-Q) (10 g/L) e a solução de trabalho foi obtida com a mistura de todos os padrões (5 g/L). As curvas foram construídas por padronização externa.

A metodologia utilizada foi de acordo com Escobal et al. (1998) com modificações. A separação cromatográfica foi realizada através de eluição isocrática, com detecção em 212 nm. A fase móvel consistiu de água ultra pura (Milli-Q) acidificada com ácido fosfórico (1,2% m/v) com pH de 2,4. O fluxo do eluente foi de 0,7 mL/min, e o tempo da corrida cromatográfica foi de 40 minutos.

Compostos fenólicos

Todas as soluções padrões dos compostos fenólicos foram preparadas individualmente em metanol (1000 mg/L) e armazenadas sob proteção da luz a -18 °C. Foram preparadas soluções estoque com concentração de 150 mg/L em vinho sintético (solução hidroalcoólica: 5 g/L de ácido tartárico, etanol 12% v/v e pH 3,2). As soluções de trabalho para a construção das curvas de calibração foram preparadas em vinho sintético contendo a mistura dos padrões de polifenóis, com exceção do ácido gálico, preparado individualmente. Solução de morin foi preparada em vinho sintético (16,2 mg/L) e foi utilizada como padrão interno e adicionada na solução de calibração dos compostos fenólicos e na amostra de vinho.

A separação cromatográfica dos compostos fenólicos foi realizada de acordo com método desenvolvido e validado no laboratório de Bioquímica de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (Capítulo 1). Foi utilizado como fase móvel água:ácido acético com pH 3,2 como solvente A e 20 % do solvente A com 80 % de acetonitrila como solvente B. Os compostos fenólicos foram eluídos com três estágios de gradiente linear: 0-30 % solvente B por 35 minutos, de 30 a 50 % de B por cinco minutos, 50 a 100 % de B durante 15 minutos, e retornando em 0 % de solvente B durante 15 minutos. O fluxo utilizado foi 1,2 mL/min, e a temperatura da sala foi mantida em 20 °C ± 1.

Os compostos foram quantificados por padronização interna utilizando solução de morin (16,2 mg/L), conforme descrito no Capítulo 1, com exceção do ácido gálico que foi determinado por padronização externa.

Trans-resveratrol

A solução estoque de trans-resveratrol foi preparada em metanol (100 mg/L) e a curva de calibração foi construída por padronização externa. Para análise foi seguida metodologia proposta por Souto et al. (2001), com modificações. O método para eluição utilizado foi isocrático, com fase móvel composta de água ultra pura (Milli-Q) e acetonitrila (75:25). O pH da solução foi ajustado para 3 com a adição de ácido fosfórico. O fluxo da fase móvel foi de 1,2 mL/min, com detecção em 306 nm.

Antocianinas livres

Soluções estoque de malvidina, delphinidina e peonidina-3-glicosídeo foram preparadas individualmente em metanol (150 mg/L) e as curvas de calibração foram construídas por padronização externa.

A análise das antocianinas foi realizada de acordo com método descrito García-Falcón et al. (2007) com modificações. Foi utilizado como fase móvel água ultra-pura (Milli-Q) acidificada com 5 % v/v de ácido fórmico (solvente A) e metanol acidificado com ácido fórmico (solvente B). O gradiente de eluição utilizado foi: 20-40 % de solvente B de 0-40 min, 40-100 % de B durante 10 min, 100 % de B foi mantido por 5 min. A coluna foi preparada para re-equilibrar com o solvente do tempo zero durante 5 min, antes da injeção da próxima amostra. O fluxo da fase móvel foi de 0,8 mL/min, com detecção em 520 nm.

2.5.5 Atividade antioxidante

A Atividade antioxidante dos vinhos foi avaliada através de 3 métodos *in vitro*: DPPH, ABTS e FRAP, e os resultados foram expressos em atividade antioxidante equivalente a trolox (mM TEAC por L de vinho).

A atividade do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) foi medida através da extinção do máximo da absorção em 517 nm (KIM; GUO; PACKER, 2002). O método consiste na incubação da amostra de vinho com solução metanólica do radical DPPH (1 mM) durante 30 minutos.

O método ABTS (ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico)) foi realizado conforme descrito por Re et al. (1999). O radical ABTS foi adicionado na amostra de vinho e foi realizada leitura espectrofotométrica em 754 nm no tempo inicial (tempo zero) e após 6 minutos de reação.

O método FRAP foi realizado de acordo com Benzie e Strain (1996) com algumas modificações descritas por Arnous, Makris e Kefalas (2002). Uma alíquota da amostra foi adicionada em solução de cloreto férrico (3 mM) e deixado em banho-maria durante 30 minutos. Posteriormente foi adicionado a solução de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina) e após 10 minutos foi realizado a leitura da absorbância em 620 nm.

2.6 Avaliação do tempo de guarda dos vinhos em garrafa

O estudo da evolução dos principais compostos fenólicos individuais, polifenóis totais, polimerizados e não-polimerizados, orto-difenóis, éster tartárico, flavonol, antocianinas totais e suas frações, e atividade antioxidante, foram realizados com as amostras dos vinhos Cabernet Sauvignon, clones 685 e 169 (local A) submetidas sob as mesmas condições após o engarrafamento. O período de avaliação durante o tempo de guarda iniciou após 6 meses da elaboração dos vinhos e foi realizado durante 11 meses de estocagem.

2.7 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como valor médio \pm desvio padrão. Foi utilizado o programa Statistica v.6,0 (2001) (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) para análise de variância (ANOVA), teste HSD Tukey ($p < 0,05$), análise de correlação, Análise de Componente Principais e Análise de Cluster.

3 Resultados e Discussão

3.1 Análises clássicas das Uvas e dos Vinhos

O monitoramento dos parâmetros físicos e químicos nas uvas no período da colheita mostra-se muito importante para obter vinhos de boa qualidade. Algumas características de interesse dos dois clones (169 e 685) da uva Cabernet Sauvignon e do respectivo vinho estão representadas na Tabela 1. Pode-se observar evidente diferença entre os clones, sendo que o clone 685 apresentou resultados superiores em relação ao peso dos cachos e das bagas, que o clone 169. A dimensão da baga depende, dentre outros fatores, das características genéticas da cultivar (JACKSON, 2000), o que pode ter induzido as diferenças entre os clones. Os valores encontrados para o pH e acidez total estão de acordo com aqueles recomendados para elaboração de vinhos de boa qualidade, pois segundo Rizzon e Miele (2003) pH inferior a 3,3 pode interferir

negativamente, afetando a estabilidade do vinho. O índice de maturação (IM), que representa o balanço entre açúcar/acidez, tem como função conferir ao vinho um equilíbrio gustativo. Os valores de IM encontrados par aos dois clones estão de acordo com aqueles estipulado pela literatura (AMERINE et al., 1980; RIZZON; MIELE, 2003).

Tabela 1. Parâmetros enológicos clássicos determinados nas uvas e nos vinhos jovens dos clones da variedade Caberent Sauvignon, safra 2008, local A e B.

Parâmetros	A-685	A-169	B-685	B-169
<i>Uvas</i>				
Peso do cacho (g)*	75,02 ^a	61,48 ^b	75,35 ^a	62,94 ^c
n° bagas / cacho*	73 ^a	68 ^b	71 ^c	60 ^d
peso médio de 100 bagas (g)	212,1 ^a	124,2 ^b	218,5 ^c	181,3 ^d
pH	3,69 ^a	3,78 ^b	3,75 ^c	3,9 ^d
sólidos solúveis totais (°Brix)	22,5 ^a	22 ^b	22 ^b	23,5 ^c
acidez total (g ácido tartárico/100 mL)	0,63 ^a	0,64 ^b	0,61 ^c	0,65 ^d
índice de maturação (°Brix/AT)	35,71 ^a	34,37 ^b	36,06 ^c	36,15 ^d
polifenóis totais (mg/100 g de casca)	815,07 ^a	1039,52 ^b	926,19 ^c	1120,08 ^d
antocianinas totais (mg/100 g de casca)	501,41 ^a	435,43 ^b	622,32 ^c	455,42 ^d
intensidade da cor**	16,23 ^a	12,66 ^b	21,29 ^c	18,11 ^d
<i>Vinhos</i>				
pH	3,75 ^a	3,81 ^b	3,60 ^c	3,80 ^b
acidez total (g de ácido tartárico/L vinho)	4,62 ^a	5,21 ^b	5,49 ^c	4,92 ^d
acidez volátil (g de ácido acético/L vinho)	0,32 ^{acd}	0,44 ^b	0,30 ^{ac}	0,33 ^{ad}
teor alcoólico (%)	11,5 ^a	11,8 ^b	11,0 ^c	11,1 ^c

* valor médio de n=10

** unidade de absorvância

A determinação do teor de polifenóis e antocianinas nas uvas são de grande importância, pois refletem na qualidade dos vinhos. Em relação a concentração destes compostos para as uvas analisadas no presente trabalho, os valores estão de acordo e/ou são superiores aos encontrados na literatura para a variedade Cabernet Sauvignon (RIZZON; MIELLE, 2002; GONZÁLEZ-NEVES et al., 2004) o que indica uma boa maturação fenólica destas uvas. O clone 685 apresentou maiores valores para o teor de antocianinas enquanto que o clone 169 maior concentração de polifenóis totais. Estes resultados estão de acordo com outros pesquisadores que também encontraram diferenças significativas entre clones de uma mesma variedade de uva considerando as análises clássicas da uva (ZAMUZ; MARTÍNEZ; VILANOVA, 2007; FERRANDINO; GUIDONE, 2010).

A Figura 1 demonstra as curvas de fermentação alcoólica para os clones. Todas as amostras de vinho iniciaram a fermentação ao mesmo tempo e a densidade final obtida foi igual para todos os vinhos (0,995), sendo que o vinho A-169 atingiu a densidade final antes das outras amostras. Pode-se observar que o comportamento dos clones durante o processo de vinificação foi similar, com exceção da amostra B-685 que apresentou fermentação mais lenta. Zamuz, Martínez e Vilanova (2007) ao avaliar vinhos produzidos com 8 clones da variedade Cabernet Sauvignon observaram haver diferenças nas curvas de fermentação para os vinhos, no entanto os clones 169 e 685 não foram avaliados por estes autores.

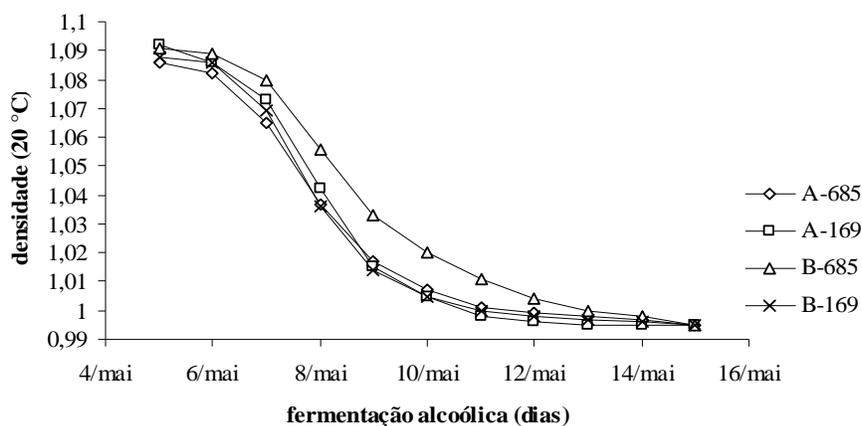


Figura 1. Curvas de fermentação para os clones da variedade Cabernet Sauvignon, local A e B, safra 2008.

3.2 Ácidos orgânicos

A Tabela 2 apresenta as características analíticas do método cromatográfico, o qual se mostra adequado para a quantificação destes compostos, pois os valores de R^2 , para todos os compostos, foram maiores que 0,999 e os valores de recuperação variaram de 93 a 98 % indicando boa eficiência para o método, valores que estão de acordo com dados da literatura para a quantificação de ácidos orgânicos (MATO; SUÁREZ-LUQUE; HUIDOBRO, 2007; PERES et al., 2009). Na Figura 2 um cromatograma típico dos ácidos orgânicos para identificação em amostras de vinho.

Tabela 2. Características analíticas do método para quantificação de ácidos orgânicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Compostos	Concentração (g/L)	R^2	LOD (g/L)	LOQ (g/L)	Rec (%)
Ácido tartárico	0,1 – 4,0	0,9998	0,0224	0,0748	98
Ácido málico	0,05 – 1,0	0,9993	0,0373	0,1244	94
Ácido láctico	0,1 – 3,0	0,9999	0,0239	0,0797	97
Ácido cítrico	0,03 – 1,0	0,9998	0,0093	0,0308	95
Ácido succínico	0,03 – 2,0	0,9991	0,0255	0,0852	93

LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; Rec: recuperação

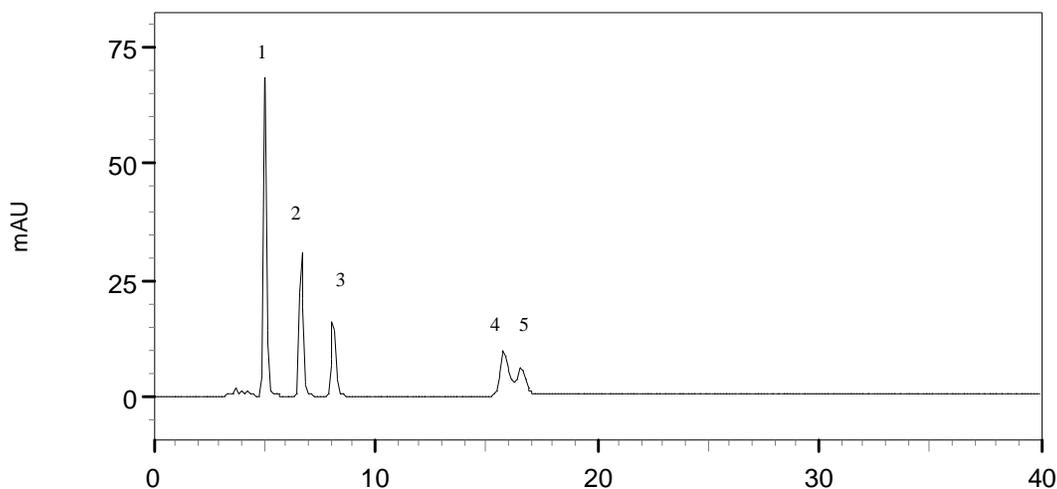


Figura 2. Cromatograma típico de solução padrão dos ácidos orgânicos. (1) ácido tartárico; (2) ácido málico; (3) ácido láctico; (4) ácido cítrico; (5) ácido succínico.

Os resultados do teor de ácidos orgânicos nos vinhos estão representados na Tabela 3, sendo que os valores obtidos para os vinhos Cabernet Sauvignon estão de acordo com aqueles descritos na literatura (MATO; SUÁREZ-LUQUE; HUIDOBRO, 2007; ZHENG et al., 2009), no entanto deve-se considerar que o teor destes compostos no vinho depende do tipo de uva, do local de produção, assim como das técnicas de vinificação utilizadas. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram encontradas entre os clones. O ácido tartárico foi o ácido característico para os vinhos produzidos com os dois clones, sendo que este ácido representa cerca de 50 % do conteúdo total dos ácidos orgânicos do vinho. Não foi detectada a presença de ácido málico, o qual indica a ocorrência completa da fermentação malolática, havendo a transformação deste em ácido lático. O ácido cítrico também não foi detectado nestes vinhos, indicando que não houve adição deste composto para ajustar a acidez do vinho assim como este pode ter sido consumido durante a fermentação malolática. Estudos realizados por Peres et al. (2009) também não detectaram a presença de ácido cítrico em vinhos brasileiro, dentre eles vinhos da variedade Cabernet Sauvignon.

Tabela 3. Concentração de ácidos orgânicos (g/L) dos vinhos Cabernet Sauvignon, clones 169 e 685, locais A e B, safra 2008.

	A-685	A-169	B-685	B-169
Ácido tartárico	3,04 ^a ± 0,01	3,29 ^b ± 0,44	3,54 ^c ± 0,02	3,64 ^d ± 0,01
Ácido málico	nd	nd	nd	nd
Ácido lático	1,90 ^a ± 0,01	2,01 ^b ± 0,03	1,93 ^c ± 0,01	1,97 ^d ± 0,02
Ácido cítrico	nd	nd	nd	nd
Ácido succínico	0,78 ^a ± 0,01	0,88 ^b ± 0,00	0,79 ^a ± 0,01	0,69 ^c ± 0,01

nd: não detectável. Valores médios ± desvio padrão. Letras diferentes em mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras.

3.3 Determinação do conteúdo total das famílias de polifenóis e parâmetros de Cor

O conteúdo total de polifenóis das amostras de vinho foi determinado por métodos espectrofotométricos (Tabela 4) e pode-se observar diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras de vinho produzidas com os clones da uva Cabernet Sauvignon.

Tabela 4. Concentração dos compostos fenólicos totais e parâmetros de cor dos vinhos jovens de Cabernet Sauvignon, clone 169 e 685, locais A e B.

	A-685	A-169	B-685	B-169
PT	2114,9 ^a ± 10,2	2431,6 ^b ± 29,6	2205,7 ^c ± 27,9	2569,8 ^d ± 32,4
PP	1293,6 ^a ± 24,8	1458,4 ^b ± 9,3	1319,5 ^c ± 17,9	1516,6 ^d ± 21,3
PNP	878,7 ^a ± 19,4	834,3 ^b ± 6,9	736,1 ^c ± 11,2	753,1 ^d ± 17,1
OD	370,78 ^a ± 5,69	451,33 ^b ± 2,36	380,09 ^c ± 3,21	445,22 ^d ± 1,52
ET	262,55 ^a ± 0,25	232,62 ^b ± 1,41	239,63 ^c ± 0,80	311,14 ^d ± 1,19
FLV	240,53 ^a ± 0,41	205,34 ^b ± 0,56	200,35 ^c ± 0,81	268,05 ^d ± 0,75
AMT	185,22 ^a ± 3,72	164,08 ^b ± 3,26	209,33 ^c ± 1,69	167,67 ^d ± 2,59
IC^y	12,03 ^a ± 0,02	10,89 ^b ± 0,01	12,73 ^c ± 0,01	11,72 ^d ± 0,02
TC^y	0,73 ^a ± 0,01	0,80 ^b ± 0,01	0,63 ^c ± 0,01	0,78 ^b ± 0,01
AM^y	2,50 ^a ± 0,09	1,84 ^b ± 0,04	3,05 ^c ± 0,06	2,20 ^d ± 0,10
AP^y	2,27 ^a ± 0,10	2,23 ^b ± 0,08	2,35 ^c ± 0,02	2,16 ^d ± 0,01
AC^y	1,69 ^a ± 0,03	1,23 ^b ± 0,05	1,50 ^c ± 0,10	1,22 ^b ± 0,20
a*	1,66 ^a ± 0,05	1,41 ^b ± 0,03	2,44 ^c ± 0,02	1,37 ^d ± 0,04
b*	0,11 ^a ± 0,01	0,11 ^a ± 0,01	0,22 ^c ± 0,02	0,13 ^b ± 0,01
L*	18,85 ^a ± 0,04	19,73 ^b ± 0,04	18,67 ^c ± 0,08	19,95 ^d ± 0,05
C*	1,66 ^a ± 0,02	1,42 ^b ± 0,02	2,45 ^c ± 0,04	2,3 ^c ± 0,03

^yexpresso em índice (unidades de absorvância).

Valores médios ± desvio padrão. Letras diferentes em mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes clones em mesmo vinhedo.

PT: polifenóis totais (mg/L de ácido gálico); PP: polifenóis polimerizados (mg/L de catequina); PNP: polifenóis não-polimerizado (mg/L de catequina); OD: ortodifenóis (mg/L de catequina); ET: éster tartárico (mg/L de ácido cafeico); FLV: flavonol (mg/L de quercetina); AMT: antocianinas monoméricas totais (mg/L de malvidina 3-glicosídeo). IC: intensidade da cor; TC: tonalidade da cor; AM: antocianinas monoméricas; AP: antocianinas poliméricas; AC: antocianinas copigmentadas; a*, b*, L*, C*: parâmetros CIElab.

Em relação ao conteúdo de polifenóis, como PT, PP e OD, o clone 169 foi o que apresentou os maiores valores, independente do local de produção. Em contraste, ao avaliar os parâmetros de cor, AMT, AC, AP, AM, foi observado maiores valores para os vinhos produzidos com o clone 685. Esta maior concentração de antocianinas contribuiu para que estes vinhos apresentassem maiores valores de IC, a^* e menores valores de TC e L, o que está de acordo com pesquisas realizadas por Cliff, King e Schlosser (2007).

Os valores encontrados de polifenóis totais para os vinhos Cabernet Sauvignon procedentes do Estado de Santa Catarina, Brasil, estão de acordo, e muitas vezes são considerados elevados quando comparado com vinhos da mesma variedade de uva produzidos em outros países. Pesquisadores encontraram valores de PT para vinhos Cabernet Sauvignon oriundos da China, variando de 1410 a 2488 mg/L (LI et al., 2009). Rastija, Srecnik e Saric (2009) pesquisaram vinhos procedentes da Croácia, dentre eles da variedade Cabernet Sauvignon e encontraram valores de PT em torno de 1400 mg/L. Roginsky et al. (2006) ao avaliar vinhos tintos da Califórnia, encontrou para vinhos Cabernet Sauvignon de diferentes safras, valores médios de 1800 mg/L. O conteúdo de antocianinas monoméricas totais (AMT) para todas as amostras de vinho, também foram superiores aos resultados encontrados por Cliff, King e Schlosser (2007), que obtiveram valores de AMT de 125 mg/L, no entanto, foram menores que aqueles encontrados para os vinhos Cabernet Sauvignon produzidos no Rio Grande do Sul, embora sejam oriundos de safras diferentes (RIZZON; MIELE, 2002).

3.4 Compostos fenólicos flavonóides e não-flavonóides

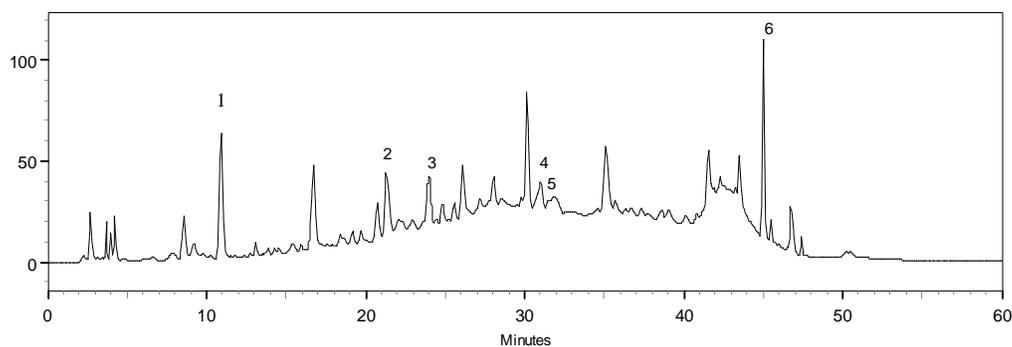
Os principais compostos fenólicos individuais, presentes nos vinhos, foram determinados por cromatografia líquida. O método para quantificação dos ácidos cafeico, ferrúlico e *p*-cumárico, catequina e quercetina foram otimizados e validados de acordo com ICH (1994), e estão apresentados no Capítulo 1 deste trabalho. A Tabela 5 demonstra alguns parâmetros analíticos de validação dos diferentes métodos utilizados para quantificação dos outros compostos fenólicos determinados nas amostras de vinho. A Figura 3 ilustra cromatogramas típicos para os polifenóis determinados neste trabalho para os vinhos Cabernet Sauvignon.

Tabela 5. Parâmetros de validação dos métodos para quantificação dos compostos fenólicos.

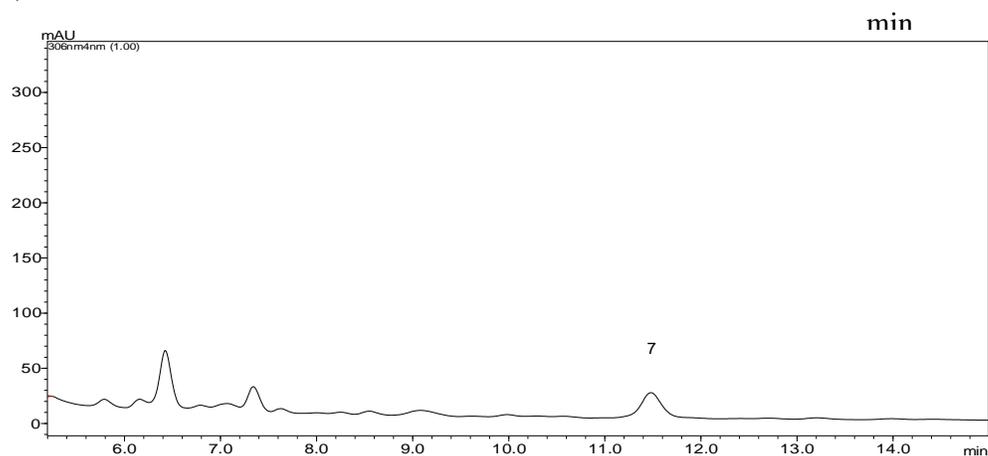
Compostos	Concentração (mg/L)	R ²	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Rec (%)
Malvidina 3-glicosídeo	0,9 – 90,0	0,9999	0,0760	0,2307	94,3
Delfinidina 3-glicosídeo	1,0 – 50,0	0,9978	0,0335	0,1018	92,3
Peonidina 3-glicosídeo	0,2 - 50,0	0,9926	0,0039	0,0119	90,1
Trans-resveratrol	0,1 – 25,0	0,9984	0,0536	0,1063	95,6
Ácido gálico	8,0 – 80,0	0,9981	0,3222	0,9763	88,4

LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; Rec: recuperação.

A)



B)



C)

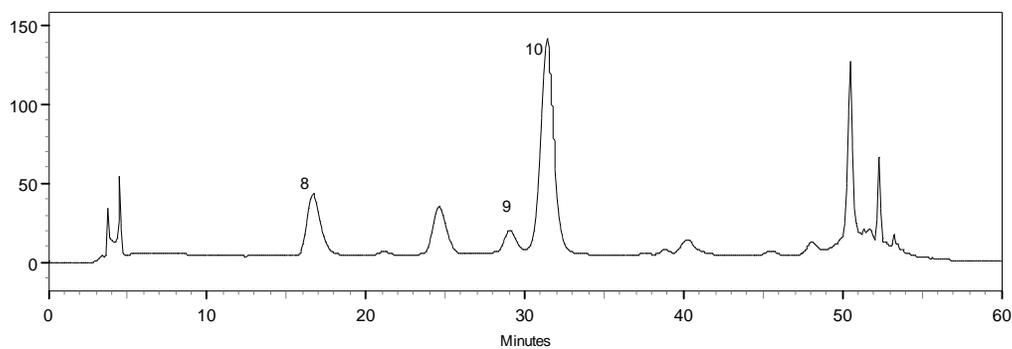


Figura 3. Separação Cromatográfica dos compostos fenólicos presentes nos vinho Cabernet Sauvignon, safra 2008, determinados em comprimentos de onda específicos para cada composto. A) 280 nm; B) 360 nm; C) 520 nm. (1) ácido gálico; (2) catequina; (3) ácido cafeico; (4) ácido *p*-cumárico; (5) ácido ferrúlico; (6) quercetina; (7) *trans*-resveratrol; (8) delphinidina 3-glicosídeo; (9) peonidina 3-glicosídeo; (10) malvidina 3-glicosídeo.

Os compostos fenólicos flavonóides e não-flavonóides determinados neste trabalho (Tabela 6) representam os principais polifenóis presentes em vinho tinto. Sabe-se que estes polifenóis, são muito utilizados para diferenciar vinhos produzidos com diferentes variedades de uva, no entanto, há poucos trabalhos na literatura utilizando os principais compostos fenólicos determinados por CLAE para diferenciar vinhos produzidos com diferentes clones de uma mesma variedade de uva. Neste trabalho estes compostos foram usados para caracterizar e diferenciar vinhos produzidos com os clones 169 e 685 da variedade Cabernet Sauvignon.

Dentre os compostos determinados a catequina e o ácido gálico foram encontrados em maior concentração nos vinhos produzidos com o clone 169, o qual também apresentou maior concentração de todos os compostos fenólicos não-flavonóides avaliados. Os vinhos produzidos com o clone 685 demonstraram maior concentração das antocianinas monoméricas avaliadas, com destaque para a malvidina 3-glicosídeo que foi o composto majoritário nestes vinhos. Os resultados obtidos para as uvas estão de acordo com o observado para os respectivos vinhos, pois o clone 685 apresentou maior teor de antocianinas nas cascas das uvas, e para o clone 169 maior concentração de polifenóis totais, indicando que a característica da uva prevaleceu no respectivo vinho.

Diferentes clones, com diferentes características enológicas são identificados em muitas variedades de uva, mas a literatura apresenta dados que divergem em relação as diferenças na composição química dos clones. Pesquisas realizadas para diferenciar clones cultivados em mesmo local, demonstraram que a composição de antocianinas difere significativamente entre amostras de clones de uma mesma variedade (FORVEILLE; VERCAUTEREN; RUTLEDGE, 1996) o que está de acordo com os resultados obtidos no presente estudo. No entanto, pesquisas contrárias a este trabalho, evidenciaram para diferentes clones das uvas Cabernet Sauvignon e Pinot Noir, que o conteúdo de antocianinas livres, determinadas por CLAE, são similares na maioria dos clones estudados (CASTAGNOLI; VASCONCELOS, 2006; FIDELIBUS et al., 2006). Outros pesquisadores afirmam que além da influência das características do clone no respectivo vinho, as variações entre as amostras são mais significativas ao considerar as diferentes safras (REVILLA; GARCÍA-BENEYTEZ; CABELLO, 2009).

Tabela 6. Determinação por cromatografia líquida de alta eficiência dos compostos fenólicos flavonóides e não-flavonóides (mg/L) nos vinhos Cabernet Sauvignon, clones 169 e 685, locais A e B.

Compostos	A-685	A-169	B-685	B-169
<i>Flavonóides</i>				
Malvidina-3-glic.	35,70 ^a ± 0,15	32,32 ^b ± 0,61	42,21 ^c ± 0,27	31,71 ^d ± 0,09
Delfinidina-3-glic.	4,27 ^a ± 0,08	3,76 ^b ± 0,03	7,1 ^c ± 0,12	3,26 ^d ± 0,08
Peonidina-3-glic.	17,32 ^a ± 0,20	14,07 ^b ± 0,18	22,85 ^c ± 0,45	14,12 ^d ± 0,15
Catequina	17,51 ^a ± 0,12	50,42 ^b ± 0,85	9,96 ^c ± 0,05	39,23 ^d ± 0,33
Quercetina	38,69 ^a ± 1,11	15,36 ^b ± 0,96	24,56 ^c ± 0,12	52,61 ^d ± 1,25
<i>Não-flavonóides</i>				
Trans-resveratrol	0,75 ^a ± 0,02	1,52 ^b ± 0,04	0,65 ^c ± 0,02	1,89 ^d ± 0,03
Ácido gálico	30,29 ^a ± 0,06	32,63 ^b ± 0,71	31,52 ^c ± 0,33	44,22 ^d ± 0,12
Ácido caféico	1,56 ^a ± 0,09	5,16 ^b ± 0,38	1,79 ^c ± 0,05	1,84 ^d ± 0,16
Ácido ferrúlico	0,08 ^a ± 0,01	0,12 ^b ± 0,01	0,05 ^c ± 0,01	0,14 ^b ± 0,01
Ácido <i>p</i> -cumárico	1,47 ^a ± 0,04	2,50 ^b ± 0,03	0,79 ^c ± 0,02	6,80 ^d ± 0,09

Letras diferentes em mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes clones em mesmo vinhedo.

Ao considerar, de maneira geral, os vinhos Cabernet Sauvignon analisados neste trabalho, foi possível observar que este apresentou altos teores de compostos fenólicos, com destaque para o ácido gálico e a catequina, quando comparado com vinhos da mesma variedade oriundos de outros países (MONAGAS et al., 2005; GUTIÉRREZ; LORENZO; ESPINOSA, 2005; CADAHÍA et al., 2009). Além disto, os teores de trans-resveratrol também se mostram significativos nestes vinhos e foram superiores aos encontrados para vinhos Cabernet Sauvignon procedentes da região nordeste do Brasil, com valores de 0,55 e 0,04 mg/L (LUCENA et al., 2010), para os vinhos da Espanha com concentração de 0,4 e 0,70 mg/L de acordo com pesquisas realizadas por Cadahía et al. (2009) e Abril et al. (2005), respectivamente. Souto et al. (2001) ao pesquisar

trans-resveratrol em vinhos comerciais produzidos no Sul do Brasil, encontrou para aqueles da variedade Cabernet Sauvignon, de diferentes safras, concentrações variando de 0,32 a 3,57 mg/L. Gerogiannaki-Christopoulou et al. (2006) determinaram a concentração de trans-resveratrol em 31 amostras de vinho produzidas com diferentes variedades de uvas, brancas e tintas, e os teores encontrados foram abaixo de 2,0 mg/L. Estas diferenças encontradas em relação a composição fenólica dos vinhos Cabernet Sauvignon de diferentes países, pode estar condicionada, além dos diferentes clones usados da variedade Cabernet Sauvignon, ao processo de vinificação que influencia na extração e difusão dos compostos do mosto para o vinho, aos fatores que afetam o desenvolvimento da baga tais como solo, origem geográfica e condições climáticas, como também fatores que exercem forte influencia como o tamanho da baga e o grau de maturação da uva (RIZZON; MIELE, 2002; MORENO-LABANDA et al., 2004; BAUTÍSTA-ORTÍN et al., 2007).

3.5 Atividade antioxidante e a correlação com os compostos fenólicos

A atividade antioxidante encontrada através dos diferentes métodos para os vinhos produzidos com os dois clones da variedade Cabernet Sauvignon, (Figura 4) demonstraram haver diferença significativa ($p < 0,05$) entre os métodos utilizados, com exceção da amostra B-685 que não mostrou diferenças para aos métodos DPPH e FRAP. Foi observado que os valores de atividade antioxidante foram maiores para o método ABTS em todas as amostras, variando de 18,68 a 22,51 mM TEAC para A-685 e B-169, respectivamente. Li et al. (2009), ao analisar 37 amostras de vinhos, tinto, rose e branco, também encontraram maiores valores para atividade antioxidante através do método ABTS. Os clones avaliados neste estudo, demonstraram diferença significativa ($p < 0,05$) na capacidade antioxidante, em que o clone 169, tanto do local A como do B, apresentaram valores superiores de atividade antioxidante para os três métodos avaliados, sendo que este clone também conferiu maior teor de polifenóis tanto para as uvas quanto para os respectivos vinhos.

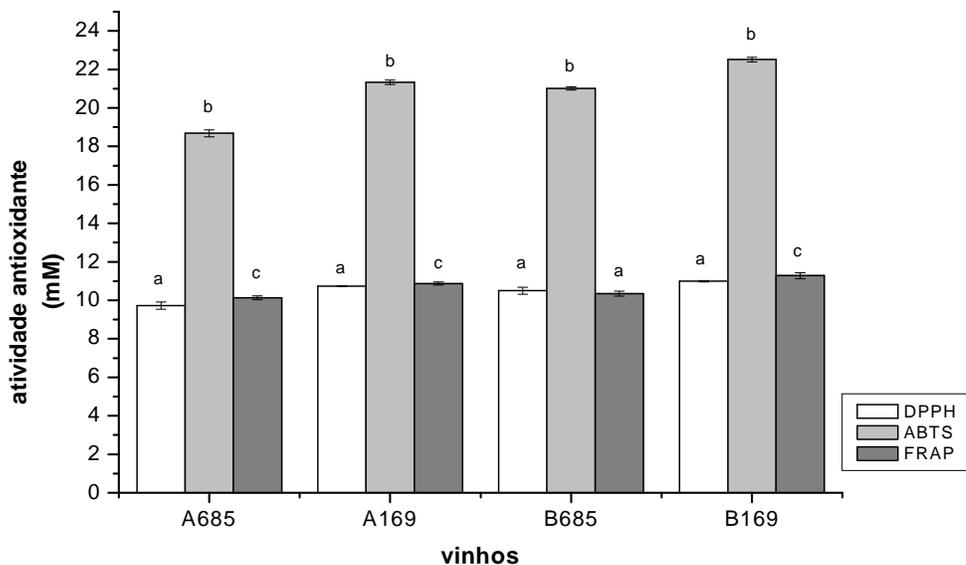


Figura 4. Atividade antioxidante através dos métodos DPPH, ABTS e FRAP (mM TEAC) para vinhos de dois clones da variedade Cabernet Sauvignon, 685 e 169, locais A e B, safra 2008. Os resultados são expressos como a média \pm desvio padrão; colunas com diferentes letras em uma mesma amostra indicam diferença significativa entre os métodos ($p < 0,05$).

O potencial antioxidante encontrado neste estudo para os clones são superiores aqueles reportados na literatura para a mesma variedade (Di MAJO et al., 2008; KONDRASHOV et al., 2009; LI et al., 2009), como também estes vinhos apresentaram atividade antioxidante superior a vinhos produzidos com outras variedades de uva (LANDRAULT et al., 2001; ALÉN-RUIZ et al., 2009; NIXDORF; GUTIÉRREZ, 2010). Kondrashov et al. (2009) sugerem que os vinhos produzidos com a variedade Cabernet Sauvignon podem ser de interesse nutricional devido sua alta capacidade antioxidante. Além da atividade antioxidante ‘in vitro’, Wang et al. (2006) em estudo realizado ‘in vivo’ também evidenciaram que o consumo moderado do vinho Cabernet Sauvignon ajuda a reduzir o risco de incidência de doenças degenerativas, como Alzheimer, assim como apresenta propriedades antiinflamatórias, anticarcinogênicas e proteção cardiovascular (FRANKEL et al., 1998, BURNS et al., 2000).

Através de análise de correlação, uma correlação positiva foi encontrada entre a atividade antioxidante determinada pelos 3 métodos (DPPH, ABTS e FRAP) e cada fenólico individual determinado neste estudo. Isto está de acordo com outros pesquisadores que afirmam que a capacidade antioxidante do vinho é dependente dos

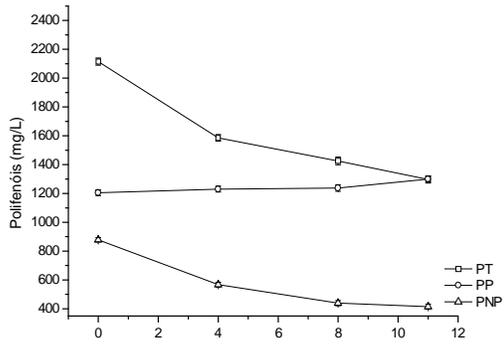
compostos fenólicos (SATO et al., 1996; ZAFRILLA et al., 2003; LI et al., 2009), no entanto há divergências na literatura em relação quais são os principais compostos que atuam como antioxidante. O método ABTS apresentou correlação mais forte com os polifenóis que os métodos DPPH e FRAP para ambos os vinhos, o que também foi reportado por Rivero-Pérez et al. (2008). Dentre os compostos analisados, a catequina foi principal fenólico que demonstrou maior correlação com a atividade antioxidante, para os três métodos avaliados, apresentando um coeficiente de correlação de Pearson (R) maior que 0,9, o que também tem sido reportado por outros pesquisadores que afirmam ser a catequina o composto que mais contribui como antioxidante no vinho (ARNOUS et al., 2002; Di MAJO et al., 2008; ROUSSIS et al., 2008). Isto confirma as observações de outros autores que indicam ser a catequina o mais importante flavanol detectado em vinhos de diferentes variedades (MONAGAS et al., 2005; GÓMEZ-ALONSO; GARCÍA-ROMERO; GUTIÉRREZ, 2007; PUÉRTOLAS et al., 2010). Além da catequina, os polifenóis totais (PT) e os polimerizados (PP) também demonstraram alta correlação com a capacidade antioxidante do vinho ($R > 0,8$), resultado este que está de acordo com pesquisas realizadas por Alén-Ruiz et al. (2009) que afirma ser as formas poliméricas presente no vinho dentre as principais responsáveis pela atividade antioxidante. Estes resultados indicam que o potencial antioxidante do vinho não está relacionado somente a um composto, mas por haver um sinergismo entre a ação antioxidante das diferentes classes de polifenóis. As antocianinas foram os compostos que apresentaram a menor correlação com a atividade antioxidante, o que também foi evidenciado por Sánchez-Moreno et al. (2003), para o conteúdo total de antocianinas. Os outros compostos fenólicos determinados também demonstraram correlação positiva, no entanto com $R < 0,50$, o que também foi evidenciado em estudos realizados por Di Majo et al. (2008), que ao correlacionar compostos fenólicos individuais com a capacidade antioxidante dos vinhos encontrou valores de $R < 0,55$. Os mesmos autores também sugerem que nem sempre o composto majoritário no vinho apresenta a maior correlação, e afirmam que a capacidade antioxidante está mais relacionada com a classe e estrutura dos compostos fenólicos que com o conteúdo total.

3.6 Evolução dos compostos fenólicos durante o tempo de guarda em garrafa

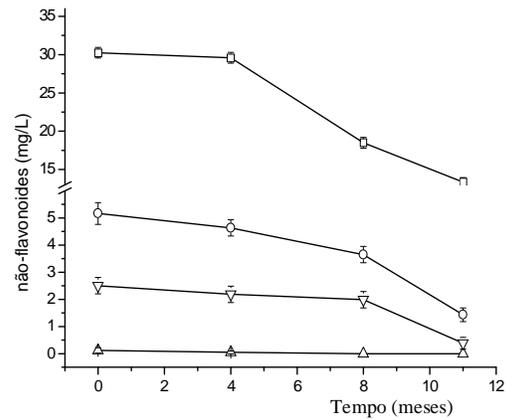
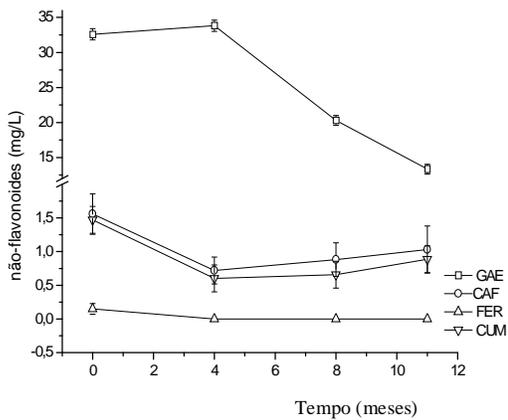
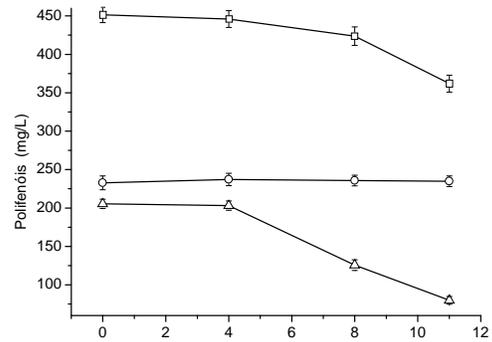
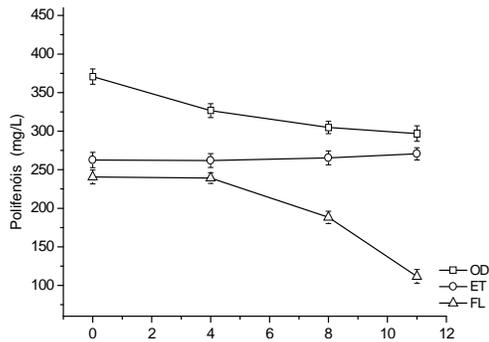
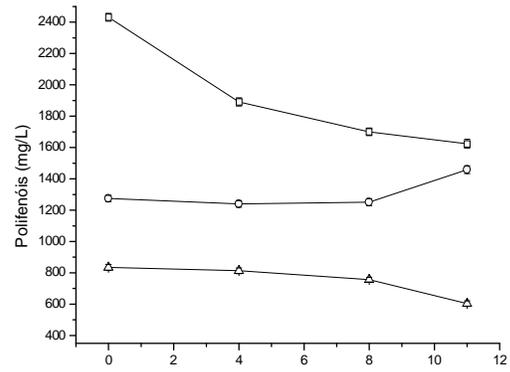
Alterações no conteúdo de compostos fenólicos em vinhos armazenados em garrafa foram monitorados durante um período de 11 meses (Figura 5). No início da estocagem os polifenóis não antociânicos predominantes foram aqueles pertencentes a classe dos flavanois e flavonois, seguido pelos ácidos hidroxibenzóico e hidróxicinâmicos. A Tabela 7 demonstra o comportamento dos compostos, expresso em porcentagem, considerando o resultado inicial e o final dos 11 meses de estudo. Os vinhos produzidos com os dois clones apresentaram similar comportamento durante o envelhecimento.

O conteúdo de polifenóis não-polimerizados diminuiu durante o envelhecimento dos vinhos em garrafa, acompanhado pelo esperado aumento dos polifenóis polimerizados, o que também foi evidenciado por Monagas, Gómez-Cordovés e Bartolomé (2006) e por Roginsky et al. (2006) em pesquisas realizadas em vinhos tintos. Os orto-difenóis também diminuíram ao longo do tempo, fato que pode ser explicado pela perda da capacidade destes compostos de formar complexos quelantes com o molibdênio, devido a participação em numerosas reações de condensação, polimerização e oxidação que ocorrem ao longo do tempo. De acordo com Gómez-Cordovés e Gonzáles-SanJosé (1995) estes compostos atuam como substratos para reações de oxidação e condensação. Os ésteres tartáricos permaneceram praticamente inalterados enquanto o conteúdo total de flavonol reduziu durante os 11 meses de estudo.

(A-685)

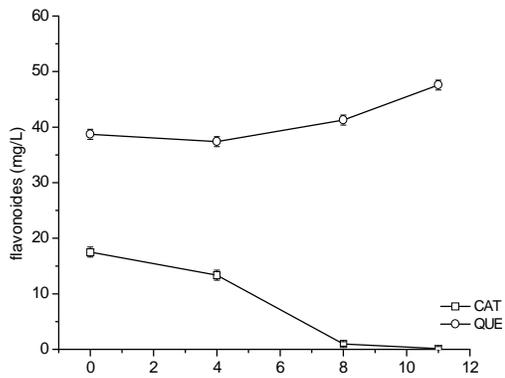


(A-169)

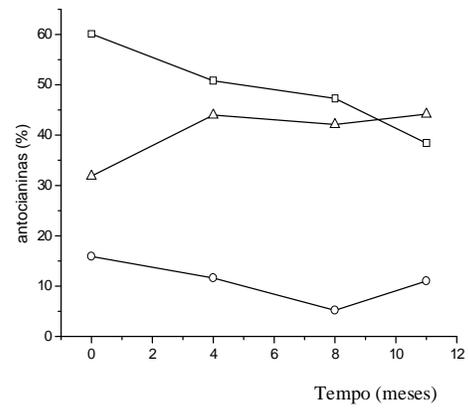
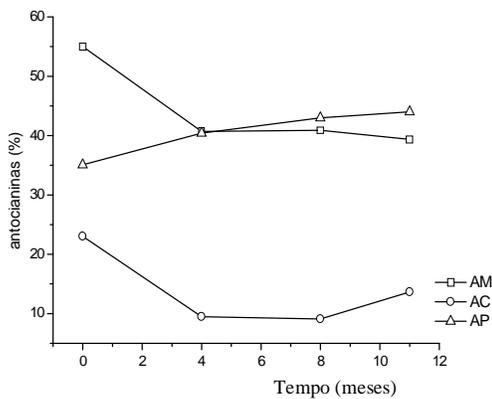
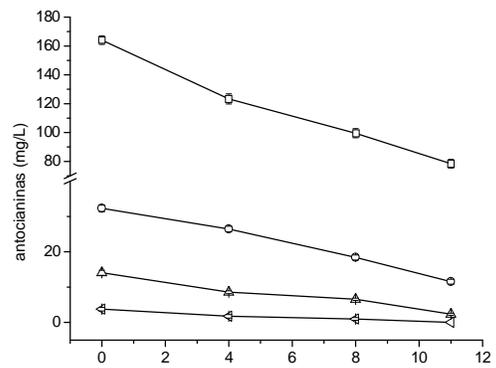
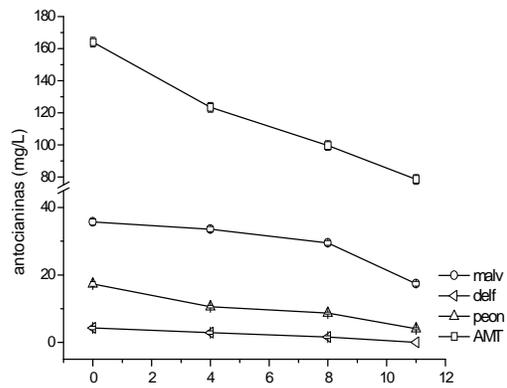
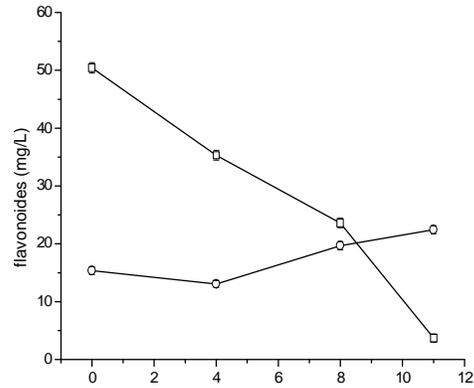


Continuação

(A-685)

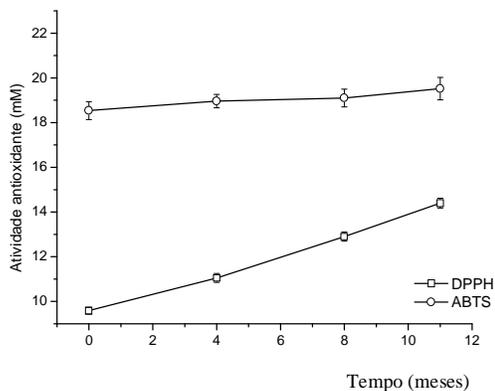


(A-169)



Continuação

(A-685)



(A-169)

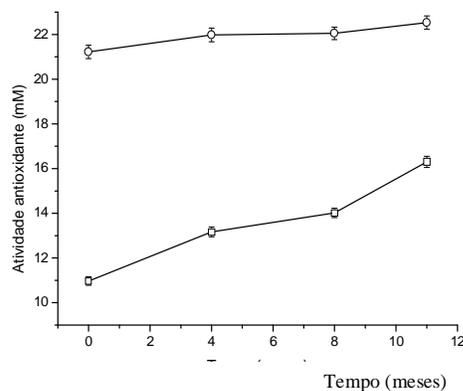


Figura 5. Evolução dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante (DPPH e ABTS) durante o tempo de guarda em garrafa (11 meses) dos vinhos produzidos com os clones 685 e 169 da variedade Cabernet Sauvignon, local A, safra 2008: PT, polifenóis totais; PP, polifenóis polimerizados; PNP, polifenóis não-polimerizados; OD, ortodifenóis; ET, éster tartárico; FL, flavonol; GAE, ácido gálico; CAF, ácido cafeico; FER, ácido ferrúlico; CUM, ácido *p*-cumárico; CAT, catequina; QUER, quercetina; MALV, malvidina 3-glicosídeo; DELF, delphinidina 3-glicosídeo; PEON, peonidina 3-glicosídeo; AMT, antocianinas monoméricas totais; AM, antocianinas monoméricas (%); AC, antocianinas copigmentadas (%); AP, antocianinas poliméricas (%); DPPH, (1,1-difenil-2-picrilhidrazil); ABTS, (ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico).

Tabela 7. Alterações dos compostos fenólicos (%) avaliados durante o envelhecimento do vinho, clone 685 e 169, safra 2008, no período de 11 meses. Valores positivos (+) indicam a porcentagem de aumento dos compostos e valores negativos (-) indicam a porcentagem de diminuição.

<i>Compostos</i>	<i>A-685</i> (%)	<i>A-169</i> (%)
Polifenóis totais (PT)	- 39,0	- 34,0
Polifenóis polimerizado (PP)	+ 6,9	+ 12,6
Polifenóis não-polimerizados (PNP)	- 52,8	- 27,6
Orto-difenóis (OD)	- 19,9	- 19,8
Éster tartárico (ET)	+ 3,04	+ 0,9
Flavonol (FL)	- 53,6	- 61,1
Antocianinas monoméricas totais (AMT)	- 50,1	- 52,2
Antocianinas monoméricas (AM)	- 29,9	- 36,1
Antocianinas poliméricas (AP)	+ 25,3	+ 38,6
Antocianinas copigmentada (AC)	- 59,3	- 69,3
DPPH	+ 50,0	+ 48,6
ABTS	+ 5,2	+ 6,1
Ácido gálico (GAE)	- 59,1	- 55,8
Ácido cafeico (CAF)	- 19,3	- 72,1
Ácido ferrúlico (FER)	- 100,0	- 100,0
Ácido <i>p</i> -cumárico (CUM)	- 33,0	- 84,8
Catequina (CAT)	- 99,0	- 92,6
Quercetina (QUER)	+ 22,9	+ 46,1
Malvidina 3-glicosídeo (MALV)	- 51,3	- 64,3
Delfinidina 3-glicosídeo (DELF)	- 100,0	- 100,0
Peonidina 3-glicosídeo (PEON)	- 76,7	- 85,5

Dentre os compostos não-flavonóides, o comportamento dos principais ácidos hidroxicinâmicos (ácidos *p*-cumárico, cafeico e ferrúlico) para ambos os vinhos foi semelhante e apresentaram diminuição na concentração, sendo que o ácido ferrúlico, no final do experimento, apresentou uma redução de 100 %. A diminuição da concentração destes compostos, durante o envelhecimento do vinho, também foi evidenciada por outros pesquisadores sendo causada, provavelmente, pela formação de copigmentos com as antocianinas (GUTIÉRREZ; LORENZO; ESPINOSA, 2005; MONAGAS; GÓMEZ-CORDOVÉS; BARTOLOMÉ, 2005; GUADALUPE; AYESTARÁN, 2008). Kallithraka, Salacha e Tzourou (2009) ao estudarem a evolução dos compostos fenólicos em vinhos brancos, evidenciaram que durante o período de 9 meses em garrafa, os vinhos apresentaram aumento da concentração dos ácidos hidroxicinâmicos, talvez pela ausência das antocianinas, estes não participarem das reações de copigmentação que ocorre nos vinhos tintos. Nos vinhos estudados, também foi observada uma redução de mais de 50 % no teor de ácido gálico, sendo que a maior diminuição na concentração foi entre o quarto e o oitavo mês de estocagem. Dados contraditórios são apresentados na literatura no que se refere ao comportamento do ácido gálico durante o envelhecimento do vinho. Resultados semelhantes ao encontrado neste trabalho também foram reportados por García-Falcón et al. (2007) ao avaliar vinhos tintos e por Hernanz et al. (2009) para vinhos brancos. No entanto, pesquisadores como Gutiérrez, Lorenzo e Espinosa (2005) e Monagas, Gómez-Cordovés e Bartolomé e (2006) ao avaliar vinhos Cabernet Sauvignon evidenciaram um aumento na concentração de ácido gálico. Revilla e Gonzáles-San José (2003) não encontraram alterações significantes na concentração de ácido gálico após 24 meses de guarda.

Os compostos flavonóides, catequina e quercetina, apresentaram comportamentos diferentes ao longo do tempo, observando diminuição para a catequina e um aumento no teor de quercetina, em ambos os clones. A concentração de catequina no final dos 11 meses foi muito próxima a zero. A diminuição do teor de catequina durante a estocagem é bem conhecida, a qual também foi reportada por Gutiérrez, Lorenzo e Espinosa (2005) ao avaliar vinhos tintos, Hernanz et al. (2009) para vinhos brancos ao avaliar 12 meses de engarrafamento, como também por Monagas, Gómez-Cordovés e Bartolomé (2006) ao avaliar vinhos Cabernet Sauvignon. O mesmo autor observou que para os vinhos Graciano o teor de quercetina praticamente não alterou ao

longo do tempo. Pesquisas têm demonstrado que alguns derivados glicosilados dos flavonóis diminuem durante o tempo de envelhecimento. Como consequência pode ocorrer um aumento nas correspondentes agliconas, como resultado da hidrólise dos compostos glicosídeos (ZAFRILLA et al., 2003; GUTIÉRREZ; LORENZO; ESPINOSA, 2005). Assim, isto pode explicar o aumento na concentração de quercetina observado neste trabalho. O mesmo foi evidenciado por García-Falcón et al (2007) que avaliou a presença de quercetina em três fases: após a fermentação malolática, com 3 meses de guarda em garrafa e com 1 ano, e somente conseguiu quantificar após um ano de guarda. Cadahía et al. (2009) evidenciou este comportamento para a concentração de mircetina que também aumentou durante o período dos 12 meses avaliados, com a consequente diminuição dos derivados glicosilados.

Como esperado, foi observado uma diminuição na concentração das antocianinas livres nas duas amostras de vinhos, sendo que a redução foi em média de 60, 80 e 100 % para a malvidina 3-glicosídeo, delphinidina 3-glicosídeo e peonidina 3-glicosídeo, respectivamente. Esta diminuição também foi evidenciada para o conteúdo de antocianinas monoméricas totais durante o tempo avaliado. Gutiérrez, Lorenzo e Espinosa (2005) também observaram uma rápida diminuição da concentração das antocianinas monoméricas em vinhos Cabernet Sauvignon restando 32 % destas após 9 meses de envelhecimento em garrafa. Esta diminuição no teor de antocianinas monoméricas durante o envelhecimento em garrafa é consistente com a participação destas antocianinas em numerosas reações de condensação durante o período de armazenamento, assim como na participação de reações hidrolíticas (MONAGAS; GÓMEZ-COROVÉS; BARTOLOMÉ, 2006; ALCALDE-EON et al., 2006). Bakker, Picinelli e Bridle (1993) ao pesquisarem a evolução de antocianinas utilizaram solução modelo de vinho, com o objetivo de evitar a interferência dos constituintes do meio, e observaram uma diminuição logarítmica da concentração de antocianinas monoméricas durante a estocagem, juntamente com alterações no comprimento de onda máximo. De acordo com Somers (1971) as alterações mais rápidas na composição da cor, ocorrem durante o primeiro ano de estocagem, quando a cor vermelho-vivo, que é típica de vinhos jovens, altera para vermelho-tijolo. Estas alterações são principalmente causadas pelo desaparecimento dos pigmentos monoméricos por formas oligoméricas mais estáveis. Em relação a contribuição das frações de antocianinas para a coloração do vinho, observou-se que para os dois clones AC % e AM % diminuíram o que está de

acordo com o aumento das AP % ao longo do tempo avaliado. Peng et al. (2002) reportou que os pigmentos poliméricos contribuem em 50 % da cor do vinho após 2 anos de envelhecimento. Gutiérrez, Lorenzo e Espinosa (2005) também evidenciaram aumento da polimerização e diminuição da copigmentação, sendo estas mais drásticas após os 9 meses de envelhecimento. Os mesmos autores afirmam que as principais reações envolvendo antocianinas monoméricas, que acarreta na sua diminuição ao longo do tempo, é a formação de pigmentos poliméricos, através de condensação com outros compostos fenólicos, mediado e acelerado pelo acetaldeído. No entanto, sabe-se que há a formação de novos pigmentos derivados das antocianinas, chamados de piroantocianinas, originadas da reação entre antocianinas monoméricas, principalmente malvidina 3-glicosídeo, e compostos presentes nos vinhos, principalmente com os ácidos hidroxicinâmicos, a qual é resistente a presença de bissulfito (HAYASAKA; ASENSTORFER, 2002; MATEUS et al., 2003; SCHWARZ; WABNITZ; WINTERHALTER, 2003), conseqüentemente estas reações também contribuem para a diminuição da porcentagem de AM. Muitos autores afirmam que a alteração da cor de vinhos envelhecidos, de vermelho vivo para tonalidade de laranja escuro é resultado da formação das piroantocianinas durante o tempo de guarda (RENTZSCH; SCHWARZ; WINTERHALTER, 2007).

A atividade antioxidante, avaliada através dos métodos DPPH e ABTS, demonstrou um aumento significativo ao longo do tempo estudado, sendo que o método DPPH foi o que apresentou maior aumento, em torno de 50 %, para os dois clones. As informações existentes na literatura em relação a evolução da atividade antioxidante dos vinhos com o tempo de estocagem é ainda muito conflitante. Estudos realizados por Zafrilla et al. (2003) demonstraram que ao avaliar a capacidade antioxidante de vinhos tintos através dos dois métodos, não evidenciaram nenhuma alteração na atividade antioxidante durante os 7 meses de estocagem. Outros pesquisadores afirmam que a atividade antioxidante diminui ao longo do tempo (PELLEGRINI et al., 2000; LANDRAUT et al., 2001; De BEER et al., 2005). No entanto, há pesquisas que estão de acordo com o encontrado no presente trabalho, afirmando que a atividade antioxidante aumenta ao longo do tempo de armazenamento (LARRAURI et al., 1999; ECHEVERRY et al., 2005; KALLITHRAKA; SALACHA; TZOUROU, 2009) devido os compostos presentes nestes vinhos apresentarem maior habilidade de capturar radicais livres do que os vinhos jovens. Dentre as reações que ocorrem com os

compostos fenólicos presentes nos vinhos são as transformações oxidativas, resultando na condensação destes compostos. Este processo apresenta como característica marcante o número de grupos –OH ativos, responsáveis pela atividade antioxidante, permanecer praticamente inalterados em condições anaeróbias (SINGLETON, 2000), o qual pode ter contribuído para o não decréscimo da atividade antioxidante dos vinhos ao longo do tempo.

A fim de avaliar a influencia do tempo de estocagem em relação a atividade antioxidante dos compostos fenólicos, foram realizadas análises de correlação linear entre os métodos DPPH e ABTS com cada compostos fenólico obtido após os 11 meses de envelhecimento dos vinhos em garrafa. Dentre os compostos, a quercetina apresentou correlação significativa ($p < 0,05$) com os dois métodos antioxidantes, com um coeficiente de correlação (R) maior que 0,88, sendo que antes do período de envelhecimento dos vinhos em garrafa (11 meses), foi a catequina que apresentou a maior correlação com a atividade antioxidante para todos os vinhos avaliados. Este fato pode ser explicado devido a quercetina ser o único composto que apresentou aumento da concentração ao longo do tempo, podendo ter contribuído para o aumento observado da atividade antioxidante. Pesquisas realizadas por Kallithraka, Salacha e Tzourou (2009), também avaliaram a correlação entre compostos fenólicos individuais e a atividade antioxidante (DPPH) para vinhos brancos, durante 9 meses de armazenamento, observando que para a maioria dos compostos fenólicos a correlação diminuiu durante o tempo, chegando a valores insignificantes, com exceção do ácido cafeico que apresentou maior correlação no decorrer do tempo, assim como também teve sua concentração aumentada durante o período avaliado.

Alterações na composição fenólica são principalmente devido a participação em numerosas reações, como copigmentação, cicloadição, polimerização e oxidação. Estas reações enzimáticas e não-enzimáticas iniciam logo após a maceração das uvas e continuam no decorrer da fermentação e do envelhecimento tanto em garrafa como em barrica (GUADALUPE; AYESTARÁN, 2008; CEREZO et al., 2010; PUÉRTOLAS et al., 2010), contribuindo para importantes alterações nas propriedades sensoriais, como também na estabilização da cor dos vinhos com a formação de pigmentos mais estáveis. Experimentos realizados por Recamalles et al. (2006) indicam que as condições de estocagem podem exercer forte efeito no conteúdo de polifenóis do vinho. Fatores tais como luz e temperatura influenciam nas reações de hidrólise, oxidação e condensação.

Os resultados obtidos para o presente trabalho, são referentes a amostras de vinhos armazenadas em iguais condições de estocagem, sendo estas submetidas aos mesmos tratamentos e processo de vinificação, assim pode-se sugerir que os efeitos observados são atribuídos, unicamente, ao tempo de estocagem.

3.7 Análise multivariada

As técnicas multivariadas são muito utilizadas com o objetivo de explicar a diferenciação entre as amostras e obter mais informação de quais são as principais variáveis que influenciam nas similaridades e diferenças. Para isto, os compostos fenólicos, são usados como ferramenta na diferenciação e classificação de amostras de vinho. Pesquisas têm demonstrado que a fração fenólica pode separar os vinhos de acordo com a variedade da uva, com a origem geográfica e também pelas técnicas de vinificação (PÉREZ-PRIETO; LÓPEZ-ROCA; GÓMEZ-PLAZA, 2003; CLIFF; KING; SCHLOSSER, 2007; RASTIJA; SRECNIK; SARIC, 2009). Neste trabalho, a separação dos clones do vinho Cabernet Sauvignon foi realizada através de análises multivariada dos dados, a fim de verificar se os dois clones, 169 e 685, apresentam características distintas. A separação foi obtida através da Análise de Componentes Principais (ACP) (Figura 6) e por análise de Cluster (Figura 7).

ACP (Figura 6) foi realizada utilizando os compostos fenólicos flavonóides e não-flavonóides determinados por HPLC, atividade antioxidante (ABTS, DPPH e FRAP), assim como antocianinas monoméricas totais e polifenóis totais.

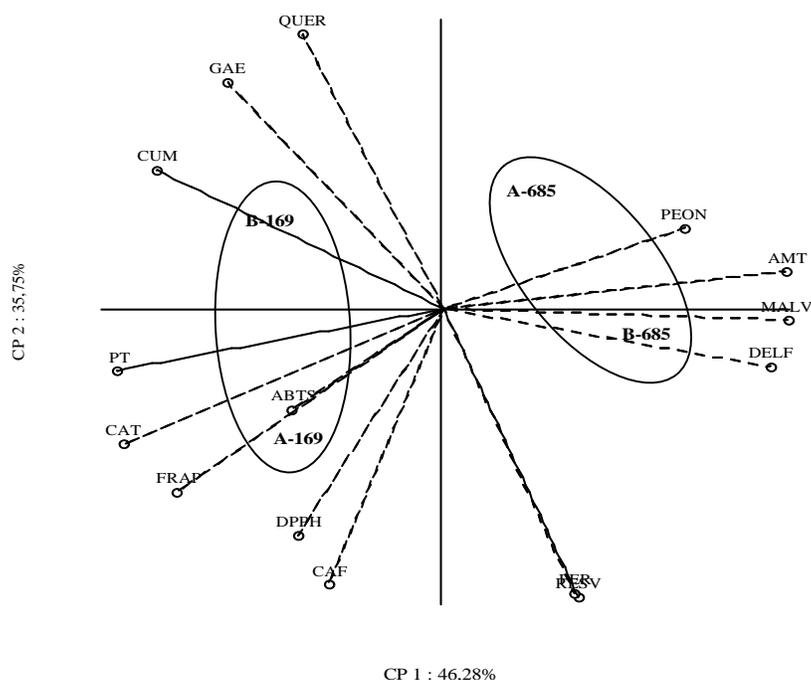


Figura 6. Análise de Componentes Principais (ACP) utilizando os resultados da atividade antioxidante (ABTS, DPPH e FRAP) e dos compostos fenólicos para os vinhos Cabernet Sauvignon produzidos com os clones 685 e 169 provenientes de dois locais (A e B), safra 2008. Compostos fenólicos determinados por cromatografia líquida: QUER: quercetina; GAE: ácido gálico; CUM: ácido *p*-cumárico; CAT: catequina; CAF: ácido cafeico; RES: resveratrol; FER: ácido ferúlico; DELF: delfinidina 3-glicosídeo; MALV: malvidina 3-glicosídeo, PEON: peonidina 3-glicosídeo. PT: polifenóis totais; AMT: antocianinas monoméricas totais.

A Figura 6 demonstra que as amostras de vinho foram claramente separadas por duas funções (CP1 x CP2), que explicaram 81,43 % da variabilidade total dos dados. A primeira componente representou 46,28 % e a segunda componente 35,15 % da dispersão total. Pode ser observado que as amostras de vinho foram separadas de acordo com o tipo de clone considerando CP1 que explicou a maior variabilidade dos dados. Os clones 685 estão localizados positivamente em relação ao CP1, enquanto as amostras dos clones 169 estão localizadas negativamente. Em relação as variáveis analisadas, houve clara separação em relação a CP1, em que as antocianinas ficaram localizadas

positivamente e os polifenóis e antioxidantes negativamente. Os vinhos do clone 685, locais A e B, apresentaram alta correlação positiva com todas as antocianinas, indicando a prevalência das características de cor neste clone. Já o clone 169 demonstrou alta correlação positiva com a atividade antioxidante e com os polifenóis, principalmente, catequina, ácido *p*-cumárico e cafeico. Dados estes que estão de acordo com o descrito na Tabela 4 e 6.

A análise de cluster foi realizada pelo método de Ward (Figura 7), considerando todos os compostos fenólicos totais, determinados por espectrofotômetro, assim como os compostos fenólicos individuais, determinados por CLAE, a fim de obter as similaridades/diferenças entre as amostras.

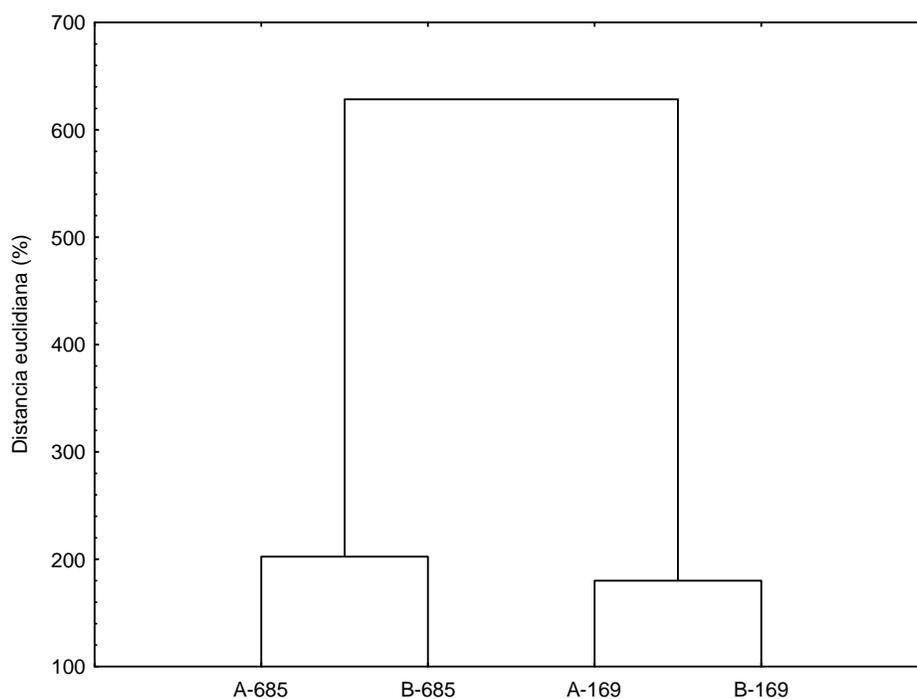


Figura 7. Dendrograma de análise de cluster utilizando o teor dos compostos fenólicos totais, individuais determinado por CLAE e atividade antioxidante, para os vinhos Cabernet Sauvignon, produzidos com os clones 169 e 685, locais A e B, safra 2008.

A representação gráfica foi realizada na forma de um dendograma, em que o critério de separação usado foi a distancia euclidiana (%). Foi possível observar claramente a formação de dois grupos homogêneos, sendo um grupo formado pelo clone 169 referentes aos dois locais (A e B) e outro grupo formado com o clone 685. Estes resultados sugerem que o perfil fenólico determinado neste trabalho foi suficiente para diferenciar e separar vinhos produzidos com diferentes clones, indicando que cada clone apresenta características particulares que são transmitidas aos respectivos vinhos.

Resultados semelhantes a este trabalho foram obtidos por Gómez-Plaza et al. (1999), que ao estudar diferentes clones da variedade Monastrel evidenciaram que os vinhos apresentaram características particulares e distintas em relação aos compostos aromáticos, obtendo clara separação entre as amostras de vinho. Em outro estudo realizado com os mesmos clones de Monastrel, Gómez-Plaza, Gil-Muñoz e Martínez-Cutillas (2000) utilizaram para avaliação o teor de minerais, parâmetros de cor e os ácidos orgânicos, e evidenciaram haver diferenças significativas entre as amostras, e através de técnicas multivariadas, como ACP e Análise de cluster, os autores constataram haver uma separação das amostras de vinho de acordo com o clone ao qual pertencia, prevalecendo a característica do clone. Pesquisadores utilizando os parâmetros enológicos clássicos determinados em vinhos, também evidenciaram prevalecer a característica do clone ao analisar vinhos produzidos com diferentes clones da variedade Albariño, obtendo clara separação entre as amostras ao aplicar nas amostras Análise de Componentes Principais (ZAMUZ; MARTÍNEZ; VILANOVA, 2007). Esti et al. (2010) estudaram vinhos produzidos com diferentes clones da variedade Grechetto, de diferentes safras, vinhedos e locais de produção, em relação aos parâmetros sensoriais, e observaram que as amostras de vinhos forma agrupadas de acordo com o clone, sendo que o efeito safra e local de produção não exerceram distinção relevante entre as amostras.

4 Conclusão

Foram observados diferenças significativas entre os clones 685 e 169 tanto para as uvas Cabernet Sauvignon como também para os respectivos vinhos, em relação as famílias de compostos fenólicos determinadas neste estudos. Os vinhos apresentaram alta atividade antioxidante, para os três métodos avaliados, o vinho produzido com o clone 169 foi o que demonstrou maiores valores. Dentre os três métodos os maiores resultados foram obtidos com o método ABTS. Correlação positiva foi encontrada para todos os compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos vinhos, sendo que a catequina apresentou maior correlação seguida pelo polifenóis totais e polifenóis polimerizados.

Os vinhos apresentaram as características de acordo com o clone que foram produzidos, o clone 169 demonstrou predomínio do teor de polifenóis enquanto o clone 685 predominou o conteúdo de antocianinas, tanto nas uvas como no vinho. Estes resultados foram confirmados através de análises multivariadas, em que a Análise de Componentes Principais demonstrou a correlação de cada clone com as variáveis analisadas e assim como na Análise de Cluster também foi observada clara separação e agrupamento das amostras de vinho de acordo com o clone. Os principais compostos fenólicos determinados neste trabalho podem ser utilizados como ferramenta para a classificação e discriminação dos diferentes clones.

A evolução dos diferentes compostos fenólicos foram muito similares entre os vinhos produzidos com os dois clones, evidenciando que as alterações ocorridas foram unicamente devido ao tempo de guarda, pois as amostras de vinhos foram submetidas as mesmas condições ambientais.

Capítulo 4

**Caracterização e diferenciação de dois clones da
variedade Cabernet Sauvignon quanto ao ciclo
fenológico e evolução da maturação**

Caracterização e diferenciação de dois clones da variedade Cabernet Sauvignon quanto ao ciclo fenológico e evolução da maturação

Resumo

A seleção clonal tem permitido expressivos ganhos na viticultura tanto em qualidade como em quantidade de produção. A variedade Cabernet Sauvignon apresenta vários clones, sendo que a principal característica que diferencia estes clones é o potencial produtivo. O objetivo deste trabalho foi avaliar e caracterizar dois clones, 169 e 685, da variedade Cabernet Sauvignon, procedentes de São Joaquim, Santa Catarina, Brasil, durante o período de maturação, safra 2009, e determinar as principais características físicas e químicas dos clones e verificar a existência de diferenças entre as amostras. As plantas apresentaram similaridade na idade, foram cultivados em mesmo vinhedo, sob mesmo porta-enxerto e sistema de condução. Foram avaliados a duração do ciclo fenológico de cada planta e determinado o requerimento térmico durante este período. Os clones também foram diferenciados em relação a área foliar. Durante o período de maturação foram monitorados a evolução da composição físico-química, dos compostos fenólicos, ácidos orgânicos e antocianinas. No período da colheita das uvas determinaram-se as componentes de rendimento para cada clone. Os resultados demonstraram que os dois clones apresentaram semelhança na duração do ciclo fenológico, assim como no requerimento térmico (graus-dias) e no índice heliotérmico. Durante o período de maturação a evolução dos compostos fenólicos e dos parâmetros físico-químicos foi semelhante entre os clones. Os clones diferiram significativamente quanto a produtividade, número de cachos e de bagas, área foliar, ácidos orgânicos, polifenóis totais e antocianinas. Análise de correlação e Análise de Componentes Principais demonstraram que o clone 685 foi fortemente correlacionado com as características de cor, principalmente antocianinas, enquanto o clone 169 com os polifenóis totais. Os resultados sugerem que a composição química e as características físicas são atribuídas exclusivamente a cada clone e podem ser utilizadas como ferramenta para a caracterização e diferenciação de diferentes clones de mesma variedade de uva.

Palavras-chave: clone, uva, Cabernet Sauvignon, maturação, fenologia.

1 Introdução

A seleção clonal tem permitido expressivos ganhos na viticultura tanto em qualidade como em quantidade de produção. Para as variedades da espécie *Vitis vinifera*, os clones são selecionados sob o ponto de vista sanitário e genético, buscando a isenção das principais viroses que atacam a videira, assim como a expressão de determinadas características químicas. Variações fenotípicas são frequentemente observadas entre os clones de uma mesma variedade, que podem aparecer antes ou após o período de maturação. Pesquisadores observaram que diferentes clones de mesma variedade podem diferir em relação às características produtivas, composição química e consequentemente, produzir vinhos com características organolépticas distintas (CASTAGNOLI; VASCONCELOS, 2006; ZAMUS; MARTÍNEZ; VILANOVA, 2007).

Para a variedade Cabernet Sauvignon, originária da região de Bordeaux na França, existem 25 clones registrados, sendo que estes atendem às diferentes exigências de produção, no caso específico da seleção clonal francesa, são separados em 3 classes: qualitativos (A), medianos (B) e produtivos (C). Dentre estes clones, estão os clones 169 e 685 ambos de origem francesa. A principal característica que diferencia estes clones é a produtividade, o clone 169 caracteriza-se por menor vigor, com fertilidade baixa e peso de cacho médio, enquanto para o clone 685 a fertilidade é de potencial médio com boa produtividade, o qual apresenta maior vigor (ENTAV, 1995).

Na viticultura, a determinação das fases fenológicas da videira, principalmente os períodos de brotação, floração e colheita, são utilizados para caracterizar as variedades viníferas, assim como os diferentes clones de uma mesma variedade, pois os períodos fenológicos variam de acordo com o genótipo, condições climáticas e com a localização geográfica (JONES; DAVIS, 2000; LEÃO; SILVA, 2003). A videira é influenciada por diversos elementos meteorológicos do clima, dentre eles temperatura, precipitação pluviométrica, radiação solar, vento e umidade relativa do ar, sendo este um fator preponderante na duração do ciclo, qualidade do fruto, fitossanidade e produtividade da videira (DELOIRE et al., 2005). Assim, a caracterização das exigências térmicas da videira mediante o conceito de graus-dias é utilizada por diversos autores, sendo um método eficiente para avaliar a duração do ciclo, a produção,

a qualidade do produto e prever antecipadamente a data de colheita (PEDRO JÚNIOR; SENTELHAS; MARTINS, 1994; CHAVARRIA et al., 2009).

A qualidade da uva na colheita é o principal fator que interfere na qualidade do vinho. O período de maturação das uvas caracteriza-se por um processo contínuo, e inicia com a alteração de cor e termina com a colheita da uva. Durante este período ocorrem importantes modificações nas uvas que refletem em alterações na sua composição, tais como o aumento de volume e amolecimento da baga, acúmulo de açúcares, diminuição da acidez, aumento do pH, desaparecimento da clorofila e consequente acúmulo de pigmentos corantes na casca, síntese de substâncias aromáticas e modificação do sabor (MOTA et al., 2006; LEMOIGNE et al., 2008). Pesquisadores definem o período ótimo de colheita, considerando principalmente, o teor de açúcar, pH e a acidez total da uva (HUNTER et al., 1990). No entanto, o acúmulo de compostos fenólicos e a evolução dos ácidos orgânicos também são frequentemente utilizados (RIZZON; MIELE, 2002).

A concentração e a presença de vários compostos nas uvas dependem principalmente de fatores genéticos e do meio, assim como das práticas vitícolas. (HASELGROVE et al., 2000). A concentração de alguns metabólitos secundários, como os compostos fenólicos, é sugerido ser dependente, principalmente, da produtividade da planta, da área foliar e do peso das bagas por planta (PONI; GIACHINO, 2000; SANTESTEBAN; ROYO, 2006).

Pesquisadores têm aplicado técnicas estatísticas multivariadas na viticultura com a finalidade de identificar as principais variáveis que estão relacionados com a qualidade de uvas e vinhos, assim como para diferenciar uvas e vinhos de diferentes clones de mesma variedade considerando a composição química e aromática (GÓMEZ-PLAZA et al., 1999; ZAMUS; MARTÍNEZ; VILANOVA, 2007; REVILLA; GARCÍA-BENEYTEZ; CABELLO, 2009).

Com base no exposto acima, o objetivo deste trabalho foi avaliar e caracterizar dois clones da variedade Cabernet Sauvignon, procedentes de São Joaquim, Santa Catarina, Brasil, durante o período de maturação e determinar as principais características físicas e químicas dos clones e verificar a existência de diferenças entre as amostras. Análise multivariada dos dados foi utilizada para relacionar as principais características químicas com cada clone.

2 Material e Métodos

2.1 Caracterização da área experimental

O experimento foi conduzido em um vinhedo situado na região de São Joaquim, localizada no Planalto Sul do Estado de Santa Catarina, Brasil, (1200 m de altitude, 28°15'1.2'' de latitude e 49°34'51'' de longitude), seguindo um delineamento experimental inteiramente casualizado. Neste vinhedo foram avaliados dois clones da variedade Cabernet Sauvignon, o clone 169 e 685, safra 2009, conduzidos sob mesmo porta-enxerto Paulsen 1103 (*V. berlandierli* Planch \times *V. rupestris* Scheele). Foram marcadas, aleatoriamente, 12 plantas para cada clone, em 3 fileiras centrais, com similaridade na idade (3 anos) e conduzidas no sistema de condução Manjedoura (V sistem) com espaçamento de 1,3 x 3,0 metros.

A região de São Joaquim apresenta como característica um relevo estável e as altitudes variam de 900 a aproximadamente 1400 m. De acordo com Falcão et al. (2008c) o solo desta região é classificado como Inceptisol, localizado em solo basáltico, material de origem extrusiva e rochas vulcânicas. Caracteriza-se por ser bem drenado, solo de consistência macia e friável, apresenta alta capacidade de retenção de água. A coloração varia de 'cinza a cinza-escuro'. Os solos apresentam boa fertilidade, sendo que estas características tornam possível o cultivo de variedade *Vitis vinifera* em São Joaquim-SC.

2.2 Dados Climáticos

Os dados climáticos foram obtidos de uma Estação Meteorológica Automática da Epagri/Ciram (Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina, Brasil). Os dados consistiam de observações diárias de temperaturas máxima, média e mínima (°C) do ar, amplitude térmica, precipitação pluviométrica (mm) e umidade relativa do ar (%). Para a caracterização climática foram calculados os seguintes parâmetros:

Soma térmica (Graus-dias): foi determinada do período da brotação até a colheita, como também para cada subperíodo, de acordo com as equações 1 e 2.

$$GD = \Sigma (T_m - T_b) + [(T_M - T_m)/2], \text{ quando } T_m > T_b \quad (1)$$

$$GD = \Sigma [(T_M - T_b)^2 / 2 * (T_M - T_m)], \text{ quando } T_m \leq T_b \quad (2)$$

Sendo: T_M : Temperatura máxima diária (°C); T_m : Temperatura mínima diária (°C); T_b : temperatura basal (10°C).

Índice Heliotérmico (IH): determinado durante o período da brotação até a colheita de acordo com método proposto por Huglin (1978) (Equação 3). Para classificação da região foi utilizada a Classificação Climática Multicritério (CCM) proposta por Tonietto e Carboneau (2004).

$$IH = \Sigma \{ [(T_{med} - T_b) + (T_M - T_b)] / 2 \} \quad (3)$$

Sendo: T_{med} : temperatura média diária (°C); T_M : temperatura máxima diária; T_b : temperatura base = 10°C.

2.3 Fenologia

As avaliações das fases fenológicas da planta foram acompanhadas entre o período da brotação até a colheita, referente a safra 2009, e as datas para cada período foram registradas. Os estádios fenológicos foram determinados como: 1) período da brotação a floração; 2) floração a frutificação; 3) frutificação ao início da maturação; 4) início da maturação até a colheita.

2.4 Determinação da área foliar

Para a determinação da área foliar, primeiramente foram coletados, aleatoriamente, 100 folhas dos ramos de diversas plantas e com diferentes tamanhos, para cada clone avaliado. Estas folhas foram acondicionadas em caixas térmicas e transportadas até o laboratório de Bioquímica de Alimentos na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Com o auxílio de um paquímetro foi medido o comprimento das nervuras principal (NP), lateral direita (NLD) e lateral esquerda (NLE) (cm), de acordo com o método proposto por Carbonneau (1976). As folhas foram fotocopiadas

com a utilização de um analisador portátil (AM 300 ADC, Inglaterra) para obter a área de cada folha (cm^2). Para a escolha de uma equação que pudesse representar a área foliar em função das dimensões do comprimento das nervuras (NP, LE e LD), foi realizado estudo de regressão linear para obter o coeficiente de determinação (R^2) que melhor explica o ajuste do modelo.

No período da colheita, para os dois clones, foi medido o comprimento de 2 ramos de cada planta, previamente marcada (12 plantas), em um dos ramos foi contado o número de folhas e do outro as folhas foram retiradas, acondicionadas em caixas térmicas e transportadas até o laboratório. Em todas as folhas, foram medidas o comprimento das nervuras principal e laterais (cm), e a partir do modelo matemático escolhido, foi determinado a área foliar por planta para cada clone.

2.5 Amostragem e Monitoramento da Maturação

O período de amostragem para o monitoramento da maturação, iniciou no *véraison*, que compreende o período quando aproximadamente 50 % das bagas atingiram coloração característica, o qual é observado visualmente, e se estendeu até a colheita. As uvas foram coletadas, em cada vinhedo, de plantas previamente marcadas (12 plantas), a cada 10 dias, seguindo uma coleta uniforme e em diferentes partes do cacho, o qual totalizou 240 bagas para cada avaliação realizada para os dois clones. Em cada coleta, as bagas foram acondicionadas em caixas térmicas e transportadas até o laboratório de Bioquímica de Alimentos, na Universidade Federal de Santa Catarina, onde foram realizadas todas as análises. Cada amostra de 240 bagas foram divididas em 3 sub-amostras (90, 90 e 60 bagas), sendo utilizado 90 bagas para as análises de maturação tecnológica (análises físico-químicas, ácidos orgânicos) e 90 bagas para maturação fenólica (polifenóis totais, antocianinas totais e medida da cor), e o restante foi armazenado à $-18\text{ }^\circ\text{C}$. A colheita foi realizada considerando o pH e o teor de açúcares ($^\circ\text{Brix}$) das bagas de uvas.

Componentes de rendimento

Para cada clone foram determinados o peso de 100 bagas em duplicata, e o número e o peso das sementes ao longo do período de maturação. Na colheita foram

determinados o número de cacho por planta, o peso das bagas (n=100) em duplicata para obter o peso médio por baga, o peso dos cachos (n=5) e o número de baga por cacho (n=5) para cada planta previamente marcada e calculado a produtividade por planta (kg).

Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas com o mosto da uva, obtido a partir do esmagamento da uva, utilizando 30 bagas em triplicata. As amostras foram analisadas de acordo com metodologias propostas pela OIV (1990). Para determinação de pH utilizou-se pHmetro digital (pHmetro 220, Metler, Toledo); acidez total titulável (ATT) foi realizada por titulação com NaOH 0,1N; sólidos solúveis totais (SST - °Brix) determinado por leitura direta à 25°C em refratômetro (Abbe, Ausjena, modelo 265085).

Antocianinas monoméricas totais, Polifenóis totais e Medida da cor

Para as análises de antocianinas monoméricas totais (AMT), polifenóis totais (PT) e medida da cor foi preparado um extrato metanólico das uvas, utilizando 30 bagas de uvas em triplicata, sendo as cascas separadas da polpa, pesadas para a preparação do extrato. O extrato foi preparado pela maceração das cascas durante 24 horas sob abrigo da luz a $4,0 \pm 1^\circ\text{C}$ com metanol/HCl 1 % (LEES; FRANCIS, 1972). Os extratos foram filtrados em papel Whatman n°1, utilizando funil de Buchner, e acondicionados em frasco âmbar a -18°C . Todas as análises foram realizadas em espectrofotometria UV-VIS (Hitachi, U2010, Tokyo, Japão).

A quantificação das AMT foi realizada através do método de pH diferencial de acordo com Giusti e Wrolstad (2001), utilizando $\epsilon = 28000$ e $MM = 529$. Os resultados foram expressos em mg malvidina 3-glicosídeo/100 g de casca.

O conteúdo de PT foi determinado utilizando o método de Folin-Ciocalteu, com leituras de absorvância em 760 nm e expresso em mg ácido gálico/100 g de casca (SINGLETON; ROSSI, 1965).

Para a medida da cor os extratos foram diluídos 10 vezes em água destilada e foram realizadas leituras de absorvância em 420, 520 e 620 nm. Estes resultados foram

utilizados para calcular a intensidade (IC) e a tonalidade (T) da cor de acordo com Glories (1984) (Equações 4 e 5).

$$IC = \text{Abs } 420 + \text{Abs } 520 + \text{Abs } 620 \quad (4)$$

$$T = \text{Abs } 420 / \text{Abs } 520 \quad (5)$$

Ácidos orgânicos

Foram determinados os ácidos tartárico, málico, láctico, cítrico e succínico durante o período de maturação. Os compostos foram quantificados utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), Shimadzu (Kyoto, Japan), equipado com desgaseificador (DGU-14A), bomba quaternária (LC-10AT), detector UV-vis (SPD-10AV) e injetor manual de 20 μL , com software CLASS-VP (ver 6.1). A coluna (4,6 mm x 250 mm, 5 μm tamanho de partícula) e a pré-coluna (4,6 mm x 12,5 mm) foram C18 de fase reversa (Hichrom, Europe).

Foi preparado o mosto das uvas através do esmagamento de 20 bagas em duplicata, posteriormente este mosto foi centrifugado a 3 000 rpm (Jaetzki k24, Jena, Alemanha) durante 15 minutos, transferido para frasco âmbar e acondicionado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para realização da análise o mosto foi diluído 10 vezes em água ultra-pura (Milli-Q), filtrado em membrana de 0,45 μm (Millipore) e injetado no cromatógrafo (20 μL).

A metodologia para quantificação foi de acordo com Escobal et al. (1998) com modificações. A separação cromatográfica foi realizada através de eluição isocrática, com detecção em 212 nm. A fase móvel consistiu de água ultra pura (Milli-Q) acidificada com ácido fosfórico (1,2 % m/v) com pH de 2,4. O fluxo do eluente foi de 0,7 mL/min, e o tempo da corrida cromatográfica foi de 40 minutos.

Padrões dos ácidos orgânicos foram diluídos separadamente em água ultra-pura (Milli-Q) (10 g/L) e a solução de trabalho foi obtida com a mistura de todos os padrões (5 g/L). As curvas foram construídas por padronização externa.

2.6 Análise estatística

Para as análises de regressão linear, análise de variância (ANOVA), teste de Tukey ($p < 0,05$) e análise de componentes principais (ACP) foram utilizados o programa Statistica 6.0 (2001) (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3 Resultados e Discussão

3.1 Caracterização climática e determinação dos estádios fenológicos

O monitoramento dos parâmetros climáticos além de influenciar diretamente na qualidade das uvas e dos vinhos, também caracterizam as diferentes regiões vitivinícolas. De acordo com o Sistema de Classificação Climática Multicritério (TONIETTO; CARBONNEAU, 2004) o clima da região de São Joaquim é classificado como “Frio, de noites Frias e Úmido”.

A temperatura exerce forte influência em todo o desenvolvimento da videira, sendo que a temperatura basal inferior a 10 °C impede seu desenvolvimento (WINKLER, 1980). Além disto, a temperatura influencia no pH, nível de acidez, concentração de açúcar, componentes aromáticos e no teor de compostos fenólicos. Considerando as temperaturas diárias observadas para a região de São Joaquim durante este estudo, safra 2009, os valores médios de temperatura no período de maturação das uvas variaram de 11,9 a 20,5 °C (dados não mostrados). A ocorrência de noites frias, o que é característica desta região, favorece o acúmulo de açúcares e dos compostos fenólicos, principalmente das antocianinas (TOMANA; UTSUNOMIYA; DATAOKA, 1979). A maior amplitude térmica registrada (15,2°C) nesta safra, ocorreu no período que compreende o início da maturação até a colheita (dados não mostrados), a qual é considerada um fator importante na fisiologia vegetal, pois influencia o equilíbrio fotossintético/respiratório da planta, e conseqüentemente, no acúmulo energético para o desenvolvimento das uvas neste período (GONZÁLEZ et al., 2007). De acordo com Briguenti e Tonietto (2004) amplitude térmica em torno de 10°C pode ser considerada excelente para o desenvolvimento da videira.

Na Figura 1 estão representados os valores mensais registrados de precipitação (mm) e umidade relativa do ar (%) durante o ciclo da videira. Observou-se que a umidade relativa do ar foi acima de 87 % o que é característico da região Sul do Brasil. Os valores registrados para a safra 2009 são considerados normais e estão de acordo para promover adequado desenvolvimento das bagas (ESTEBAN; VILLANUEVA; LISSARRAGUE, 2002). Com relação a precipitação pluviométrica (mm) registrada durante todo ciclo da videira, safra 2009, foi aproximadamente de 900 mm. No período final da maturação, foi registrado a menor precipitação do ciclo, o qual é favorável para o acúmulo de açúcares pela planta além de evitar a ocorrência de podridão do cacho (*Botritis*). Falcão et al. (2008a) em estudos realizados na Região de São Joaquim, com uvas Cabernet Sauvignon, safras 2005 e 2006, verificaram uma variação para a precipitação pluviométrica durante todo o ciclo da videira de aproximadamente 900 e 600 mm, respectivamente. Pesquisas indicam que os vinhos de qualidade são produzidos em regiões com precipitação anual de 600 a 900 mm. É conhecido que altos índices de precipitação influenciam negativamente na qualidade final das uvas, podendo influenciar a acidez e o teor de sólidos solúveis totais do mosto e consequentemente na perda de qualidade para a elaboração do vinho (JACKSON, 2000; MEDRANO et al., 2003).

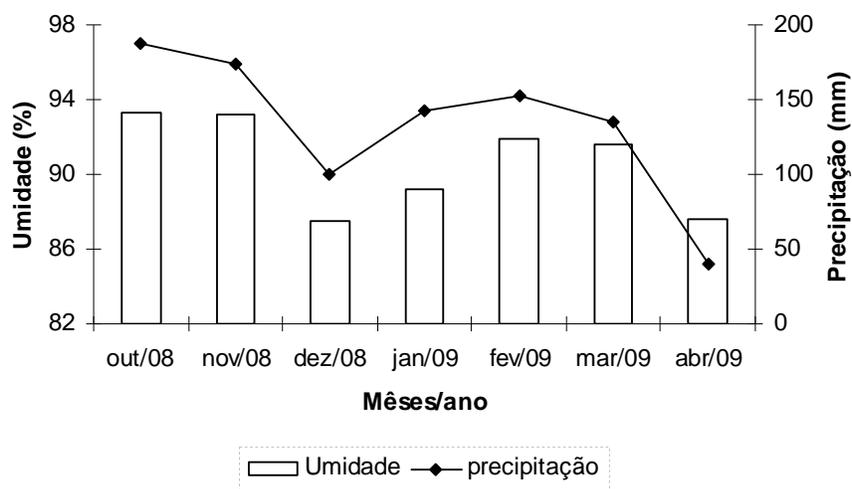


Figura 1. Valores médios mensais de precipitação (mm) e umidade relativa do ar (%), durante o ciclo 2009, para a Região de São Joaquim-SC.

A quantificação das unidades térmicas necessárias para a videira completar as diferentes fases do ciclo produtivo fornecem ao viticultor o conhecimento das prováveis datas de colheita, indicando o potencial climático da região para o cultivo da videira. Dentre os índices climáticos com aplicação na viticultura, destacam-se a soma térmica (GD) e o índice heliotérmico (IH), relacionados às exigências térmicas das diferentes variedades assim como dos diferentes clones de uma mesma variedade, correlacionando a qualidade da vindima com a tipicidade dos vinhos (TONIETTO; CARBONNEAU, 2004).

O somatório de graus-dias (GD) acumulado durante os estádios fenológicos do ciclo 2009 para os dois clones estão representados na Figura 2, sendo que os valores encontrados para os dois clones avaliados foram muito semelhantes.

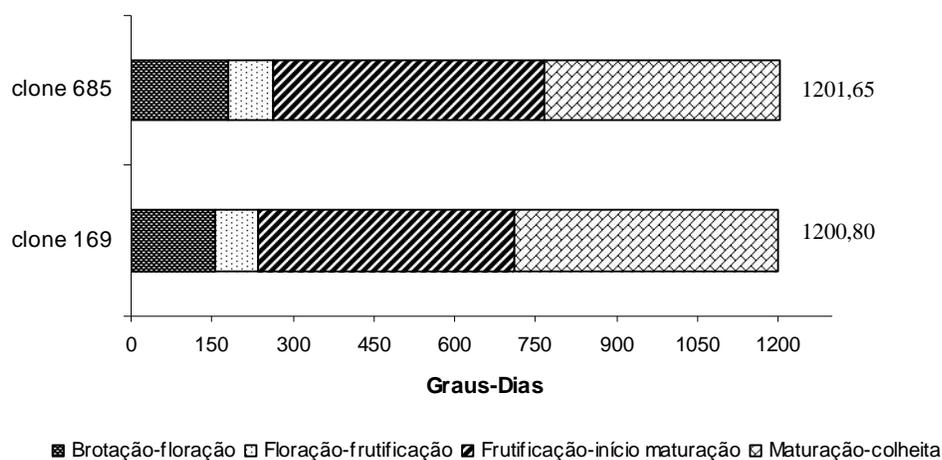


Figura 2. Requerimento térmico (Graus-Dias – base 10°C) para os períodos das principais fases fenológicas: Brotação à Floração, Floração à Frutificação, Frutificação ao Início da Maturação e do Início da Maturação até a Colheita, dos clones 169 e 685 da variedade Cabernet Sauvignon, safra 2009.

O requerimento térmico da videira é diretamente relacionado a duração do período que vai da brotação até a colheita, o qual explica a semelhança dos GD entre os clones, pois estes apresentaram semelhante duração do ciclo fenológico. Resultados de acordo com este, foram evidenciados por Fallahi et al. (2005) em pesquisas realizadas com diferentes clones de diferentes variedades de uvas, os autores observaram não

haver diferença significativa na soma térmica (GD) para clones da variedade Cabernet Sauvignon, quando avaliados em mesma safra. No entanto, a soma térmica dos clones 685 e 169, em cada fase fenológica, diferiu significativamente ($p < 0,05$), pois o período de duração também foi diferente. O clone 169 apresentou maior requerimento térmico no período do início da maturação até a colheita (488,4 GD), enquanto para o clone 685 foi no período de frutificação até o início da maturação que apresentou maiores valores (501,75 GD). Os resultados obtidos de aproximadamente 1200 graus-dias para a safra 2009 classificam a região de São Joaquim como Região I (<1389 GD), que é uma região fria de acordo com a Escala de Winkler (WINKLER et al., 1974).

Pesquisas realizadas por Falcão (2007) e Gris et al. (2010) também demonstraram que a região de São Joaquim pertence a Região I nesta classificação. De acordo com Tonieto e Carbonneau (2004) locais com classificação próxima tendem a pertencer a mesmos grupos climáticos, e conseqüentemente, apresentam características semelhantes na tipicidade do vinho. Dentre os regiões vitivinícolas do mundo classificadas na mesma Região I que São Joaquim estão o Vale do Reno na Alemanha, as regiões de Champagne e Côte d'Or na França e a região de Puget Sound nos Estados Unidos. Pesquisas têm demonstrado diferentes demandas térmicas para a variedade Cabernet Sauvignon procedente das diferentes regiões vitícolas do Brasil e também de outros países, pois dentre os fatores que influenciam estão a altitude, latitude e o clima (TESIC et al., 2001; ROBERTO et al., 2005; SANTOS et al., 2007).

O índice heliotérmico (IH) é amplamente utilizado na viticultura, principalmente para classificar regiões vitícolas, avaliar as condições climáticas para a adaptação da videira, monitorar o desenvolvimento bioquímico e fisiológico das variedades e dos respectivos clones, e acompanhar os estádios fenológicos e a maturação das uvas (BARBEAU et al., 1998; TONIETTO; CARBONNEAU, 2004). Na Figura 3 estão apresentados os valores de IH, onde se verifica o somatório do cálculo diário de IH durante os períodos fenológicos entre a brotação e a colheita.

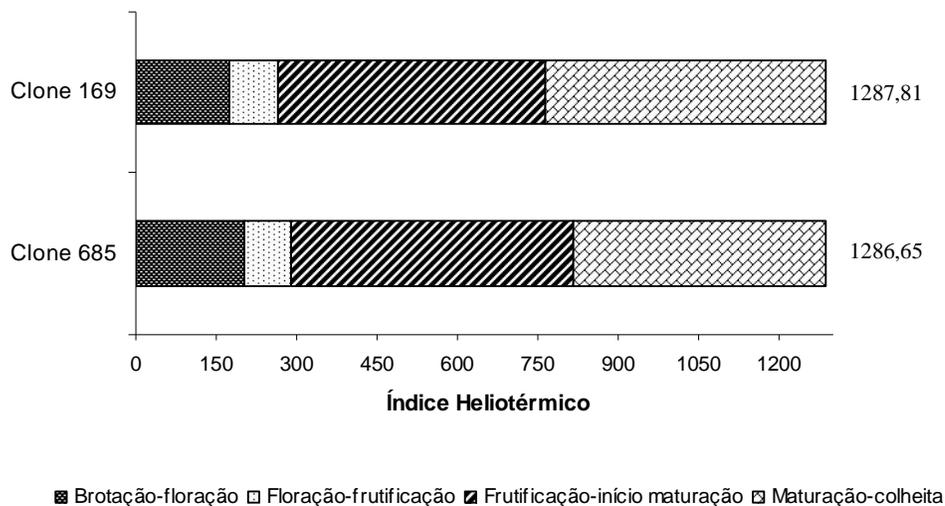


Figura 3. Somatório do Índice Heliotérmico acumulado durante as principais fases fenológicas para os clones 169 e 685 da variedade Cabernet Sauvignon, safra 2009.

Os índices para atingir a maturação para os dois clones, safra 2009, foram muito semelhantes. Com base na Classificação Climática Multicritério (CCM), desenvolvida por Tonietto e Carbonneau (2004), os valores encontrados de IH classificam esta região como IH₁, denominada de Região muito fria (≤ 1500). De acordo com os valores de IH, no Brasil há diferentes regiões vitícolas, como por exemplo, a região de Bento Gonçalves, pólo vitícola na Serra Gaúcha, considerada uma região de clima temperado quente (IH₄) ($>2100 \leq 2400$) (BRIGUENTI; TONIETTO, 2004).

Em geral, foi verificado que os parâmetros climáticos avaliados para a região de São Joaquim foram apropriados para o desenvolvimento fenológico dos dois clones, assim como para o período de maturação das uvas Cabernet Sauvignon, safra 2009.

A Tabela 1 apresenta as datas de ocorrência dos estádios fenológicos e na Figura 4 observa-se a duração total do período entre a brotação e a colheita na safra 2009, para os dois clones avaliados.

Tabela 1. Datas do início da ocorrência das fases fenológicas dos dois clones da variedade Cabernet Sauvignon, safra 2009.

Fases Fenológicas	Clone 685	Clone 169
Brotação	09/10/2008	03/10/2008
Floração	25/11/2008	12/11/2008
Frutificação	10/12/2008	05/12/2009
Maturação	19/02/2009	12/02/2009
Colheita	01/05/2009	29/04/2009

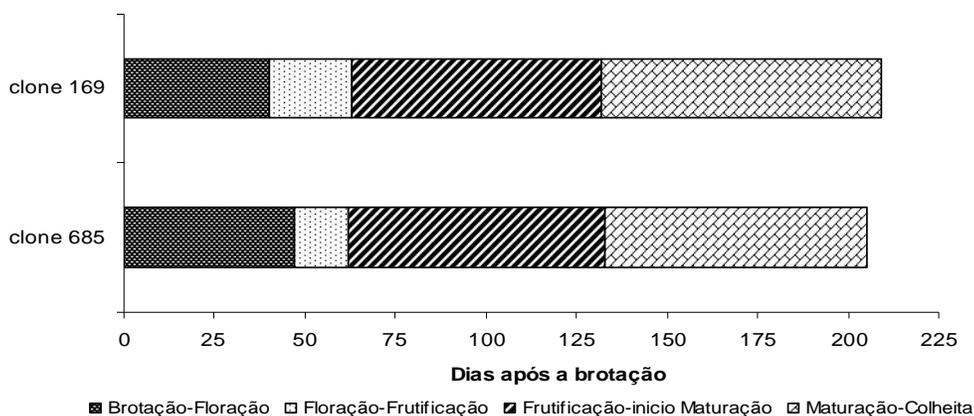


Figura 4. Duração dos eventos fenológicos, a partir da brotação, para os clones 685 e 169 da uva Cabernet Sauvignon, safra 2009.

Observou-se pequenas diferenças na duração das fases fenológicas dos dois clones, sendo que o clone 169 apresentou o ciclo de 209 dias e o clone 685 de 205 dias. Regina e Audeguim (2005) avaliaram 3 clones da variedade Syrah e também observaram haver diferenças de apenas 4 dias no período da colheita das uvas dos diferentes clones, não havendo diferença na duração das fases fenológicas. Além disto, foram observadas diferenças no período entre a floração e frutificação em que o clone 169 também apresentou maior duração (23 dias). Ewart et al. (1993) ao avaliar clones da variedade Sauvignon Blanc, de mesma safra, observaram pequenas diferenças no período que abrange o início da maturação até colheita dos clones cultivados no sul da Austrália.

Pesquisas realizadas com a variedade Cabernet Sauvignon evidenciaram diferentes períodos de duração para as fases fenológicas. Falcão et al. (2008b) em estudos realizados com esta mesma variedade, provenientes também do Estado de Santa Catarina, observaram uma variação do ciclo fenológicos entre os diferentes locais avaliados, sendo que para São Joaquim a duração foi de 211 dias para a safra 2005/06, o qual se mostra próximo ao encontrado neste trabalho referente a safra 2009. Em consequência do regime térmico, a duração do período que vai da brotação à colheita das uvas é maior em São Joaquim quando comparado com outras regiões vitícolas brasileiras, como por exemplo, no Estado do Paraná foi registrado para a variedade Cabernet Sauvignon um ciclo fenológico de 126 dias (Roberto et al., 2005). Segundo Jones e Davis (2000) na região de Bordeaux na França, a duração do ciclo para a mesma variedade foi de 193 dias. Estas diferenças observadas na duração dos ciclos podem ser atribuídas as diferentes condições climáticas de cada região vitícola.

3.2 Caracterização dos clones quanto a Área foliar e Componentes de rendimento

A determinação da área foliar (AF) é um parâmetro de extrema importância para a viticultura, pois fornece informações das relações entre fotossíntese e produtividade da planta, assim como do potencial qualitativo dos frutos (LOPES; PINTO, 2005). A área foliar total de cada clone foi determinada a partir dos resultados da análise de regressão, efetuados com a área foliar real (AF) e as medidas dos resultados do comprimento das nervuras principal (NP) e laterais direita (NLD) e esquerda (NLE) e suas combinações. A equação utilizada foi aquela considerando AF x somatório do comprimento das nervuras laterais (NLD + NLE), pois apresentou, para os dois clones, maior coeficiente de determinação ($R^2 > 0,9$), o qual está de acordo com pesquisa realizada por Santesteban e Royo (2006) que também utilizaram a soma das nervuras laterais para expressar a AF.

Pode-se observar (Tabela 2) que os clones diferiram significativamente ($p < 0,05$) em relação AF, sendo que o clone 685 apresentou maior área foliar por planta (m^2). É importante ressaltar que o clone com maior AF também apresentou resultados superiores em relação as componentes de rendimento, o que está de acordo com outros pesquisadores que afirmam que a AF é dependente do vigor da planta (CANDOLFI-VASCONCELLOS; KOBLET, 1990; SANTESTEBAN; ROYO, 2006).

Tabela 2. Caracterização dos clones 685 e 169 da variedade Cabernet sauvignon, safra 2009, procedente da região de São Joaquim, SC.

	<i>Clone 685</i>	<i>Clone 169</i>
Número de ramos	23 ^a	15 ^b
Número de folha / ramo	16 ^a	21 ^b
Comprimento do ramo (m)	1,48 ^a	1,38 ^b
Produtividade da planta (Kg)	4,05 ^a	2,19 ^b
Número de cachos / planta	31,17 ^a	20,64 ^b
Peso do cacho (g)	146,8 ^a	113,9 ^b
Número de bagas / cacho	96 ^a	85 ^b
Peso da baga (g)	1,3 ^a	1,2 ^b
Peso da semente (g) (n=50)	2,2 ^a	2,1 ^b
Número de semente / baga	1,3 ^a	1,3 ^a
Area foliar / planta (m ²)	6,31 ^a	4,04 ^b

Resultado expresso em valores médios. Letras diferentes em mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os clones.

Observou-se que o clone 685 apresentou uma produtividade significativamente maior ($p < 0,05$) que o clone 169, safra 2009. Este mesmo clone também apresentou maior número de cachos por planta o que está associado ao peso dos cachos e ao número de bagas, que também foram superiores (Tabela 2). Pesquisadores afirmam que esta diferenciação do tamanho e peso das bagas reflete em uvas com teores de sólidos distintos e está diretamente relacionado aos índices de chuvas no período de maturação (RIZZON; MIELE, 2006), assim como a produtividade está positivamente relacionada a duração dos ciclo fenológico (GRANJEIRO; LEÃO; SOARES, 2002). Além disto, Mota et al. (2009) também verificaram que o porta-enxerto influencia significativamente na produtividade das variedades. No entanto, neste trabalho os clones foram procedentes de mesma safra, apresentaram semelhante duração do período fenológico, como também foram cultivados em mesmo local, sob mesmo pota-enxerto, podendo atribuir as diferentes características encontradas exclusivamente as características genéticas de cada clone.

Trabalhos que estão de acordo com as diferenças encontradas para os dois clones avaliados neste estudo, foram evidenciados por Wolpert, Kasimatis e Verdegaal (1995) que avaliaram 7 clones da variedade Cabernet Sauvignon cultivados na Califórnia, e

observaram haver diferenças significativas na produtividade dos clones, assim como no peso dos cachos e das bagas. Estudos realizados com 20 clones da variedade Pinot Noir demonstraram haver diferenças nas componentes de rendimento, produtividade e peso dos cachos (CASTAGNOLI; VANSCONCELOS, 2006). Alonso, Blanco e Rodriguez (2004) evidenciaram em estudo com clones da variedade Albariño a existência de variabilidade agrônômica entre os clones, sendo que estes diferiram quanto a produtividade, rendimento de mosto por baga, e no potencial alcoólico. Regina e Audeguim (2005) ao avaliar 3 clones da variedade Syrah, observaram haver expressiva diferença em relação a produtividade destes clones.

Análise de correlação foi realizada considerando como nível de significância 5% ($p < 0,05$) e foi possível observar correlação positiva entre a produtividade e a área foliar ($R = 0,8$) para o clone 685 e negativa para o clone 169 ($R = -0,5$), o que está de acordo com os resultados, pois o clone 169 demonstrou menor produtividade. Há pesquisadores que afirmam que variedades com maior área foliar, tendem a ser mais produtiva e com maior vigor e apresentar bagas mais pesadas (SANTESTEBAN; ROYO, 2006). No entanto, Barbeau et al. (1998) também encontraram correlação negativa entre estas duas variáveis para a variedade Cabernet Franc cultivada na França. A produtividade apresentou correlação positiva com o peso e o número de bagas para ambos os clones, apresentando maior correlação para o clone 685 ($R > 0,8$). Além disto, para o clone 685 a produtividade também foi correlacionada positivamente com o número de cachos e para o clone 169 esta correlação foi negativa. Esta maior correlação observada para o clone 685 entre as componentes de rendimento e AF, estão de acordo com pesquisadores que afirmam que a maturação e o desenvolvimento das bagas são relacionados com a fotossíntese, pois o potencial enológico das bagas é diretamente relacionado com a quantidade de luz que a planta é exposta sendo esta dependente da área de folia da planta (MIELE, 1989; HUNTER; VISSER, 1990; SANTESTEBAN; ROYO, 2006).

3.3 Avaliação do período de maturação

Os indicativos mais utilizados para determinar a qualidade do mosto das uvas para a vinificação são o pH, sólidos solúveis e acidez, no entanto, somente estes fatores não são suficientes para avaliar a qualidade da uva para elaboração de vinhos de alta qualidade. Assim, foram avaliados parâmetros referentes a maturação fenólica

(polifenóis totais e antocianinas monoméricas totais) e maturação tecnológica (parâmetros físico-químicos e ácidos orgânicos) para os dois clones da uva Cabernet Sauvignon, 685 e 169, safra 2009 (Figuras 5 e 6). A Tabela 3 demonstra a composição química final do mosto no período da colheita.

O comportamento da evolução dos sólidos solúveis totais para os dois clones foi muito semelhante, registrando um aumento progressivo até o final da maturação, atingindo valores finais de 23,5 e 24,0 °Brix para o clone 169 e 685, respectivamente. Apesar de ser observado diferença estatística entre os resultados (Tabela 3), esta variação (0,5 °Brix), não demonstra significado enológico para diferenciar o mosto dos dois clones. Esta semelhança nos teores de SST pode estar relacionada com o peso das bagas dos clones, que também apresentaram tamanhos semelhantes (Tabela 3).

Os valores de pH apresentaram crescente aumento até a 5ª coleta decaindo até o final da maturação, atingindo valores finais de 3,49 e 3,51 para o clone 685 e 169, respectivamente (Tabela 3), não apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) no pH final. Segundo Rizzon e Miele (2002) valores de pH abaixo de 3,3 podem interferir negativamente na qualidade do vinho, no entanto, Amerine e Ough (1976) afirmam que valores superiores a 3,6 também podem interferir negativamente na estabilidade do vinho. A avaliação do pH do mosto das uvas é de extrema importância, pois este interfere diretamente na cor dos vinhos, na deterioração microbiana e no processo de fermentação. Observou-se durante a maturação, uma queda brusca nos valores de acidez total (ATT) para os dois clones, no mesmo período que houve aumento do pH, registrado até 50º dias após o início da véraison. Esta mesma tendência da diminuição da acidez total ao longo da maturação também foi observada por Falcão et al. (2007) ao avaliar uvas Cabernet Sauvignon e por Gris et al. (2010) ao avaliar diferentes variedades de uvas cultivadas na região de São Joaquim, SC. A diminuição da acidez com a maturação, resulta de vários fatores, como aumento da respiração pela planta, redução da translocação dos ácidos da folha para o fruto, transformação dos ácidos em outros compostos, efeito da diluição devido aumento do volume da baga e a redução da capacidade da fruta em sintetizar ácidos orgânicos neste período (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Os dois clones diferiram significativamente no teor de acidez total. Foi obtida correlação significativa, $R = 0,88$ e $R = 0,86$, entre a diminuição dos valores de pH e o aumento da acidez ao longo do período da maturação para os clones 169 e 685, respectivamente.

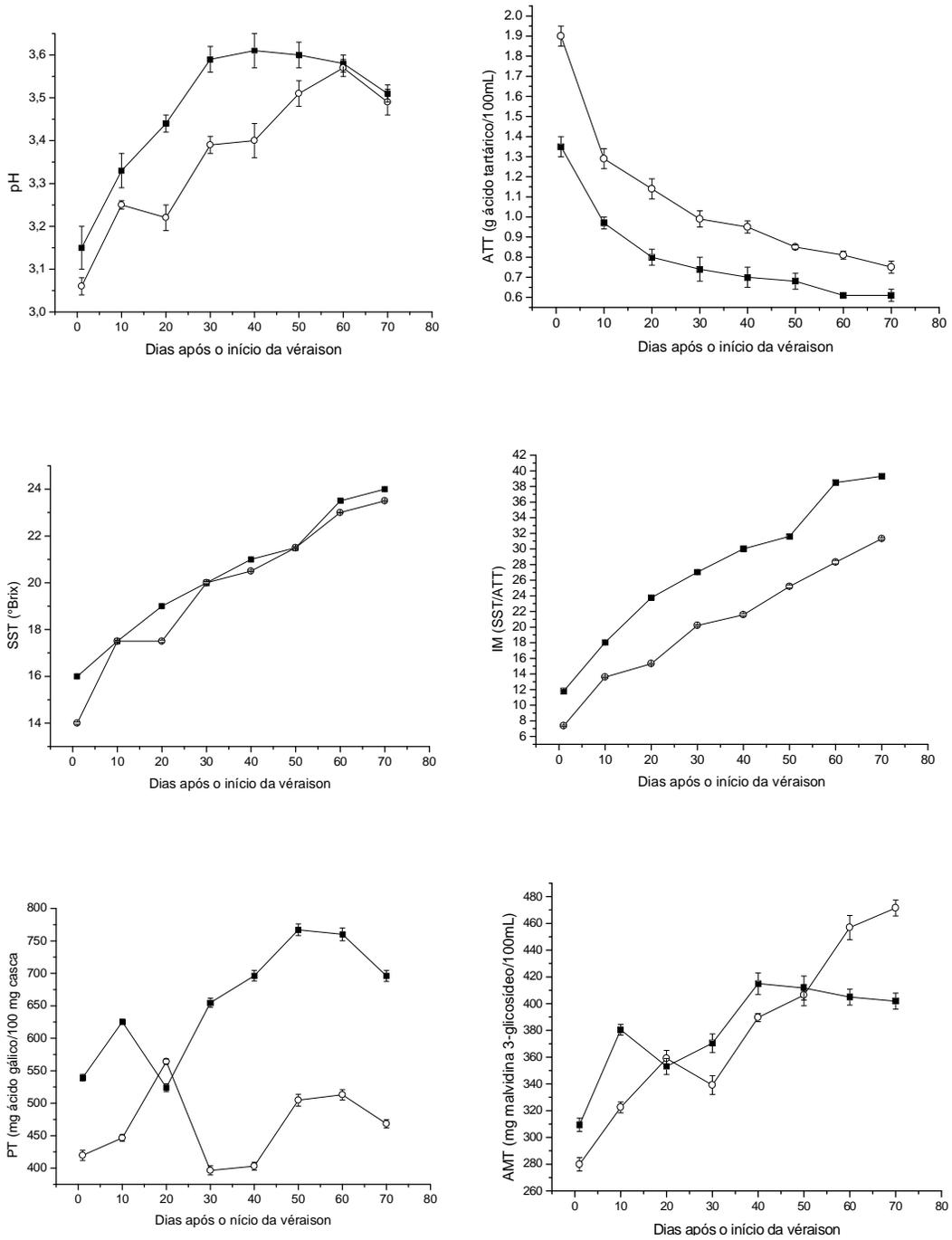


Figura 5. Evolução do pH, acidez total titulável (ATT), sólidos solúveis totais (SST, °Brix), índice de maturação (IM), polifenóis totais (PT) e antocianinas monoméricas totais (AMT) de dois clones da uva Cabernet Sauvignon: clone 169 (—■—) clone 685 (—○—), safra 2009.

Tabela 3. Resultado das análises realizadas para os dois clones, 685 e 169, da uva Cabernet Sauvignon no período da colheita, safra 2009.

	<i>Clone 685</i>	<i>Clone 169</i>
Sólidos solúveis totais (°Brix)	23,5 ± 0,02 ^a	24,0 ± 0,03 ^b
pH	3,49 ± 0,01 ^a	3,51 ± 0,02 ^a
Acidez total [*]	0,75 ± 0,08 ^a	0,61 ± 0,06 ^b
Índice de maturação	31,3 ± 0,11 ^a	39,3 ± 0,09 ^b
Antocianinas totais ^{**}	471,49 ± 5,63 ^a	401,87 ± 3,51 ^b
Polifenóis totais ^{***}	468,37 ± 8,54 ^a	685,98 ± 6,32 ^b
Intensidade da cor ^{****}	14,11 ± 0,08 ^a	11,19 ± 0,09 ^b
Tonalidade da cor ^{****}	0,38 ± 0,02 ^a	0,38 ± 0,03 ^a
Abs 420 nm ^{****}	3,812 ± 0,01 ^a	2,995 ± 0,02 ^b
Abs 520 nm ^{****}	9,912 ± 0,02 ^a	7,841 ± 0,01 ^b
Abs 620 nm ^{****}	0,390 ± 0,01 ^a	0,350 ± 0,00 ^a
Ácido tartárico ^{*****}	2,41 ± 0,12 ^a	4,01 ± 0,10 ^b
Ácido málico ^{*****}	3,73 ± 0,15 ^a	2,38 ± 0,11 ^b
Ácido láctico ^{*****}	nd	nd
Ácido cítrico ^{*****}	0,08 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,01 ^b
Ácido succínico ^{*****}	0,69 ± 0,02 ^a	0,73 ± 0,02 ^b
Ácido tartárico/ácido málico	0,65	1,68

^{*} mg de ácido tartárico / 100 mL de mosto; ^{**} mg de malvidina 3-glicosídeo / 100 g de casca; ^{***} mg de ácido gálico / 100 g casca; ^{****} valores de absorvância; ^{*****} g/L de mosto. Valores médios ± desvio padrão. Letras diferentes em mesma linha indicam diferença significativa entre as médias (Teste de Tukey, p<0,05).

O índice de maturação (IM) que representa o balanço entre o teor de açúcar e a acidez do mosto, conferindo um equilíbrio gustativo ao vinho, torna este índice muito utilizado como um marcador para realizar a colheita da uva (MOTA et al., 2006). Os clones apresentaram aumento progressivo do IM até a 6ª coleta das uvas, para o clone 169 o valor permaneceu constante até a colheita e para o clone 685 o aumento não foi muito intenso. Os clones 169 e 685 apresentaram valores finais de IM igual a 31,3 e 39,3, respectivamente. Estes valores indicam que houve um bom amadurecimento das

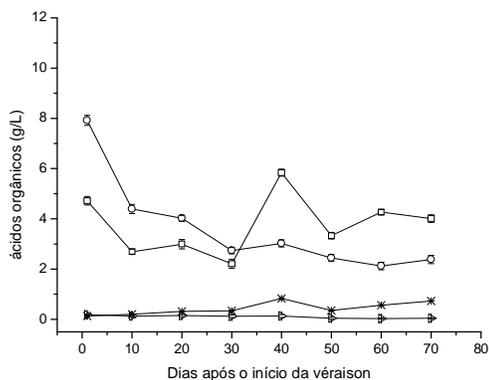
bagas, o que de acordo com Rizzon e Miele (2003) os valores de IM devem estar próximos a 30, enquanto que Amerine et al. (1980) indicam valores entre 37 e 39. Os valores de IM encontrados para os dois clones da variedade Cabernet Sauvignon cultivada em São Joaquim, SC, são superiores aqueles encontrados para a mesma variedade procedente do Estado do Rio Grande do Sul (RIZZON; MIELE, 2002), o qual pode estar associado aos maiores teor de SST encontrados para as uvas cultivadas no Estado de Santa Catarina.

Em relação a evolução dos polifenóis totais (PT) e antocianinas monoméricas totais (AMT) os clones apresentaram características distintas. Foi observado um aumento no teor de AMT no decorrer do período de maturação para os dois clones, sendo que o clone 685 apresentou maior concentração final (471,49 mg/100g casca) (Tabela 3). Os valores de PT para o mosto dos clones diferiram significativamente, em que o clone 169 apresentou concentração superior (685,98 mg/100 g casca). Os dois clones apresentaram aumento no teor de PT até a 7^a coleta, observando uma queda no conteúdo no período final da maturação. Outros pesquisadores também observaram este comportamento da concentração fenólica no final da maturação, atribuindo as condições ambientais que ocorrem neste período (JONES; DAVIS, 2000; RYAN; REVILLA, 2003; GRIS et al., 2010). Pesquisas demonstram que o acúmulo de compostos fenólicos nas bagas das uvas é favorecido por baixas temperaturas durante o período de maturação (MAZZA; MINIATI, 1993; MORI; SUGAYA; GEMMA, 2005), o qual foi evidenciado na região de São Joaquim, safra 2009, o que pode explicar a elevada concentração fenólica das uvas. Contudo, os dois clones foram avaliados sob mesmo local, influenciados pela mesma temperatura, assim as diferenças observadas no teor final de PT e AMT, sugerem que estes clones apresentam características distintas em relação ao conteúdo fenólico. Estudos realizados durante o período de maturação das uvas de três clones da variedade Syrah, a fim de demonstrar a ocorrência de alterações na composição das uvas, evidenciaram haver diferenças cinéticas na formação de açúcares e de antocianinas individuais entre os clones (ROGGERO; COEN; RAGONNET, 1986). No entanto, Castagnoli e Vansconcelos (2006) ao avaliar 20 clones da variedade Pinot Noir observaram que o teor de antocianinas nas cascas foi muito semelhante entre os clones.

O perfil e a concentração do nível de ácidos orgânicos são correlacionados com a variedade da uva, o tipo de clone, localização do vinhedo e técnicas de vinificação. A

acidez da uva na maturação deve-se principalmente aos ácidos tartárico e málico, encontrados em todas as partes da videira (RIBÉREAU-GYON et al., 2006). A evolução dos ácidos orgânicos é muito utilizada para avaliar o processo de maturação da uva. Estes ácidos exercem importante papel nas propriedades organolépticas do vinho. O comportamento dos ácidos orgânicos observados neste estudo, no decorrer do período avaliado, está de acordo com dados reportados por outros pesquisadores (LAMIKANRA et al., 1995; RIZZON; SGANZERELA, 2007). Para os dois clones (Figura 6), o ácido predominante no início do período da maturação foi o málico, pois este é intensamente sintetizado no período da brotação e frutificação, sendo que houve diminuição da sua concentração ao longo do período de maturação, por predominar reações de degradação em relação á síntese. No decorrer da maturação, houve também diminuição da concentração do ácido tartárico e em menor intensidade do ácido cítrico. Dentre estes ácidos, a maior taxa de degradação foi do ácido málico, com perda de aproximadamente 70 % da sua concentração inicial, para os dois clones, o que está de acordo com Rizzon e Sganzerela (2007) que afirmam que o teor de ácido málico diminui de forma constante e mais rápida comparado com os outros ácidos presentes nas uvas. Esta redução do ácido málico está diretamente relacionada a diminuição da acidez do mosto observado durante este período (Figura 5). Foi também observado um pequeno aumento na concentração do ácido succínico para os dois clones no final da maturação, o qual não exerceu influencia significativa no pH final do mosto, pois este aumentou no decorrer do período de maturação de acordo com a diminuição dos ácidos majoritários. Não foi detectado em nenhuma das amostras, a presença do ácido láctico, o qual não está presente naturalmente nas uvas, sendo originado no vinho através da fermentação malolática.

(A-169)



(A-685)

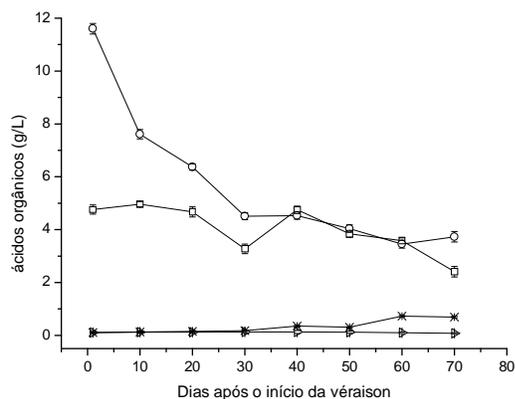


Figura 6. Evolução do conteúdo de ácidos orgânicos após o início da maturação até a colheita das uvas Cabernet Sauvignon, safra 2009, local A, clones 169 e 685. Ácido tartárico (—□—); ácido málico (—○—); ácido cítrico (—▷—); ácido succínico (—×—).

No período da colheita das uvas (Tabela 3), os clones apresentaram diferentes ácidos predominantes no mosto, para o clone 685 a maior concentração foi do ácido málico, enquanto para o clone 169 predominou maior teor de ácido tartárico. Esta diferença no conteúdo final pode ser atribuída ao clone 685 apresentar maior área foliar, pois a síntese do ácido málico ocorre principalmente nas folhas o que pode explicar a maior concentração no início da maturação, pois a taxa de degradação deste ácido foi similar para os dois clones ao longo da maturação. De acordo com Rizzon e Sganzerla (2007) a capacidade de sintetizar ou degradar o ácido málico pode variar entre as variedades de uva, podendo também ser diferente entre os clones de uma mesma variedade.

A concentração final encontrada no mosto dos ácidos tartárico e málico estão de acordo com aqueles reportados por Rizzon e Sganzerla (2007) para o mosto de uvas procedentes do Estado do Rio Grande Sul, e por Zheng et al. (2009) para mostos de uvas Cabernet Sauvignon cultivadas na Austrália. O baixo teor evidenciado para os ácidos succínico e cítrico no final da maturação estão de acordo com dados reportados na literatura, para uvas *Vitis vinifera* (LAMIKANRA et al., 1995, SOYER et al., 2003; ZHENG et al., 2009).

Ribéreau-Gayon et al. (2006), afirmam que a degradação dos ácidos orgânicos são influenciadas pelas temperaturas, disponibilidade de água e condições de produção. No entanto, como os dois clones avaliados foram submetidos as mesmas condições, estas diferenças encontradas na concentração e no tipo de ácido predominante podem ser atribuídas unicamente a característica química particular de cada clone.

No final da maturação das uvas na safra 2009 foi observado através de análise de correlação, considerando como nível de significância 5 % ($p < 0,05$), que a ATT foi correlacionada positivamente com os ácidos málico ($R = 0,96$) e cítrico ($R = 0,89$), para os dois clones avaliados. De acordo com Rizzon e Miele (2003) a ATT das uvas apresenta maior correlação com o teor de ácido tartárico, no entanto os dois clones apresentaram correlação menor que 0,65 com este ácido. Os resultados de PT, AMT, IC (Tabela 3), demonstram boa maturação fenólica para os dois clones, o que estão de acordo com outras pesquisas para elaboração de vinhos de qualidade (RIZZON; MIELE, 2002; NAVARRO et al., 2008; SEGADE; VÁZQUEZ; LOSADA, 2008). Os dois clones demonstraram diferenças significativas no teor final dos compostos relacionados com os parâmetros de cor (IC, Abs 420 e 520 nm, AMT) e o conteúdo de PT. Além disto, foi observada correlação significativa ($p < 0,05$) caracterizando o clone 685 com os atributos de cor ($R > 0,9$), enquanto o 169 apresentou maior correlação com o teor de PT ($R > 0,9$), sugerindo que os dados da maturação fenólica podem ser utilizados como ferramenta para diferenciar estes clones.

Resultados semelhantes ao deste trabalho na diferenciação de clones de mesma variedade de uva foram obtidos por Zamuz, Martínez e Vilanova (2007) que analisaram diferentes clones da variedade Albariño (*Vitis vinifera*) todos procedentes do mesmo local e da mesma safra. Os autores observaram que houve diferença significativa, com 99,9 % de probabilidade, em relação aos parâmetros físico-químicos (pH, sólidos solúveis totais, acidez total e índice de maturação) determinados no mosto das uvas no período da colheita. Eles evidenciaram que os parâmetros clássicos determinados no período da colheita das uvas podem ser usados como ferramenta para diferenciar clones de uma mesma variedade de uva. Ferrandino e Guidoni (2010) avaliaram diferentes clones da variedade Barbera (*Vitis vinifera*), cultivados em mesmo local, no período da colheita, em safras distintas. Os autores observaram que os dados de maturação, como pH, sólidos solúveis e acidez total apresentaram diferença significativa com 99,9 % de

probabilidade ($p < 0,0001$) entre os diferentes clones, sendo que para o peso das bagas a diferença encontrada foi considerando 95 % de probabilidade ($p < 0,05$).

Com o objetivo de identificar as variáveis que podem diferenciar os clones, foi realizado Análise de Componentes Principais (ACP) (Figura 7) a partir dos dados de composição da uva na colheita, safra 2009 que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para os dois clones avaliados, a fim de identificar as diferenças mais importantes entre as amostras e relacionar com a composição química e com o respectivo clone. Foi possível observar que CP1 x CP2 explicaram 99,33 % da variabilidade total dos dados. A primeira componente que representa 96,78 % variabilidade total, pode ser denominada de “clone”, pois os dois clones da uva Cabernet Sauvignon, 169 e 685, apresentaram-se distribuídos ao longo da CP1, demonstrando evidente separação das amostras. As variáveis de cor (AMT, Abs 420, Abs 520, IC), ácidos málico e cítrico e acidez total titulável mostram-se fortemente negativamente correlacionadas com o CP1, sendo estas fortemente correlacionadas entre si. O clone 685 apresentou alta correlação com os parâmetros de cor enquanto o clone 169 mostrou forte correlação com PT, IM, e ácidos tartárico e cítrico. Ferradino e Guidone (2010) observaram que através da Análise de Componentes Principais foi possível diferenciar clones de mesma variedade de uva, sendo que a utilização dos dados de maturação permitiu obter ótima separação dos clones independente da safra analisada, indicando que a determinação destes parâmetros enológicos clássicos podem ser utilizados como ferramenta para diferenciar clones de mesma variedade de uva.

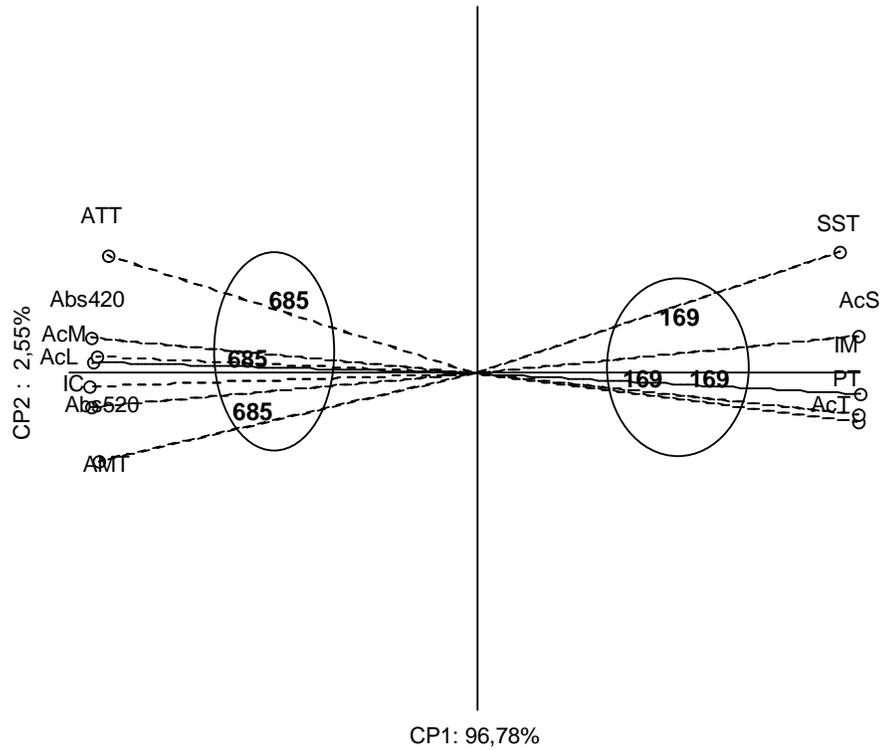


Figura 7. Análise de Componentes Principais realizada com os resultados significativos da composição das uvas na colheita dos dois clones da uva Cabernet Sauvignon, 169 e 685, safra 2009. ATT, acidez total titulável; SST, sólidos solúveis totais; Abs420, absorvância em 420 nm; Abs520, absorvância em 520 nm; AcM, ácido málico; AcL, ácido lático; AcS, ácido succínico; AcT, ácido tartárico; IM, índice de maturação; IC, intensidade da cor; AMT, antocianinas monoméricas totais; PT, polifenóis totais.

4 Conclusão

Os clones 169 e 685, apresentaram comportamento semelhante em relação a duração do ciclo fenológico, assim como na evolução dos compostos avaliados durante o período de maturação. Os clones apresentaram diferenças em relação as características químicas, e as componentes de rendimento, observando que o clone 685 apresentou maior produtividade, com conseqüente maior número de cachos e bagas. Análise de Componentes Principais e análise de correlação demonstraram que o clone 685 apresentou maior correlação com as características de cor, principalmente antocianinas monoméricas, enquanto o clone 169 caracterizou-se por apresentar maior correlação com polifenóis totais. Estes resultados sugerem que a composição química e as características físicas são atribuídas exclusivamente a cada clone e podem ser utilizadas como ferramenta para a caracterização e diferenciação de diferentes clones de mesma variedade de uva.

Conclusões Gerais

Considerando que os compostos fenólicos flavonóides e não-flavonóides são importante parâmetro de qualidade em vinho, neste trabalho foi desenvolvido e validado uma metodologia para determinação simultânea através de cromatografia líquida de alta eficiência dos principais compostos fenólicos em vinho tinto. O método proposto apresentou excelente precisão, exatidão, limites de detecção e recuperação para os fenólicos presentes nos vinhos. A separação cromatográfica dos compostos avaliados foi satisfatória. Assim, este método pode ser usado para determinar os compostos fenólicos em diferentes amostras de vinho, como também caracterizar e diferenciar estas amostras.

Foram observadas diferença significativa entre os clones 685 e 169 tanto para as uvas Cabernet sauvignon como para os respectivos vinhos, safra 2008, em relação as famílias de compostos fenólicos determinadas neste estudo. Os vinhos apresentaram alta atividade antioxidante, para os três métodos avaliados, o vinho produzido com o clone 169 foi o que demonstrou maiores valores. Correlação positiva foi encontrada para todos os compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos vinhos, sendo que a catequina apresentou maior correlação seguida pelo polifenóis totais e polifenóis polimerizados. Os vinhos safra 2008 apresentaram as características de acordo com o clone que foram produzidos, o clone 169 demonstrou predomínio do teor de polifenóis enquanto o clone 685 predominou o conteúdo de antocianinas, tanto nas uvas como no vinho. Os principais compostos fenólicos determinados neste trabalho podem ser utilizados como ferramenta para a classificação e discriminação dos diferentes clones. As uvas dos clones 169 e 685, safra 2009, apresentaram diferenças em relação as características químicas, e as componentes de rendimento, observando que o clone 685 apresentou maior produtividade, com conseqüente maior número de cachos e bagas.

Os resultados foram confirmados através de análises multivariadas, em que a Análise de Componentes Principais demonstrou a correlação de cada clone com as variáveis analisadas e juntamente com a Análise de Cluster foi observada separação e agrupamento das amostras de vinho de acordo com o clone. Estes resultados sugerem que a composição química e as características físicas são atribuídas exclusivamente a cada clone e podem ser utilizadas como ferramenta para a caracterização e diferenciação de diferentes clones de mesma variedade de uva.

Referências Bibliográficas

- ABRIL, M.; NEGUERUELA, A.I.; PÉREZ, C.; JUAN, T.; ESTOPAÑÁN, G. Preliminary study of resveratrol content in Aragón red and rosé wines. **Food Chemistry**, v.92, p.729-736, 2005.
- ALCALDE-EON, C.; ESCRIBANO-BAILÓN, M. T.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing A comprehensive study. **Analytica Chimica Acta**, v.563, p.238-254, 2006.
- ALÉN-RUIZ, F.; GARCÍA-FALCÓN, M.S.; PÉREZ-LAMELA, M.C.; MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; SIMAL-GÁNDARA, J. Influencia of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. **Food Chemistry**, v.113, p.53-60, 2009.
- ALONZO, S.B.; BLANCO, J.L.S.; MARTÍNEZ-RODRIGUEZ, M.C. Intravarietal agronomic variability in *vitis vinifera* L. cv. Albariño. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.55, p.279-282, 2004.
- ÁLVAREZ, I.; ALEIXANDRE, J.L.; GARCÍA, M.J.; LIZAMA, V. Impacto of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. **Analytica Chimica Acta**, v.563, p.109-115, 2006.
- ALONSO, S.B.; BLANCO, J.L.S.; RODRIGUEZ, M.C.M. Intravarietal agronomic variability in *Vitis vinifera* L. cv. Albariño. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.55, p.279-282, 2004.
- AMERINE, A. M.; OUGH, S. C. **Análisis de Vinos y Mostos**, Acribia: Zaragoza, p.89-99, 1976.
- AMERINE, M. A., BERG, H. W.; KUNKEE, R. E.; OUGH, C. S.; SINGLETON, V. L.; WEBB, A. D. **The Technology of Wine Making**, 4th Edition, AVI Publishing Company, Inc., Westport, Conn., 1980. 794 p.
- AMORIM, D. A., REGINA, M. A., FÁVERO, A. C., MOTA, R. V., PEREIRA, G. E. Elaboração de vinho tinto. **Informe Agropecuário**, v.27, p.65-76, 2006.
- ARNOUS, A.; MAKRIS, D.P.; KEFALAS, P. Correlation of pigment and flavanol content wine antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.15, p.655-665, 2002.
- AUBERT, C. M.; DANGLES, A.; AMIOT, M. J. Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.49, p.170-176, 2001.

AUW, J. M.; BLANCO, V.; O'KEEFE, S. F.; SIMS, C. A. Effect of processing on the phenolics and color of Cabernet Sauvignon, Chambourcin and Noble wines and juices. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 47, p. 279-286, 1996.

BAKKER, J.; PICINELLI, A.; BRIDLE, P. Model wine solutions: Color and composition changes during ageing. **Vitis**, v.32, p.111-118, 1993.

BARBEAU, G.; MORLAT, R.; ASSELIN, C.; JACQUET, A. ; PINARD, C. Comportement du cépage Cabernet Franc dans différents terroirs du Val de Loire. Incidence de la précocité sur la composition de la vendange en année climatique normale. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, v.32, p.69-81, 1998.

BAUTISTA-ORTÍN, A.B.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J.I.; LÓPEZ-ROCA, J.M.; GÓMES-PLAZA, E. The effects of enological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine colour and their dependence on grape characteristics. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, p.546-552, 2007.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v.239, p.70-76, 1996.

BOTELHO, G.; MENDES-FAIA, A. CLÍMACO, M.C. Differences in Odor-Active Compounds of Trincadeira Wines obtained from Five Different Clones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.7393-7398, 2008.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, v.585, p.325-337, 2008.

BOULTON, R.B. The copigmentation of anthocyanins and its role in the colour of red wine: A critical review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.55, p.67-87, 2001.

BOWERS, J. E.; MEREDITH, C. P. The parentage of a classical wine grape Cabernet Sauvignon. **Nature Genetics**, v.16, p.84-87, 1997.

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

BRDE, BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL. **Viticultura em Santa Catarina – Situação atual e perspectivas**, 2005. Disponível em: <www.brde.com.br>. Acesso em: 13 maio 2008.

BRIGHENTI, E.; TONIETTO, J. O clima de São Joaquim para a viticultura de vinhos finos: classificação pelo sistema CCM geovíticola. In **Congresso Brasileiro de Fruticultura**, Florianópolis, Brasil, 2004.

- BURNS, J.; GARDNER, P.T.; O'NEIL, J.; CRAWFORD, S.; MORECROFT, I.; McPHAIL, D.B.; LISTER, C.; MATTHEWS, D.; MACLEAN, M.R.; LEAN, M.E.J.; DUTHIE, G.G.; CROZIER, A. Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity and phenolic content of red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p.220-230, 2000.
- BURNS, J.; GARDNER, P.T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G.G.; LEAN, M.E.J.; CROZIER, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.5795-5808, 2001.
- BURNS, J.; MULLEN, W.; LANDRAULT, N.; TEISSEDE, P. L.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. Variations in the Profile and Content of Anthocyanins in wines made from Cabernet Sauvignon and Hybrid Grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.4096-4102, 2002.
- CADAHÍA, E.; SIMÓN, B.F.; SANZ, M.; POVEDA, P.; COLIO, J. Chemical and chromatic characteristics of Tempranillo, Cabernet Sauvignon and Merlot wines from DO Navarra aged in Spanish and French oak barrels. **Food Chemistry**, v.115, p.639-649, 2009.
- CANDOLFI-VASCONCELLOS, M.C.; KOBLET, W. Yield, fruit quality, bud fertility and starch reserves as a function of leaf removal in *Vitis vinifera* - evidence of compensation and stress recovering. **Vitis**, v.29, p.199-221, 1990.
- CANTOS, E.; ESPÍN, J.C.; FERNÁNDEZ, M.J.; OLIVA, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Post-harvest UV-irradiated grapes as a potential for producing stilbene-enriched red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.1208-1214, 2003.
- CARBONNEAU, A. Analyse de la croissance des feuilles du sarment de vigne: estimation de la surface foliaire par échantillonnage. **Connaissance Vigne Vin**, Bordeaux, v. 10, p.141-159, 1976.
- CASTAGNOLI, S.P.; VASCONVELOSO, M.C. Field performance of 20 Pinot Noir clones in the Willamette Valley of Oregon. **HortTechnology**, v.16, p.153-161, 2006.
- CEREZO, A.B.; TESFAYE, W.; SORIA-DÍAZ, M.E.; TORIJA, M.J.; MATEO, E.; GARCIA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. Effect of Word on the phenolic profile and sensory properties of wine vinegars during ageing. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.23, p.175-184, 2010.
- CHAVARRIA, G.; SANTOS, H.P.; MANDELLI, F.; MARODIN, G.A.B.; BERGAMASCHI, H.; CARDOSO, L.S. Caracterização fenológica e requerimento térmico da cultivar Moscato Giallo sob cobertura plástica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.31, p.119-126, 2009.
- CHEUNG, L. M.; CHEUNG, P. C. K.; OOI, V.E.C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, v.81, p.249-255, 2003.

CHO, Y.J.; CHUN, H.S.; LEE, S.K.; MIN, H.Y. Ultrasonication-assisted extraction of resveratrol from grapes. **Journal of Food Engineering**, v.77, p.725-730, 2006.

CIMINO, F.; SULFARO, V.; TROMBETTA, D.; SAIJA, A.; TOMAINO, A. Radical-scavenging capacity of several Italian red wines. **Food Chemistry**, v.103, p.75-81, 2007.

CLARE, S.S.; SKURRAY, G.R.; SHALLIKER, R.A. Effect of yeast strain selection on the concentration of cis- and trans-resveratrol and resveratrol glucoside isomers in wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.11, p.9-14, 2005.

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

COOMBE, B.G. The regulation of set and development of the grape berry. **Acta Horticulturae**, v.34, p.261-273, 1973.

CRAVERO, M. C.; DI STEFANO, R. I composti fenolici e l'origine varietale delle uve. **Rivista di Viticoltura e di Enologia**, v.1, p.33-44, 1990.

DALLAS, C.; LAUREANO, O. Effects of pH, sulphur dioxide, alcohol content, temperature and storage time on colour composition of a young portuguese red table wine. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.65, p.477-485, 1994.

DALLAS, A.; RICARDO-DA-SILVA, J. M.; LAUREANO, O. Interactions of Oligomeric Procyanidins in Model Wine Solutions Containing Malvidin-3-Glucoside and Acetaldehyde. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 70, p. 493-500, 1996.

DANGLES, O; WIGAND M. C.; BROUILLARD, R. Anthocyanin anti-copigment effect. **Phytochemistry**, v.31, p.3811-3812, 1992.

DE BEER, D.; JOUBERT, E.; GELDERBLUM, W.C.A.; MANLEY, M. Changes in phenolic composition and antioxidant activity of Pinotage, Cabernet Sauvignon, Chardonnay and Chenin Blanc wines during bottle ageing. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v.26, p.6-15, 2005.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Atualidades em Química**, 1998

DELOIRE, A.; VAUDOUR, E.; CAREY, V.; BONNARDOT, V.; VAN LEEUWEN, C. Grapevine responses to terroir: A global approach. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, v.39, p.149-162, 2005.

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

- Di MAJO, D.; La GUARDIA, M.; GIAMMANCO, S.; La NEVE, L.; GIAMMARNCO, M. The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. **Food Chemistry**, v.111, p.45-49, 2008.
- ECHEVERRY, C.; FERREIRA, M.; REYES-PARADA, M.; ABIN-CARRIQUIRY, J.A.; BLASINA, F.; GONZÁLEZ-NEVES, G.; DAJAS, F. Changes in antioxidant capacity of Tanta red wines during early maturation. **Journal of Food Engineering**, v.69, p.147-154, 2005.
- EDWARDS, R.; LYON, T.; LITWIN, S.E.; RABOVSKY, A.; SYMONS, J.D.; JALILI, T. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. **The Journal of Nutrition**, v.137, p.2405-2411, 2007.
- EIRO, M.J.; HEINONEN, M. Anthocyanin Color Behavior and Stability during Storage: Effect of Intermolecular Copigmentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.7461-7466, 2002.
- ENTAV. **Catalogue des variétés et clones de vigne cultivés en France**. Le Grau du Roi, 1995. 357 p.
- ENTAV, **Establissement National Technique Pour L'amélioration De La Viticulture**. Disponível em: <http://www.entav.fr>. Acesso em: 10 mar 2010.
- ESCOBAL, A.; IRIONDO, C.; LABORRA, C.; ELEJALDE, E.; GONZALEZ, I. Determination of acids and volatile compounds in red Txakoli wine by high-performance liquid chromatography and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 823, p. 349-354, 1998.
- ESTEBAN, M.A.; VILLANUEVA, M.J.; LISSARRAGUE, J.R. Relationships between different berry components in Tempranillo (*Vitis vinifera* L) grapes from irrigated and non-irrigated vines during ripening. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.82, p.1136-1146, 2002.
- ESTEVEZ, V.I.; LIMA, S.S.F.; LIMA, D.L.D.; DUARTE, A.C. Using capillary electrophoresis for the determination of organic acids in Port wine. **Analytica Chimica Acta**, v.513, p.163-167, 2004.
- ESTI, M.; AIROLA, R.L.G.; MONETA, E.; PAPERAIIO, M.; SINESIO, F. Qualitative data analysis for an exploratory sensory study of grechetto wine. **Analytica Chimica Acta**, v.660, p.63-67, 2010.
- EWART, A.J.W.; GAWEL, R.; THISTLEWOOD, S.P.; MCCARTHY, M.G. Evaluation of must composition and wine quality of six clones of *Vitis vinifera* cv. Sauvignon Blanc. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.33, p.945-951, 1993.
- FALCÃO, L.D. **Caracterização analítica e sensorial de vinhos Cabernet Sauvignon de diferentes altitudes de Santa Catarina**. 2007, 150p. Tese (Doutor) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FALCÃO, L. D.; DE REVEL, G.; PERELLO, M. C.; MOUTSIU, A.; ZANUS, M. C.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. A survey of seasonal temperatures and vineyard altitude influences on 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, C₁₃-norisoprenoids and the sensory profile of Brazilian Cabernet Sauvignon wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.3605-3612, 2007.

FALCÃO, L.D.; CHAVES, E.S.; BURIN, V.M.; FALCÃO, A.P.; GRIS, E.F.; BONIN, V.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Maturity of cabernet Sauvignon berries from grapevines grown with two different training systems in a new grape growing region in Brazil. **Ciencia e Investigación Agraria**, v.35, p.321-332, 2008a.

FALCÃO, L.D.; BRIGHENTI, E.; ROSIER, J.P.; UBERTI, A.A.A.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Phenology and maturation of Cabernet Sauvignon grapes from young vineyards at Santa Catarina state, Brazil – a survey of vineyard altitude and mesoclimate influences. **VII Congrès International des terroirs viticoles**, Nyon, Suisse, v.1, p.165-170, 2008b.

FALCÃO, L. D.; DE REVEL, G.; ROSIER, J. P.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. CG-Olfatometria: percepção de aromas de impacto em dos vinhos Cabernet Sauvignon sensorialmente diferentes. **Revista Enología**, n°4, ano 5, setembro-outubro, 2008c.

FALCHI, M.; BERTELLI, A.; LO SCALZO, R.; MORASSUT, M.; MORELLI, R. Comparison of cardioprotective abilities between the flesh and skin of grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.6613-6622, 2006.

FALLAHI, E.; FALLAHI, B.; SHAFII, B.; STARK, J.C. Performance of six wine grapes under Southwest Idaho environmental conditions. **International Journal of Fruit Science**, v.04, p.77-84, 2005.

FANG, F.; LI, J. M.; PAN, Q. H.; HUANG, W. D. Determination of red wine flavonoids by HPLC and affect aging. **Analytical, Nutrition and Clinical Methods**, v.101, p.428-433, 2007.

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

FERRANDINO, A.; GUIDONI, S. Anthocyanins, flavonols and hydroxycinnamates: an attempt to use them to discriminate *Vitis vinifera* L. cv 'Barbera' clones. **European Food Research and Technology**, v.230, p.417-427, 2010.

FIDELIBUS, M.W.; CHRISTENSEN, L.P.; KATAYAMA, D.G.; VERDENAL, P.T. Yield components and fruit composition of six Cabernet Sauvignon grapevine selections in the Central San Joaquin Valley, California. **Journal of the American Pomological Society**, v.60, p.32-36, 2006.

FLANZY, M. ; AUBERT, S. Évaluation des Composés Phénoliques des Vins Blancs. **Annals Technologie Agricole**, v.18, p.27-44, 1969.

FRANCISCO, M.L.; RESURRECCION, A.V.A. Development of a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut extracts. **Food Chemistry**, v.117, p.356-363, 2009.

FRANKEL, E.N.; BOSANEK, C.A.; MEYER, A.S.; SILLIMAN, K.; KIRK, L.L. Commercial Grape Juices Inhibit the in Vitro Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.46, p.834-838, 1998.

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

FOREVEILLE, L.; VERCAUTEREN, J.; RUTLEDGE, D.N. Multivariate statistical analysis of two-dimensional NMR data to differentiate grapevine cultivars and clones. **Food Chemistry**, v.57, p.441-450, 1996.

FULCRAND, E.; BENARDELJAIL, C.; RIGAUD, J.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. A new Class of Wine Pigments Generated by Reaction between Pyruvic Acid and Grape Anthocyanins. **Phytochemistry**, v.47, p.1401-1407, 1998.

FULEKI, T.; RICARDO-DA-SILVA, M. J. Effects of Cultivar and Processing Method on the Contents of Catechins and Procyanidins in Grape Juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.640-646, 2003.

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

GEROGIANNAKI-CHRISTOPOULOU, M.; ATHANASOPOULOS, P.; KYRIAKIDIS, N.; GEROGIANNAKI, I.A.; SPANOS, M. trans-Resveratrol in wines the major Greek red and white grape varieties. **Food Control**, v.17, p.700-706, 2006.

GHISELLI, A.; NARDINI, M.; BALDI, A.; SCACCINI, C. Antioxidant activity of different phenolic fraction separated from Italian red wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 361-367, 1998.

GIUSTI M.M.; WROLSTAD R.E. **Anthocyanins: characterization and measurement with UV-visible spectroscopy**, F1.2.1-13. In: Wrolstad, R.E. Current protocols in food analytical chemistry. New York: John Wiley & Sons Inc., 2001.

GIUSTI, M.; SAONA-RODRIGUEZ, L. E.; WROLSTAD, R. E. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4631-4637, 1999.

GLORIES, Y. La couleur des vins rouges. **Connaissance Vigne Vin**, v. 18, n. 4, p. 253-271, 1984.

- GLORIES, Y. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. **Bulletin de la Societe Chimique**, v.9, p.2649-2652, 1978.
- GOLDBERG, D.M.; TSANG, E.; KARUMANCHIRI, A.; DIAMANDIS, E.P.; SOLEAS, G.; NG, E. Method to Assay the Concentrations of Phenolic Constituents of Biological Interest in Wines. **Analytical Chemistry**, v.68, p.1688-1694, 1996.
- GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, p.618-626, 2007.
- GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, L. M. Interpretation of Color Variable during the Aging of Red wines: Relationship with Families of Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.557-561, 1995.
- GÓMEZ-PLAZA, E.; GIL-MUÑOZ, R.; MARTÍNEZ-CUTILLAS, A. Multivariate classification of wines from seven clones of Monastrell grapes. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 80, p. 497-501, 2000.
- GÓMEZ-PLAZA, E.; GIL-MUÑOZ, R.; LÓPEZ-ROCA, M.J.; MARTÍNEZ, A. Color and Phenolic Compounds of a Young Red Wine. Influence of Wine-Making Techniques, Storage Temperature, and Length of Storage Time. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.736-741, 2000.
- GÓMEZ-PLAZA, E.; GIL-MUÑOZ, R.; CARREÑO-ESPÍN, J.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A.; MARTÍNEZ-CUTILLAS, A. Investigation on the aroma of wines from seven clones of Monastrell grapes. **European Food Research and Technology**, v.209, p.257-260, 1999.
- GONZÁLEZ, G.; FRANCO, J.; BARREIRO, L.; GIL, G.; MOUTOUNET, M.; CARBONNEAU, A. Varietal differentiation of Tannat, Cabernet Sauvignon and Merlot grapes and wines according to their anthocyanic composition. **European Food Research and Technology**, v. 225, p.111-117, 2007.
- GONZÁLEZ-NEVES, G.; CHARAMELO, D.; BALADO, J.; BARREIRO, L.; BOCHICCHIO, R.; GATTO, G.; GIL, G.; TESSORE, A.; CARBONNEAU, A.; MOUTOUNET, M. Phenolic potential of Tannat, Cabernet Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition. **Analytica Chimica Acta**, v.513, p.191-196, 2004.
- GRANJEIRO, L.C.; LEÃO, P.C.S.; SOARES, J.M. Caracterização fenológica e produtiva da variedade de uva superior seedless cultivada no Vale do São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.552-554, 2002.
- GRIS, E.F.; BURIN, V.M.; BRIGHENTI, E.; VIEIRA, H.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Phenology and ripening of *Vitis vinifera* grape varieties in São Joaquim, southern Brazil: a new South American wine growing region. **Ciencia e Investigación Agraria**, 2010, *in press*.

GUADALUPE, Z.; AYESTARÁN, B. Changes in the color components and phenolic content of red wines from *Vitis viníferas* L. cv. 'Tempranillo' during vinification and aging. **European Food Research and Technology**, v.228, p.29-38, 2008.

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

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v.16, p.845-850, 1994.

HASELGROVE, L.; BOTTLING, D.; VAN HEESWIJCK, R.; HOJ, P.B.; DRY, P.R.; FORD, C.; ILAND, P.G. Canopy microclimate and berry composition: The effect of bunch exposure on the phenolic composition of *Vitis viníferas* L. cv Shiraz grape berries. **Australian journal of Grape and Wine Research**, v.6, p.141-149, 2000.

HAYASAKA, Y.; ASENSTORFER, R.E. Screening for potential pigments derived from anthocyanins in red wine using nanoelectrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v.50, p.756-761, 2002.

HEREDIA, F. J.; ARICHA, E. M. F.; GONZALO, J. C. R.; VICARIO, I. M.; BUELGA, C. S. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes-I. pH effect. **Food Chemistry**, v. 63, p.491-498, 1998.

HERNANZ, D.; GALLO, V.; RECAMALES, A.F.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J.; GONZÁLEZ-MIRET, M.L.; HEREDIA, F.J. Effect of storage on the phenolic content, volatile composition and colour of white wines from the varieties Zalema and Colombard. **Food Chemistry**, v.113, p.530-537, 2009.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.

HUGLIN, P. Nouveau mode d'évaluation des possibilités héliothermiques d'un milieu viticole. C. R. Academie d' Agriculture, p.1117-1126, 1978.

HUNTER, J.J.; VISSER, J.H. The effect of partial defoliation on grown characteristics of *Vitis vinífera* L. cv. Cabernet Sauvignon II. Reproductive growth. S. Afr. J. Enol. Vitic., v.11, p.26-32, 1990.

ICH Harmonised Tripartite Guideline, Q2(RI), **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**, 1994.

JACKSON, R.S. **Wine Science: Principle and Application**, California: Academic Press, 2ed., 2000, 706 p.

JONES, G.; DAVIS, R.E. Climate influences on grapevine phenology, grape composition and wine production and quality for Bordeaux, France. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.51, p.249-261, 2000.

- KALLITHRAKA, S.; SALACHA, M.I.; TZOUROU, I. Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. **Food Chemistry**, v.113, p.500-505, 2009.
- KAPADIA, G. J.; BALASUBRAMANIAN, V.; TOKUDA, H.; IWASHINA, A.; NISHINO, H. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced Epstein virus early antigen activation by natural colorants. **Cancer Letters**, v.115, p.173-178, 1997.
- KENNEDY, J.A.; MATTHEWS, M.A.; WATERHOUSE, A.L. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. **Phytochemistry**, v.55, p.77-85, 2000.
- KENNEDY, J. A.; SAUCIER, C.; GLORIES, Y. Grape and wine phenolics: History and perspectives. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.57, p.239-248, 2006.
- KIM, Y K.; GUO, Q.; PACKER, L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. **Toxicology**, v.172, p.149-156, 2002.
- KONDRASHOV, A.; SEVCIK, R.; BENÁKOVÁ, H.; KOSTÍROVÁ, M.; STÍPEK, S. The key of grape variety for antioxidant capacity of red wines. **E-SPEN, the European e-journal of Clinical Nutrition and Metabolism**, v.4, p.41-42, 2009.
- KONG, J.M.; CHIA, L.S.; GOH, N.K.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 65, p. 923-933, 2003.
- LAMIKANRA, O.; INYANG, I.D.; LEONG, S. Distribution and Effects of Grape Maturity on Organic Acid Content of Red Muscadine Grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.3026-3028, 1995.
- LANÇAS, F. M. **Cromatografia em Fase Gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 254p.
- LANDRAULT, N.; POUCHERET, P.; REVEL, P.; GASC, F.; CROS, G.; TEISSEDE, P.L. Antioxidant Capacities and Phenolics Level of French wines from Different Varieties and Vintages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.3341-3348, 2001.
- LAPIDOT, T.; HAREL, S.; AKIRI, B.; GRANIT, R.; KANNER, J. pH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.67-70, 1999.
- LARRAURI, J.A.; SÀNCHEZ-MORENO, C.; RUPÉREZ, P. ; SAURA-CALIXTO, F. Free radical scavenging capacity in the aging of selected red Spanish wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.1603-1606, 1999.
- LAZZÉ, M. C.; PIZZALA, R.; SAVIO, M.; STIVALA, L. A.; PROSPERI, M.; BIANCHI, L. Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells. **Mutation Research**, v.535, p.103-115, 2003.

- LEÃO, P. C. S.; SILVA, E. E. G. Caracterização fenológica e requerimentos térmicos de variedades de uvas sem sementes no vale do São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, p. 458-460, 2003.
- LEE, H.S. HPLC analysis of phenolic compounds. In Nollet, L.M.L. **Food analysis by HPLC**, 2 ed. New York: Marcel Dekker Inc., 2000.
- LEES, D. H.; FRANCIS, F. G. Standardization of pigment analysis in cranberries. **Hortscience**, v.7, p. 83-84, 1972.
- LEITE, F. **Validação em análise química**. 4ed, Campinas: Átomo, 2002.
- LE MOIGNE, M.; MAURY, C.; BERTRAND, D.; JOURJON, F. Sensory and instrumental characterisation of Cabernet Franc grapes according to ripening stages and growing location. **Food Quality and Preference**, v.19, p.220-231, 2008.
- LE MOIGNE, M.; SYMONEAUX, R.; JOURJON F. How to follow grape maturity for wine professionals with a seasonal judge training? **Food Quality and Preference**, v.19, p. 672-681, 2008.
- LESSCHAEVE, I.; NOBLE, A.C. Polyphenols: Factors influencing their sensory properties and their effect on food and beverage preferences. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.81, p.3305-3355, 2005.
- LEVENGOD, J.; BOULTON, R. **The Variation in the Color due to Copigmentation in Young Cabernet Sauvignon Wines**. In: Red Wine Color. American Chemical Society: Washington, 2004, 314p.
- LI, H.; WANG, X.; LI, Y.; LI, P.; WANG, H. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. **Food Chemistry**, v.112, p.454-460, 2009.
- LOPEZ-VELEZ, M.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, F.; DEL VALLE-RIBES, C. The Study of Phenolic Compounds as Natural Antioxidants in Wine - Critical Reviews. **Food Science and Nutrition**, v.43, p.233-244, 2003.
- LÓPEZ, M.; MARTINEZ, F.; DEL VALLE, C.; ORTE, C.; MIRÓ, M. Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.922, p.359-363, 2001.
- LOPES, C.; PINTO, P.A. Easy and accurate estimation of grapevine leaf area with simple mathematical models. **Vitis**, v.44, p.55-61, 2005.
- LUCENA, A.P.S.; NASCIMENTO, R.J.B.; MACIEL, J.A.C.; TAVARES, J.X.; BARBOSA-FILHO, J.M.; OLIVEIRA, E.J. Antioxidant activity and phenolics content of selected Brazilian wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.23, p.30-36, 2010.
- MARTENS, S.; KNOTT, J.; SEITZ, C.A.; JANVARI, L.; YU, S.; FORKMAN, G. Impacto of biochemical pré-studies on specific metabolic engineering strategies os

- flavonoids biosynthesis in plant tissues. **Journal of Biological Engineering**, v.14, p.227-235, 2003.
- MATEJÍČEK, D.; MIKES, O.; KLEJDUS, B.; STERBOVÁ, D.; KUBÁN, V. Changes in contents of phenolic compounds during maturing of barrique red wines. **Food Chemistry**, v.90, p.791-800, 2005.
- MATEUS, N.; SILVA, A.M.S.; RIVAS-GONZALO, J.C.; SANTOS-BUELGA, C.; FREITAS, V. A new class of blue anthocyanins-derived pigments isolated from red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.1919-1923, 2003.
- MATO, I.; SUÁREZ-LUQUE, S.; HUIDOBRO, J.F. Simple determination of main organic acids in grape in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct detection. **Food Chemistry**, v.102, p.104-112, 2007.
- MATTIVI, F.; GUZZON, R.; VRHOVSEK, U.; STEFANINI, M.; VELASCO, R. Metabolite Profiling of Grape: Flavonols and Anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.7692-7702, 2006.
- MAZZA, G. Anthocyanins in grape and grape products. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v.35, p.341-371, 1995.
- MAZZA, G.; MINIATI, E. **Anthocyanins in fruits, vegetables and grains**. Florida: Boca Raton, CRC Press, 1993. 362p.
- MAZZA, G.; FUKUMOTO, L.; DELAQUIS, P.; GIRARD, B.; EWERT, B. Anthocyanins, Phenolic, and Color of Cabernet Franc, Merlot and Pinot Noir Wines from British Columbia. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 4009-4017, 1999.
- MCDONALD, M. S.; HUGHES, M.; BURNS, J.; LEAN, M. E. J.; MATTHEWS, D.; CROZIER, A. Survey of the free and conjugated myrcetin na quercetin contento f red wines of different geographical origins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.368-375, 1998.
- MCCARTHY, M.G. The effect of transient déficit on berry development of cv. Shiraz (*Vitis viníferas* L.). **Australian Journal of Grape and wine Research**, v.3, p.2-8, 1997.
- MEDRANO, H.; ESCALONA, J.M.; CIFRÉ, J.; BOTA, J.; FLEXAS, J. A tem-years study on the physiology of two Spanish grapevine cultivars under field conditions: effects of water availability from leaf photosynthesis to grape yield and quality. **Functional Plant Biology**, v.30, p.607-619, 2003.
- MELLO, R. M. L. **Vitivinicultura Brasileira: Panorama 2009**. Disponível em: <www.cnpuv.embrapa.br>. Acesso em: 05 fev 2010.
- MIELE, A. Influencia do sistema de condução na evolução dos açúcares redutores e da acidez total durante a maturação da uva: relação com a área foliar, radiação solar e fotossíntese. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.1, p.31-40, 1989.

- MONAGAS, M.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. **Food Chemistry**, v.95, p.405-412, 2006.
- MONAGAS, M.; SUÁREZ, R.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wine by HPLC-DAD/ESI-MS. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.56, p.139-147, 2005
- 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.
- MORENO-LABANDA, J.F.; MALLAVÍA, R.; PÉREZ-FONZ, L.; LIZAMA, V.; SAURA, D.; MICOL, V. Determination of piceid and resveratrol in Spanish wines deriving from Monastrell (*Vitis vinifera* L.) grape variety. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.5396-5403, 2004.
- MORI, K.; SUGAYA, S.; GEMMA, H. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. **Scientia Horticulturae**, v.105, p.319-330, 2005.
- MOTA, R. V.; REGINA, M. A.; AMORIM, D. A.; FÁVERO, A. C. Fatores que afetam a maturação e a qualidade da uva para vinificação. **Informe Agropecuário**, v. 27, n. 234, p. 56-64, 2006.
- MOTA, R.V.; SOUZA, C.R.; FAVERO, A.C.; SILVA, C.P.C.; CARMO, E.L.; FONSECA, A.R.; REGINA, M.A. Produtividade e composição físico-química de bagas de cultivares de uva em distintos porta-enxertos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.576-582, 2009.
- MUÑOZ-MUÑOZ, A.C.; GRENIER, A.C.; GUTIÉRREZ-PULIDO, H.; CERVANTES-MATÍNEZ, J. Development and validation of High Performance liquid Chromatography-Diode Array detection method for the determination of aging markers in tequila. **Journal of Chromatography A**, v.1213, p.218-223, 2008.
- MUÑOZ, S.; MESTRES, M.; BUSTO, O.; GUASH, J. Determination of some flavan-3-ols and anthocyanins in red grape seed and skin extracts by HPLC-DAD: Validation study and response comparison of different standards. **Analytica Chimica Acta**, v.628, p.104-110, 2008.
- NAVARRO, S.; LEÓN, M.; ROCA-PÉREZ, L.; BOLUDA, R.; GARCÍA-FERRIZ, L.; PÉREZ-BERMÚDEZ, P.; GAVIDIA, I. Characterisation of Bodal and Crujidera grape cultivars, in comparison with Tempranillo and Cabernet Sauvignon: Evolution of leaf macronutrients and berry composition during grape ripening. **Food Chemistry**, v.108, p.182-190, 2008.

- NAVE, F.; CABRITA, M.J.; COSTA, C.T. Use of solid-supported liquid-liquid extraction in the analysis of polyphenols in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1169, p. 23-30, 2007.
- NIXDORF, S.L.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, H. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity. **Analytica Chimica Acta**, v.659, p.208-215, 2010.
- OIV. Office International de la Vigne et du Vin. Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Vins et des Moûts, Paris, 1990.
- PARK, Y.K., PARK, E., KIM, J., KANG, M. Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. **Mutation Research**, v.529, p.77-86, 2003.
- PANORETTO, L. **Polifenoli e tecnica enologica**, Selepress: Milan, p.101-132, 1977.
- PEDRO JÚNIOR, M. J.; SENTELHAS, P. C.; MARTINS, F. P. Previsão agrometeorológica da data de colheita para a videira 'Niagara Rosada'. **Bragantina**, v. 53, p.113-119, 1994.
- PELLEGRINI, N.; SIMONETTI, P.; BRENNNA, O.; BRIGHENTI, F.; PIETTA, P. Polyphenol content and total antioxidant activity of Vini novella (young red wine). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.481, p.732-735, 2000.
- PELSY, F.; HOCQUIGNY, S.; MONCADA, X.; BARBEAU, G.; FORGET, D.; HINRICHSEN, P.; MERDINOGLU, D. An extensive study of the genetic diversity within seven French wine grape variety collections. **Theoretical and Applied Genetics**, v.120, p.1219-1231, 2010.
- PENG, Z.; ILAND, P.G.; OBERHOLZER, A.; SEFTON, M.A.; WALTERS, E.J. Analysis of pigmented polymers in red wine by reverse phase HPLC. **Australian Journal of Grape and Wines Research**, v.8, p.70-75, 2002.
- PERES, R.G.; MORAES, E.P.; MICKE, G.A.; TONIN, F.G.; TAVARES, M.F.M.; RODRIGUESZ-AMAYA, D.B. Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Food Control**, v.20, p.548-552, 2009.
- PÉREZ-MAGARIÑO, S.; GONZÁLEZ-SAN JOSÉ, M.L. Evolution of Flavanols, Anthocyanins and their Derivatives during the Aging of Red Wines Elaborated from Grapes Harvested at Different Stages of Ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.1181-1189, 2004.
- PÉREZ-MANGARIÑO, S.; GONZÁLEZ-SAN JOSÉ. Prediction of red and rosé wine CIElab parameters from simple absorbance measurements. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.82, p. 1319-1324, 2002.

- PÉREZ-PRIETO, L.J.; LÓPEZ-ROCA, J.M.; GÓMEZ-PLAZA, E. Differences in major volatile compounds of red wines according to storage length and storage conditions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.16, p.697-705, 2003.
- PONI, S.; GIACHINO, E. Growth, photosynthesis and cropping of potted grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) in relation with shoot trimming. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.06, p.216-226, 2000.
- PUÉRTOLAS, E.; SALDAÑA, G.; CONDÓN, S.; ÁLVAREZ, I.; RASO, J. Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle. **Food Chemistry**, v.119, p.1063-1070, 2010.
- RASTIJA, V.; SRECNIK, G.; SARIC, M.M. Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins. **Food Chemistry**, v.115, p.54-60, 2009.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGEMANTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology Medicine**, v.26, p.1234-1237, 1999.
- RECAMALES, A.F.; SAYAGO, A.; GONZÁLEZ-MIRET, M.L.; HERNANZ, D. The effect of time and storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine. **Food Research International**, v.39, p.220-229, 2006.
- REGINA, M.A.; AUDEGUIN, L. Avaliação ecofisiológica de clones de videira cv. Syrah. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, p.875-879, 2005.
- REMY, S.; FULCRAND, H.; LABARBE, B.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin-tannin reactions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.745-751, 2000.
- RENTZSCH, M.; SCHWARZ, M.; WINTERHALTER, P. Pyranoanthocyanins: an overview on structures, occurrence and pathways of formation. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p.526-534, 2007.
- REVILLA, E.; GARCÍA-BENEYTEZ, E.; CABELLO, F. Anthocyanin fingerprint of clones of Tempranillo grapes and wines made with them. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.15, p.70-78, 2009.
- REVILLA, E.; GARCÍA-BENEYTEZ, E.; CABELLO, F.; MARTÍN-ORTEGA, G.; RYAN, J. M. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. **Journal of Chromatography A**, v.915, p.53-60, 2001.
- REVILLA, I.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ M.L. Composition changes during the storage of red wines treated with pectolytic enzymes: low molecular-weight phenols and flavan-3-ol derivative levels. **Food Chemistry**, v.80, p.205-214, 2003.
- REVILLA, E.; RYAN, J.M. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid

- chromatography-photodiode array detection without sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p.461-469, 2000.
- RIBANI, M.; BOTTOLO, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, p.771-780, 2004.
- RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÉCHE, B.; LONVAUD, A. **Handbook of Enology: the microbiology of wine and vinifications**. 2ed. Wiley & Sons, 2006. 429 p.
- RIBICHAUD, J.L.; NOBLE, A.C. Astringency and bitterness of selected phenolic in wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.53, p.343-353, 1990.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v.20, p.933-956, 1996.
- RIVAS, E. G. P.; ALCALDE-EON, C.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J.; ESCRIBANO-BAILÓN, M. T. Behavior and characterisation of the colour during red wine making and maturation. **Analytica Chimica Acta**, v.563, p.215-222, 2006.
- RIVERO-PÉREZ, M.D.; MUÑIZ, P.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M.L. Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger activity and biomarkers of oxidative stress methodologies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p. 5476-5793, 2007.
- RIVERO-PÉREZ, M.D.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M.L. ORTEGA-HERÁS, M.; MUÑIZ, P. Antioxidant potential of single-variety red wines aged in the barrel and in the bottle. **Food Chemistry**, v.111, p.957-964, 2008.
- RIZZON, L.A.; SGANZERLA, V.M.A. Ácidos tartárico e málico no mosto de uva em Bento Gonçalves- RS. **Ciência Rural**, v.37, p.911-914, 2007.
- RIZZON, L.A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Cabernet Sauvignon para elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, p.192-198, 2002.
- RIZZON, L.A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Merlot para elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.156-161, 2003.
- RIZZON, L.A.; MIELE, A. Efeito da safra vitícola na composição da uva, do mosto e do vinho Isabel da Serra Gaúcha, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, p.959-964, 2006.
- RODRIGUEZ-DELGADO, M.A.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, G.; CONDE-GONZÁLEZ, J.E.; PÉREZ-TRUJILLO, J. P. Principal component análisis of the polyphenol content in young red wines. **Food Chemistry**, v.78, p.523-532, 2002.
- ROBERTO, S.R.; SATO, A.J.; BRENNER, E.A.; JUBILEI, B.S.; SANTOS, C.E.; GENTA, W. Caracterização fenológica e exigência térmica (graus-dias) para a uva

Cabernet Sauvignon em zona subtropical. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.27, p.183-187, 2005.

ROBREDO, L.M.; JUNQUEIRA, B.; GONZALEZ-SANJOSÉ, M. L.; BARRON, L. J. R. Biochemical events during ripening of grapes berries. **Italian Journal of Food Science**, v.3, p.173-180, 1991.

ROGGERO, J.P.; COEN, S.; RAGONNET, B. High Performance Liquid Chromatography survey on changes in pigment content in ripening grapes of Syrah. An approach to anthocyanins metabolism. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.37, p.77-83, 1986.

ROGINSKY, V.; De BEER, D.; HARBERTSON, J.F.; KILMARTIN, P.A.; BARSUKOVA, T.; ADAMS, D.O. The antioxidant activity of Californian red wines does not correlate with wine age. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v.86, p.834-840, 2006.

ROMERO, E.G.; MUÑOZ, G.S. Determination of organic acids in grape musts, wines and vineyards by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.655, p.111-117, 1993.

ROMERO, C.; BAKKER, J. Anthocyanins and colour evolution during maturation of four port wines: effect of pyruvic acid addition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.81, p.252-260, 2000.

ROSIER, J. P.; BRIGUENTI, E.; SCHUCK, E.; BONIN V. Comportamento da variedade Cabernet Sauvignon cultivada em vinhedos de altitude em São Joaquim – SC. In: **Congresso Brasileiro de Fruticultura**, 8, 2004, Florianópolis.

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

RYAN, J.M.; REVILLA, E. Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.3372-3378, 2003.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; CAO, G.; OU, B.; PRIOR, R.L. Anthocyanin and Proanthocyanin Content in Selected White and Red Wines. Oxygen Radical Absorbance Capacity Comparison with Nontraditional Wines Obtained from Highbush Blueberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.4889-4896, 2003.

SANTESTEBAN, L.G.; ROYO, J.B. Water status, leaf area and fruit load influence on berry weight and sugar accumulation of cv ‘Tempranillo’ under semiarid conditions. **Scientia Horticulturae**, v.109, p.60-65, 2006.

SANTOS, C.E.; ROBERTO, S.R.; SATO, A.J.; JUBILEU, B.S. Caracterização da fenologia e da demanda térmica das variedades Cabernet Sauvignon e Tannat para a região norte do Paraná. **Acta Science Agronomy**, v.29, p.361-366, 2007.

SAONA-RODRIGUEZ, L. E.; GIUSTI, M., M. WROLSTAD, R. E. Anthocyanin pigment composition of red-fleshed potatoes. **Journal of Food Science**, v.63, p.458-463, 1998.

SATO, M.; RAMARATHNAM, N.; SUZUKI, Y.; OHKUBO, T.; TAKEUCHI, M.; OCHI, H. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.44, p.37-41, 1996.

SCHWARZ, M.; WABNITZ, T.C.; WINTERHALTER, P. Pathway leading to the formation of anthocyanins-vinylphenol adducts and related pigments in red wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.3682-3687, 2003.

SCHNEIDER, R.; RAZUNGLES, A.; CHARRIER, F.; BAUMES, R. Effect du site, de la maturité et de l'éclaircissement des grappes sur la composition aromatique des baies de *Vitis vinifera* L. Cv. Melon B. Dans le vignoble du muscadet. **Bulletin de l'OIV**, p.270-282, 2002.

SEGADE, S.R.; VÁZQUEZ, E.S.; LOSADA, E.D. Influence of ripeness grade on accumulation and extractability of grape skin anthocyanins in different cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.21, p.599-607, 2008.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Wine in food phenolics: Sources, chemistry, effects, applications**. Pennsylvania: Technomic Publishing Co, pp. 136-148, 1995.

SILVA, R. P.; DANTAS, G. G.; NAVES, R. V.; CUNHA, M. G. Comportamento fenológico e videira, cultivar patricia em diferentes épocas de poda de frutificação em Goiás. **Bragantia**, Campinas, v.65. p.399-406, 2006.

SILVA, B.M.; ANDRADE, P.B.; VALENTA, P.; FERRERES, F.; SEABRA, R.M.; FERREIRA, M.A. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.4705-4712, 2004.

SINGLETARY, K. W.; STANSBURY, M. J.; GIUSTI, M.; VAN BREEMEN, R. B.; WALLIG, M.; RIMANDO, A. Inhibition of Mammary Tumorigenesis by Concord Grape Juice Constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.7280-7286, 2003.

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

SINGLETON, V.L. A survey of wine aging, especially with oxygen, in Proceedings of American Society for enology and viticulture, 50th Anniversary Annual Meeting, Seattle, WA, p.323-336, 2000.

- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colourimetry of total phenolics with phosphomolibdicphosphotungstic acid reagent. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.
- SLADKOVSKÝ, R.; SOLICH, P.; URBÁNEK, M. high-performance liquid chromatography determination of phenolic components in wine off-line isotachophoretic pretreatment. **Journal of chromatography A**, v.1040, p.179-184, 2004.
- SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2ed. New York: John Wiley & Sons Inc.,1997. 745p.
- SOMAATMADJA, D.; POWERS, J. J. Anthocyanins pigments of Cabernet Sauvignon grapes. **Journal of Food Science**, v.28, p.617-622, 1963.
- SOMERS, T. C.; EVANS, E. M. Spectral Evaluation of Young Red Wines: Anthocyanin Equilibria, Total Phenolics, Free and Molecular SO₂, "Chemical Age". **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.28, p.279-287, 1977.
- SOMERS, T. C.; EVANS, M.E. Evolution of red wines. Ambient influences on color composition during early maturation. **Vitis**, v.25, p.31-39, 1986.
- SOMERS, T.C. The polymeric nature of wine pigments. **Phytochemistry**, v.10, p.2175-2186, 1971.
- SOUTO, A.; CARNEIRO, M. C.; SEFERIN, M.; SENNA, M. J. H.;CONZ, A. GOBBI, K. Determination of trans-Resveratrol concentrations in Brazilian red wines by HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 441-445, 2001.
- SOYER, Y.; KOCA, N.; KARADENIZ, F. Organic acid profile of Turkish white grapes and grapes juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.16, p.629-636, 2003.
- SPÁCIL, Z.; NOVÁKOVÁ, L.; SOLIDH, P. Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography. **Talanta**, v.76, p.189-199, 2008.
- STERVBO, U.; VANG, O.; BONNESEN, C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. **Food Chemistry**, v.101, p.449-457, 2007.
- TESIC, D.; WOOLLEY, D.J.; HEWETT, E.W.; MARTIN, D.J. Environmental effects on cv. Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) grown in Hawke's, New Zealand. 1. Phenology and characterization of viticultural environments. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.8, p.15-26, 2001.
- TONIETTO, J.; CARBONNEAU, A. A multicriteria climatic classification system for grape-growing regions worldwide. **Agricultural and Forest Meteorology**, v.124, p.81-97, 2004.
- TONIETTO, J.; MANDELI, F. **Clima**. Disponível em: <www.cnpuv.embrapa.br>. Acesso em: 08 nov 2009.

- TOMANA, T.; UTSUNOMIYA, N.; DATAOKA, I. The effect of environmental temperatures on fruit on ripening on the tree. II. The effect of temperatures around whole vines and clusters on the coloration of 'Kyoho' grapes. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v.48, p.261-266, 1979.
- VILJAKAINEN, S.K.; LAAKSO, S.V. The use of malolactic *Oenococcus oeni* (ATCC 39401) for deacidification of media containing glucose, malic acid and citric acid. **European Food Research and Technology**, v.211, p.438-442, 2000.
- VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; TRONCOSO, A.M.; GARCÍA-PARRILLA, M.C. Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. **Food Chemistry**, v.95, p.394-404, 2006.
- WANG, J. ; HO, L. ; ZHAO, Z. ; SEROR, I.; HUMALA, N.; DICKSTEIN, D. L.; THIYAGARAJAN, M.; PERCIVAL, S. S.; TALCOTT, S. T. ; PASINETTI, G. M. Moderate consumption of Cabernet sauvignon attenuates A β neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. **The FASEB Journal**, v. 20, p. 2315-2320, 2006.
- WANG, H.; RACE, E.J.; SHRIKHANDE, A.J. anthocyanin transformation in Cabernet Sauvignon wine during aging. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v.51, p.7989-7994, 2003.
- WATSON, B. **Evaluation of winegrape maturity**. In HELLMAN, E.W. (Ed) Oregon Viticulture, Oregon State University Press, Corvallis, Oregon, p.235-245, 2003.
- WINKLER A. **Viticultura**, México: Compañía Editorial Continental S.A., p.792, 1980
- WINKLER A.J.; COOK J.A.; KLEWER W.M.; LIDER L.A. **General Viticulture**, University of California Press, California, 1974
- WOLPERT, J.A.; KASIMATIS, A.N.; VERDEGAAL, P.S. Viticultural Performance of Seven Cabernet Sauvignon clones in the Northern San Joaquin Valley, California. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 46, p.437-441, 1995.
- ZAFRILLA, P.; MORILLAS, J.; MULERO, J.; CAYUELA, J.M.; MARTÍNEZ-CACHÁ, A.; PARDO, F.; NICOLÁS, J.M.L. Changes during storage in conventional and ecological wine: phenolic content and antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.4694-4700, 2003.
- ZAMUZ, S.; MARTÍNEZ, M.C.; VILANOVA, M. Primary study of enological variability of wines from different clones of *Vitis vinifera* L cv. Albariño grown in Misión Biológica de Galicia (CSIC). **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, p.591-595, 2007.
- ZHENG, Y.J.; DUAN, Y.T.; ZHANG, Y.F.; PAN, Q.H.; LI, J.M.; HUANG, W.D. Determination of organic acids in red wine and must on only one RP-LC-Column directly after sample dilution and filtration. **Chromatographia**, v.69, Full Short Communication, 2009.

ZOECKLEIN, B.W.; FUGELSANG, K.C.; GUMP, B.H.; NURY, F.S. **Wine analysis and production**. The Chapman e Hall Enology Library. International Thompson Publishing, 1995.

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