

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

Vívian Maria Burin

**PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO DO MOSTO: INFLUÊNCIA  
NA COMPOSIÇÃO FENÓLICA, NITROGENADA E NO PERFIL  
VOLÁTIL DE VINHOS. COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS-  
N,S,O, GLUTATIONA E AMINOÁCIDOS, CONTRIBUIÇÃO  
PARA O 'BOUQUET'**

Florianópolis  
2014



Vívian Maria Burin

**PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO DO MOSTO: INFLUÊNCIA  
NA COMPOSIÇÃO FENÓLICA, NITROGENADA E NO PERFIL  
VOLÁTIL DE VINHOS. COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS-  
N,S,O, GLUTATIONA E AMINOÁCIDOS, CONTRIBUIÇÃO  
PARA O 'BOUQUET'**

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

Orientadora: Profª. Dra. Marilde T.  
Bordignon Luiz

Florianópolis  
2014

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

Burin, Vívian Maria  
PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO DO MOSTO: INFLUÊNCIA NA  
COMPOSIÇÃO FENÓLICA, NITROGENADA E NO PERFIL VOLÁTIL DE  
VINHOS. COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS-N,S,O, GLUTATIONA E  
AMINOÁCIDOS, CONTRIBUIÇÃO PARA O 'BOUQUET' / Vívian Maria  
Burin ; orientadora, Marilde T. Bordignon Luiz -  
Florianópolis, SC, 2014.  
231 p.

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

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Processo de clarificação do  
mosto. 3. Aminoácidos. 4. Compostos voláteis. 5. Compostos  
heterocíclicos. I. Bordignon Luiz, Marilde T. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

**Vívian Maria Burin**

**PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO DO MOSTO: INFLUÊNCIA  
NA COMPOSIÇÃO FENÓLICA, NITROGENADA E NO PERFIL  
VOLÁTIL DE VINHOS. COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS-  
N,S,O, GLUTATIONA E AMINOÁCIDOS, CONTRIBUIÇÃO  
PARA O 'BOUQUET'**

Esta Tese foi julgada adequada para a obtenção do Título de "Doutora em Ciência dos Alimentos", e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 21 de março de 2014

Coordenadora:

---

Prof<sup>ª</sup>.Dra. Roseane Fett (UFSC)

**Banca Examinadora:**

Presidente:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Marilde T. Bordignon Luiz (UFSC)

Membro:

---

Dr. Giuliano Elias Pereira (EMBRAPA)

Membro:

---

Dr. Jean Pierre Rosier (Epagri)

Membro:

---

Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva (UFSC)

Membro:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi (UFSC)

Membro:

---

Prof. Dr. Luciano Vitali (UFSC)



Dedico os meus pais,  
por todo amor, carinho, e incentivo que me  
fez ir à busca dos meus ideais e chegar tão longe.  
Devo a eles tudo o que sou hoje.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre.

A minha família, especialmente aos meus pais, Eloides e Ivo, pela vida, pelo amor e por nunca ter desistido de mim; aos meus irmãos João, Rafael e Diogo e minhas cunhadas Lilica e Thais, por todo apoio. Agradecimento especial ao meu amor Tanes, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, lutando junto durante toda esta caminhada. Obrigada pelo apoio, torcida, paciência e pelo inestimável amor!

À minha orientadora, Profa. Dra. Marilde T. Bordignon Luiz, 'profe' como costume chamar, agradeço imensamente por todas as oportunidades concedidas desde o ano de 2003. São praticamente 11 anos de convivência, amizade e apoio. Obrigada por me iniciar na pesquisa científica, desde a graduação com a iniciação científica, mestrado e neste momento finalizando com o doutorado; agradeço muito por todos os ensinamentos em todos esses anos de convívio. Obrigada por ter sido mais que uma simples professora na minha vida!

Ao Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva, pelo apoio na realização deste trabalho e principalmente por sempre me incentivar a buscar meus sonhos.

Ao Dr. Jean Pierre Rosier, pelo apoio na realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Paulo Ogliari por toda ajuda nas análises estatísticas, inclusive por skype, e principalmente por ser uma pessoa maravilhosa que eu admiro muito.

À Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina – Epagri, Estação Experimental de Videira, pelo apoio técnico, em especial ao pesquisador Vinicius Caliari que contribuiu para a realização deste trabalho.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelos bons momentos juntos, pela cooperação e disponibilidade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos que participaram de toda a minha jornada: Nayla, Lidinha, Vinicus, Gabriel, Isabela, Carol, Saionara, Isabel, Daiani e Odinei, obrigada pelos bons momentos e aprendizados compartilhados; em especial agradeço à Trilícia, pela preciosa ajuda na realização de parte deste trabalho e pela disponibilidade sempre prestada a mim.

Agradeço imensamente a uma grande amiga e colega que me acompanhou durante todo este trabalho, Nayla Ferreira Lima, obrigada pela ajuda, apoio, amizade e dedicação em todos os momentos.

Agradeço profundamente a duas pessoas muito importante que fizeram parte de toda minha vida acadêmica, à Eliana Fortes Gris por toda ajuda prestada desde o ano de 2005 quando iniciei na iniciação científica, pela dedicação no laboratório e amizade e à Leila Falcão por todos os ensinamentos e pelo companheirismo durante minha estada em Bordeaux.

Agradeço muito a todos os meus amigos: Pri, Nayla, Thais, Taísa, Fê, Elizete, Ana, Paty, Rafa, Diogo, Maurício, Tito, Ander, pela amizade, companheirismo e principalmente por todos os 'churrascos' realizados que me proporcionaram momentos de muita alegria.

Direciono meus sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Gilles de Revel por ter me acolhido em seu Laboratório de Química Analítica no *Institut des Sciences de la Vigne e du Vin* (ISVV), na Université de Bordeaux 2, França, por ter acreditado e confiado a mim a realização de uma pesquisa muito importante para o seu laboratório. Agradeço imensamente pela oportunidade concedida para realização do curso de degustação juntamente com os estudantes de enologia do curso do *Diplôme National d' Oenologie* (DNO).

Agradeço a todos do Laboratório de Química Analítica (Bordeaux): Dra. Sthephanie Marchand, Magali, David, Sophie, Marie-Helene, Eleonore, Laurent pela compreensão e apoio na realização das análises no laboratório; à Dra. Céline Franc por todo os ensinamentos em cromatografia; à Eunjin (Jin) pela amizade, paciência e companheirismo em todos os momentos desta caminhada e também pelos ensinamentos da língua francesa; e em especialmente agradeço imensamente à Marie-Claire Perello pela ajuda indispensável, companheirismo e preocupação dedicada a mim durante toda minha estada em Bordeaux e por estar disponível em todas as horas, o meu muito obrigada. Serei eternamente grata à todos!

Agradeço a duas pessoas maravilhosas que conheci durante a realização do doutorado em Bordeaux: à Daniele Rodrigues por toda ajuda prestada e à Bárbara pela amizade e companheirismo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste sonho, o meu eterno e mais sincero MUITO OBRIGADA!

*'O vinho alegra o coração do homem; e a alegria  
é a mãe de todas as virtudes'*

Johann Wolfgang Von Goethe



## RESUMO

Os objetivos deste estudo foram avaliar o efeito do processo de clarificação no mosto de uvas brancas, em função do tempo e do agente clarificante, como também desenvolver e validar um método para a quantificação simultânea de 24 compostos heterocíclicos (oxigenados, sulfurados e nitrogenados) em vinhos tintos e brancos. Para avaliação do processo de clarificação em função do tempo (12 e 30 horas) foi utilizado mosto de uvas brancas Sauvignon Blanc, Vermentino e Viognier, e para avaliar os agentes clarificantes (bentonite, enzima e sílica gel) foi utilizado mosto de uvas da variedade Chardonnay. Foram avaliados a cinética de fermentação dos mostos adicionados de cada agente clarificante, como também a evolução e o consumo dos compostos nitrogenados durante a fermentação alcoólica. Nos mostos e nos vinhos foram determinados o perfil de aminoácidos, íon amônio, aminas biogênicas e compostos fenólicos, por cromatografia líquida de alta eficiência, e glutatona por cromatografia líquida de ultra eficiência. Também foram determinados nos vinhos o perfil de compostos voláteis por cromatografia gasosa. Para a extração dos compostos fenólicos foram avaliados 4 métodos de extração, extração líquido-líquido, extração em fase sólida, ultrassom e QuEChERS. Este método foi utilizado também para caracterizar diferentes variedades de uvas *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera* quanto a presença de compostos bioativos. A determinação dos compostos heterocíclicos nos vinhos franceses foi realizada por cromatografia gasosa através de microextração em fase sólida, a qual foi otimizada utilizando delineamento central composto por metodologia de superfície resposta. O método foi validado. Os vinhos franceses também foram caracterizados quanto ao perfil de aminoácidos e glutatona por cromatografia líquida de ultra eficiência. Os resultados deste trabalho demonstraram que, dentre os métodos de extração dos compostos fenólicos avaliados, a extração líquido-líquido apresentou os melhores resultados de precisão e repetibilidade. A caracterização das variedades de uvas *V. labrusca* e *V. vinifera* quanto a compostos bioativos mostrou que o tipo e a concentração destes compostos são mais dependentes da variedade de uva do que da espécie. Com relação ao processo de clarificação do mosto, este exerceu forte influência na composição química dos mostos como também na composição volátil e não volátil dos vinhos. O tempo de clarificação do mosto alterou significativamente o seu conteúdo nitrogenado, especialmente a concentração de aminoácidos, que foi maior no menor tempo de clarificação (12 h). Além disto, os mostos clarificados por

menor tempo, foram correlacionados principalmente com os aromas varietais do vinho, enquanto o maior tempo de clarificação (30 h) do mosto originou vinhos com predomínio de aromas fermentativos. Os agentes clarificantes também influenciaram a composição do mosto e do vinho. O uso de bentonite resultou em mosto com menor concentração de nitrogênio enquanto a adição de enzima no mosto provocou efeito contrário. Vinhos obtidos da clarificação do mosto com enzima apresentaram maior concentração dos aromas varietais, enquanto a clarificação com bentonite resultou em vinhos com maior concentração dos ésteres majoritários e de sulfeto de hidrogênio. Foi observada uma relação entre os aminoácidos, arginina e alanina, que mais contribuíram como fonte de nitrogênio para as leveduras, com a formação dos compostos voláteis nos vinho, principalmente para os ésteres. Quanto à extração dos compostos heterocíclicos, a metodologia de superfície resposta mostrou que as melhores condições de extração foram pH 5,5; 3 g de NaCl e tempo de extração de 55 minutos. O método validado apresentou excelente precisão, exatidão, e limites de detecção e quantificação. Os vinhos provenientes de diferentes origens geográficas foram separados por análises multivariadas de acordo com a composição de aminoácido como também de compostos heterocíclicos-S,N,O.

**Palavras-chave:** Clarificação do mosto. Aminoácidos. Compostos voláteis. Compostos heterocíclicos-N,S,O.

## ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate the effect of the white grape must clarification process over time using different clarifying agents and to develop and validate a method for the simultaneous quantification of 24 heterocyclic compounds of different classes (furans, thiophenes, thiazoles and alkylpyrazines) in white and red wines. The clarification process over time (12 and 30 h) was evaluated using musts of Sauvignon Blanc, Vermentine and Viognier grapes and to investigate different clarifying agents (bentonite, enzyme and silica) Chardonnay grape must was used. Also, the fermentation kinetics of the musts with clarifying agents added was investigated, along with the development and consumption of nitrogenous compounds during alcoholic fermentation. The musts and wines were analyzed by high performance liquid chromatography to determine the amino acids profile, ammonium, biogenic amines and phenolic compounds, and glutathione was determined by ultra performance liquid chromatography. The wines were also analyzed to determine the volatile profile by gas chromatography. For the extraction of phenolic compounds 4 extraction methods were evaluated: liquid-liquid extraction, solid phase extraction, ultrasound and QuEChERS. This method was also used to characterize different varieties of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes in relation to bioactive compounds. For the characterization of French wines in relation to heterocyclic compounds, solid phase micro extraction was used, which was optimized employing a composite central design, using the surface response methodology, and the determination was carried out by gas chromatography. This method was validated. The wine French also were characterized in relation to amino acid content and glutathione by ultra performance liquid chromatography. The results of this study showed that the extraction method which gave the best results for accuracy and repeatability was liquid-liquid extraction. The determination of bioactive compounds in *V. labrusca* and *V. vinifera* grapes showed that the classes and concentrations of these compounds have a stronger dependence on the grape variety than the species. In relation to the must clarification process, this showed a strong influence on the chemical composition of the musts as well as on the volatile and non-volatile composition of the wines. The time of must clarification significantly affected the must concentration of nitrogen compounds, especially amino acids, which was higher for the shorter clarification time (12 h). Moreover, the musts clarified for this shorter time were correlated mainly with the varietal aroma of the wine, while the longer

must clarification time (30 h) originated predominantly fermentative aromas in the wines. The clarifying agents influenced the must and wine composition. The addition of bentonite resulted in musts with lower nitrogen concentration, while the addition of an enzyme had the opposite effect. The wines obtained from must clarification with enzyme showed higher concentrations of compounds with varietal aroma, while the clarification with bentonite resulted in wines with higher concentrations of the major esters and of hydrogen sulfide. A relation between the amino acids arginine and alanine was observed, and these provided the highest contributed of nitrogen to the yeast, with volatile compounds (mainly esters) being formed in the wines. Regarding the extraction of heterocyclic compounds, the response surface methodology showed that the best conditions for extraction were: pH 5.5, 3 g of NaCl and extraction time of 55 min. The validated method showed excellent accuracy, repeatability, and detection and quantification limits. The wines from different regions of France were separated in the multivariate analysis according to the amino acid composition as well as the heterocyclic compounds. Red wines from same region (Bordeaux Region) were separated according the vintage when the profile for the heterocyclic compounds was considered.

**Keywords:** Must clarification. Amino acids. Volatile compounds. N,S,O-heterocyclic compounds

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1 - Fluxograma básico do processo de vinificação. ....	38
Figura 2 - Metabolismo da fermentação alcoólica. ....	43
Figura 3 - Estrutura geral dos flavonóides e seus principais derivados indicando a substituição dos radicais. ....	50
Figura 4 - Estrutura dos compostos não-flavonóides e seus principais derivados. ....	52
Figura 5 - Estrutura química da glutatona reduzida (GSH) (A) e glutatona oxidada (GSSG) (B). ....	59
Figura 6 - Estrutura química das principais aminas bioativas encontradas em mosto e vinho. ....	62
Figura 7 - Metabolismo dos compostos nitrogenados pelas leveduras durante o processo de fermentação. ....	65
Figura 8 - Biossíntese dos compostos responsáveis pelos aromas varietais do vinho: monoterpenos e norisoprenóides. ....	67
Figura 9 - Formação dos alcoóis superiores durante o processo de fermentação do vinho. ....	70
Figura 10 - Síntese dos principais ésteres pelas leveduras <i>S. cerevisiae</i> . ....	72
Figura 11 - Metabolismo dos compostos sulfurados pelas leveduras <i>S. cerevisiae</i> . ....	75
Figura 12 - Formação dos compostos heterocíclicos pela reação de Maillard. ....	77

### CAPÍTULO 2

Fig. 1. Standard chromatogram of grape juice polyphenols by LLE method. A) Hydroxybenzoic acid, B) hydroxycinnamic acids, C) flavanols and tyrosol, D) stilbenes, E) flavonols. 1, Gallic; 2, protocatechuic; 3, vanillic; 4, syringic; 5, ellagic; 6, tyrosol; 7, catechin; 8, epicatechin; 9, trans-caftaric; 10, caffeic; 11, p-coumaric; 12, ferulic; 13, trans-resveratrol; 14, myricetin; 15, quercetin; 16, kaempferol. ....	83
Fig. 2. Principal component analysis of the free phenolic compounds, total phenolic (TP) and antioxidant activity (DPPH and ABTS) for <i>V. vinifera</i> and <i>V. labrusca</i> grapes. CS, Cabernet Sauvignon; M, Merlot; Ch, Chardonnay; SB, Sauvignon Blanc; Verm, Vermentino; Viog, Viognier; Nig, Niágara; NigR, Niágara Rosada; Isb, Isabel; Conc,	

Concord; Brd, Bordô. Data utilized were the average of 3 repetitions.....87

### **CAPÍTULO 3**

Figure 1 - Principal component analysis for the aminoacids and ammonium ions in the must (A) and volatile profile of the wines (B). Mver12 and Mver30, MSB12 and MSB30, Mviog12 and Mviog30: musts of Vermentino, Sauvignon Blanc, Viogner settled for 12 and 30 h, respectively. Wver12 and Wver30, WSB12 and WSB30, Wviog12 and Wviog30: wines of Vermentino, Sauvignon Blanc, Viogner made from musts settled for 12 and 30 h, respectively. Abbreviations for volatile compounds: E, ethyl; M, methyl; acet, acetate. .... 113

### **CAPÍTULO 4**

Figura 1 - Glutaciona reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e glutaciona total (GSH total) em mostos clarificados com agentes clarificantes bentonite, enzima e sílica gel (A) e nos respectivos vinhos (B). ..... 133  
Figura 2 - Alterações no conteúdo de nitrogênio total (NT) (A), nitrogênio protéico (NP) (B) e nitrogênio assimilável pelas leveduras (NAL) (C) durante o processo de fermentação alcoólica dos mostos clarificados com os diferentes agentes clarificantes: bentonite, enzima, sílica gel. .... 137  
Figura 3 - Análise de componentes principais do perfil volátil (compostos primários e de fermentação) dos vinhos obtidos de mostos clarificados com 3 agentes clarificantes (bentonite, enzima, sílica gel). ..... 156

### **CAPÍTULO 5**

Figure 1. Optimization on the extraction efficiency of heterocyclic compounds. Mean  $\pm$  SD (n = 3). (A) Relative peak area as a function of type of fiber for the extraction of heterocyclic compounds from wine, with the corresponding standard deviations. For each group, the ratio between the absolute peak area and the highest absolute area peak is presented along the Y-axis; (B) effect of the wine dilution using the headspace SPME method (50:50 and 25:75 water:wine)..... 163  
Figure 2. Response surface graph for solid-phase microextraction of the heterocyclic compounds, using pH *versus* NaCl (g), at a fixed extraction time of 55 min. .... 164

## CAPÍTULO 6

Figura 1 - Análise discriminante dos resultados para os vinhos tintos (VT) e vinhos brancos (VB) de acordo com a região vitícola. As variáveis utilizadas para análise foram: 1) compostos heterocíclicos; 2) aminoácidos e glutatona. (I) Bordeaux; (II) Cotês du Rhône; (III) Bourgogne; (IV) Alsace (A região de Alsace somente para vinhos brancos). Os centróides foram representados em cada região (\*). .... ..182

Figure 2 - Análise estatística das amostras de vinhos tintos procedentes da Região de Bordeaux, de diferentes safras. (A) Análise de componentes principais utilizando como variáveis a soma dos compostos heterocíclicos detectados em cada classe: furanos, tiazóis, tiofenos e pirazinas definidos pelas duas primeiras componentes (CP1 x CP2); (B) Dendograma da análise de Cluster usando todos os compostos heterocíclicos individuais, realizado pelo método de Ward. .... ..186



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Aminas biogênicas e os aminoácidos precursores.....	62
--	----

### CAPÍTULO 2

Table 1. Physicochemical parameters for berries of different grape varieties. ....	81
Table 2. Comparative repeatability (RSD %) and recovery (Rcv%) using relative peak area as a function of the extraction method for individual phenolic compounds determined by HPLC.....	82
Table 3. Analytical performance of liquid–liquid extraction for phenolic compound analysis. ....	84
Table 4. Individual phenolic compounds, total polyphenol compounds and antioxidant activity for <i>V. vinifera</i> and <i>V. labrusca</i> grapes. ....	86

### CAPÍTULO 3

Table 1 - General analysis of musts and wines after clarification process applying two different settling times. ....	99
Table 2 - Free amino acids, ammonium ion, protein nitrogen and biogenic amine content (mg/L) in the white musts after the clarification process applying two different settling times: 12 and 30 h. ....	100
Table 3 - Table 3. Concentration of varietal volatile compounds for experimental wines obtained by fermentation of musts settled for 30 and 12 h. ....	104
Table 4 - Concentration of volatile yeast fermentation products in experimental white wines obtained by fermentation of musts settled for 30 and 12 h. ....	107

### CAPÍTULO 4

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos e teor de ácidos orgânicos dos mostos clarificados com diferentes agentes clarificantes e dos respectivos vinhos. ....	127
Tabela 2 - Composição nitrogenada de mostos após o processo de clarificação com diferentes agentes clarificantes e percentual de	

consumo dos compostos nitrogenados durante a fermentação alcoólica.....	130
Tabela 3 -Concentração dos compostos fenólicos individuais (mg/L) polifenol total (mg/L) e atividade antioxidante (mM) dos mostos obtidos após o processo de clarificação com diferentes agentes clarificantes e dos respectivos vinhos. ....	140
Tabela 4 - Concentração de compostos voláteis primários, terpenos e C13-norisoprenóides, nos vinhos obtidos de mostos clarificados com 3 agentes clarificantes. ....	145
Tabela 5 - Concentração de alcoóis superiores e hexanol nos vinhos obtidos de mostos clarificados com 3 agentes clarificantes: bentonite, enzima e sílica gel. ....	147
Tabela 6 - Perfil de ésteres dos vinho obtidos de mostos clarificados com 3 agentes clarificantes. ....	149
Tabela 7 - Compostos sulfurosos voláteis nos vinhos obtidos de mostos clarificados com bentonite, enzima e sílica gel.....	153

## **CAPÍTULO 5**

Table 1. Flavor description, boiling point and ions monitored in SIM detection for each compound. ....	161
Table 2. Analysis of variance for response surface quadratic model for the sum of the peak areas for the heterocyclic compounds in wine. ....	163
Table 3. Linearity, detection and quantification limits, repeatability, reproducibility and accuracy of the method. ....	164
Table 4. Range of heterocyclic compounds (mg L <sup>-1</sup> ) in wine samples.....	165

## **CAPÍTULO 6**

Tabela 1 - Parâmetros clássicos dos vinhos. ....	172
Tabela 2 - Teores mínimos (Min) e máximos (Máx.) encontrados em amostras de vinhos brancos e tintos quanto ao conteúdo de aminoácidos, glutatona e compostos heterocíclicos.....	176
Tabela 3 - Matriz de classificação dos vinhos brancos (VB) e vinhos tintos (VT) considerando os compostos heterocíclicos (CH), aminoácidos (Aa), e glutatona (GSH) de acordo com a região vitícola.....	184

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico  
Acetil-CoA: Acetilcoenzima A  
ADP: adenosina difosfato (do inglês: *adenosine diphosphate*)  
ATP: adenosina trifosfato (do inglês: *adenosine triphosphate*)  
BSA: soro albumina bovina  
CA: análise de cluster (do inglês: *Cluster Analysis*)  
CAR/PDMS: Carboxen/Polidimetilsiloxano  
CG: cromatografia gasosa  
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência  
DAD: detector de arranjo de diodo (do inglês: *diod array detector*)  
DEEMM: diethyl ethoxymethylenemalonate  
DMS: dimetilsulfeto  
DNA: ácido desoxirribonucleico (do inglês: *deoxyribonucleic acid*)  
FID: detector de ionização de chama (do inglês: *flame ionization detector*)  
FLD: detector de fluorescência (do inglês: *fluorescence detector*)  
FPD: detector fotométrico de chama (do inglês: *flame photometric detection*)  
GSH: glutationa reduzida  
GSSG: glutationa oxidada  
GR: glutationa redutase  
Heterocíclicos-S,N,O: heterocílicos sulfurados, nitrogenados e oxigenados  
IDA: ácido iodoacético (do inglês: *iodoacetic acid*)  
LDA: linear discriminante analysis  
LLE: extração líquido-líquido (do inglês: *liquid-liquid extraction*)  
LOD: limite de detecção  
LOQ: limite de quantificação  
MS: detector de massas  
NAD: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (do inglês: *Nicotinamide adenine dinucleotide*)  
NADH: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida (do inglês: *Nicotinamide adenine dinucleotide reduced*)  
NAL: nitrogênio assimilável pelas leveduras  
NCR: repressão catabólica de nitrogênio (do inglês: *nitrogen catabolite repression*)  
NDA: naftaleno 2,3-dicarboxialdeido  
NP: nitrogênio protéico

NT:nitrogênio total  
NTU: unidade nefelométrica de turbidez (do inglês:*nephelometric turbidity unit*)  
OPA: ortoftaldeído (do inglês: *ortho-phthaldialdehyde*)  
PA: Poliacrilato  
PCA: *principal component analysis*  
PDMS: Polidimetilsiloxano  
PE: ponto de ebulição  
PT: polifenóis totais  
QuEChERS: rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro (do inglês: *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*)  
RSD: desvio padrão relativo (do inglês: *relative standard deviation*)  
SBSE: extração sortiva em barra de agitação (do inglês: *stir bar sorptive extraction*)  
SPE: extração em fase sólida (do inglês: *solid phase extraction*)  
SPME: microextração em fase sólida (do inglês: *solid phase microextraction*)  
SST: sólidos solúveis totais  
TCEP:tris (2-carboxietil) fosfana  
UV-Vis: ultravioleta-visível  
WC/DVB: Carbowax-divinilbenzeno

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>35</b>
<b>1. ESPÉCIES DE UVA DO GÊNERO VITIS .</b> .....	<b>36</b>
<b>2. PROCESSO DE VINIFICAÇÃO</b> .....	<b>37</b>
2.1 ETAPA PRÉ-FERMENTATIVA .....	38
<i>Processo de Clarificação do mosto</i> .....	39
2.2 PROCESSO DE FERMENTAÇÃO.....	41
<b>3. COMPOSTOS PRESENTES NA UVA E NO VINHO</b> .....	<b>45</b>
3.1 ÁLCOOL.....	45
3.2 AÇÚCARES.....	46
3.3 ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	47
3.4 COMPOSTOS FENÓLICOS .....	48
<i>Compostos Flavonóides</i> .....	49
<i>Compostos não-flavonóides</i> .....	52
<b>3.4.1 Atividade antioxidante</b> .....	<b>54</b>
3.5 COMPOSTOS NITROGENADOS.....	55
Amônio.....	56
Aminoácidos.....	56
Peptídeos .....	58
Proteínas .....	60
Aminas biogênicas .....	61
<b>3.5.1 Metabolismo do nitrogênio durante a fermentação</b> .....	<b>63</b>
3.6 COMPOSTOS VOLÁTEIS .....	65
<b>3.6.1 Terpenos</b> .....	<b>66</b>
<b>3.6.2 C13-norisoprenóides</b> .....	<b>68</b>
<b>3.6.3 Alcoóis superiores</b> .....	<b>69</b>
<b>3.6.4 Ésteres</b> .....	<b>71</b>
<b>3.6.5 Lactonas</b> .....	<b>73</b>
<b>3.6.6 Compostos sulfurados</b> .....	<b>74</b>
<b>3.6.7 Compostos heterocíclicos aromáticos</b> .....	<b>76</b>
<b>CAPÍTULO 2 - BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF VITIS VINIFERA AND VITIS LABRUSCA GRAPES: EVALUATION OF DIFFERENT EXTRACTION METHODS</b> .....	<b>79</b>

<b>Abstract.....</b>	<b>80</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>80</b>
<b>2. Material and methods.....</b>	<b>81</b>
2.1. Chemicals and reagents.....	81
2.2. Samples.....	81
2.3. Extraction processes for phenolic compound analysis.....	81
<b>2.3.1. Liquid–liquid extraction.....</b>	<b>81</b>
<b>2.3.2. Solid phase extraction.....</b>	<b>81</b>
<b>2.3.3. Ultrasound extraction.....</b>	<b>81</b>
<b>2.3.4. QuEChERS method.....</b>	<b>81</b>
<b>2.3.5. Repeatability and recovery for extraction methods.....</b>	<b>81</b>
2.4. HPLC assay for individual phenolic compounds.....	81
2.4.1. Calibration curves and analytical performance.....	82
2.5. Total polyphenols and antioxidant activity.....	82
2.6. Statistical analysis.....	82
<b>3. Results and discussion.....</b>	<b>82</b>
3.1. Comparison between extraction techniques.....	82
3.2. Analytical performance.....	82
3.3. Bioactive compounds and antioxidant activity of grape juices from <i>V. vinifera</i> and <i>V. labrusca</i> varieties.....	85
<b>4. Conclusions.....</b>	<b>87</b>
<b>References.....</b>	<b>87</b>

**CAPÍTULO 3 - RELATION BETWEEN NITROGEN COMPOUNDS IN MUSTS AND VOLATILE PROFILE OF WHITE WINES: INFLUENCE OF MUST CLARIFICATION PROCESS..... 89**

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>90</b>
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>91</b>
<b>2. MATERIAL AND METHODS.....</b>	<b>93</b>
2.1 CHEMICALS AND REAGENTS.....	93
2.2 GRAPE MUSTS - EXPERIMENTAL DESIGN.....	93

2.3 GENERAL ANALYSIS OF MUSTS AND WINES .....	94
2.4 NITROGEN COMPOUNDS .....	94
2.5 VOLATILE COMPOUNDS OF THE WINES.....	95
2.6 STATISTICAL ANALYSIS.....	97
<b>3. RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>98</b>
3.1 ENOLOGICAL PARAMETERS OF MUSTS AND WINES .....	98
3.2 NITROGEN COMPOUNDS OF THE MUSTS AND VOLATILE PROFILE OF THE WINES .....	99
3.3 CHEMOMETRIC ANALYSIS.....	112
<b>4. CONCLUSIONS.....</b>	<b>114</b>
<b>CAPÍTULO 4 - Influência do agente clarificante na composição fenólica e nitrogenada do mosto e o efeito na composição volátil e não volátil do vinho .....</b>	<b>117</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>118</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>119</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>121</b>
2.1 REAGENTES QUÍMICOS.....	121
2.2 AMOSTRAS .....	121
2.3 ANÁLISES DO MOSTO E VINHO.....	122
2.4 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.....	123
2.5 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA GASOSA .....	125
2.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	126
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	126
<b>3. RESULTADO E DISCUSSÃO.....</b>	<b>127</b>
3.1 PARÂMETROS CLÁSSICOS DO MOSTO E VINHO.....	127
3.2 INFLUÊNCIA DOS AGENTES CLARIFICANTES NO CONTEÚDO NITROGENADO DOS MOSTOS.....	129
<b>3.2.1 Consumo dos compostos nitrogenados durante a fermentação alcoólica e cinética de fermentação.....</b>	<b>133</b>
3.3 INFLUÊNCIA DOS AGENTES CLARIFICANTES NA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS MOSTOS E VINHOS .....	139

3.4 INFLUÊNCIA DOS AGENTES CLARIFICANTES E DA COMPOSIÇÃO NITROGENADA DO MOSTO NO PERFIL VOLÁTIL DO VINHO.....	143
3.5 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS .....	154

<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>156</b>
---------------------------	------------

**CAPÍTULO 5 - DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD FOR HETEROCYCLIC COMPOUNDS IN WINE: OPTIMIZATION OF HS-SPME CONDITIONS APPLYING A RESPONSE SURFACE METHODOLOGY..... 159**

<b>Abstract.....</b>	<b>160</b>
----------------------	------------

<b>1. Introduction .....</b>	<b>160</b>
------------------------------	------------

<b>2. Material and methods.....</b>	<b>161</b>
-------------------------------------	------------

2.1. Chemicals and Standards .....	161
------------------------------------	-----

2.2. Sample preparation and spiking.....	161
--	-----

2.3. Solid-phase microextraction (SPME) - Experimental design .....	162
---	-----

2.4. GC-MS analysis .....	162
---------------------------	-----

<b>3. Results and discussion .....</b>	<b>162</b>
--	------------

3.1. Method optimization.....	162
-------------------------------	-----

<b>3.1.1. Extraction mode and sample dilution.....</b>	<b>162</b>
--	------------

<b>3.1.2. Response surface methodology .....</b>	<b>163</b>
--	------------

3.2. Analytical performance.....	164
----------------------------------	-----

<b>3.2.1. Linearity and limits of detection and quantification.....</b>	<b>164</b>
---	------------

<b>3.2.2. Repeatability.....</b>	<b>164</b>
----------------------------------	------------

<b>3.2.3. Reproducibility.....</b>	<b>164</b>
------------------------------------	------------

<b>3.2.4. Accuracy and specificity.....</b>	<b>164</b>
---	------------

3.3. Wine analysis .....	165
--------------------------	-----

<b>4. Conclusions.....</b>	<b>166</b>
----------------------------	------------

<b>References.....</b>	<b>166</b>
------------------------	------------

**CAPÍTULO 6 - APLICAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS NA CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE VINHOS FRANCESES QUANTO AO**

<b>PERFIL DE AMINOÁCIDOS, GLUTATIONA E COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS-N,S,O.....</b>	<b>167</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>168</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>169</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>171</b>
2.1 REAGENTES QUÍMICOS.....	171
2.2 VINHOS.....	171
2.3 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (UHPLC).....	172
2.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	174
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA E QUIMIOMÉTRICAS .....	174
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>175</b>
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>188</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>189</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>191</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>221</b>
<b>APÊNDICE A</b> - Parâmetro analíticos de validação dos compostos determinados por cromatografia líquida.....	221
<b>APÊNDICE B</b> - Compostos voláteis determinados nos vinhos com os descritores aromáticos, limiar de percepção e íons utilizados para identificação e quantificação dos compostos por CG-MS.....	223
<b>APÊNDICE C</b> - Cromatograma de mosto contaminado com solução padrão de todos os aminoácidos, ion amônio e aminas biogênicas.....	225
<b>APÊNDICE D</b> - Cromatograma da glutaciona (GSH) de uma amostra de vinho branco adicionada de solução padrão. ....	226
<b>APÊNDICE E</b> - Cromatograma dos ácidos orgânicos de uma amostra de vinho branco. ....	227
<b>ANEXO .....</b>	<b>228</b>
<b>ANEXO A</b> - Estrutura química dos compostos heterocíclicos sulfurados, nitrogenados e oxigenados.....	228

<b>ANEXO B - Estrutura química dos aminoácidos presentes em uva e vinho. ....</b>	<b>230</b>
---	------------

## INTRODUÇÃO

No Brasil o cultivo da videira do gênero *Vitis* é bastante difundido, com destaque para o cultivo das variedades *Vitis vinifera*, de origem euro-asiáticas e *Vitis labrusca e híbrida*, originária da América Setentrional. O setor vitivinícola brasileiro apresenta uma característica atípica em relação aos países tradicionais produtores de vinhos, como França, Itália e Espanha, enquanto que nestes países são elaborados vinhos utilizando uvas viníferas (*V. vinifera*), no Brasil, também são elaborados vinhos de cultivares americanas (*V. labrusca*), denominados de vinhos comuns ou de mesa (BARNABÉ; VENTURINI FILHO; BOLINI, 2007). No Estado de Santa Catarina as uvas da espécie *V. labrusca* e as uvas híbridas são amplamente cultivadas e representam a maior parte da produção do Estado (PROTAS; CAMARGO, 2011).

A transformação da uva madura em vinho é realizada através do processo de vinificação, o qual abrange um conjunto complexo de etapas que são divididas em etapas pré-fermentativas que inicia com a colheita da uva até a obtenção do mosto, a etapa da fermentação que consiste na conversão dos açúcares fermentescíveis do mosto pelas leveduras em etanol, como também é nesta etapa que ocorre a formação da composição química do vinho (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a). Dentre as etapas pré-fermentativas mais importante na elaboração de vinhos, principalmente dos brancos, é o processo de clarificação do mosto, que tem como principal objetivo reduzir as partículas sólidas suspensas no meio, a qual interfere diretamente na fermentescibilidade do mosto. A eficiência desta etapa é controlada pela turbidez do mosto (FERRANDO; GÜELL; LÓPEZ, 1998; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; JACKSON, 2008). Uma prática comum dos enólogos é adicionar no mosto substâncias, denominadas de agentes clarificantes, com a finalidade de aumentar a eficiência da clarificação. Muitos compostos são empregados com esta função, dos quais enzimas, bentonite e sílicas são muito utilizados. O processo de clarificação resulta em alterações na composição química do mosto, principalmente na composição nitrogenada o que influenciaria a composição aromática do vinho. Além disto, podem ocorrer alterações na composição fenólica do mosto, uma vez que estes compostos podem permanecer adsorvidos no material precipitado no mosto (FERREIRA et al., 2002; LAMBRI et al., 2010).

A composição nitrogenada do mosto, como o íon amônio, aminoácidos, proteínas, peptídeos e aminas, exercem forte influência na composição do vinho, uma vez que são utilizados para o crescimento e

metabolismo das leveduras durante o processo de fermentação. Além disto, estes compostos influenciam diretamente na cinética de fermentação. Dentre os compostos nitrogenados, os aminoácidos compreendem a principal fração de nitrogênio assimilável pelas leveduras, os quais são metabolizados para originar os diferentes compostos voláteis e não voláteis dos vinhos (HENSCHKE; JIRANEK, 1993; FUGELANG; EDWARDS, 2007).

A composição aromática é um dos fatores de relevante importância na identidade, tipicidade e qualidade de um vinho. De acordo com suas origens, os compostos voláteis presentes no vinho podem ser classificados em: a) compostos voláteis varietais, que são provenientes das uvas, como os monoterpênicos e norisoprenóides; b) compostos voláteis fermentativos, aqueles formados pelo metabolismo das leveduras durante os processos de fermentação, como os alcoóis superiores, compostos sulfurados e nitrogenados, ésteres e acetatos. Além destes, alguns compostos podem ser formados por reações que ocorrem tanto durante o processo de vinificação como também durante o tempo de armazenamento dos vinhos, como os compostos voláteis heterocíclicos sulfurados, nitrogenados e oxigenados (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; JACKSON, 2008).

Muitos destes compostos voláteis sintetizados pelas leveduras são alterados em resposta à fonte de nitrogênio e/ou a concentração de nitrogênio do mosto. Os compostos mais influenciados pelo conteúdo nitrogenado são os alcoóis superiores e os ésteres, os quais contribuem para os aromas de fermentação do vinho e são principalmente correlacionados com a concentração de aminoácidos do meio (BELL; HENSCHKE, 2005). Assim, tem sido sugerido que controlar e modificar a composição nitrogenada do mosto pode ser uma ferramenta efetiva para modular a composição aromática e o estilo de vinho.

Outra classe de compostos muito importante presente na uva e no vinho são os compostos fenólicos, os quais são associados com compostos bioativos devido sua ação benéfica a saúde (FRANKEL et al., 1998; BURNS et al., 2000; GRIS et al., 2011).

Cabe ressaltar, que para realizar uma pesquisa de composição química em uma matriz complexa como a uva e o vinho, faz-se necessário a utilização de métodos analíticos otimizados e validados que forneçam resultados confiáveis e precisos. Uma etapa muito importante que precede a análise é o preparo da amostra, que deve ser otimizada para garantir o máximo de eficiência de extração. Com isto, foram avaliados diferentes processos de extração de compostos

fenólicos presentes no mosto das uvas, a fim de obter resultados analíticos precisos.

Este trabalho apresenta como objetivos: Avaliar o efeito do processo de clarificação do mosto de uvas brancas, em função do tempo e do agente clarificante. Foram avaliados o perfil de aminoácidos e os compostos fenólicos dos mostos como também a influência deste processo na composição volátil e não volátil dos vinhos; e desenvolver e validar um método para a quantificação simultânea de 24 compostos heterocíclicos sulfurados, nitrogenados e oxigenados em vinhos tintos e brancos. Vinhos de diferentes safras e regiões da França foram caracterizados quanto à presença de compostos heterocíclicos, glutatona e o perfil de aminoácidos.

A presente tese é estruturada na forma de capítulos, onde o primeiro capítulo apresenta uma revisão bibliográfica e os demais relatam os resultados desta pesquisa, os quais foram elaborados no formato de artigos científicos. Os resultados relatados nos capítulos 5 e 6 são referentes ao trabalho desenvolvido durante o estágio de doutorado 'Sanduíche' realizado no *Institut des Sciences de la Vigne et du Vin* (ISVV) da Universidade de Bordeaux 2, França, no período de março de 2012 a fevereiro de 2013.

O Capítulo 1 apresenta uma revisão bibliográfica que abrange o processo de vinificação com destaque para a etapa pré-fermentativa de clarificação do mosto, como também descreve a composição química da uva e do vinho. Esta revisão também contempla a formação dos principais compostos voláteis durante o processo de fermentação alcoólica. Ademais, destaca os métodos de extração e os métodos analíticos mais utilizados para determinar a composição volátil e não volátil da uva e do vinho.

No Capítulo 2 foram avaliados diferentes métodos de extração dos compostos fenólicos das uvas, e determinamos o conteúdo de compostos bioativos e a atividade antioxidante das uvas *Vitis vinifera* e *Vitis Labrusca* amplamente cultivadas no Brasil.

O Capítulo 3 avalia a influência do tempo de clarificação do mosto de uvas brancas na composição nitrogenada e no perfil volátil dos vinhos. Correlações são realizadas entre o conteúdo nitrogenado do mosto, principalmente os aminoácidos, e os compostos voláteis do vinho.

O Capítulo 4 apresenta a influência de agentes clarificantes, bentonite, enzima e sílica gel, na composição química, principalmente nitrogenada e fenólica, e a influência da ação destes agentes na composição volátil e não volátil do vinho. Além disto, este capítulo

apresenta o consumo dos aminoácidos pelas leveduras durante a fermentação alcoólica, relacionando com a cinética da fermentação, e apresenta a contribuição de cada composto nitrogenado do mosto como fonte de nitrogênio para as leveduras.

O Capítulo 5 apresenta o desenvolvimento e a validação de um método para a determinação de 24 compostos heterocíclicos sulfurados, nitrogenados e oxigenados em vinhos. A extração dos compostos foi realizada por microextração em fase sólida (SPME), a qual foi otimizada usando metodologia de superfície resposta.

O Capítulo 6 contém a identificação da presença de compostos heterocíclicos sulfurados, nitrogenados e oxigenados, de glutatona e o perfil de aminoácidos em vinhos tintos e brancos procedentes de diferentes regiões vitícolas da França, de diferentes safras. Identificados os compostos nos vinhos, foram utilizadas análises estatística multivariadas, para avaliar a influência de fatores como a safra e região vitícola na presença destes compostos. Foram identificados pela primeira vez simultaneamente 24 compostos heterocíclicos em vinhos.

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 1. ESPÉCIES DE UVA DO GÊNERO VITIS

A videira pertence à família *Vitaceae*. Essa família é constituída de 700 espécies, divididas em 12 gêneros e distribui-se nas regiões tropicais e subtropicais do planeta e em algumas áreas temperadas, como o vale do Reno, na Europa. A maior parte dos membros dessa família são espécies trepadeiras, dotadas de gavinhas (brotos ou inflorescências modificadas, que podem ter ventosas na extremidade). Vários gêneros são ornamentais, como *Cissus*, *Parthenocissus* e *Vitis*. No gênero *Vitis*, as gavinhas crescem inserindo-se nas fendas da estrutura que a suporta, devido ao fototropismo negativo. Uma vez inseridas, estas intumescem e aderem-se ao suporte, mantendo a planta erguida (HEYWOOD, 1993).

O cultivo da videira do gênero *Vitis* é bastante difundida no Brasil, com destaque para o cultivo das espécies *Vitis vinifera*, de origem euro-asiática, e *Vitis labrusca*, originária da América Setentrional. O cultivo de uva no Brasil ocupa uma área plantada de 82.530 hectares, com as maiores áreas de colheita e produção situadas nas Regiões Sul e Sudeste (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2012). O setor vitivinícola brasileiro apresenta uma característica atípica em relação aos países tradicionais produtores de vinho, como França, Itália e Espanha, enquanto que nestes países são elaborados vinhos somente de uvas vinífera (*V. vinifera*), no Brasil, também podem ser elaborados vinhos de cultivares americanas (*V. labrusca*), denominados de vinhos comuns (BARNABÉ; VENTURINI FILHO; BOLINI, 2007). No entanto, no Estado de Santa Catarina as uvas da espécie *V. labrusca* e as uvas híbridas (originadas do cruzamento entre diferentes espécies de *Vitis*) são amplamente cultivadas e representam 80% da produção do Estado (PROTAS; CAMARGO, 2011).

As uvas *V. labrusca* são denominadas de "uvas rústicas" ou "uvas de mesa", de maneira geral, estas caracterizam-se por apresentar elevada produtividade e alta resistência às doenças que atacam as cultivares de *V. vinifera*, como o míldio. Assim, esta resistência às doenças fúngicas, representa uma alternativa interessante para a produção de uvas, vinhos e sucos. Dentre as variedades mais cultivadas em Santa Catarina pode-se citar a variedade Isabel, Niágara Branca, Niágara Rosada, Bordô e Concord (PROTAS; CAMARGO, 2011). Alguns trabalhos tem sido realizados com as variedades de uvas *V. labrusca* com objetivo de caracterizar a uva e vinho cultivados em diferentes

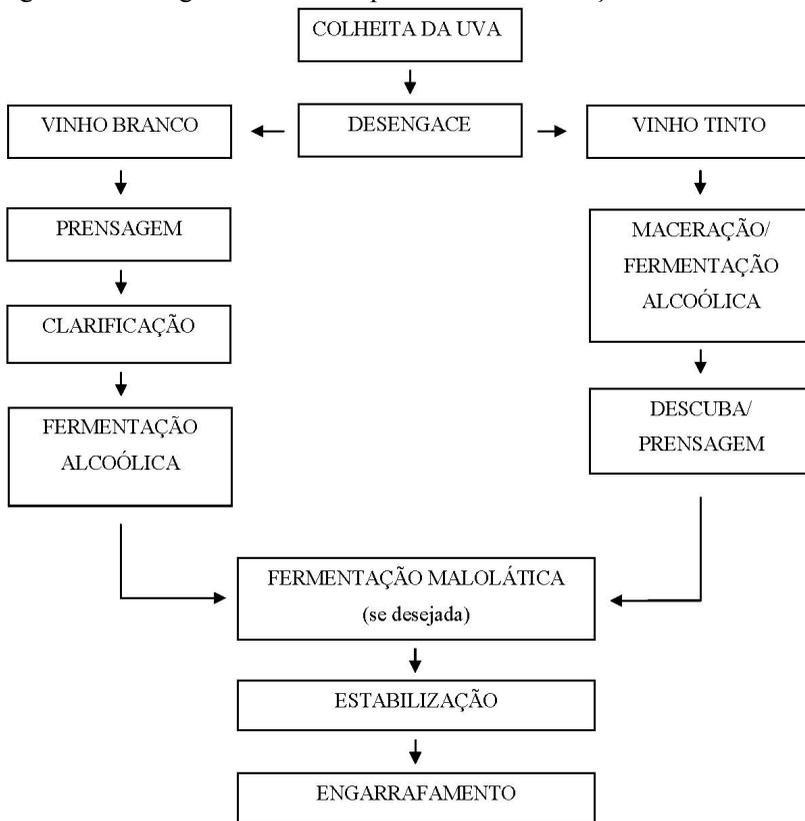
regiões do Brasil e assim valorizar a tipicidade local (NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010; LAGO-VANZELA et al., 2011).

Com relação à espécie *V. vinífera*, são denominadas como variedades de uva fina, e são principalmente destinadas para a elaboração de vinhos. No estado de Santa Catarina, o cultivo desta espécie representa ainda pequena parcela da produção, a qual é principalmente destinada para elaboração de vinhos tranquilos e espumantes. Dentre as variedades mais cultivadas no Estado, estão Cabernet Sauvignon e Merlot entre as uvas tintas e Chardonnay e Sauvignon Blanc entre as variedades brancas (MELO, 2012).

## **2. PROCESSO DE VINIFICAÇÃO**

A transformação da uva madura em vinho é realizada através do processo de vinificação, o qual abrange um conjunto complexo de etapas pré-fermentativas que inicia com a colheita da uva, até o processo de fermentação alcoólica e/ou fermentação malolática. A Figura 1 demonstra um fluxograma básico do processo de vinificação de vinhos tintos e brancos.

Figura 1 - Fluxograma básico do processo de vinificação.



Fonte: Adaptado de Jackson (2008).

## 2.1 ETAPA PRÉ-FERMENTATIVA

A etapa pré-fermentativa para elaboração de vinhos compreende diferentes processos, em que, de maneira geral, inicia com a colheita da uva, seguido do desengace com a separação das bagas de uva da raquis, esmagamento, maceração, prensagem e clarificação do mosto. No entanto, a realização destes processos e sua sequência são diferentes para a elaboração de vinhos brancos e tintos. Para os vinhos tintos, após o esmagamento da uva, é realizado diretamente a etapa de maceração, onde as partes sólidas da uva (casca e semente) são mantidas em contato com o mosto da uva antes e durante a fermentação alcoólica. Como principal efeito desta etapa está a extração da cor e dos taninos. O tempo

de maceração é realizado de acordo com o estilo de vinho desejado. No entanto, a etapa de maceração nem sempre é realizada para vinhos brancos, e quando realizada é por um curto período de tempo para manter o frescor e os aromas frutados do vinho (CLARKER; BAKKER, 2004).

Na elaboração de vinhos brancos a realização das etapas pré-fermentativas é extremamente importante com o objetivo de manter a qualidade do vinho e prevenir ocorrência da oxidação do mosto. De maneira geral, após o esmagamento, as uvas brancas são prensadas para liberar o mosto da uva, e então é separado o mosto das cascas e sementes. Posterior a esta fase, é realizado o processo de clarificação do mosto, com o objetivo de reduzir as partículas sólidas suspensas no meio (JACKSON, 2008). De acordo com pesquisadores, a realização da clarificação do mosto de uva branca é essencial para elaborar vinhos de qualidade e manter o caráter fresco e frutado dos vinhos brancos, uma vez que é nesta etapa que se condiciona a quantidade de matéria suspensa a qual interfere na fermentescibilidade do mosto (FERRANDO; GÜELL; LÓPEZ, 1998; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b).

#### *Processo de Clarificação do mosto*

Após a extração do mosto da uva, o mesmo se encontra turvo, contendo partículas em suspensão de diversas origens, tais como, partículas de terra, fragmentos da película e do engaço, restos celulares da polpa da uva, resíduos insolúveis dos produtos de tratamentos da videira, microrganismos, entre outros. Para eliminar este material suspenso antes de iniciar a fermentação alcoólica é realizado o processo de clarificação do mosto que tem como principal objetivo diminuir a quantidade de material insolúvel e consequentemente diminuir a turbidez do mosto. De maneira geral, durante a clarificação do mosto as pequenas partículas sólidas suspensas no meio são induzidas a coalescer formando partículas de tamanho maior, e assim devido ao aumento do peso são precipitadas no fundo do recipiente. O material que é sedimentado é então removido por *trasfega* o que permite obter um mosto com maior limpidez. Além de simplesmente remover material insolúvel, a clarificação também altera a composição química do mosto, devido à eliminação de compostos como, os ácidos orgânicos, compostos fenólicos e principalmente os compostos nitrogenados (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; JACKSON, 2008; MARCHAL; JEANDET, 2009).

A clarificação pode ser realizada através de processo dinâmico, como por exemplo, a centrifugação e a filtração a vácuo, ou de maneira estática sob temperatura controlada. De acordo com pesquisas, a clarificação dinâmica do mosto induz a maior perda de substâncias insolúveis no meio o que acarreta em vinhos com menor concentração de compostos aromáticos (FERRANDO; GÜELL; LÓPEZ, 1998; MOIO et al., 2004). Assim, dentre todas as técnicas, a clarificação estática é a mais utilizada (LOZADA et al., 2011; VALDÉS et al., 2011), onde o mosto é mantido a uma temperatura de refrigeração (4 °C) durante todo o processo. O tempo que o mosto permanece nesta condição para sedimentar as substâncias insolúveis é dependente das características da uva, como o grau de maturação, estado sanitário, e com a adição dos adjuvantes enológicos no mosto que auxiliam na sedimentação. Pesquisadores tem utilizado diferentes tempos para a clarificação do mosto, que variam de 12 h a 36 h (GUITART; HERNÁNDEZ-ORTE; CACHO, 1998; LOSADA et al., 2011; VALDÉS et al., 2011). De acordo com a literatura, o tempo de clarificação do mosto de uvas brancas influencia diretamente na turbidez do mosto e conseqüentemente na qualidade sensorial e aromática do vinho (KARAGIANNIS; LANARIDIS, 2002; VALDÉS et al., 2011).

Uma prática comum dos enólogos é adicionar no mosto determinadas substâncias, denominadas de agentes clarificantes, com a finalidade de aumentar a eficiência da clarificação, principalmente durante a clarificação estática. Muitos compostos são empregados com esta função, dos quais enzimas, bentonite e sílicas são muito utilizados.

As enzimas utilizadas na clarificação do mosto são preparações comerciais contendo pectinases ou preparados enzimáticos à base de enzimas pectinolíticas contendo principalmente pectina liase, poligalacturonase, pectina metilesterase e celulase, todas produzidas a partir de *Aspergillus niger*. O mecanismo de ação consiste na hidrólise da pectina, que acarreta uma diminuição da viscosidade do mosto e permite assim a sedimentação dos elementos sólidos em suspensão (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; UGLIANO, 2009). Pesquisadores demonstraram que o uso de enzimas durante a clarificação do mosto favorece a extração de compostos precursores dos aromas primários presentes na uva (MOIO et al., 2004).

A bentonite é o nome genérico dado a uma argila mineral formada por silicato de alumínio hidratado pertencente ao grupo das montmorilonites (LIPKA, 1974). Estruturalmente é composta por duas camadas tetraédricas de sílica e uma camada octaédrica de hidróxido de alumínio, combinadas em uma estrutura única, complexada com

compostos catiônicos como sódio, cálcio e magnésio. Seu mecanismo de ação ocorre através de uma interação eletrostática, através de um processo de troca catiônica, onde as camadas que compõe a bentonite são carregadas negativamente e assim adsorvem as cargas positivas (BOULTON et al., 1996). No pH do mosto e do vinho, a bentonite se comporta como um colóide eletronegativo que interage, flocula e precipita compostos carregados positivamente como as proteínas. Além destes, a bentonite pode interagir e remover outras espécies carregadas presentes no meio como também compostos que ficam adsorvidos nos precipitados protéicos como por exemplo os compostos fenólicos (FERREIRA et al., 2002; LAMBRI et al., 2010).

A sílica gel, uma mistura de dióxido de silício com gelatina, atua com mecanismo de ação similar à bentonite. Por se um composto eletronegativo, reage com os compostos de carga positiva presentes no mosto e vinho, especialmente com as proteínas. Sua atividade baseia-se na floculação recíproca entre as partículas de dióxido de silício, carregadas negativamente, e as da gelatina, que apresentam, entretanto, cargas positivas, com formação de flóculos que precipitam e são removidos. Durante a precipitação estes podem interagir e arrastar outros compostos presentes no meio. De acordo com a literatura, a principal vantagem de usar sílica gel em relação a bentonite é que a sílica não provoca significantes alterações nas características sensoriais do vinho (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; MARCHAL; JEANDET, 2009).

Após o processo de clarificação do mosto, a quantidade de sólidos do meio é controlada através da turbidez (NTU, unidades nefelométricas). De acordo com a literatura a turbidez do mosto deve variar entre 50 e 300 NTUs, o qual reflete diretamente na cinética de fermentação alcoólica e nas características aromáticas do vinho (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a). Pesquisadores demonstram que mosto clarificados excessivamente, com baixa turbidez, podem acarretar em fermentação incompleta, e com pouco ou nenhum aroma varietal. Por outro lado, mostos com alta turbidez tendem a originar vinhos com predomínio de aromas herbáceos e com perda das características frutadas do vinho (ANCÍN; AYESTARAN; GARRIDO, 1996; BELL; HENSCHKE, 2005).

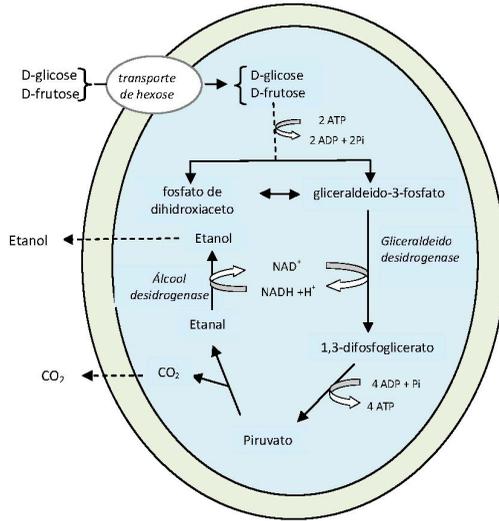
## 2.2 PROCESSO DE FERMENTAÇÃO

Após a preparação do mosto (etapa pré-fermentativa) ocorre o processo de fermentação pela ação de leveduras, principalmente

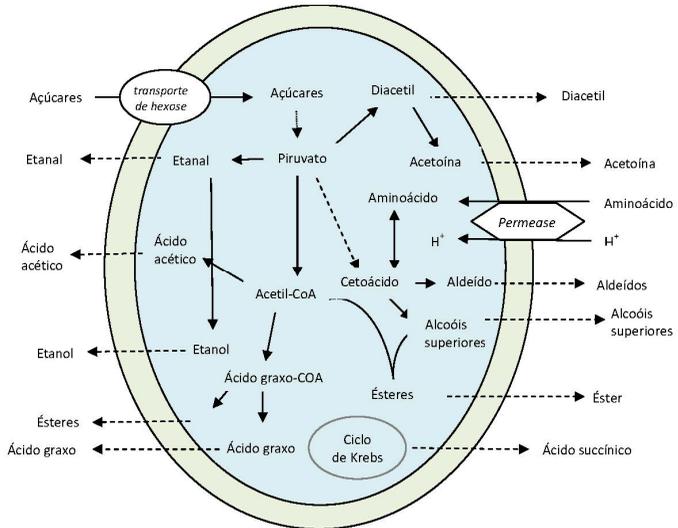
*Saccharomyces cerevisiae*, responsáveis pela fermentação alcoólica do vinho. Neste processo os açúcares fermentescíveis (glicose e frutose) presentes no mosto são convertidos pelas leveduras em etanol (álcool etílico) e dióxido de carbono com geração de energia na forma de ATP (adenosina trifosfato) na ausência de oxigênio. A fase inicial do catabolismo dos açúcares (principalmente da glicose) pelas leveduras ocorre através de uma via metabólica denominada de Glicólise ou Embden-Meyerhoff. Esta via envolve uma sequência de 11 reações químicas para quebrar as hexoses e liberar energia na forma de ATP. O produto final da glicólise é o piruvato, que então é utilizado pelas leveduras em outras vias metabólicas. Durante a fermentação alcoólica as leveduras em meio anaeróbio metabolizam o piruvato que sofre descarboxilação (perda de um átomo de carbono, na forma de CO<sub>2</sub>), pela ação enzimática (piruvato descarboxilase), formando aldeído acético. Este aldeído sofre redução formando o etanol, processo mediado pela enzima álcool desidrogenase (Figura 2A) (ZAMORA, 2009).

Figura 2 - Metabolismo da fermentação alcoólica.

A)



B)



Fonte: Adaptado de Zamora (2009)

O tempo para completar todo o processo de fermentação alcoólica, depende de vários parâmetros como por exemplo, da concentração de açúcares no mosto e de nitrogênio disponível para as leveduras, da turbidez, aeração e da temperatura do meio. A fermentação alcoólica é considerada completa de acordo com a concentração de açúcar do meio, que deve ser menor que 2 g/L de açúcares redutores. Além disto, a densidade também é controlada diariamente para monitorar a cinética da fermentação, que deve ser aproximadamente 0,994 g/L (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b).

Paralelamente a produção de etanol durante a fermentação alcoólica, também ocorrem diferentes reações químicas, bioquímicas e físico-químicas que tornam possível a transformação da uva madura em vinho. Assim, além do etanol, vários outros compostos presentes no vinho são produzidos durante a fermentação alcoólica por diferentes vias metabólicas e a partir de diferentes substratos, como por exemplo os alcoóis superiores, ésteres, acetatos, compostos sulfurados, entre outros (Figura 2B) (ZAMORA, 2009). É importante destacar que o desenvolvimento e a finalização de todo o processo de fermentação é dependente, além da ação das leveduras, da composição do mosto, que fornece os nutrientes para ser metabolizado pelas leveduras e assim originar todos os constituintes do vinho. Além dos açúcares, os compostos nitrogenados, com destaque para os aminoácidos, são essenciais e servem como substrato para a formação do *bouquet* aromático do vinho (CLARKE; BAKKER, 2004; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; JACKSON, 2008).

No final da fermentação alcoólica os vinhos podem ser submetidos a um segundo processo de fermentação denominado de fermentação malolática. A fermentação malolática é promovida pelo desenvolvimento de bactérias lácticas, que possuem a capacidade de transformar o ácido málico em ácido lático e em outros compostos secundários, como ácido acético, ácido succínico, glicerol, manitol e outros poliálcoois, gás carbônico e outros (JACKSON, 2008).

A fermentação malolática é realizada principalmente pela levedura *Oenococcus oeni*, uma espécie capaz de suportar baixo pH (pH<3,5), alto teor alcoólico (> 10% v/v) e altos níveis de dióxido de enxofre SO<sub>2</sub> (cerca de 50 mg/L). Estes parâmetros são característicos dos vinhos no final da fermentação alcoólica (JACKSON, 2008). Dentre as diversas reações químicas que ocorrem durante este processo, destaca-se a transformação do ácido málico em ácido lático. No entanto, também há produção de diversos compostos voláteis que alteram as características aromáticas dos vinhos. Como a principal consequência da

fermentação malolática é a diminuição da acidez do vinho, é principalmente realizada em vinhos tintos, para redução da sua acidez. Nos vinhos brancos, sua ocorrência pode ser evitada pela diminuição da temperatura (aproximadamente à 12 °C) imediatamente após ao final da fermentação alcoólica (COSTANTINI; GARCÍA-MORUNO; MORENO-ARRIBAS, 2009).

Após o final do processo de fermentação é realizada a *trasfega* do vinho, que consiste na transferência de um recipiente para outro, visando separá-lo dos sólidos insolúveis que sedimentam no fundo do tanque. Podem seguir também, em alguns casos, uma aeração do vinho, reequilibrando seu potencial de oxi-redução. Todo vinho produzido passa por um período de repouso, que tem por objetivo obter o ponto máximo qualitativo por meio de uma oxidação lenta, provocando alterações de cor, aroma e gosto. O período varia de um vinho para outro. Posteriormente os vinhos são engarrafados e armazenados (Figura 1) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b).

### **3. COMPOSTOS PRESENTES NA UVA E NO VINHO**

#### **3.1 ÁLCOOL**

Além da água, o etanol (álcool etílico) é o composto mais abundante no vinho. A quantidade de etanol em vinhos é expressa em termos de teor alcoólico ou porcentagem de álcool por volume. Nos vinhos, o álcool é principalmente produzido durante a fermentação alcoólica do açúcar presente no mosto (Figura 2 A). Entretanto, as células das uvas podem também formar pequenas quantidades principalmente sob condições anaeróbicas (maceração carbônica) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b). O etanol possui diversos efeitos em vinhos, como realçar o sabor, modificar a percepção de acidez, sensação de calor, contribui para o corpo do vinho, além de reduzir a adstringência de taninos. Durante o envelhecimento pode reagir com ácidos orgânicos produzindo ésteres ou com aldeídos produzindo acetais (JACKSON, 2008). A concentração de etanol em vinhos tranquilos brancos e tintos pode variar de 8 a 15 % e reflete o tipo de vinho e grau de maturação das uvas com as quais foi produzido. O conteúdo de etanol pode afetar as propriedades químicas, físicas e sensoriais do vinho, com efeitos na sensação de calor, no corpo, na viscosidade, no sabor, acidez, aroma e textura (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

Outro álcool simples presente em pequena concentração no vinho é o álcool metílico (metanol), formado durante a fermentação alcoólica,

resultante da hidrólise enzimática dos grupos hidroxil das pectinas durante a fermentação. Os vinhos elaborados com uvas híbridas ou *V. labrusca* apresentam maior conteúdo de metanol que aqueles com as variedades *V. vinifera*, devido a maior quantidade de pectina na casca das uvas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

O glicerol (propano 1,2,3-triol) é um poliálcool e está presente no vinho em baixas concentrações, produzido durante a fermentação. Apresenta como principal efeito modificar a viscosidade e o corpo do vinho (ZAMORA, 2009).

### 3.2 AÇÚCARES

Os açúcares são produzidos durante a fotossíntese nos vegetais, sendo que em uvas os principais açúcares são glicose e frutose. No início da maturação há o predomínio da glicose, mas à 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 *V. vinifera*, no entanto pode estar presente em até 10 % nos frutos de outras espécies de uva (*V. labrusca*, *V. bourquina*, entre outras). As uvas contêm ainda pequena quantidade de açúcares não fermentescíveis sendo estes encontrados também nos vinhos. Esses açúcares são as pentoses, principalmente arabinose e xilose (JACKSON, 2008).

O conteúdo de açúcares nas uvas depende, principalmente, da espécie, da variedade e do grau de maturação. As variedades de *V. vinifera* geralmente produzem 20% ou mais de açúcares na maturação, enquanto que outras espécies, como *V. labrusca* e *V. 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, o que gera no final da fermentação resíduos de frutose (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a; ZAMORA, 2009).

Os açúcares podem participar de reações bioquímicas envolvendo a ação de enzimas como pectinases e celulasas, e como resultado dessas reações diferentes frações de carboidratos são produzidas. A adição de

enzimas durante a vinificação é uma prática comum que visa melhorar a extração de compostos aromáticos (UGLIANO, 2009). Além disso, os açúcares como a glicose são precursores da biossíntese de ácidos orgânicos como ácido cítrico, málico e succínico (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a). Apesar de constituir uma classe de compostos minoritários, esses compostos contribuem para as propriedades sensoriais e podem participar de diferentes reações durante a fermentação e envelhecimento, como reações com ácidos e bases, reação de Maillard, oxidação e redução (UGLIANO, 2009).

### 3.3 ÁCIDOS ORGÂNICOS

Nas uvas os ácidos orgânicos predominantes são o tartárico e o málico, sendo que o succínico e o cítrico estão em menor concentração. A concentração destes ácidos varia de acordo com as condições climáticas, solo, variedade da uva, localização do vinhedo, bem também com as práticas agrônômicas. O ácido tartárico é o principal ácido presente na uva, encontrado em um pequeno número de espécies vegetais. Caracteriza-se por ser um ácido forte, por isto interfere diretamente no pH do vinho. O ácido málico natural da uva é o isômero L(-), considerado um ácido fraco e pouco resistente à respiração oxidativa (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a). No início da maturação é encontrado maior teor de ácido málico nas uvas, sendo que a partir do *veraison* (mudança de coloração das bagas de uva tintas), 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 (RIZZON; SGANZERLA, 2007).

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, láctico e acético) (VILJAKAINEN; LAAKSO, 2000). 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 sabor, aroma e cor, mas também a estabilidade química e o pH do meio, refletindo na qualidade final do vinho. O equilíbrio da acidez é uma característica essencial nos vinhos, sendo que em excesso realça a percepção de sabor ácido e adstringência,

enquanto que a baixa acidez reduz a harmonia do vinho (ROMERO; MUÑOZ, 1993).

No decorrer da fermentação alcoólica o ácido tartárico tem sua concentração diminuída pela precipitação sob a forma de cristais de bitartrato de potássio. A concentração do 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 láctico é originado a partir do ácido málico, durante a fermentação malolática, a qual tem como benefício fornecer ao vinho maior maciez. Traços de ácido succínico podem ser encontrados em todos os vinhos, o qual é oriundo do metabolismo das leveduras, principalmente a partir da biossíntese dos aminoácidos (UGLIANO; HENSCHKE, 2009). Sua presença está relacionada com a acidez total e com o enriquecimento no sabor e aroma do vinho durante o envelhecimento (ZOTOU; LOUKOU; KARAVA, 2004).

### 3.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são constituintes fundamentais dos vegetais resultantes do metabolismo secundário das plantas e influenciam diretamente na pigmentação, regulação do crescimento celular e na defesa contra agentes agressores. Do ponto de vista químico, os compostos fenólicos são caracterizados por apresentar um núcleo benzênico, agrupado a um ou vários grupos hidroxilas. Na uva estes compostos são principalmente encontrados nas cascas e sementes. Sua concentração depende da variedade da uva e é influenciada pelos fatores vitícolas e do meio ambiente, como por exemplo o estágio de maturação, condições climáticas e o solo (DELOIRE et al., 2005).

Nos vinhos, esses compostos constituem um parâmetro de qualidade devido à sua contribuição para as características organolépticas, particularmente para a cor (antocianinas) e para as sensações gustativas, como a adstringência e o amargor (ácidos fenólicos e flavanóis). São produzidos nos vinhos pelo metabolismo das leveduras, extraídos da casca e semente durante o período de maceração, assim como são oriundos da madeira durante envelhecimento dos vinhos em barricas (GÓMEZ-ALONSO; GARCÍA-ROMERO; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2007).

Os compostos fenólicos apresentam grande diversidade e podem ser subdivididos em dois grandes grupos em razão da similaridade de suas cadeias de átomos de carbono: flavonóides e não-flavonóides.

### *Compostos Flavonóides*

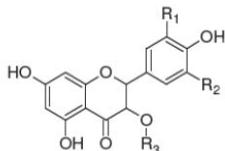
Os flavonóides são compostos fenólicos que se caracterizam por uma estrutura básica e comum C6-C3-C6, sintetizados a partir da combinação dos derivados da fenilalanina (através da rota do ácido chiquímico) e ácido acético (JACKSON, 2008). A estrutura base consiste em dois anéis aromáticos ligados por um anel pirano. Podem ocorrer na forma livre, glicosilada ou acilada. Ao contrário da uva e do vinho tinto, nas variedades brancas os flavonóides correspondem a uma concentração menor que 20% do teor total de compostos fenólicos, uma vez que o processo de fermentação ocorre na ausência das partes sólidas da uva.

A composição de compostos flavonóides no vinho depende não somente dos compostos presentes na uva, mas também da extração desses compostos e subsequentes reações durante o processo de vinificação. Dessa forma, vinhos brancos obtidos através da prensagem direta, com o mínimo de contato com a casca contêm em sua maioria os compostos flavonóides presentes somente na polpa. A extração de compostos continua até que os sólidos sejam separados do mosto através da prensagem. A composição também é afetada por fatores pré-fermentativos, como a clarificação, que pode diminuir a concentração destes compostos no mosto através da precipitação das substâncias insolúveis do meio (CHEYNIER; SILVA, 1991; BADERSCHNEIDER; WINTERHALTER, 2001).

Os compostos flavonóides (Figura 3) são divididos em 3 grupos: flavonóis, flavanóis e antocianinas. As antocianinas estão presentes nas cascas das uvas tintas e são responsáveis pela sua coloração, não estão presentes em uva e vinho branco.

Figura 3 - Estrutura geral dos flavonóides e seus principais derivados indicando a substituição dos radicais.

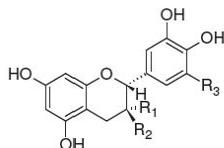
### Flavonóis



<i>Flavonol</i>	$R_1$	$R_2$	$R_3$
Quercetina	OH	H	H
Mircetina	OH	OH	H
Campferol	H	H	H

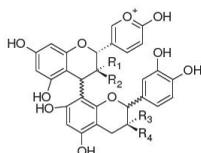
### Flavanóis

(A)



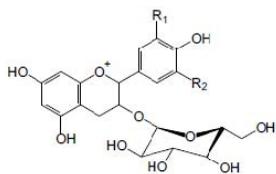
<i>Flavanol</i>	$R_1$	$R_2$	$R_3$
(+)-Catequina	H	OH	H
(-)-Epicatequina	OH	H	H

(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

### Antocianinas



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

Fonte: Spacil, Nováková e Solidh, 2008.

Dentre os compostos flavonóides, os flavanóis estão presentes em maior concentração em uvas e vinhos brancos. Nas uvas, estes compostos são sintetizados principalmente nas cascas. Exercem papel importante na proteção contra as radiações ultravioletas. A quercetina é o flavonol majoritário nas uvas tintas e brancas, e nas variedades brancas o campferol é encontrado em menor concentração. A síntese destes compostos inicia semanas após o início da floração e continua após o período do *veraison* (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a). De acordo com Mattivi et al. (2006) cada variedade de uva apresenta perfil específico de flavanóis, tanto qualitativa como quantitativamente, podendo ser usada para a caracterização taxonômica. Estudos demonstram que o conteúdo de flavanóis é dependente da exposição ao sol das uvas, da fertilização nitrogenada e do estado hídrico das variedades (CANTOS et al., 2000).

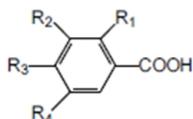
A composição de flavanóis nas uvas é dependente das condições genéticas e do desenvolvimento da planta. A síntese destes compostos ocorre principalmente nas sementes, iniciando após o período de floração, mas também podem ser encontrados em alta concentração nas cascas das uvas. Pesquisas demonstram que sua concentração mantém constante durante todo o período de maturação (DOWNEY; HARVEY; ROBINSON, 2003), enquanto outros afirmam que a concentração de flavanóis aumenta após o *veraison* (KENNEDY; MATTHEWS; WATERHOUSE, 2000). Os flavanóis presentes nas uvas são representados por flavanóis e proantocianidinas. O primeiro grupo encontra-se principalmente na forma livre, representado por (+)-catequina e (-)-epicatequina, sendo a catequina o composto majoritário, tanto nas variedades brancas como nas tintas. Estes compostos são extraídos das cascas e sementes da uva durante o processo de vinificação e durante o 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). Vinhos brancos produzidos sem a etapa de maceração (contato com as cascas) apresentam pequenas concentrações de flavanóis, uma vez que estes estão presentes nas cascas. As proantocianidinas, também denominadas de taninos condensados, são oligômeros e polímeros de catequina e epicatequina, com destaque para a proantocianidina B1. Em uvas e vinhos brancos a concentração de proantocianidina é na ordem de traços, aproximadamente 20 vezes menor que em variedades tintas (JACKSON, 2008).

### Compostos não-flavonóides

Os compostos não-flavonóides são sintetizados nas uvas a partir da fenilalanina, enquanto que aqueles originados durante o processo de vinificação, através da ação das leveduras, são sintetizados a partir do ácido acético (JACKSON, 2008). Ao grupo de compostos fenólicos não-flavonóides pertencem os ácidos fenólicos (derivados do ácido hidroxibenzóico e do ácido hidroxicinâmico) e outros derivados fenólicos como os estilbenos (resveratrol *cis* e *trans*) e o tirosol (Figura 4). Na uva e no vinho o mais comum não-flavonóide são os derivados do ácido hidroxicinâmico, que se encontram na casca e polpa, principalmente sob a forma de ésteres tartáricos, também denominados de hidroxicinamatos (ácidos caftárico, fertárico e cutárico). Os ácidos cinâmicos são sintetizados nas uvas a partir da fenilalanina pela via do ácido chiquímico, onde o aminoácido é convertido até o ácido *trans*-cinâmico por ação enzimática (RENTZSCH; WILKENS; WINTERHALTER, 2009).

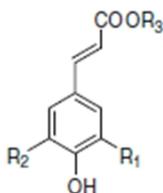
Figura 4 - Estrutura dos compostos não-flavonóides e seus principais derivados.

#### Ácidos hidroxibenzóicos



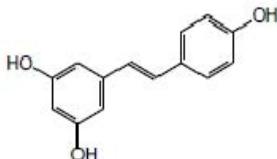
Benzóicos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Ác. gálico	H	OH	OH	OH
Ác. vanílico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Ác. siríngico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Ác. protocateico	H	OH	OH	H
Ác. <i>p</i> -hidroxibenzóico	H	H	OH	H

#### Ácidos hidroxicinâmicos

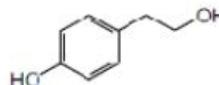


Cinâmicos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Ác. cafeico	OH	H	H
Ác. ferrúlico	OCH <sub>3</sub>	H	H
Ác. <i>p</i> -cumárico	H	H	H
Ác. caftárico	OH	H	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>

Figura 4 – Continuação

*Trans*-resveratrol

Tirosol



Fonte: Spacil, Nováková e Solidh, 2008.

Em mostos no início do processo de maceração e nos vinhos, devido à ocorrência de reações enzimáticas hidrolíticas, também encontram-se as formas livres (ácidos cafeico, ferrúlico, e *p*-cumárico) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a; SPÁCIL; NOVÁKOVÁ; SOLIDH, 2008). Dentre estes compostos, o ácido caftárico é encontrado em maior concentração em mostos e vinhos de variedades brancas. A principal função dos ácidos hidroxicinâmicos é a participação nas reações de oxidação que conduzem ao acastanhamento de mostos e vinhos, principalmente nas variedades brancas com destaque para o ácido caftárico, enquanto que nas uvas tintas participam das reações com as antocianinas, agindo como copigmentos (JACKSON, 2008). Embora não exerçam influência direta no gosto dos vinhos, os ácidos hidroxicinâmicos estão envolvidos no aparecimento de fenóis voláteis com consequentes alterações aromáticas (VRHOVSEK, 1998). As concentrações dos ácidos caftárico e cutárico diminuem durante a fermentação do vinho, porém durante o envelhecimento essas perdas ocorrem com menor intensidade. Diferentes concentrações destes compostos no vinho são descritas na literatura, a qual está relacionada a fatores referentes à variedade da uva, às condições climáticas, a fatores pré-fermentativos e ao processamento durante a vinificação (BETÉS-SAURA; ANDRÉS-LACUEVA; LAMUELA-RAVENTÓS, 1996; FERNÁNDEZ-ZURBANO, 1999).

Entre os compostos derivados do ácido benzóico presentes na uva e no vinho destacam-se os ácidos gálico, siríngico, vanílico, *p*-hidroxibenzóico e protocatéico. O ácido gálico pode estar presente em vinhos em altas concentrações, pois além de ser proveniente das uvas, também é formado durante a hidrólise dos taninos condensados que pode ocorrer durante o período de armazenamento do vinho. Os ácidos hidroxibenzóicos estão presentes nas uvas na forma de éster e durante a vinificação são lentamente hidrolisados, apresentando-se na forma de

compostos livres. Vinhos que passam por envelhecimento em barricas apresentam elevados níveis de hidroxibenzoicos, principalmente de ácido elágico (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

Dentre os estilbenos, destacam-se os seus monômeros: *cis* e *trans* resveratrol. Esses compostos são fitoalexinas, sintetizados pela videira em resposta a uma situação de estresse. Resveratrol e seus derivados concentram-se nas cascas das uvas, por isso vinhos tintos apresentam maior concentração (MATTIVI, 1993). O *trans*-resveratrol (*trans*-3,5,4-trihidroxi estilbeno) é o composto mais estudado devido a seu potencial benéfico para a saúde humana e é encontrado principalmente em vinhos tintos em concentrações muito variadas. Vinhos brancos apresentam menor concentração de estilbenos que os tintos. O isômero *cis* é formado a partir da isomerização do *trans*-resveratrol ou a partir da quebra de polímeros de resveratrol durante a fermentação do vinho. As formas glicosiladas (*piceid*) do resveratrol são constituintes naturais de uvas (MATTIVI, 1993).

O metabolismo das leveduras pode produzir adicionais compostos não-flavonóides, sendo que o mais prevalente é o tirosol. O tirosol (2-4-hidroxifenol etilalcool) é um composto presente nos vinhos, tintos e brancos, produzido a partir da tirosina (4-hidroxifenil-L-fenilalanina) pelas leveduras durante a fermentação do mosto, é o único composto fenólico produzido em quantidades significativas a partir de precursores não fenólicos (COVAS et al., 2003; JACKSON, 2008). A concentração de tirosol no vinho foi relatada ser independente da variedade de uva e do envelhecimento do vinho (DI STEFANO, 1999).

### 3.4.1 Atividade antioxidante

As reações de oxidação nos sistemas biológicos induzem a formação de radicais livres no organismo. Estes compostos, devido a sua estrutura química, são altamente reativos, agindo sobre muitas moléculas biológicas do nosso 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 e cardiovasculares, assim como inflamações crônicas (CHEUNG; CHEUNG; OOI, 2003).

Com o intuito de identificar substâncias que apresentam efeitos protetores, pesquisas evidenciaram que os compostos fenólicos, presentes em frutas e vegetais, apresentam alta capacidade antioxidante (FRANKEL et al., 1998; BURNS et al., 2000). As uvas são ricas em

compostos fenólicos, como por exemplo, catequina, 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* (GRIS et al., 2011) e *in vitro* (CIMINO et al., 2007; BURIN et al., 2011), propriedades antiinflamatória, anticarcinogênicas e proteção contra doenças cardiovasculares (FRANKEL et al., 1998).

O efeito antioxidante destes compostos ocorre por agirem como sequestradores das espécies reativas de oxigênio (“*scavengers*”) etambém 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).

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 hidroxila 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 C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> combinado com grupo OH na posição 3 do anel C (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

### 3.5 COMPOSTOS NITROGENADOS

O nitrogênio é um macronutriente que desempenha papel importante no desenvolvimento das funções e dos processos biológicos da videira e dos microorganismos. Assim, o conteúdo de nitrogênio da uva influencia na concentração e composição dos componentes do vinho,

como por exemplo, na composição de polifenóis, amins biogênicas, ésteres, alcoóis superiores, terpenos, entre outros (BELL; HENSCHKE, 2005). Os compostos nitrogenados estão presentes na uva e no mosto na forma inorgânica (amônio) e orgânica (aminoácidos, peptídeos e proteínas). Dentre estes compostos, o íon amônio e os aminoácidos são as principais fontes nitrogenadas utilizadas pelas leveduras durante o processo de vinificação. A composição nitrogenada da uva e do vinho depende de vários fatores, como a variedade e o grau de maturação da uva, o tipo de solo e sua fertilização nitrogenada, das etapas pré-fermentativas como a clarificação do mosto, da espécie de levedura utilizada no processo de fermentação, entre outros (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

### *Amônio*

O amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) é um importante componente nitrogenado da uva e do mosto, o qual é a fonte nitrogenada preferencial pelas leveduras principalmente no início do processo de fermentação alcoólica onde é rapidamente consumido (BISSON, 1991; JIRANEK et al. 1995). Sua concentração no mosto varia largamente, e tem sido reportado entre 5 - 350 mg N/L (HENSCHKE; JIRANEK 1993), enquanto que nos vinhos sua concentração é bem inferior. O íon amônio pode representar de 5 - 53% do nitrogênio assimilável pelas leveduras (NAL) (HUANG; OUGH, 1989).

Uma prática muito comum entre os viticultores é adicionar sais de amônio, especialmente na forma de fosfato de diamônio, no vinhedo com o objetivo de manipular a concentração nitrogenada final do mosto. Além disto, pesquisas tem demonstrado que a adições de amônio diretamente no mosto antes da fermentação, principalmente naqueles deficientes de nitrogênio, acarreta em vinhos com diferentes características aromáticas (AYESTARÁN et al., 1995; VILANOVA et al., 2007; UGLIANO et al., 2009).

### *Aminoácidos*

Os aminoácidos são os principais componentes nitrogenados de mostos e vinhos, representam uma importante fonte de nutrientes das leveduras durante os processos de fermentação alcoólica e malolática, sendo utilizados tanto para a síntese de compostos voláteis como também para os composots não voláteis presentes nos vinho (RAPP; VERSINI, 1991).

Durante o período de maturação das uvas há um considerável aumento na concentração total de aminoácidos. Pesquisas demonstram que a diminuição na produtividade por planta acarreta um aumento no conteúdo de nitrogênio total e também nos níveis de aminoácidos, principalmente de prolina (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a). De acordo com Garden-Cerdán et al. (2009) a composição de aminoácidos de diferentes variedades de uvas no período da colheita pode ser utilizada como ferramenta para diferenciar as variedades de uva. Os aminoácidos livres mais abundantes em mostos são geralmente arginina, prolina, alanina, no entanto em certas variedades, a prolina pode representar entre 80 a 90% do teor de aminoácidos livres totais (DAUDT; BOEIRA; PEREIRA, 1995).

Os aminoácidos no mosto da uva são geralmente presentes em concentrações que variam entre 100 - 4000 mg/L, enquanto que em vinhos a concentração total pode variar de 3 - 3000 mg/L. A concentração dos aminoácidos individuais nas uvas varia consideravelmente, dependente principalmente dos tratamentos vitícolas realizados nos vinhedos como também das etapas pré-fermentativas realizadas no mosto (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b).

Os aminoácidos livres presentes no vinho podem ser de diferentes origens, como aqueles provenientes da uva que são parcial ou totalmente metabolizados pelas leveduras durante a fermentação, e os aminoácidos também podem ser liberados pelas leveduras no final da fermentação ou originados por proteólise durante a autólise das leveduras (MORENO-ARRIBAS et al., 1998). Alguns dos aminoácidos preferencialmente assimilados pelas leveduras durante o processo de fermentação são a arginina, ácido glutâmico, glutamina, ácido aspártico, asparagina, treonina e serina. A arginina é quantitativamente o mais importante aminoácido utilizado pelas leveduras (HENSCHKE; JIRANEK, 1993; JIRANEK et al., 1995), o seu catabolismo é realizado pela enzima arginase com formação de ornitina e uréia, que irão originar glutamato e amônio, respectivamente. A arginina é rapidamente incorporada pelas leveduras no início da fermentação e subsequentemente é excretada no vinho durante a autólise das leveduras. A prolina, um aminoácido secundário, tem sua utilização limitada pelas leveduras durante a fermentação alcoólica, devido ser necessário a presença de oxigênio para ação da prolina oxidase (BELL; HENSCHKE, 2005). Simultaneamente, através de processo enzimático as leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*, degradam peptídeos de baixo peso molecular, liberando diferentes aminoácidos para o meio. Devido à falta

de atividade proteolítica extracelular desta levedura, as proteínas não podem ser usadas como fonte de nitrogênio.

A fração nitrogenada utilizada pelas leveduras é denominada de nitrogênio assimilável (NAL). Diversos fatores são envolvidos na utilização de aminoácidos durante a fermentação alcoólica, como a temperatura, a concentração de açúcar e a concentração de oxigênio. A concentração e o tipo de aminoácido que permanece no vinho após a fermentação, exerce forte influência na composição aromática do vinho durante o seu período de envelhecimento (BELL; HENSCHKE, 2005).

Os vinhos que são submetidos a fermentação malolática apresentam menor concentração de aminoácidos livres, principalmente de arginina, devido ser preferencialmente metabolizada pelas bactérias lácticas. No entanto, a concentração de alguns aminoácidos como leucina, metionina, triptofano, ácido aspártico e glutâmico podem aumentar significativamente após este período (SOUFLEROS et al., 2003).

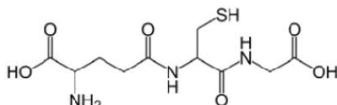
### *Peptídeos*

Os peptídeos formam um grupo heterogêneo de compostos, devido sua estrutura química, composição e sequência de aminoácidos. Geralmente são denominados de oligopeptídeos ou peptídeos de baixo peso molecular. Os oligopeptídeos presentes em mostos e vinhos são compostos de no máximo 4 aminoácidos. Estes compostos estão envolvidos no vinho em diversas propriedades, como por exemplo, exercem ação tensoativa, principalmente para os espumantes, nas características sensoriais e na atividade antioxidante. Além disto, podem agir como importante fonte de nutrientes para as leveduras durante o processo de fermentação. A fração de peptídeos do vinho pode ser oriunda do mosto, ou então originada durante os diferentes estágios de elaboração do vinho, principalmente na fermentação alcoólica (POSO-BAYÓN et al., 2005).

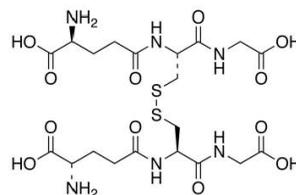
Entre um grande número de peptídeos encontrados no mosto e no vinho, pode-se destacar a glutatona ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinylglycine), que é um importante tripeptídeo, formado pela união enzimática de 3 aminoácidos: ácido glutâmico, cisteína e glicina. A glutatona pode estar presente na sua forma reduzida (GSH) (Figura 5A) ou na sua forma oxidada (GSSG) (Figura 5B).

Figura 5 - Estrutura química da glutatona reduzida (GSH) (A) e glutatona oxidada (GSSG) (B).

(A)



(B)



Fonte: Webber et al., 2012

Os níveis de GSSG no mosto e vinho podem ser utilizados com indicativos de oxidação (DU TOIT et al., 2007). A glutatona reduzida (GSH) possui propriedade de sequestrar radicais livres devido a sua capacidade de transferir um átomo de hidrogênio do seu grupo sulfidril (SH), como também tem a capacidade de manter em forma reduzida muitas outras moléculas presentes no mosto/vinho. Enquanto oxidantes favorecem a formação de GSSG, a manutenção dos níveis de GSH ocorre devido à redução da GSSG por NADPH, uma reação catalisada pela glutatona redutase (GR) (NOCTOR; FOYER, 1998; DU TOIT et al., 2007).

A glutatona exerce uma importante função associada à prevenção da oxidação do mosto e vinho, principalmente nas variedades de uvas brancas. Sua ação antioxidante ocorre devido ao resíduo de cisteína reagir parcialmente com as *orto*-quinonas, que são originadas por reações enzimáticas com os compostos fenólicos principalmente com os ácidos hidroxicinâmicos, o que resulta no impedimento das reações de oxidação do fenol. Este mecanismo está associado principalmente com a prevenção do escurecimento do vinho branco. A medida que esta reação ocorre os níveis de glutatona reduzida diminuem no meio (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

A concentração de glutatona nas uvas e mostos é muito variável e depende principalmente da variedade de uva, podendo variar de 0,001 mg/L a 100 mg/L (CHEYNIER; CHEUNG; OOI, 1989; PARK; BOULTON; NOBLE, 2000), enquanto que nos vinhos sua concentração pode variar de 0,01 a 30 mg/L para vinhos brancos, cerca de 3 mg/L em vinhos tintos e 40 mg/L em sucos de uvas (DU TOIT et al., 2007; JANES; LISJAK; VANZO, 2010; MARCHAND; De REVEL, 2010; FRACASSETTI et al., 2011). O teor de glutatona nos vinhos é

relacionado com o conteúdo nitrogenado do mosto. Pesquisas têm demonstrado dados contraditórios em relação à concentração de glutatona durante o processo de fermentação, enquanto que alguns pesquisadores afirmam que sua concentração aumenta (PARK; BOULTON; NOBLE, 2000; LAVIGNE; PONS; DUUBORDIEU, 2007), outros observaram haver uma diminuição da concentração de glutatona ao longo da fermentação (Du TOIT et al., 2007; PATEL et al., 2010).

Pesquisadores propõem que a glutatona exerce importante papel na proteção de tióis voláteis, que são responsáveis pelos aromas varietais nos vinhos brancos durante o envelhecimento em garrafa. No entanto, mesmo com efeitos benéficos confirmados, a adição de glutatona como um aditivo no processo de vinificação deve ser cautelosa, pois concentrações acima de 50 mg/L podem levar ao desenvolvimento de aromas desagradáveis associados aos compostos voláteis sulfurados (DUBOURDIEU; LAVIGNE-CRUÈGE, 2004).

### *Proteínas*

As proteínas são macromoléculas com peso molecular acima de 10.000 Da e consistem de cadeias ou sequência de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. De acordo com o pH do meio, as proteínas podem ser positivamente ou negativamente carregadas, assim como apresentar o pH igual ao ponto isoeletrico e ter carga neutra (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

A concentração de proteínas na uva aumenta durante o período de maturação, no entanto, fatores como stress, ação de patógenos e deficiência hídrica também estão relacionados com o aumento da concentração protéica. Pesquisadores observaram que uvas infectadas com patógenos induziram um aumento da expressão de alguns genes relacionados a síntese protéica, o qual acarretou maior concentração de proteínas nestas uvas (BÉZIER; LAMBERT; BAILLIEU, 2002). Pesquisadores indicam que as proteínas do vinho são originadas principalmente da uva (DAMBROUCK et al., 2003), no entanto, Yokotsuka, Ebihara e Sato (1991) ao analisar o perfil de proteínas de uvas Koshu encontraram no vinho 8 frações protéicas que não estavam presentes no mosto desta uva e sugeriram que foram originadas a partir das leveduras.

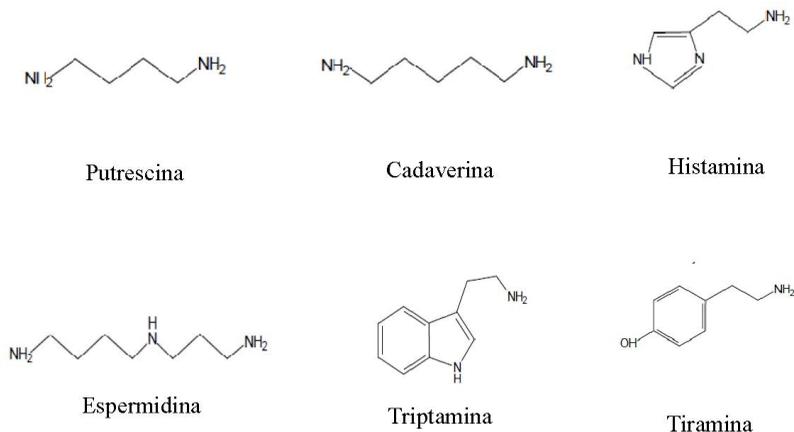
As proteínas presentes no mosto são as principais causas de instabilidade, afetando a clarificação dos vinhos, principalmente os brancos. Quando as proteínas precipitam, originam a chamada casse

protéica, que é caracterizada pelo aparecimento de maior turbidez ou depósitos de precipitados nas garrafas, principalmente quando estocadas em temperaturas superiores a 25 °C. Este fenômeno de ‘casse’ também pode ocorrer quando os taninos se ligam as proteínas formando um colóide hidrofóbico que irá flocular na presença de cátions no meio. Assim, a floculação de proteínas torna-se responsável por problemas relacionados à clarificação de vinhos brancos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a). Pesquisas utilizando eletroforese em gel demonstram que as proteínas responsáveis por causar instabilidade no vinho são idênticas aquelas presentes no mosto, originadas diretamente da uva. Waters, Wallace e Williams (1991), demonstraram que as proteínas instáveis em vinhos Muscat são caracterizadas com peso molecular entre 24.000 a 32.000 Da, e a composição dos aminoácidos inclui alta proporção de ácido aspártico, glicina, treonina e serina. No entanto, os tipos específicos de proteínas, bem como seu ponto isoelétrico, grau de glicosilação e sensibilidade ao calor, diferem principalmente de acordo com a variedade de uva.

### *Aminas biogênicas*

As aminas biogênicas são compostos amplamente encontrados na natureza, de baixo peso molecular com um ou mais substituintes orgânicos ligados ao átomo de nitrogênio. De acordo com a estrutura química as aminas podem ser classificadas como alifáticas (putrescina, cadaverina, espermidina), aromática (tiramina, feniletilalanina) ou heterocíclica (histamina, triptamina). A estrutura química das principais aminas presentes em vinho está apresentada na Figura 6, dentre estas, a histamina é encontrada em maior concentração no vinho (SMIT; TOIT; TOIT, 2008).

Figura 6 - Estrutura química das principais aminas bioativas encontradas em mosto e vinho.



Fonte: Smit, Toit e Toit, 2008.

As aminas são formadas principalmente durante os processos de fermentação, como também durante o período de armazenamento, produzidas pela descarboxilação do correspondente aminoácido precursor (Tabela 1).

Tabela 1 - Aminas biogênicas e os aminoácidos precursores.

<i>Aminoácido</i>	<i>Bioamina</i>
histidina	histamina
fenilalanina	feniletilamina
ornitina	putrescina
lisina	cadaverina
tirosina	tiramina
triptofano	triptamina
arginina	putrescina
metionina	espermidina

Fonte: Ribéreau-Gayon et al., 2006a.

Nos vinhos, as aminas podem ser provenientes da uva ou originadas durante o processo de fermentação, envelhecimento ou estocagem. No entanto, a maioria destes compostos são originados durante a fermentação malolática. Estudos demonstram que vinhos tintos apresentam maior concentração destes compostos que os brancos, devido a grande maioria dos vinhos brancos não ser submetidos a fermentação malolática (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). As

condições que favorecem a ocorrência de amins biogênicas em vinhos dependem do tempo de contato do mosto com a casca das uvas, do teor de aminoácidos presente na fase inicial e final da fermentação e do tempo de contato com a levedura. O tipo e o grau de maturação das uvas, o clima e o solo da viticultura, bem como as técnicas de vinificação também podem contribuir para aumentar o teor de amins biogênicas em vinhos (MARQUES; LEITÃO; SANROMÃO, 2008). Em diversos estudos, as amins biogênicas são sugeridas como indicadores das condições higiênico-sanitárias durante os processos de produção do vinho ou são associadas com precárias condições sanitárias das uvas (DEL PRETE et al., 2009).

As amins quando em baixas concentrações são consideradas essenciais para o desenvolvimento das funções metabólicas de animais, plantas e microrganismos. No entanto, alimentos com altas concentrações de amins podem desencadear efeitos tóxicos para a saúde humana, como por exemplo, a histamina, tiramina e a fenietilamina podem causar vômito, hipertensão e problemas cardíacos. Putrescina e cadaverina são exemplos de amins não tóxicas, no entanto sua presença pode potencializar a toxicidade de algumas amins por interferir nas reações de detoxificação. Além disto, putrescina e cadaverina podem exercer efeitos negativos no aroma do vinho, como aromas de carne podre (MORENOS-ARRIBAS; POLO, 2009).

O teor de amins biogênicas nos vinhos descritos na literatura é muito variado. García-Villar, Hernandez-Cassou e Saurina (2007) ao avaliar diferentes vinhos tintos Espanhóis observaram valores entre 0,2 a 15,2 mg/L para histamina, de 5,2 a 44,3mg/L para putrescina, de 0,8 a 30,5 mg/L para cadaverina. Outros pesquisadores avaliaram o teor de amins biogênicas em vinhos brancos de diferentes safras (1990 a 2000) e observaram valores menores que 17 mg/L de tiramina, histamina e putrescina e cadaverina (LEITÃO; MARQUES; ROMÃO, 2005).

No Brasil ainda não tem legislação específica que controle os níveis máximo de amins em vinhos. No entanto, alguns países têm estabelecido limites para histamina em vinhos, como na Suíça, onde é recomendada como nível máximo 10 mg/L, na Alemanha 2 mg/L e na França 8 mg/L (GLÓRIA; VIEIRA, 2007).

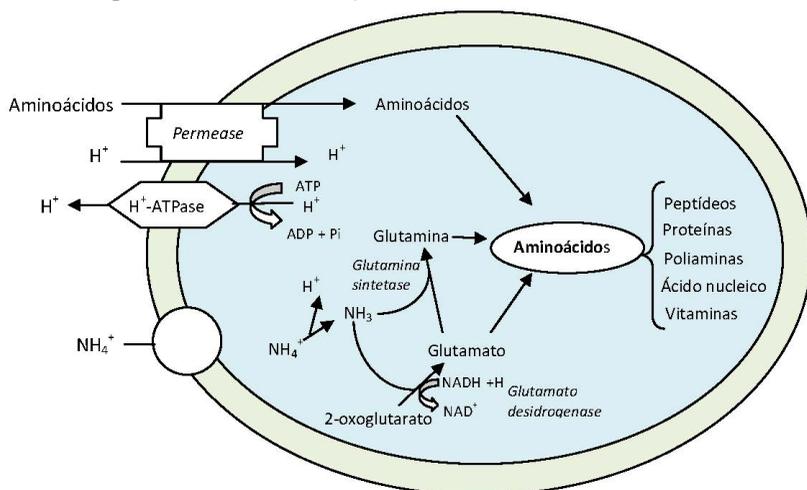
### **3.5.1 Metabolismo do nitrogênio durante a fermentação**

Uma ampla gama de compostos nitrogenados, como os aminoácidos, amins, poliaminas, peptídeos e proteínas, estão presentes no mosto e podem ser metabolizados pelas leveduras (HENSCHKE;

JIRANEK, 1993; FUGELSANG; EDWARDS, 2007). Dentre a complexidade dos componentes nitrogenados, os aminoácidos e o íon amônio são os compostos mais utilizados para o crescimento e metabolismo das leveduras (VALERO et al., 2003; BELL; HENSCHKE, 2005). Estes compostos são rapidamente acumulados pelas leveduras na fase inicial da fermentação, utilizados primeiramente para a síntese de proteínas e desenvolvimento das leveduras, sendo o excedente armazenado nos vacúolos das células (SALMON, 1996). Cabe ressaltar que a taxa de consumo e o metabolismo dos compostos nitrogenados são dependentes de fatores relacionados a cepa da levedura e com as propriedades físico-químicas do mosto (COOPER, 1982). Determinadas cepas de *S. cerevisiae* podem incorporar os aminoácidos diretamente nas proteínas ou então utilizá-los como fonte de nitrogênio através da desaminação oxidativa. Além disto, a levedura pode utilizar o nitrogênio proveniente da degradação dos aminoácido para a síntese de outros compostos nitrogenados constituintes das células, e sua estrutura de carbono pode ser excretada para o vinho ou então usada como fonte de carbono para a síntese dos compostos voláteis e não voláteis presentes no vinho (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b).

As leveduras utilizam um mecanismo denominado de repressão catabólica do nitrogênio (NCR) para selecionar a melhor fonte de nitrogênio a ser utilizada, através da expressão de um sistema de transporte apropriado mediado por permeases para a entrada dos compostos na célula (Ter SCHURE; VAN RIEL; VERRIPS, 2000; MAGASANIK; KAISER, 2002). A primeira etapa da assimilação de nitrogênio consiste no seu transporte para dentro da célula. A Figura 7 ilustra a absorção de nitrogênio pela levedura. O íon amônio é primeiramente transportado para dentro da célula através de uma difusão facilitada. No entanto, o pH intracelular causa a liberação do próton do íon amônio o qual é posteriormente enviado para fora da célula via um sistema de ATPase. Uma vez no citoplasma, o amônio é incorporado junto aos aminoácidos via glutamato desidrogenase ou glutamina sintetase produzindo assim glutamato e glutamina, respectivamente. O glutamato é o principal doador de grupo amino para a biossíntese dos diferentes aminoácidos pelas leveduras (HENSCHKE; JIRANEK 1993).

Figura 7 - Metabolismo dos compostos nitrogenados pelas leveduras durante o processo de fermentação.



Fonte: Adaptado de Zamora (2009).

Com relação aos aminoácidos, estes são transportados para o interior da célula através de diferentes transportes (Figura 7). Já foram identificados cerca de 15 sistemas de transportes para os aminoácidos em *S.cerevisiae* (BARRE et al., 1998), todos acoplados a um próton H<sup>+</sup> para manter a homeostasia celular. Todos os aminoácidos do mosto, com exceção de prolina, podem ser usados pela levedura durante a fermentação tanto para a síntese protéica, como também para originar os componentes voláteis e não-voláteis do vinho. De acordo com a literatura, amônio, glutamina e asparagina são preferencialmente acumulados, seguidos de outros aminoácidos como arginina, alanina glicina e glutamato e posteriormente as fontes de nitrogênio consideradas mais pobres como uréia. Os diferentes padrões de indução das permeases para os aminoácidos foram relatados em várias publicações e são explicados em função da cepa e da composição do meio (HENSCHKE; JIRANEK, 1993; MAGASANIK; KAISER, 2002).

### 3.6 COMPOSTOS VOLÁTEIS

O aroma é um dos fatores de importância na identidade, tipicidade e qualidade de um vinho. É formado por um grande número de compostos voláteis, pertencentes a grupos químicos heterogêneos. A

concentração destes compostos responsáveis pelas características aromáticas dos vinhos variam de poucas ng/L até mg/L (FALCÃO et al., 2008; LOUW et al., 2010; ANTALICK; PERELLO; De REVEL, 2012). Cada composto volátil apresenta um limiar de percepção olfativa diferente, o qual representa a mínima concentração necessária para ser detectado sensorialmente. O impacto olfativo de cada composto no aroma do vinho depende tanto da concentração quanto das características químicas do composto (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b).

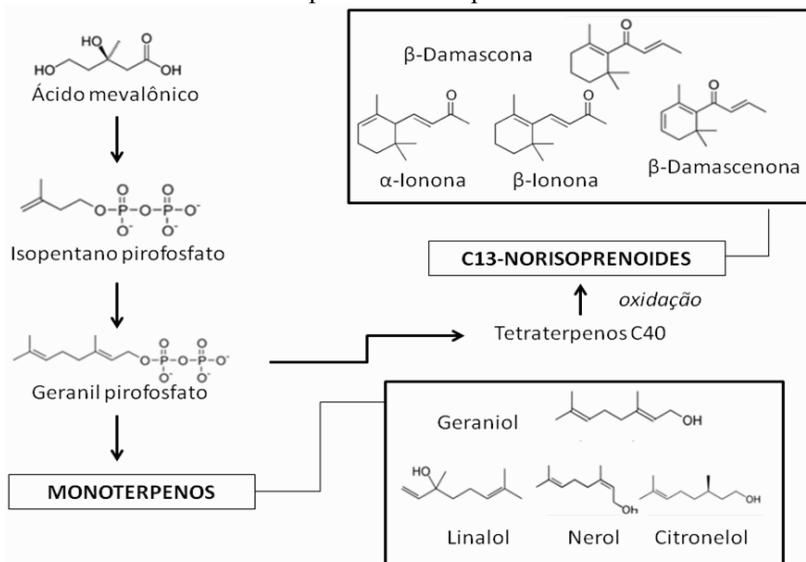
A complexidade aromática de um vinho é dependente de vários fatores, como aqueles relacionados ao metabolismo da uva, da variedade de uva, do clima, do solo e das técnicas de manejo do vinhedo; dos procedimentos realizados no mosto durante as etapas pré-fermentativas, como a maceração e clarificação do mosto; como também estão relacionados as atividades metabólicas dos microrganismos responsáveis pelo processo de fermentação (FALCÃO et al., 2007; CARRAU et al., 2008; LOSADA et al., 2011).

De acordo com suas origens, os compostos voláteis presentes no vinho podem ser classificados em: a) compostos voláteis varietais, que são provenientes da uva como os monoterpenos e norisoprenóides; b) compostos voláteis fermentativos, aqueles formados pelo metabolismo das leveduras durante os processos de fermentação alcoólica e malolática, como os alcoóis superiores, compostos sulfurados e nitrogenados, algumas lactonas, ésteres e acetatos. Além destes, alguns compostos podem ser formados por reações que ocorrem tanto durante o processo de vinificação como também durante o tempo de armazenamento dos vinhos, como os compostos heterocíclicos voláteis (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; REINECCIUS, 2006).

### **3.6.1 Terpenos**

Os terpenos compreendem uma grande e diversa família de compostos presentes nas plantas. Nas uvas, os compostos da família dos terpenos que apresentam importante expressão aromática são os monoterpenos (compostos com 10 átomos de carbonos) formados a partir do ácido mevalônico, um metabólito derivado do Acetil-CoA (Figura 8) (STYGER; PRIOR; BAUER, 2011).

Figura 8 - Biossíntese dos compostos responsáveis pelos aromas varietais do vinho: monoterpenos e norisprenóides.



Fonte: Adaptado de Styger, Prior e Bauer, 2011.

Dentre os monoterpenos mais encontrados nas uvas e com maior potencial odorífero estão o geraniol (aroma de gerânio e rosa), linalol (aromas de anis), citronelol (aroma de citronela),  $\alpha$ -terpenieol (aromas de pinho, lírio) e nerol (aromas de flores, rosa). Estes compostos são responsáveis pelos aromas florais dos vinhos, sendo principalmente relacionados as variedades de uvas brancas Moscatos, Gewürztraminer e Riesling. Os monoterpenos por ser sintetizados nas uvas durante o período de maturação são classificados como aromas primários, responsáveis por conferir as características aromáticas varietais dos vinhos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

Em geral, a maior parte dos terpenos estão presentes nas uvas na forma de glicosídeos não voláteis do que na forma livre. Ambas as formas de terpeno, ligada e livre, podem ser modificadas em diferente intensidade durante os processos de fermentação alcoólica e malolática (SWIEGERS et al., 2005). Durante a vinificação, os terpenos glicosilados podem ser clivados por enzimas, leveduras e bactérias, aumentando assim a composição de terpenos livres voláteis, intensificando o aroma floral dos vinhos (Van RENSBURG; PRETORIUS, 2000). Fisher (2007) observou que o aumento da

concentração de terpenos livres nos vinhos a partir dos precursores glicosilados do mosto estão relacionados além da ação das enzimas glicosídicas presentes nas uvas, leveduras e bactérias, também com a ação das enzimas pectinases naturais da uva ou daquelas adicionadas no mosto nas etapas pré-fermentativas. Pesquisas demonstram que as etapas pré-fermentativas influenciam na concentração de terpenos dos vinhos. Moio et al. (2004), avaliaram a influência do processo de clarificação do mosto no conteúdo de terpenos do vinho, e observaram que a concentração de terpenos livres e seus precursores glicosilados foi maior nos vinhos originados de mosto com maior turbidez. Outros pesquisadores demonstraram que a diminuição da turbidez do mosto pelo processo de clarificação acarreta na eliminação de precursores dos aromas varietais presentes naturalmente nas uvas (SWIEGERS et al., 2005). Pesquisadores utilizaram um mosto de uva sintético ausente de precursores glicosilados e observaram que as leveduras são capazes de sintetizar monoterpenos durante o processo de fermentação alcoólica, onde a concentração de nitrogênio assimilável junto com o conteúdo de oxigênio no meio influenciam significativamente na formação dos monoterpenos pelas leveduras (CARRAU et al., 2005; MENDES-FERREIRA et al., 2009).

### 3.6.2 C13-norisoprenóides

Os norisoprenóides são compostos derivados dos carotenóides (isoprenóides tetraterpenos) sintetizados a partir da via do ácido mevalônico (Figura 8). A degradação oxidativa destes carotenóides produz, entre outros, derivados com 9, 10, 11 e 13 átomos de carbono. Entre eles, os compostos com 13 átomos de carbono, C13-norisoprenóides, têm fortes propriedades odoríferas. Do ponto de vista químico, os C13-norisoprenóides são divididos em dois grupos: megastigmanos e não-megastigmanos. Cada um deles inclui um número elevado de compostos voláteis. O esqueleto megastigmano é caracterizado por um anel ciclohexano substituído nos carbonos 1, 5 e 6, e uma cadeia alifática insaturada com 4 átomos de carbono ligados ao C6. A estrutura pode ser oxigenado no carbono 7 (série damascenona) ou no carbono 9 (série ionona). Nas uvas os principais C13-norisoprenóides são  $\beta$ -ionoa (aroma de violeta),  $\beta$ -damascenona (aroma de frutas, flores),  $\beta$ -damascona (aroma de rosa) e  $\beta$ -ionol (aroma de frutas e flores) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a).

C13-norisoprenóides estão presentes nas uvas principalmente na forma de precursores não voláteis (carotenóides e glicosídeos)

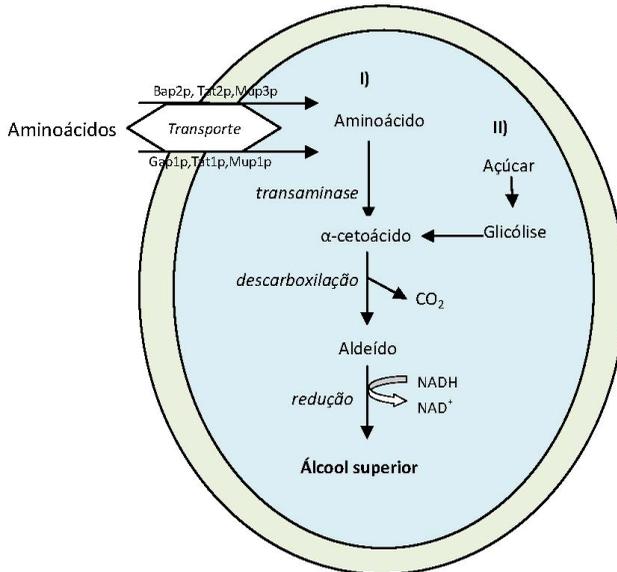
(JACKSON, 2008). No entanto, ainda não se conhece com clareza como ocorre a biossíntese e a metabolização dos norisoprenóides durante o processo de vinificação. Pesquisadores demonstraram que as etapas pré-fermentativas, como o processo de clarificação do mosto, exercem forte influência na concentração de C13-norisoprenóides nos vinhos (ARMADA; FALQUÉ, 2007). Outros pesquisadores observaram que a presença de  $\beta$ -damascenona pode ser associada ao envelhecimento de vinhos brancos, como Riesling (STRAUSS et al., 1987) e Muscat (SCHNEIDER et al., 2001).

### 3.6.3 Alcoóis superiores

Os alcoóis superiores são compostos alifáticos e aromáticos que contém mais de dois átomos de carbono. Dentre os principais alcoóis superiores presentes nos vinhos pode-se citar o 2-metilbutanol (álcool amílico), 3-metilbutanol (álcool isoamílico), 2-metilpropanol (isobutanol) e o 2-feniletanol (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b). De acordo com Rapp e Versini (1996) a concentração dos alcoóis superiores abaixo de 300 mg/L é considerada desejável e contribui para o *bouquet* aromático do vinho, no entanto, concentrações superiores podem ser prejudiciais para a qualidade sensorial do vinho.

A formação dos alcoóis superiores durante a fermentação alcoólica pode ocorrer através de dois mecanismos distintos, conforme demonstrado na Figura 9, o primeiro(I) via anabólica, que envolve a síntese de aminoácidos de cadeia ramificada a partir de  $\alpha$ -cetoácidos derivados da metabolização do açúcar pela via glicolítica; e o segundo(II) por catabolismo dos aminoácidos através da via de Ehrlich (UGLIANO; HENSCHKE, 2009; LÓPEZ-RITUERTO et al., 2010).

Figura 9 - Formação dos alcoóis superiores durante o processo de fermentação do vinho.



Fonte: Adaptado de Ugliano e Henschke, 2009.

A primeira etapa da síntese dos alcoóis superiores consiste na formação dos  $\alpha$ -cetoácidos, originado tanto a partir dos açúcares ou pela transaminação/ desaminação dos aminoácidos, que então são descarboxilados ao aldeído correspondente. O aldeído é reduzido ao respectivo álcool pela álcool desidrogenase (UGLIANO; HENSCHKE, 2009). Estudos demonstram que em mostos de uvas com baixa concentração de nitrogênio, principalmente de aminoácidos, a maioria dos  $\alpha$ -cetoácidos são sintetizados a partir dos açúcares, onde em altos níveis de nitrogênio assimilável a formação ocorre pela via de Ehrlich (NIKÄNEN, 1986; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b).

A formação dos alcoóis superiores, via catabolismo de aminoácidos, é dependente do tipo de aminoácido que é metabolizado, em que o 2-metilpropanol, 2-metilbutanol e o 3-metilbutanol são provenientes do catabolismo da valina, leucina e isoleucina, respectivamente, enquanto que o 2-feniletanol tem como precursor a fenilalanina (ANCÍN et al., 1995; LÓPEZ-RITUERTO et al., 2010).

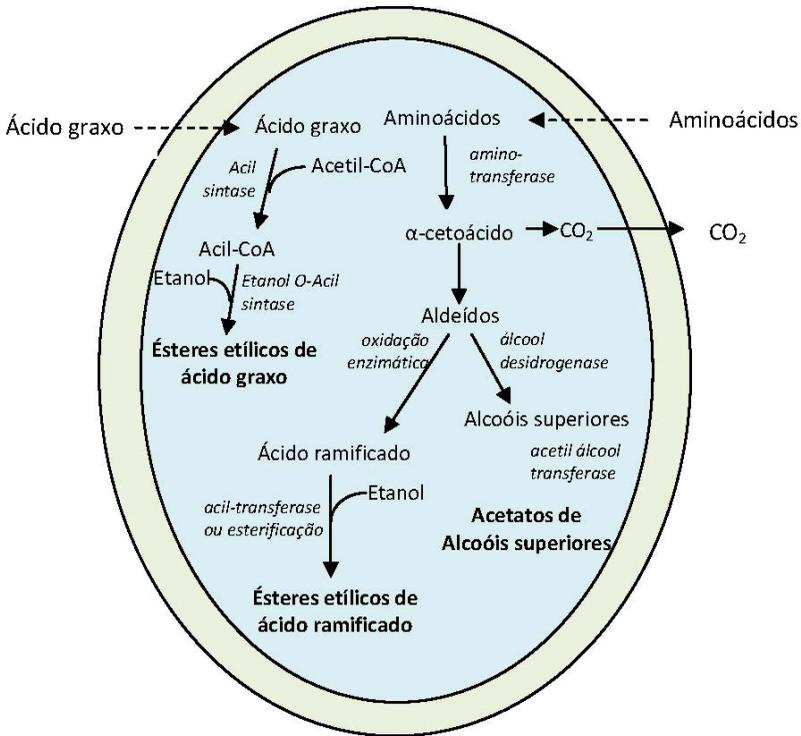
### 3.6.4 Ésteres

Os ésteres compreendem um grande grupo de compostos voláteis produzidos principalmente durante o processo de fermentação. Estes compostos são responsáveis pelos aromas frutados dos vinhos, e desempenham papel importante na composição sensorial de vinhos jovens, principalmente dos brancos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b; JACKSON, 2008). De maneira geral, a concentração dos ésteres nos vinhos é inferior ao seu limiar de percepção olfativo, no entanto, foi evidenciado que sua contribuição para os aromas frutados nos vinhos ocorre principalmente através do mecanismo de sinergismo (ESCUADERO et al., 2007).

Os ésteres presentes nos vinhos podem ser divididos em diferentes classes de acordo com sua origem ou relevância aromática, como por exemplo, ésteres etílicos de ácido graxo (propionato de etila, octanoato de etila, butirato de etila, hexanoato de etila); ésteres etílicos de cadeia ramificada (isobutirato de etila, 2-metilbutirato de etila, isovalerato de etila); ésteres polares (lactato de etila, succinato de etila); acetatos de alcoóis superiores (acetato de isobutila, acetato de hexila, acetato de isoamila, acetato de feniletila); ésteres aromáticos (fenilacetato de etila, dihidrocinamato de etila); ésteres metílicos (octanoato de metila, decanoato de metila, hexanoato de metila); ésteres isoamílicos (hexanoato de isoamila, octanoato de isoamila, butirato de isoamila); entre outros (ANTALICK, 2010). Dentre todos os ésteres dos vinhos, os ésteres etílicos e os acetatos de alcoóis superiores são qualitativamente os mais importantes para os aromas frutados dos vinhos (UGLIANO; HENSCHKE, 2009). No entanto, o acetato de etila é uma exceção, quando em concentração próxima de 150 mg/L fornece aromas de solvente. A presença deste composto é normalmente associada à contaminação do mosto ou do vinho por bactérias acéticas (JACKSON, 2008).

A Figura 10 demonstra a síntese das principais classes de ésteres presentes nos vinhos durante o processo de fermentação.

Figura 10 - Síntese dos principais ésteres pelas leveduras *S. cerevisiae*.



Fonte: Adaptado de Antalick (2010).

Os ésteres etílicos de ácidos graxos, os quais são responsáveis por conferir notas frutadas de origem fermentativa para vinhos brancos, são essencialmente produzidos durante a fermentação alcoólica pelo metabolismo das leveduras. A formação ocorre através de uma reação entre o ácido graxo e o acetil-CoA, seguida por uma etanolise (SAERENS et al., 2008; UGLIANO; HENSCHKE, 2009). Assim, o fator limitante para sua síntese é a concentração dos ácidos graxos presentes no mosto, que podem ser oriundos das uvas ou então do metabolismo das leveduras (SAERENS et al., 2008). Outro grupo de ésteres são os acetatos de alcoóis superiores, que conferem um aroma mais intenso que os ésteres etílicos, são os principais responsáveis aos aromas fermentativo do vinho branco, como também são responsáveis por mascarar os aromas varietais dos vinhos brancos quando em alta concentração. Estes ésteres também são sintetizados durante a

fermentação alcoólica pelas leveduras (Figura 10), através da reação da acetil-CoA com um álcool, o qual é formado a partir da degradação dos aminoácidos. Esta síntese é catalisada pelas enzimas aminotransferase, álcool desidrogenase e álcool acetil transferase (SAERENS et al., 2008). Em relação aos ésteres etílicos de cadeia ramificada o seu metabolismo de formação ainda não é bem conhecido. Evidências demonstram que a principal via de formação durante a fermentação alcoólica é a mesma que a dos alcoóis superiores (via de Ehrlich), através da esterificação de um ácido de cadeia ramificada formado durante o metabolismo dos aminoácidos (Figura 10) (DIAZ-MAROTO; SCHNEIDER; BAUMES, 2005). Estes compostos conferem aos vinhos aromas frutados de morango e kiwi, com algumas notas de solvente e queijo (ESCUADERO et al., 2007).

Variações na composição do mosto, como no teor de açúcares, nitrogênio assimilável (aminoácidos), a turbidez do mosto e a temperatura de fermentação são considerados importantes fatores que influenciam na síntese dos ésteres. Os níveis de sólidos presentes no mosto interferem na taxa de fermentação e conseqüentemente na formação dos ésteres, uma vez que as partes sólidas são fontes de lipídeos necessário para o desenvolvimento das leveduras (VERSTREPEN et al., 2003; BELL; HENSCHKE, 2005; CARRAU et al., 2008). Pesquisadores evidenciaram que os diferentes ésteres nem sempre variam da mesma maneira, uma vez que são originados a partir de diferentes vias metabólicas (UGLIANO; HENSCHKE, 2009).

### 3.6.5 Lactonas

A maioria das lactonas identificadas em vinhos,  $\gamma$ -lactonas e  $\delta$ -lactonas, são formadas tanto durante a fermentação como também durante o envelhecimento do vinho, podendo ser extraídas diretamente da madeira quando o vinho é envelhecido em barricas de carvalho. As lactonas são compostos voláteis que podem ser originadas através de uma reação de esterificação intramolecular, a partir da oxidação de ácidos graxos insaturados (JACKSON, 2008). No entanto, pesquisadores admitem que os aminoácidos, principalmente o ácido glutâmico, podem ser precursores das lactonas durante a fermentação alcoólica (MARTIN; ETIÉVANT; Le QUÉRÉ, 1991).

As lactonas mais abundantes no vinho são as  $\gamma$ -lactonas, que podem ser agrupadas em duas classes de acordo com a sua origem (MÜLLER; KEPNER; WEBB, 1973). Uma classe é constituída pelas  $\gamma$ -butirolactonas, que mesmo presentes nos vinhos em alta

concentração, quando em comparação com outras lactonas, não apresentam forte contribuição aromática. A segunda classe agrupa as 4-alquil- $\gamma$ -lactonas ( $\gamma$ -C5 a C10 e C12), com destaque para as  $\gamma$ -lactonas de C8 a C12, que apresentam aromas característicos de coco misturadas com notas de pêssego, que são mais pronunciados à medida que a cadeia carbônica aumenta (ANTALICK, 2010). Em geral, as lactonas estão presentes nos vinhos em concentrações inferiores ao seu limiar de percepção (COOKE et al., 2009; ANTALICK; PERELLO; de REVEL, 2012). No entanto, a contribuição destes compostos aos aromas do vinho ocorrem através de um sinergismo entre todas as lactonas presentes no meio, o qual foi evidenciada por Loscos et al. (2007).

### 3.6.6 Compostos sulfurados

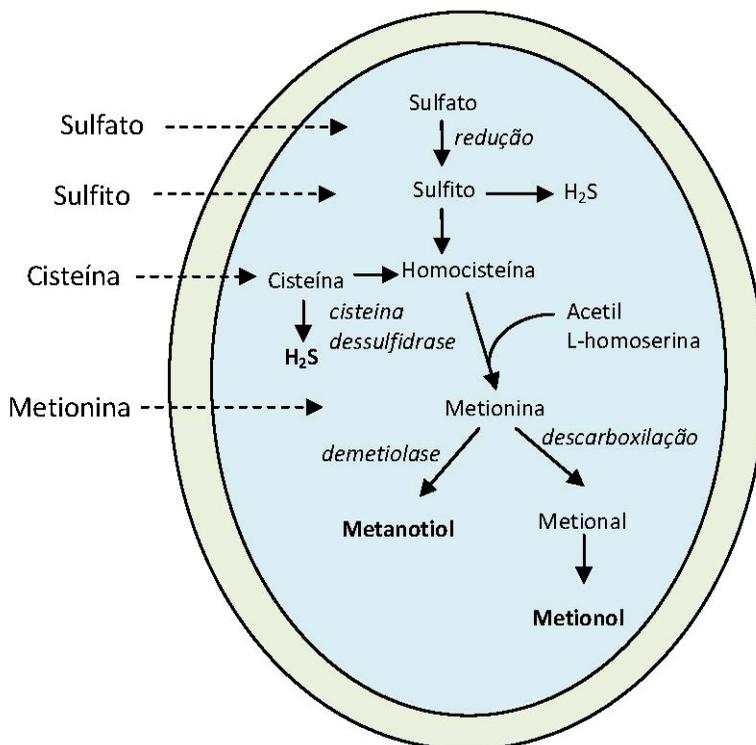
Os compostos sulfurados voláteis presentes no vinho podem ser divididos em duas classes de acordo com o ponto de ebulição (PE): compostos de baixo ponto de ebulição (PE < 90 °C) e compostos de alto ponto de ebulição (PE > 90 °C). Os compostos com baixo ponto de ebulição são caracterizados por apresentar maior volatilidade, com destaque para o sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) e o etanotiol, responsáveis por conferir aos vinhos aromas de 'ovo podre', repolho e alho (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b). Além destes, o dimetilsulfeto (DMS) é um composto sulfurado de baixo peso molecular que pode contribuir como um defeito ou favoravelmente ao aroma do vinho em função da sua concentração, sendo principalmente detectados em vinhos tintos (LANDAUD; HELINCK; BONNARME, 2008). De maneira geral, estes compostos não provocam graves problemas ao vinho, pois o ponto de ebulição é relativamente baixo e podem ser facilmente volatilizados pelo processo de aeração (MOREIRA et al., 2002). Com relação aos compostos sulfurados com alto ponto de ebulição encontrados em vinhos pode-se citar o 2-mercaptoetanol, 3 metiltio propanoato de etila, 3 metiltio propil acetato e o 3-metiltio 1-propanol (metionol). Entre estes, o metionol está presente em maior concentração nos vinhos, e quando detectado em concentração superior ao limiar olfativo, confere aromas de batata crua/cozida e couve-flor (MOREIRA et al., 2002; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b).

Além dos compostos citados, há uma classe de compostos sulfurados de cadeia longa, denominados de tióis voláteis, que estão presentes naturalmente nas uvas. São responsáveis pelos aromas varietais dos vinhos, contribuindo com os aromas frutados como o de

maracujá e pomelo, principalmente em vinhos brancos da variedade Sauvignon Blanc (TOMINAGA et al., 1998).

Os compostos sulfurados são principalmente originados durante o processo de fermentação alcoólica pelo metabolismo das leveduras. O mecanismo de formação destes compostos são variados e complexos, e são influenciados principalmente pela concentração e tipo de nitrogênio disponível para as leveduras durante a fermentação (UGLIANO et al., 2009; BARBOSA; MENDES-FAIA; MENDES-FERREIRA, 2012). Mestres, Busto e Guasch (2000) sugerem que a síntese de diversos compostos sulfurados pelas leveduras incluem a degradação de aminoácidos sulfurados, metionina e cisteína, como também a liberação e/ou metabolização de precursores derivados da uva que contem enxofre na estrutura como sulfatos e sulfitos (Figura 11).

Figura 11 - Metabolismo dos compostos sulfurados pelas leveduras *S. cerevisiae*.



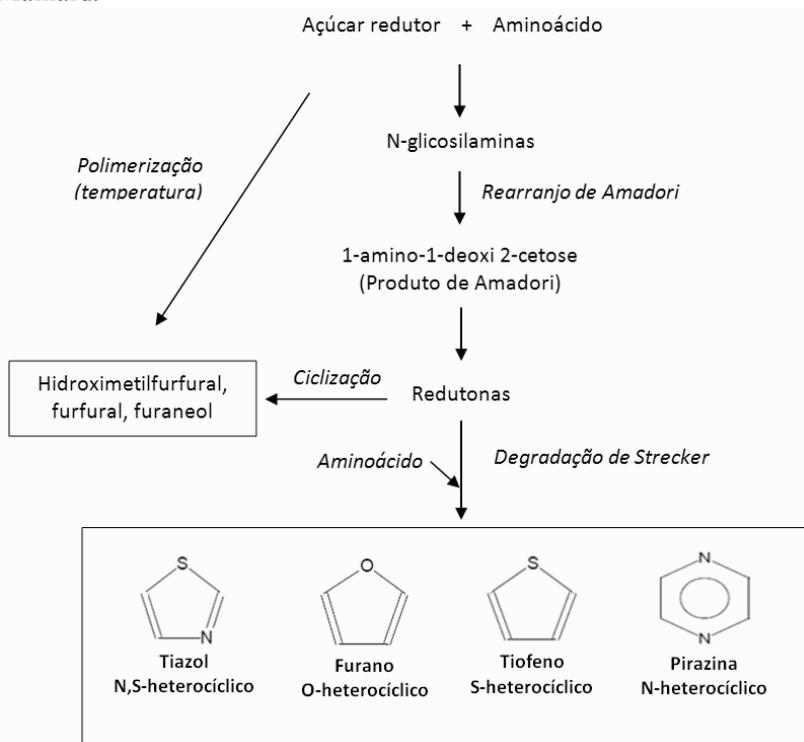
Fonte: Adaptado de Ugliano e Henschke (2009).

### 3.6.7 Compostos heterocíclicos aromáticos

Os compostos heterocíclicos aromáticos constituem uma importante família de compostos odorantes e representam grande parte dos compostos aromáticos presentes nos alimentos. A estrutura química dos compostos heterocíclicos é muito variada, e são caracterizados por apresentar um anel aromático ligado a compostos diferentes de carbono, como o oxigênio, nitrogênio e enxofre. De acordo com a literatura, as principais classes de compostos heterocíclicos de importância aromática são aqueles que apresentam 5 a 6 átomos de carbono no anel, como os furanos, pirazinas, tiazóis e tiofenos (HOFMANN; SCHIEBERLE, 1998, FERNANDEZ et al., 2002). Estes compostos são responsáveis por conferir aos alimentos aromas do tipo tostado, café, pipoca, amêndoa, balsâmico, defumado, borracha, entre outros. De acordo com a literatura os compostos heterocíclicos podem ser formados através de duas vias: através de reações enzimáticas ou reações não enzimáticas também conhecida como reação de Maillard (VERNIN; VERNIN, 1982). No entanto, pesquisadores observaram que a maior parte dos compostos heterocíclicos são formados pela reação de Maillard (RICHARD; MULTON, 1982).

A reação de Maillard pode ser dividida em três estágios (Figura 12): como apresentado no primeiro estágio, ocorre uma reação de condensação entre um grupo amino (aminoácido) com um grupamento carbonílico, normalmente um açúcar redutor, levando a formação de N-glicosaminas, que sofrem um rearranjo formando os produtos de Amadori (quando o açúcar redutor é uma aldose) ou produtos de Heyns (quando o açúcar redutor é uma cetose). No segundo estágio, etapa intermediária, os produtos de Amadori/Heyns são reidratados e originam redutonas, podendo ocorrer uma regeneração dos aminoácidos (grupo amino). Paralelamente, as redutonas sofrem reação de retroaldolização, que ocasiona a ruptura da cadeia carbônica formando compostos carbonilados (por exemplo,  $\alpha$ -dicarbonílicos) de 3, 4 ou 5 átomos de carbono. No terceiro estágio, fase final da reação, estes compostos carbonílicos reagem com aminoácidos formando aldeídos que então originam substâncias aromáticas específicas. Esta etapa é denominada de degradação de Strecker, considerada a etapa mais importante na geração dos compostos heterocíclicos aromáticos (VERNIN; VERNIN, 1982).

Figura 12 - Formação dos compostos heterocíclicos pela reação de Maillard.



Fonte: Marchand (2002).

Os compostos originados na reação de Maillard têm sido identificados nos vinhos através de análise sensorial assim como alguns destes compostos foram quantificados em vinhos tintos e brancos (MARCHAND; DE REVEL; BERTRAND, 2000; KEIN et al., 2002; BURIN et al., 2013). Marchand, de Revel e Bertrand (2000) identificaram a formação de 7 compostos heterocíclicos (tiazol, 4-metiltiazol, acetiltiazol, acetiltiazolina, trimetiloxazol, 2-tiofenotiol e 2-furanometanotiol) a partir da reação entre a cisteína e compostos dicarbonílicos (glioxal, diacetil, acetóina, metilglioxal) em meio sintético com as mesmas condições do vinho: baixo pH, meio aquoso e baixa temperatura. Os mesmos autores também quantificaram estes compostos em diferentes vinhos tintos, brancos e fortificados. Pripis-Nicolau et al. (2000) também avaliaram a formação de compostos heterocíclicos através da reação entre aminoácidos e compostos

carbonílicos em condições semelhantes àquelas do vinho. Foram identificados vários compostos, com destaque para aqueles pertencentes às classes das alquilpirazinas e tiazóis, que apresentaram notas aromáticas de enxofre, pipoca, tostado e avelã. Além dos compostos citados nos trabalhos anteriores, recentemente pesquisadores avaliaram a presença de 24 compostos heterocíclicos pertencentes a 4 classes diferentes: tiazóis, tiofenos, pirazinas e furanos, em vinhos tintos e brancos de diferentes regiões vitícolas da França (BURIN et al., 2013).

## CAPÍTULO 2

### **BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *VITIS VINIFERA* AND *VITIS LABRUSCA* GRAPES: EVALUATION OF DIFFERENT EXTRACTION METHODS**

Vivian Maria Burin, Nayla E. Ferreira-Lima, Carolina P. Panceri,  
Marilde T. Bordignon-Luiz\*

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos CAL/CCA;  
Universidade Federal de Santa Catarina; Rod. Admar Gonzaga, 1346,  
Itacorubi, Florianópolis, SC, Brazil.



## Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods



Vívian Maria Burin, Nayla E. Ferreira-Lima, Carolina P. Panceri, Marilde T. Bordignon-Luiz\*

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos CAL/CCA, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 November 2013  
Received in revised form 17 December 2013  
Accepted 17 December 2013  
Available online 27 December 2013

#### Keywords:

Grapes  
Extraction method  
Bioactive compounds  
Antioxidant activity

### ABSTRACT

Polyphenols have been associated with the bioactive potential of grapes due to their beneficial health effects. For this reason, the aim of this study was to determine the content of bioactive compounds and in vitro antioxidant activity of selected *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes widely produced in Brazil. In order to evaluate the efficiency of different methods for the extraction of the main polyphenols in grape, four methods were tested and compared. Among the extraction methods evaluated, liquid–liquid extraction was selected as the best method, which showed the best precision and repeatability. The phenolic compounds of white and red *V. vinifera* and *V. labrusca* grapes indicated that the type and concentration of polyphenols were mainly dependent on the grape variety rather than the species. The antioxidant activity of all grape samples evaluated was strongly correlated to the *trans*-resveratrol content ( $R > 0.9$ ). Among all samples, it was observed that *V. labrusca* varieties, especially Bordó and Concord grapes widely cultivated in the south of Brazil, presented higher antioxidant potential, associated with the presence of higher content of bioactive compounds.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

In the past few years there has been increasing interest in the determination of suitable dietary sources of antioxidant phenolic compounds. Grapes (*Vitis* sp.) are among the fruits consumed in greatest quantities around the world, whether processed or in their natural form, and they also have one of the highest phenolic compound contents [1]. Polyphenols have been associated with the bioactive potential of grapes due to their antioxidant, anti-inflammatory, anticarcinogenic and antibacterial activities [2,3].

Most of the data available in the literature regarding the phenolic composition of grapes and wines relates to the traditional wine producing countries (i.e., those in Europe), and the grapes investigated are predominantly wine grapes (*Vitis vinifera* L.). However, there is little information on the individual phenolic compounds of American grape varieties (*Vitis labrusca* L.) and their antioxidant activity reported in the literature [4,5]. American and hybrid grape varieties, such as Isabel, Concord, Bordó and Niágara, are widely cultivated in Brazil, mostly for juice production. These varieties present a better adaptation to the more temperate climate conditions of southern Brazil, and represent more than 80% of the grapes processed for the production of not only juice but also table wines, grappa, sweets and jams. Although *V. vinifera* grape

production in Brazil, particularly the varieties Cabernet Sauvignon, Merlot, Chardonnay and Sauvignon Blanc, has been increasing in recent years, these grapes still represent a small proportion of the national production [6].

Extraction of the functional components from plant materials, such as grapes, is an important process and various techniques have been studied in this regard. In the literature, the phenolic compounds have been determined by conventional and non-conventional extraction methods, such as liquid–liquid extraction (LLE) [7], solid phase extraction (SPE) [8], and extraction by ultrasound [9]. However, other extraction techniques such as QuChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe method), developed to analyze pesticides in fruits and vegetables, have been adapted and applied to the extraction of bioactive compounds in food matrices [10]. Thus, given the controversy associated with the different sample preparation methods, extensive studies on the best sample preparation conditions for the determination of phenolic compounds in complex matrices, such as grape samples, need to be carried out.

Considering that there is limited information available on the phenolic composition of the grapes, juices and wines produced in Brazil, providing further data on this parameter will be useful for assessing the potential biological effects of these products. In this context, the aims of this study were to evaluate the efficiency of different methods for the extraction of the polyphenols in grapes and subsequently determine the bioactive compound content and in vitro antioxidant activity of selected *V. vinifera* and *V. labrusca* grapes widely produced in Brazil.

\* Corresponding author. Tel.: +55 48 3721 5376; fax: +55 48 3331 9943.  
E-mail addresses: [marilde.bordignon@ufsc.br](mailto:marilde.bordignon@ufsc.br), [viburin@gmail.com](mailto:viburin@gmail.com) (M.T. Bordignon-Luiz).

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

The phenolic compound standards, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS [2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)], Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) and Folin-Ciocalteu reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). All chromatographic solvents were HPLC grade and were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Milli-Q water was obtained from a Milli-Q Plus water system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Stock solutions of individual phenolic compounds (1 g/L) were prepared in methanol and kept in the dark at refrigeration temperature (4 °C). The working standard solutions were prepared by dilution of the respective stock solutions and kept under similar conditions.

### 2.2. Samples

Red and white grapes from *V. vinifera* L. (Cabernet Sauvignon, Merlot, Chardonnay, Sauvignon Blanc, Vermentino and Viognier) and *V. labrusca* L. varieties (Niagara, Niagara Rosada, Isabel, Concord and Bordó) were manually harvested in Vale do Rio do Peixe, Santa Catarina State, Brazil, and kindly donated by the Agricultural Research Company of Santa Catarina State (EPAGRI). All the varietal grapes were harvested at the stage of technical maturity (Table 1) and the analysis was carried out according to OIV [11].

Grape juices were prepared to determine the phenolic compounds and antioxidant activity of the grapes. In this procedure grape berries were separated from the rachis and 100 g of randomly selected berries, of each cultivar, was manually crushed for 7 min and then macerated under agitation (100 rpm) for 24 h in a dark room (17 ± 1 °C). Finally, the grape juices were filtered and stored in amber glass bottles [12]. For each variety the grape juice yield for 100 g of berries was calculated and the results expressed as µg/100 g of grape berries (fresh weight).

### 2.3. Extraction processes for phenolic compound analysis

To verify the efficiency of each extraction method white and red grape juices were tested. The grape juice samples were spiked with phenolic compounds (5 mg/L) and the individual polyphenols were determined by liquid chromatography.

#### 2.3.1. Liquid–liquid extraction

An aliquot of 5 mL of the grape juice was extracted twice with 10 mL of ethyl acetate under agitation for 5 min (vortex mixer). Preliminary tests were carried out to determine the type and volume of extractor solvent, and the extraction time (data not shown). The organic phases

**Table 1**  
Physicochemical parameters for berries of different grape varieties.

		Bx	pH	TA
<i>Vitis vinifera</i> grapes				
Cabernet Sauvignon	Red	19.8	3.32	7.8
Merlot	Red	20.0	3.36	6.4
Chardonnay	White	18.0	3.18	6.4
Sauvignon Blanc	White	19.9	3.21	7.4
Vermentino	White	18.0	3.0	8.0
Viognier	White	17.8	3.3	6.9
<i>Vitis labrusca</i> grapes				
Niagara	White	15.0	3.31	7.1
Niagara Rosada	Red	14.6	3.35	7.0
Isabel	Red	18.3	3.38	6.1
Concord	Red	18.3	3.56	5.1
Bordó	Red	15.5	3.27	8.1

TA: total acidity, expressed as mg/L of tartaric acid.

of two extractions were combined and evaporated in a rotatory evaporator with controlled temperature (28 ± 1 °C). The remaining residue was re-dissolved in 2 mL of methanol:water (1:1 v/v) solution.

#### 2.3.2. Solid phase extraction

The solid phase extraction (SPE) was carried out based on a central composite design (3<sup>3</sup>) [13]. Before the analysis, the preconditioning of the SPE cartridge C18 (Applied Separations, Allentown, United States) was conducted with 20 mL of ethyl acetate, methanol and 0.01 N HCl. The sample (5 mL) was added to the preconditioned cartridge followed by 3 mL of HCl solution (0.01 N). The phenolic compounds were loaded with ethyl acetate and evaporated in rotatory evaporator at 28 °C. The concentrate was dissolved with 2 mL of methanol.

#### 2.3.3. Ultrasound extraction

Grape juice (2 mL) was added to 5 mL of ethyl acetate and then sonicated in an ultrasound bath (UltraCleaner 1400), for 30 min at 25 °C (determined in preliminary tests). The procedure was performed twice and the supernatants were homogenized and evaporated in a rotatory evaporator. The residue obtained was dissolved in 2 mL of methanol.

#### 2.3.4. QuEChERS method

The QuEChERS method was carried out as described by Anastassiades et al. [14], with modifications. The sample (5 mL) was transferred to a centrifuge tube and 10 mL of ethyl acetate was added. The solution was mixed (Vortex) for 2 min, followed by the addition of 4 g anhydrous MgSO<sub>4</sub> and 1 g NaCl and this solution was mixed again for 1 min. The tube was centrifuged for 5 min at 3000 rpm at 5 °C. For the cleanup of the samples an aliquot of 2 mL of the upper layer was transferred to a centrifuge tube containing 50 mg PSA and 300 mg anhydrous MgSO<sub>4</sub>. The extract was centrifuged for 5 min at 3000 rpm and the supernatant analyzed.

#### 2.3.5. Repeatability and recovery for extraction methods

The repeatability of the extraction procedures and the analyte recovery were assessed by evaluating the peak area of all the analytes studied using grape juice and spiked grape juice, respectively. At least five replicates for each extraction assay and three analyses for each replicate were performed.

### 2.4. HPLC assay for individual phenolic compounds

Chromatographic analysis was performed using a Shimadzu (Kyoto, Japan) liquid chromatography (LC-20A) (HPLC-DAD). The column (4.6 × 250 mm, 5 µm) was C18 reversed-phase (Shimadzu, Kyoto, Japan). The extract samples were filtered through a 0.45 µm PTFE membrane filter (Millipore, Massachusetts, USA) and then injected into the chromatography system.

The hydroxybenzoic acids (gallic, protocatechuic, vanillic, syringic and ellagic acids) were determined according to Burin et al. [15] with modifications. The mobile phase A was H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH (98:2 v/v) and mobile phase B was 20% of mobile phase A with 80% of CH<sub>2</sub>CN. The elutions were carried out applying a linear gradient: 0–30% solvent B for 35 min, 30–60% B for 5 min, and 60% of B maintained for 2 min. The flow rate was 1.0 mL/min, with detection at 280 nm for all compounds.

Another method was applied for the quantification of the other phenolic compounds as described by Ferreira-Lima et al. [16] with modifications. The mobile phase A was H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH (98:2 v/v) and mobile phase B was H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH:CH<sub>3</sub>CN (58:2:40 v/v/v). The gradient elution conditions were: 0–80% solvent B for 55 min and 80–100% B for 15 min. The flow rate was 0.9 mL/min and the detection was carried out at 280 nm for flavanol and tyrosol, 320 nm for cinnamic acids, 306 nm for *trans*-resveratrol and 360 nm for flavonol.

### 2.4.1. Calibration curves and analytical performance

After identifying the best extraction method for the individual phenolic compounds, calibration curves were constructed for the matrix (white or red grape juice), for all of the sixteen phenolic compounds analyzed. Each calibration curve was constructed with five data points and three replicates were carried out for each point. The areas of the peaks were related to the concentrations of the stock solutions of the phenolic compounds.

In order to verify the analytical performance, the linearity and range were determined for white and red grape juice matrices. Repeatability assays were carried out with a red grape juice spiked at 5 mg/L with all of the compounds studied. Accuracy and specificity assays, red and white grape juices were spiked at 5 mg/L, and the percentage recovery for each compound was calculated. Limits of detection ( $LOD = 3.3 \times (s/S)$ ) and quantification ( $LOQ = 10 \times (s/S)$ ) were calculated based on the standard deviation ( $s$ ) of the response ( $n = 5$ ) and the slope ( $S$ ) of the calibration curve for each compound.

### 2.5. Total polyphenols and antioxidant activity

The total phenolic content of the grape juices was determined spectrophotometrically using the Folin–Ciocalteu colorimetric method [17]. The results were expressed as mg of gallic acid (GAE)/100 g of grape berries (fresh weight).

The *in vitro* antioxidant activity of the grape juice samples was determined using two methods: DPPH and ABTS. The radical activity was measured through the extinction of the maximum absorption at 517 nm for DPPH [18] and at 754 nm for ABTS radicals [19]. The results were expressed as Trolox equivalents (TEAC/100 g of grape berries (fresh weight)).

### 2.6. Statistical analysis

All analysis was carried out in triplicate and results expressed as mean values  $\pm$  standard deviation. The STATISTICA v. 8.0 (2007) (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) software program was used for the analysis of variance (ANOVA), Tukey HSD test ( $p < 0.05$ ), correlation analysis and principal component analysis (PCA).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Comparison between extraction techniques

It is known that, some type of sample preparation is usually performed for grape samples either to remove possible column contaminants or to pre-concentrate the analytes. Liquid–liquid extraction and solid–liquid extraction are the most widely applied methods for the grape sample preparation; however, the extraction parameters (e.g. solvent type, extraction time, sample and solvent volume) provided in the literature are conflicting.

Therefore, considering these divergences, the first step of this work was to compare four different extraction methods to determine individual phenolic compounds. Using ethyl acetate as the solvent, continuous liquid–liquid extraction (LLE), solid-phase extraction (SPE), ultrasound extraction and QuEChERS were compared. The assay results for the analysis of the extracts obtained from the optimized procedures are listed in Table 2. A comparison of the average analyte peak areas obtained applying the four extraction methods for each phenolic compound was carried out by single factor ANOVA, and it was possible to observe significant differences between the methods in all cases. As shown in Table 2, LLE presented the highest recovery values for all assessed compounds (80.1 to 95.6%), with the exception of epicatechin and kaempferol for which the highest recovery values were obtained with the ultrasound method. Malovaná et al. [7] also observed that LLE was more efficient in the extraction of polyphenols from wine samples. Although several researchers have applied SPE to the extraction of

**Table 2**

Comparative repeatability (RSD %) and recovery (Rcv%) using relative peak area as a function of the extraction method for individual phenolic compounds determined by HPLC.

Compounds	LLE		SPE		Ultrasonic		QuEChERS		p-Values <sup>a</sup>
	RSD	Rcv	RSD	Rcv	RSD	Rcv	RSD	Rcv	
<i>Hydroxybenzoic acid</i>									
Gallic	5.3	90	nd	nd	6.1	76	nd	nd	***
Vanilic	4.7	80	8.1	75	7.1	77	10.1	75	***
Syringic	5.0	91	7.6	69	4.9	92	6.1	70	***
Protocatechuic	4.7	88	nd	nd	8.1	80	5.5	77	**
Ellagic	3.9	83	4.2	80	3.1	77	nd	nd	**
<i>Hydroxycinnamic acid</i>									
Caffeic	3.7	93	5.4	80	5.0	82	4.8	60	***
Trans-caftaric	2.3	95	5.9	70	3.8	84	6.3	58	***
<i>p</i> -coumaric	5.8	94	7.6	80	4.7	73	8.1	79	***
Ferulic	3.9	92	5.5	88	6.1	80	8.0	69	***
<i>Flavanol</i>									
(+)-Catechin	2.7	84	6.0	67	4.9	81	11.5	78	***
(-)-Epicatechin	3.9	80	nd	nd	5.8	83	nd	nd	*
<i>Flavonol</i>									
Myricetin	6.0	82	7.8	76	5.2	72	6.1	70	*
Kaempferol	4.7	80	4.2	70	5.1	88	4.9	60	***
Quercetin	3.8	90	5.7	83	4.1	75	4.5	72	**
<i>Stilbenes</i>									
Trans-resveratrol	4.0	92	8.1	86	6.9	73	nd	nd	***
Tyrosol	6.0	90	nd	nd	9.5	76	11.5	57	**

All data are means of five independent assays for each of the extraction methods. ( $n = 5$ ) obtained applying the four extraction methods. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Rcv: recovery %.

RSD: relative standard deviation.

nd: not detected.

<sup>a</sup> Analysis of variance (ANOVA) considering the peak area of each phenolic compound.

polyphenols from grapes and wines [20,8], in this study, SPE showed recovery values lower than those obtained with LLE. Furthermore, gallic and protocatechuic acids, epicatechin and tyrosol were not detected. The QuEChERS method presented the lowest recovery values for the analytes, and epicatechin, *trans*-resveratrol and gallic and ellagic acids were not detected. The low recoveries for SPE and QuEChERS are probably associated with reactions and/or strong interactions between phenolic compounds and the solid materials.

Based on these results, LLE was selected as the best extraction method (Fig. 1). This method showed the best precision (recovery %) and repeatability (RSD %), is easy to apply, and offers simplicity and the shortest extraction time (5 min).

### 3.2. Analytical performance

In order to evaluate the analytical performance of the LLE red and white grape juices were used. The calibration curves generated with seven standard mixtures were linear over the concentration ranges studied for all standards, with determination coefficients ( $R^2$ ) higher than 0.99 (Table 3). The method presented good repeatability, with RSD values ranging from 2.1 to 5.7% and 2.3 to 6.0% for white and red grapes, respectively. The detection and quantification limits obtained by interpolation of the calibrated curves of each compound analyzed were, in general, lower than the minimum concentration found in the grapes. The low detection and quantification limits observed revealed that LLE has a high sensitivity and is suitable for quantitative analysis. The accuracy of the analytical method was evaluated by calculating the recoveries for the spiked samples. The recoveries for almost all of the samples were around 100%, which verifies the good specificity of the method. These results for the validation of the method showed good agreement with data reported by other researchers, who also verified the analytical performance of the extraction method for bioactive compounds in grapes and wine [7,21].

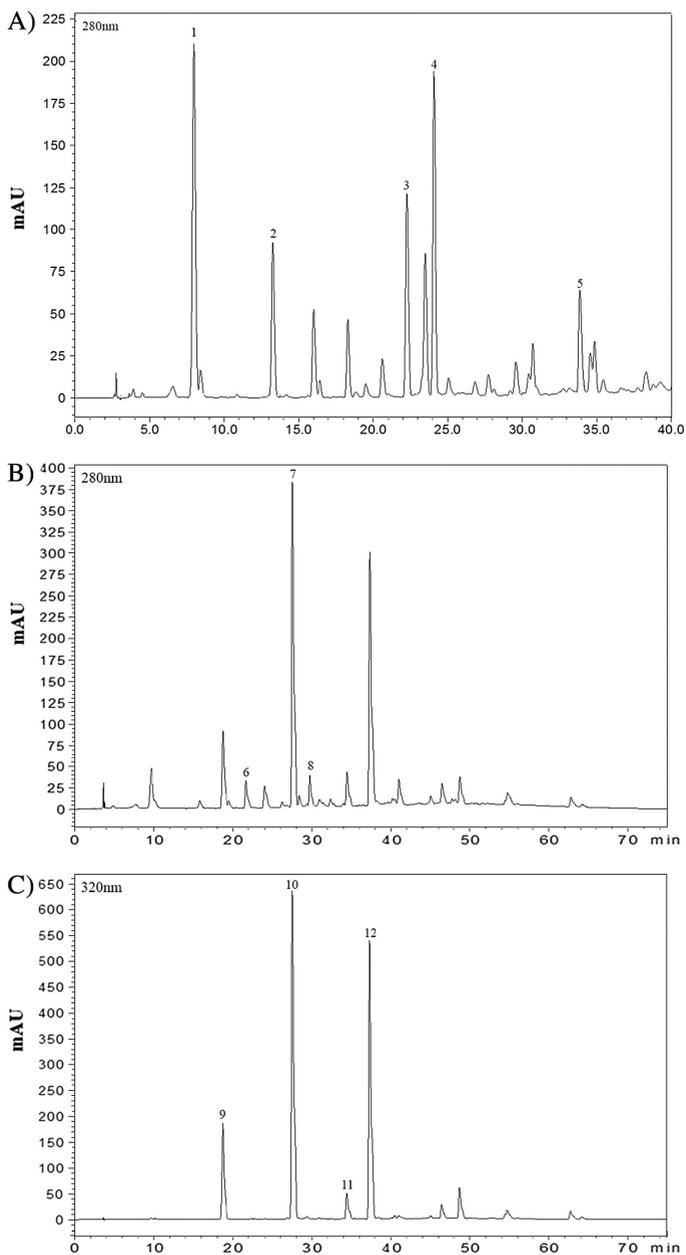


Fig. 1. Standard chromatogram of grape juice polyphenols by LLE method. A) Hydroxybenzoic acid, B) hydroxycinnamic acids, C) flavanols and tyrosol, D) stilbenes, E) flavonols. 1, Gallic; 2, protocatechuic; 3, vanillic; 4, syringic; 5, ellagic; 6, tyrosol; 7, catechin; 8, epicatechin; 9, *trans*-caftaric; 10, caffeic; 11, *p*-coumaric; 12, ferulic; 13, *trans*-resveratrol; 14, myricetin; 15, quercetin; 16, kaempferol.

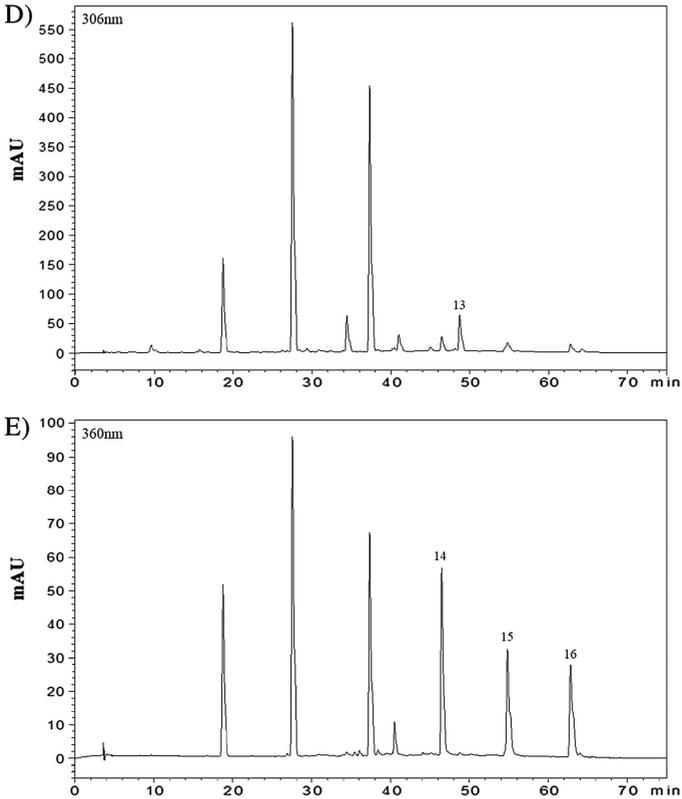


Fig. 1 (continued).

**Table 3**  
Analytical performance of liquid–liquid extraction for phenolic compound analysis.

	Range <sup>a</sup>	R <sup>2</sup>	LOD <sup>b</sup>	LOQ <sup>b</sup>	Repeatability (RSD %)		Recovery (%)	
					WG	RG	WG	RG
Gallic	0.05–30	0.991	0.03	0.08	4.2	5.1	89	87
Vanillic	0.05–30	0.998	0.04	0.11	4.9	5.2	90	94
Syringic	0.05–30	0.995	0.04	0.12	5.0	5.5	88	91
Protocatechuic	0.05–30	0.992	0.03	0.07	4.8	4.6	91	89
Ellagic	0.01–30	0.995	0.02	0.06	4.0	4.5	101	105
Caffeic	0.01–70	0.993	0.37	1.01	3.2	3.7	93	90
Trans-caftaric	0.01–20	0.998	0.02	0.07	2.1	2.3	97	98
<i>p</i> -coumaric	0.01–30	0.998	0.14	0.42	3.9	4.8	95	93
Ferulic	0.01–30	0.996	0.10	0.30	4.5	4.9	102	99
(+)-Catechin	0.01–50	0.997	0.01	0.03	3.5	3.6	105	97
(-)-Epicatechin	0.01–50	0.993	0.07	0.18	5.7	5.5	89	90
Myricetin	0.01–20	0.990	0.04	0.11	4.7	4.8	94	96
Kaempferol	0.01–20	0.996	0.04	0.09	4.8	3.7	95	102
Quercetin	0.01–20	0.991	0.02	0.07	2.4	3.1	98	99
Trans-resveratrol	0.01–20	0.995	0.04	0.11	5.2	5.7	90	93
Tyrosol	0.01–20	0.992	0.15	0.11	5.3	6.0	92	89

WG: white grapes.

RG: red grapes.

RSD: relative standard deviation.

LOD and LOQ: limits of detection and quantification, respectively.

<sup>a</sup> mg/L.

### 3.3. Bioactive compounds and antioxidant activity of grape juices from *V. vinifera* and *V. labrusca* varieties

Potentially active biological components of grapes were identified and quantified through HPLC, in the grape varieties of *V. vinifera* and *V. labrusca*, widely cultivated in the south of Brazil (Table 4). Significant differences were observed between the phenolic compounds in the different grape varieties. All grape varieties presented a high content of hydroxycinnamic acids, especially caffeic acid. We also observed that all of the white grape varieties, particularly *V. vinifera*, had a high content of caffeic acid, mainly from Viognier and Chardonnay grapes. Researchers have reported that *trans*-caffeic acid is present in high concentrations in white grape and wines, playing an important role in the oxidation reactions that lead to browning [22].

In relation to the total content of hydroxybenzoic acids, the Bordô variety showed the highest content (1117.3 µg/100 g), followed by the Merlot (1099.3 µg/100 g) and Concord (904.7 µg/100 g) varieties. Cantos et al. [23] determined the phenolic compounds of table grape varieties from Italy, 3 white and 4 red, and did not detect the presence of hydroxycinnamic acid derivatives in any of the varieties evaluated. This finding demonstrates that there is a lack of data in the literature regarding the content of benzoic acid in non-*V. vinifera* grapes.

Catechin, which is considered a powerful antioxidant, was detected in high concentrations, especially in the Bordô (881.3 µg/100 g), Isabel (215.6 µg/100 g) and Concord (254.7 µg/100 g) grapes, all *V. labrusca* grapes widely cultivated in Brazil for grape juice production as well as for in natura consumption. Our results are in agreement with other studies that also found high concentration of catechin in their research on two *V. labrusca* grape varieties (BRS Clara and BRS Morena grapes) cultivated in the south of Brazil [24]. However, epicatechin was the main flavanol present in Cabernet Sauvignon and Merlot grapes with concentrations around 10 to 5 times higher than those of catechin.

In relation to flavonol compounds, in all of the 11 grape samples evaluated, the concentrations of myricetin, kaempferol and quercetin showed almost the same trend for *V. vinifera* and *V. labrusca* varieties. The amount of kaempferol was very low, suggesting that the prevalent form in the grape is not the aglycon. The low content of flavonols is in agreement with research studies carried out on wines of the Isabel variety (*V. labrusca*) produced in the south of Brazil, which was found to have low concentrations of flavonol compounds [5].

This high content of individual phenolic compounds observed for the Bordô and Concord grape varieties is in agreement with the high content of total polyphenols determined by the Folin-Ciocalteu method. Data on the total polyphenols reported in the literature for other grape varieties show values ranging from 731 to 3486 mg of gallic acid per kg of grape (fresh weight) for red *V. vinifera* grapes [25]. Thus, these preliminary results suggest that Bordô and Concord grapes, even as Cabernet Sauvignon and Merlot grapes, could be notable sources of total phenolic compounds.

Considering the *trans*-resveratrol content of the grape, it was observed that all varieties presented noteworthy concentrations of this compound, and the red grapes showed higher concentrations than the white grapes, as previously described [26]. The stilbene values obtained in this study are in agreement with data reported in the literature for different red *V. vinifera* grape varieties [27]. Of these varieties, the highest concentration of *trans*-resveratrol was observed for the Bordô and Concord varieties, both *V. labrusca*, followed by Cabernet Sauvignon and Merlot, which showed no significant differences. In fact, the total amount of *trans*-resveratrol found in the Bordô grapes suggests that this could be considered a grape cultivar that is a high resveratrol producer, however, additional data for other samples from different vineyards and successive vintages are required. Several studies have reported that *V. vinifera* presents low levels of stress metabolites (resveratrol and viniferins) in comparison with other subspecies such as *Vitis rupestris* [28], *Vitis rotundifolia* and *V. labrusca* [29]. Santos et al. [30] analyzed four grape varieties, namely Isabel (*V. labrusca*), Niágara

(*V. labrusca*), Benitaka (*V. vinifera*), and Brazil (*V. vinifera*), from Brazil, and observed that for total polyphenols and *trans*-resveratrol, in peel, pulp and seed extracts the *V. labrusca* varieties presented the highest concentrations of these compounds in all different grape parts.

Considering all of these data, it can be noted that the differences between the major phenolic compounds of the grapes evaluated might be dependent on the variety rather than the subspecies, which has also been observed by other authors [26]. However, when *V. labrusca* varieties, such as Bordô and Concord, are compared to more widespread *V. vinifera* grape varieties used in the production of red wine their phenolic profiles resembled those grape varieties [25].

For all grape samples, the highest antioxidant activity was obtained with the ABTS method (Table 4). Studies carried out by Xu et al. [31] on white and red grapes, Burin et al. [32] on red wine and Toaldo et al. [33] on grape juice also indicated higher values for the antioxidant activity using the ABTS method. Of the varieties analyzed, the Bordô grapes presented the highest antioxidant activity, followed by Concord, Cabernet Sauvignon and Merlot grapes. As found in our study, Lago-Vanzela et al. [34] also observed that Bordô grapes, especially the skins, have a high potential antioxidant capacity, which is very likely related to their similarly high content of phenolic compounds.

It is well known that the antioxidant activity of grape-derived products is influenced, not only by their total polyphenol content, but also by their phenolic composition, both of which are influenced mainly by the grape variety, which was also verified in this study. To investigate the contribution of main phenolic constituents to the antioxidant activity of the grapes, statistical analysis was performed. In general, positive correlations were observed between the antioxidant activity determined by the two methods (DPPH and ABTS) and each individual phenolic compound determined in this study. This is in agreement with the results of other authors who verified that the antioxidant capacity of grapes and wines is dependent on the phenolic composition [35]. However, some authors have observed a lack of correlation and others a negative correlation between the polyphenol content and antioxidant activity [5].

In this study, it was observed that the ABTS method led to stronger correlations with the polyphenols content. Regarding the phenolic compounds of the grapes, *trans*-resveratrol showed the strongest correlation with antioxidant activity for the two methods evaluated, with a Pearson correlation coefficient (R) of >0.9. Gallic acid also showed high antioxidant activity (R = 0.80 and 0.85), followed by ellagic acid (R = 0.78 and 0.80), ferulic acid (R = 0.68 and 0.69), and catechin (R = 0.55 and 0.65) for DPPH and ABTS, respectively. Moreover, total phenolic (TP) compounds showed strong correlations with the antioxidant activity (R = 0.88 and R = 0.90 for DPPH and ABTS methods, respectively). These same phenolic compounds showed the strongest correlations with antioxidant activity when the correlation analysis was carried out separately for *V. vinifera* and *V. labrusca* grapes.

This high correlation of *trans*-resveratrol with antioxidant activity in grapes is in agreement with data reported in the literature, which affirm that stilbenes, especially *trans*-resveratrol, are responsible for various beneficial effects [3]. The biological properties of resveratrol include antibacterial and antifungal effects as well as cardioprotective, neuroprotective and anticancer actions [36].

Principal component analysis (PCA) was performed to obtain additional information regarding the influence of the variables analyzed in relation to the grape samples (Fig. 2). Before performing the PCA, the level of correlation (and its significance) between the studied variables (phenolic compounds) was verified through factor analysis of the data (data not shown). Through the correlation matrix of the data it was possible to observe that there is a representative number of values higher than 0.500, which means a correlation between the variables ranging from moderate to strong. The contribution of each variable in the principal components was evaluated firstly through the factor loading, which demonstrated that only caffeic, vanillic and protocatechuic acids had values below 0.5 for the two principal components. Therefore, these compounds were excluded from this analysis. The PCA was

**Table 4**  
Individual phenolic compounds, total polyphenol compounds and antioxidant activity for *Vitis vinifera* and *V. labrusca* grapes.

Individual compounds <sup>a</sup>	<i>Vitis vinifera</i> grapes					<i>Vitis labrusca</i> grapes					P-Value	
	Cabernet Sauvignon (RC)	Merlot (RC)	Chardonnay (WC)	Sauvignon Blanc (WC)	Vermintino (WC)	Vrogner (WC)	Niagara (WC)	Niagara Rosada (WC)	Isabel (RC)	Concord (RC)		Bordo (RC)
Gallic	82.6d ± 0.8c	125.6g ± 7.6	29.4c ± 1.7	16.8ab ± 0.5	11.9a ± 0.9	10.2a ± 0.4	10.5a ± 0.5	14.6a ± 3.1	26.6bc ± 1.2	88.9ef ± 1.5	97.3f ± 0.1	***
Vanillic	108.5a ± 5.8	197.9f ± 3.6	249.8g ± 3.2	264.7h ± 1.8	74.9d ± 2.36	153.3c ± 5.1	114.2b ± 3.4	138.0b ± 0.9	94.5e ± 2.3	130.9b ± 5.5	154.0c ± 3.6	***
Syringic	120.9b ± 2.6	121.8bd ± 0.2	42.7f ± 2.2	95.2c ± 2.4	55.3g ± 1.9	33.6b ± 1.3	25.5a ± 3.1	11.9e ± 1.1	82.6h ± 2.4	28.0b ± 3.7	99.4c ± 1.3	***
Protocatechuic	15.4b ± 0.6	51.7c ± 1.7	1.5f ± 0.1	2.1h ± 0.1	nd	nd	61.5e ± 1.6	52.5c ± 2.4	16.4b ± 0.3	18.9b ± 0.1	31.5d ± 0.6c	***
Ellagic	543.4f ± 3.4	602.3f ± 9.1	119.7b ± 0.2	nd	5.6a ± 0.2	2.8a ± 0.3	166.8c ± 3.1	305.2e ± 2.4	210.7d ± 4.9	638.4g ± 7.3	735.1h ± 2.8	***
Total benzoic acids	870.8	1099.3	443.1	378.8	147.7	199.9	378.5	522.8	434.4	904.7	1117.3	***
Caffeic	901.2d ± 10.7	1363.6e ± 1.9	1880.2g ± 5.0	2488.4j ± 12.4	1661.8f ± 7.3	2285.1i ± 9.9	905.3b ± 6.8	404.5a ± 4.7	833.1c ± 18.1	2110.1h ± 8.5	3609.9l ± 11.4	***
<i>p</i> -coumaric	367.5e ± 1.4	336.7d ± 11.1	271.6a ± 2.9	1430.0e ± 10.8	1076.7c ± 5.5	1075.2c ± 1.2	14.7a ± 1.4	112.7b ± 0.6	16.1a ± 0.6	20.1a ± 0.5	37.8a ± 0.9	***
Ferulic	412.2e ± 0.8	515.1h ± 4.4	195.3c ± 0.3	136.4b ± 1.4	270.2a ± 6.7	301.7b ± 2.9	268.7a ± 0.1	289.5a ± 0.1	277.2ab ± 1.4	288.4bc ± 2.0	272.3ab ± 5.2	***
Total cinnamic acids	181.0	2215.4	4265.1	4339.9	201.6c ± 0.9	140.7b ± 3.6	33.5a ± 1.7	nd	1164.8	2868.7	4154.5	***
(+)-Catechin	73.5a ± 1.3	74.2a ± 0.1	147.9c ± 0.9	102.3a ± 2.6	112.6d ± 0.9	112.7e ± 1.8	91.7b ± 0.8	90.3b ± 0.9	215.6c ± 8.6	254.7c ± 1.9	881.3g ± 3.8	**
(-)-Epicatechin	792.4g ± 3.9	3892.0d ± 0.7	87.5ab ± 3.8	210.7h ± 2.9	81.9a ± 1.6	105.1abc ± 4.2	147.0bc ± 1.7	149.8c ± 4.7	204.7f ± 2.2	206.4f ± 6.2	430.8d ± 5.6	***
Total flavanol	865.9	469.4	235.4	313.0	194.5	217.8	238.7	240.1	440.3	561.1	1321.1	***
Myricetin	256.9c ± 2.0	147.2a ± 0.6	153.3b ± 1.1	149.1a ± 2.7	154.3b ± 0.7	158.7c ± 1.8	nd	nd	146.0a ± 0.5	nd	nd	**
Kaempferol	11.9b ± 0.3	23.1c ± 1.2	8.4a ± 0.2	9.3a ± 0.6	nd	nd	nd	nd	8.8a ± 0.1	9.6a ± 0.5	8.8a ± 0.4	***
Quercetin	152.6d ± 0.3	17.99e ± 0.7	nd	145.8c ± 2.5	nd	142.3bc ± 1.8	139.2a ± 0.3	139.6a ± 0.1	140.9a ± 0.6	152.9d ± 0.8	141.4ab ± 0.6	***
Total flavonol	421.4	350.2	161.7	304.2	154.3	301.0	1382	139.6	295.7	162.5	150.2	***
<i>Trans</i> -resveratrol	56.4d ± 0.9	54.1d ± 2.7	29.4b ± 0.8	20.4a ± 0.9	24.5a ± 1.3	20.1a ± 0.4	32.2bc ± 0.1	29.3b ± 0.6	35.0c ± 0.9	64.4e ± 1.9	86.1f ± 0.8	***
Tyrosol	149.8f ± 2.8	67.0a ± 3.6	60.7ab ± 2.7	90.3d ± 1.8	91.1c ± 0.9	65.1ab ± 1.0	57.4a ± 2.8	53.2a ± 1.3	75.9b ± 1.4	130.9e ± 1.9	60.1a ± 1.5	***
Tp <sup>b</sup>	76.5b ± 9.1	83.1b ± 3.1	37.5a ± 0.5	37.8a ± 1.2	39.2a ± 1.1	33.5a ± 0.9	24.6c ± 6.2	34.1a ± 4.7	56.6d ± 6.1	84.7b ± 12.3	106.2e ± 3.1	**
Antioxidant activity <sup>c</sup>	191.1i ± 0.9	161.2g ± 1.4	57.4b ± 2.2	63.0c ± 2.5	84.3e ± 3.4	45.5a ± 0.8	45.5a ± 1.1	79.6d ± 1.0	104.3f ± 2.6	185.5h ± 1.6	233.8j ± 3.9	***
DPPH	213.5i ± 4.5	205.8g ± 3.8	93.1b ± 2.6	136.5e ± 5.1	189.7e ± 2.9	72.8a ± 2.0	91.0a ± 1.9	149.9h ± 2.2	208.6f ± 1.9	318.5h ± 3.7	367.5j ± 2.8	***
ABTS												

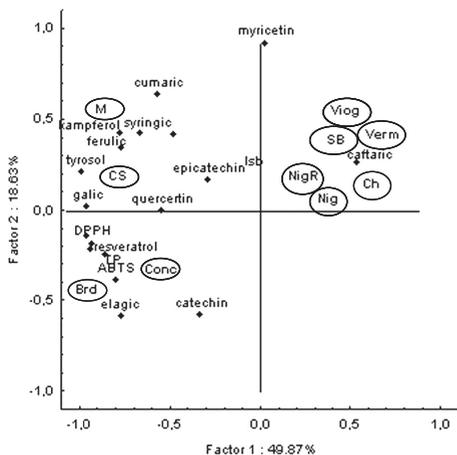
Results are expressed as mean values ± standard deviation (n = 3); nd: not detected; \*p < 0.001; \*\*p < 0.0001; \*\*\*p < 0.00001.

RC: red grape.

<sup>a</sup> Expressed as µg/100 g grapes (fresh weight).

<sup>b</sup> TP: total phenolic compounds expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE)/100 g of grapes (fresh weight).

<sup>c</sup> Expressed as Trolox equivalents (µmol TEAC/100 g grapes) (fresh weight).



**Fig. 2.** Principal component analysis of the free phenolic compounds, total phenolic (TP) and antioxidant activity (DPPH and ABTS) for *V. vinifera* and *V. labrusca* grapes. CS, Cabernet Sauvignon; M, Merlot; Ch, Chardonnay; SB, Sauvignon Blanc; Verm, Vermentino; VioG, Viognier; Nig, Niágara; NigR, Niágara Rosada; Isb, Isabel; Conc, Concord; Brd, Bordó. Data utilized were the average of 3 repetitions.

performed using the two principal components (factor 1  $\times$  factor 2) which explained approximately 70% of the variability. It should be noted that the red grapes *V. labrusca* and *V. vinifera* presented different behaviors in terms of their correlation with the variables. Cabernet Sauvignon and Merlot grapes (*V. vinifera*) showed a strong correlation with ferulic, coumaric, gallic and syringic acids and kaempferol, while the Concord and Bordó grapes (*V. labrusca*) were strongly correlated with the antioxidant activity and *trans*-resveratrol. All white grapes (*V. labrusca* and *V. vinifera*) were grouped together and presented strong correlations with caffeoyl acid.

#### 4. Conclusions

Considering the diversity reported in the literature in relation to the extraction methods employed to extract phenolic compounds from grapes, in this study, we compared four extraction methods and LLE was selected as the best extraction method, which showed the best precision and repeatability. This method is easy, simplistic and has a short analysis time. The reliability is reported using validation criteria considering the linearity, repeatability and accuracy.

In relation to the main individual phenolic compounds identified in the different grape varieties, we observed that the type and concentration of polyphenols are mainly dependent on the grape variety rather than the species. The antioxidant activity of all grape samples evaluated was strongly correlated to the *trans*-resveratrol content. However, we observed that the *V. labrusca* varieties, widely cultivated in the south of Brazil, present high antioxidant potential, associated with the presence of bioactive compounds, especially Bordó and Concord grapes. Additional data on samples from different vineyards and successive vintages need to be collected, since the phenolic content of grapes is strongly affected by both genotype and environmental factors.

#### Acknowledgments

The authors are grateful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support.

#### References

- [1] C. Manach, G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, C. Rémésy, Bioavailability and bioactivity of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (2005) 2305–2425.
- [2] D. Bagchi, M. Bagchi, S.J. Stohs, D.K. Das, S.D. Ray, C.A. Kuszynski, S.S. Joshi, H.G. Pruess, Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 148 (2000) 187–197.
- [3] E.F. Gris, F. Mattivi, E.A. Ferreira, U. Vrhovsek, D. Wilhelms, R.C. Pedrosa, M.T. Bordignon-Luiz, Stilbenes and tyrosol as target compounds in the assessment of antioxidant and hypolipidemic activity of *Vitis vinifera* Red Wines from Southern Brazil. *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 7954–7961.
- [4] P. Mazzuca, P. Ferranti, G. Picariello, L. Chianese, F. Addeo, Mass spectrometry in the study of anthocyanins and their derivatives: differentiation of *Vitis vinifera* and hybrid grapes by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 40 (2005) 83–90.
- [5] S.L. Nixdorf, I. Hermosin-Gutiérrez, Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: phenolic composition and antioxidant capacity. *Anal. Chim. Acta.* 659 (2010) 208–215.
- [6] J.F.S. Protas, U.A. Camargo, *Vitivinicultura brasileira: panorama setorial de 2010.11.10*, <http://www.cnpv.embrapa.br/publica/livro/> 2011.
- [7] S. Malovaná, F.J. García Montelongo, J.P. Pérez, M.A. Rodríguez-Delgado, Optimisation of sample preparation for the determination of *trans*-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta.* 428 (2001) 245–253.
- [8] O. Makhotkina, P.A. Kilmartin, The phenolic composition of Sauvignon Blanc juice modified by cyclic voltammetry. *Electrochim. Acta* 83 (2012) 188–195.
- [9] B.K. Tiwari, A. Patras, N. Brunton, P.J. Cullen, C.P. O'Donnell, Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrasound. Sonochem.* 17 (2010) 598–604.
- [10] M.M. Delgado-Zamarreón, L. Pérez-Martín, M. Bustamante-Rangel, R. Carabias-Martínez, A modified QuEChERS method as sample treatment before the determination of isoflavones in foods by ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta* 100 (2012) 320–328.
- [11] International Organisation of Vine and Wine (OIV), Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis, Paris 2012/2012.
- [12] C.P. Panceri, T.M. Gomes, J.S.D.E. GOES, D.L.G. Borges, M.T. Bordignon-Luiz, Effect of dehydration process on mineral content, phenolic compounds and antioxidant activity of Cabernet Sauvignon and Merlot grapes. *Food Res. Int.* 54 (2013) 1343–1350.
- [13] S.G. Arcari, V.M. Burin, L.L.F. Costa, P.J. Oglari, M.T. Bordignon-Luiz, Optimization of solid-phase extraction of non-coloured phenolic compounds from fortified wines using desorption surface methodology. *Braz. J. Anal. Chem.* 08 (2012) 345–351.
- [14] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid phase extraction” for the determination of pesticides residues in produce. *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412–431.
- [15] V.M. Burin, S.G. Arcari, L.L.F. Costa, M.T. Bordignon-Luiz, Determination of some phenolic compounds in red wine by RP-HPLC: method development and validation. *J. Chromatogr. Sci.* 49 (2011) 647–651.
- [16] N.E. Ferreira-Lima, V.M. Burin, M.T. Bordignon-Luiz, Characterization of Goethe white wines – influence of different storage conditions on the wine evolution during bottle ageing. *Eur. Food Res. Technol.* 237 (2013) 509–520.
- [17] V.L. Singleton, J.A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16 (1965) 144–158.
- [18] Y.K. Kim, Q. Guo, L. Packer, Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicology* 172 (2002) 149–156.
- [19] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* 26 (1999) 1234–1237.
- [20] C. Dominguez, D.A. Guillén, C.G. Barroso, Automated solid-phase extraction for sample preparation followed by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for the analysis of resveratrol derivatives in wine. *J. Chromatogr. A* 918 (2001) 303–310.
- [21] F. Nave, M.J. Cabrita, C.T. Costa, Use of solid-supported liquid-liquid extraction in the analysis of polyphenols in wine. *J. Chromatogr. A* 1169 (2007) 23–30.
- [22] B. Baderschneider, P. Winterhalter, Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 2788–2798.
- [23] E. Cantos, J.C. Espin, F.A. Tomás-Barberán, Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 5691–5696.
- [24] E.S. Lago-Vanzela, R. Da-Silva, E. Gomes, E. García-Romero, I. Hermosin-Gutiérrez, Phenolic composition of the Brazilian seedless table grape varieties BRS Clara and BRS Morena. *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 8314–8323.
- [25] V. Katalinic, S.S. Mozina, D. Skroza, I. Generalic, H. Abramovic, M. Milos, I. Ljubenkov, S. Piskernik, I. Pezo, P. Terpic, M. Boban, Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chem.* 119 (2010) 715–723.
- [26] R.F. Guerrero, B. Puertas, M.J. Fernández, M. Palma, E. Cantos-Villar, Induction of stilbenes in grapes by UV-C: comparison of different subspecies of *Vitis*. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 11 (2010) 231–238.
- [27] M. Rosso, A. Panighel, R. Carraro, E. Padoan, A. Favaro, A.D. Vedova, R. Flamini, Chemical characterization and organoleptical potential of Raboso varieties by study of secondary grape metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 11364–11371.
- [28] A. Bononelli, L. Mercier, J. Franchel, F. Baillieu, E. Benizi, M. Mauro, Response of grapevine density to UV-C exposure. *Am. J. Enol. Vitic.* 55 (2004) 51–59.

- [29] B.J. Ector, J.B. Magee, C.P. Hegwood, M.J. Coign, Resveratrol concentration in muscadine berries, juice, pomace, purees, seeds, and wines, *Am. J. Enol. Vitic.* 47 (1996) 57–62.
- [30] L.P. Santos, D.R. Morais, N.E. Souza, S.M. Cottica, M. Boroski, J.V. Visentainer, Phenolic compounds and fatty acids in different parts of *Vitis labrusca* and *V. vinifera* grapes, *Food Res. Int.* 44 (2011) 1414–1418.
- [31] C. Xu, Y. Zhang, L. Cao, J. Lu, Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China, *Food Chem.* 119 (2010) 1557–1565.
- [32] V.M. Burin, L.L.F. Costa, J.P. Rosier, M.T. Bordignon-Luiz, Cabernet Sauvignon wines from two different clones, characterization and evolution during bottle ageing, *LWT Food Sci. Technol.* 44 (2011) 1931–1938.
- [33] I.M. Toaldo, O. Fogolari, G.C. Pimentel, J.S. Gois, D.L.G. Borges, V. Caliani, M.T. Bordignon-Luiz, Effect of grape seeds on the polyphenol bioactive content and elemental composition by ICP-MS of grape juices from *Vitis labrusca* L, *LWT Food Sci. Technol.* 53 (2013) 1–8.
- [34] E.S. Lago-Vanzela, R. Da-Silva, E. Gomes, E. García-Romero, I. Hermosín-Gutiérrez, Phenolic composition of the edible parts (flesh and skin) of Bordô grape (*Vitis labrusca*) using HPLC-DAD-ESI-MS/MS, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 13136–13146.
- [35] D. Tagliazucchi, E. Verzelloni, D. Bertolini, A. Conte, A. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols, *Food Chem.* 120 (2010) 599–606.
- [36] R.E. King, J.A. Bomser, D.B. Min, Bioactivity of resveratrol, *Compr. Rer. Food Sci. F.* 5 (2006) 65–70.

## CAPÍTULO 3

### **RELATION BETWEEN NITROGEN COMPOUNDS IN MUSTS AND VOLATILE PROFILE OF WHITE WINES: INFLUENCE OF MUST CLARIFICATION PROCESS**

Vívian Maria Burin<sup>1,2</sup>, Trilicia M. Gomes<sup>1</sup>, Vinícius Caliani<sup>1,3</sup>, Gilles de Revel<sup>2</sup>, Marie-Claire Perello<sup>2</sup>, Jean Pierre Rosier<sup>3</sup>, Marilde T. Bordignon Luiz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos CAL/CCA, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, CEP 88034-001, Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>2</sup>Université de Bordeaux, ISVV, EA 4577, Unité de Recherche Oenologie, 33882 Villenave d'Ornon, France.

<sup>3</sup>Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina (EPAGRI-SC) Estação Experimental de Videira SC, 89560-000, Brazil.

## ABSTRACT

Many of the volatile compounds synthesized by yeast also change in response to the nitrogen concentration. It has been suggested that nitrogen management of wine fermentation can be an effective tool to modulate wine aroma composition and style. The aim of this study was to investigate the influence of clarification time on the must of the white grapes, and to establish a practical understanding of the effect of the nitrogen content (amino acids and ammonium) on the must in relation to volatile profile of the wine. The musts were clarified by applying two settling time: 12 h and 30 h, and submitted to the same microvinification procedure. The results showed that the must clarification time, influenced significantly the nitrogen compounds content, especially the amino acids concentration, where the total amino acid content was higher in musts clarified for a shorter time. Moreover, the aromatic profile of these experimental wines was clearly influenced by the must clarification time. Principal components analysis showed a strong influence of the must clarification time on the separation of the wines was observed. The results confirm that the management of the nitrogen content of the musts can be used as a tool to obtain wines with different aromas.

*Keywords:* Clarification time; must; white wine; nitrogen compounds; volatile profile.

## 1. INTRODUCTION

Aroma is one of the most important factors determining the character and quality of a wine. It is known that wine aroma is strongly influenced by several parameters including grape variety, viticultural practices, climatic conditions, alcoholic fermentation and wine ageing. The pre-fermentation steps have a strong influence on the quality and stability of a wine, particularly in the case of white wines, and they also greatly affect the must clarification process. Spontaneous settling at low temperature is the standard approach to removing the solid matter from white grape juice prior to fermentation. The addition of pectolytic enzymes during this step helps to eliminate the pectin substances and reduces the time required for the settling of solid substances (ČAPOUNOVÁ; DRDÁK, 2002). These enzymes can also be used as fining agents containing protein (gelatine) or non-protein (bentonite, silica) materials that allow the precipitation of insoluble particles by means of adsorption mechanisms (ARMADA; FALQUÉ, 2007). Continuous methods, such as filtration and centrifugation, are preferred in many cases, but they give rise to cleaner musts which leads to much longer fermentation processes compared with spontaneous settling (FERRANDO; GUELL; LÓPEZ, 1998).

The favorable effect of clarification on wine quality is evidenced by the superior organoleptic characteristics of wines produced from clarified musts, particularly with regard to aroma. Furthermore, wines made from clarified musts have the advantage of being more stable and, importantly, more resistant to oxidation (RIBEREAU-GAYON; LAFON-LAFOURCADE; BERTRAND, 1975). In contrast to the advantages afforded by clarification, problems associated with the excessive clarification of grape musts include slow or stuck fermentation (BELL; HENSCHKE, 2005), which results in wine with no varietal aroma, since this can be masked by the products of fermentation. On the other hand, excessive turbidity in the must leads to wine with an herbaceous aroma and has a tendency to reduce the varietal aromas (ANCÍN; AYESTARAN; GARRIDO, 1996).

The turbidity of the must obtained after the clarification step is mainly related to the nitrogen content in the must. Nitrogen is present as both inorganic (ammonium) and organic (protein and, mainly, amino acid) forms, which are the two main sources of yeast assimilable nitrogen (VALDÉS et al., 2010). It has even been shown that the nature of the varietal aroma of certain cultivars can be partially explained by the amino acid composition of the grape must. During the early stages of

fermentation, these compounds are rapidly accumulated by the yeast, thus fulfilling the biosynthetic requirements for the amino acids needed for protein synthesis and yeast growth (VARELA; PIZARRO; AGOSIN, 2004). The effect of must nitrogen content on the formation of yeast derived volatile compounds is complex and dependent on the type and concentration of nitrogen present as well as the class of volatile compounds. Moreover, the nitrogen composition of the grape may affect the kinetics of alcoholic fermentation.

Many of the volatile compounds synthesized by yeast also change in response to the nitrogen source and/or nitrogen concentration (BELL; HENSCHKE, 2005). The most important compounds include higher alcohols and esters, which are mostly associated with solvent/fusel odors and fruity/floral aromas, respectively. These compounds contribute to the fermentation *bouquet* of wine and are correlated with the concentration of amino acids in the must (GARDE-CERDÁN; ANCÍN-AZPILICUETA, 2008). The catabolism of amino acids to yield the ketoacids and their corresponding alcohols and ester are an example of the important relation between nitrogen metabolism and these groups of volatile compounds.

Researchers have shown that nitrogen supplementation in the form of assimilable nitrogen and amino acids can significantly affect the production of different groups of fermentation-derived volatile compounds (VILANOVA et al., 2007). It has been suggested that nitrogen management of wine fermentation can be an effective tool to modulate wine aroma composition and style (UGLIANO et al., 2007). However, few studies have investigated the effect of the nitrogen content of the musts (without the addition of nitrogenous substances) after the clarification process on the volatile profile of the wines. In this context, the aim of this study was to investigate the influence of clarification time on the must of the white grapes Sauvignon Blanc, Vermentino and Viognier, and to establish a practical understanding of the effect of the nitrogen content (amino acids and ammonium) on the must in relation to volatile profile of the wine.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 CHEMICALS AND REAGENTS

Standards of amino acids and biogenic amine were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Volatile compounds were obtained from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France), with the exception of methyl butyrate, methyl hexanoate, isoamyl butyrate and ethyl trans-hexanoate (Alfa Aesar A Johnson Matthey Company, Bischheim, France), isoamyl acetate (VWR-Prolabo, Fontenay-sous-bois, France) and ethyl lactate (Fischer Scientific Labosi, Elancourt, France). All solvents were HPLC grade and purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All solutions were filtered through membranes with 0.45 µm of diameter (Millipore). All reagents had purity greater than 95%.

### 2.2 GRAPE MUSTS - EXPERIMENTAL DESIGN

Experiments were carried out with musts obtained from white grapes of the *Vitis vinifera* varieties from the Southern Region of Brazil: Sauvignon Blanc, Vermentino and Viogner. The training system used for all plants was the V System, the rootstock was Paulsen 1103 (*V. berlandierli* Planch x *V. rupestris* Scheele), and the row and vine spacing were 2.7 x 1.3 m, respectively. All grape varieties at harvest showed good technical maturity with mean values of 20 °Brix, pH of 3.2 and total acidity of 7.5 g/L of tartaric acid. The grapes were destemmed and crushed to obtain the must. The must of each variety was distributed in to two fermentation tanks and the clarifying agents, bentonite (Majorbenton, AEB S/A) and silica sol (Baykisol 30, AEB S/A) were added to each tank. The dosage of the clarifying agents used was 7 mL/L for a bentonite solution 10% (v/v) and 2 mL/L for the silica sol; these were recommended by the supplier for musts. The musts were clarified by applying two settling time: 12 h and 30 h, at 4 °C. After this step, the must samples were collected and frozen until the analysis. The experiments were carried out in duplicate.

After the clarification process, the musts were submitted to the same microvinification procedure carried out by EPAGRI (Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina), in Videira, SC, Brazil. The alcoholic fermentations were carried out with the addition of *Saccharomyces cerevisiae* (20 g/100 Kg) (Fermol Blanc, Pascal Biotech)

at 17 °C. The experimental wines were cold-stabilized and the sulfite content was then adjusted to 30 mg/L of free SO<sub>2</sub> (Noxitan, AEB). After bottling the wines were stored at 13 °C.

## 2.3 GENERAL ANALYSIS OF MUSTS AND WINES

The following standard chemical parameters were determined: pH, total acidity (g/L of tartaric acid) and turbidity (nephelometric turbidity units; NTU) for the musts and pH, total acidity (g/L of tartaric acid), volatile acidity (g/L acetic acid) and ethanol (ebulliometry) carried out according to OIV (2012) for the wines. The organic acids (tartaric, malic and succinic acids) contents were determined by HPLC-DAD, according to Burin et al. (2011).

Protein nitrogen (PN) was determined using the Bradford method, and the results expressed in mg/L of BSA (bovine serum albumin), based on a calibration curves constructed from data obtained in white wine (BRADFORD, 1976).

## 2.4 NITROGEN COMPOUNDS

For all must samples, the quantitative determination of the nitrogen compounds, amino acids, ammonium ion and biogenic amines, was carried out, in triplicate, using a Shimadzu (Kyoto, Japan) liquid chromatograph (LC-20A) (HPLC-DAD). The column (4.6 x 250 mm, 5 µm) and pre-column (4.6 mm x 12.5 mm) were C18 reversed-phase columns (Shimadzu, Kyoto, Japan).

The analyses were carried out using the method described by Gómez-Alonso, Hermosín-Gutiérrez and García-Romero (2007), with modifications. The mobile phases were acetate buffer (25 mM) pH = 5.8 (solvent A) and acetonitrile:methanol (80:20) (solvent B). The compounds were eluted applying a binary gradient: 90% of solvent B for 10.5 min, 90-83% of solvent B for 8.5 min, 83 – 80 % of B for 11.5 min and maintained under this condition for 3 min, 80-60 % of solvent B for 26.5 min, 60-18 % of B for 5 min, 18-0% of B for 3 min and maintained under this condition for 4 min. The oven temperature was 35 °C during the whole chromatographic run and the flow was 0.9 mL/min. For the quantification an internal standard (2-amino adipic acid, 1g/L) was used, and the identification of the analytes was performed at 280 nm, with the exception of proline and the ammonium ion (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (292 and 268 nm, respectively). All compounds were detected in a single chromatographic run. Briefly, the derivatization of these compounds

was carried out through the reaction of 1.75 mL of borate buffer (pH = 9), 750  $\mu$ L of methanol (Merck), and 1 mL of sample previously centrifuged (4000 rpm) for 20 min and filtered through a modified 0.45 mm PTFE membrane filter with 13 mm of diameter (Millipore, Bedford, MA), with the addition of 20  $\mu$ L of internal standard and 30  $\mu$ L of derivatization reagent diethyl ethoxymethylenemalonate (DEEMM). The derivatization reaction was carried out in a screw-cap test tube over 30 min in an ultrasound bath. The sample was then kept at 70 °C for 2 h to allow complete degradation of the excess DEEMM and reagent by products. The stability of the amino acid derivatives before the derivatization reaction was investigated, over 48 h, where the samples were placed in a dark room at 4 °C. All analytes showed stable concentrations (maintaining 100% of the initial concentration) 24 h after derivatization (data not shown).

The analysis was carried out in triplicate. The target compounds were identified according to the retention times and UV-vis spectral characteristics of the corresponding derivatized standards, expressed in mg/L. Quantification was performed using the calibration curves of the respective standards. The analytical performance of this method was investigated, indicating good linearity ( $R^2 > 0.99$ ), repeatability (RSD < 5 %) and accuracy (recovery > 80 %).

## 2.5 VOLATILE COMPOUNDS OF THE WINES

The volatile profile of the wines (56 compounds) was obtained by gas chromatography (GC), using five different methods according to each class of compounds analyzed. All methods were developed and evaluated in the laboratory of *Institut des Sciences de la Vigne et du Vin* (ISVV), University of Bordeaux 2, France. The identification of the compounds was performed by comparing the retention times and/or mass spectra (NIST database mass spectra) with those of pure standards. The specific mass ( $m/z$ ) for the identification and quantification of each analyte quantified by mass spectrometry is described in Table 3 and Table 4. The quantification for all compounds was performed using calibration curves based on data obtained in white wine.

*Apolar Esters (HS-SPME-GC/MS)*. This method, developed and validated by Antalick, Perello and de Revel (2010), allows 32 apolar esters to be quantified: fatty acid ethyl esters, higher alcohol acetates, branched acid ethylesters, isoamyl esters, methyl esters, ethyl cinnamates and minor esters (Table 4). In accordance with this method,

20  $\mu\text{L}$  of internal standard solution was added to 25 mL of wine. An aliquot of 10 mL of this wine was introduced into a 20 mL standard headspace vial previously filled with 3.5 g of sodium chloride, the mixture was homogenized using a vortex shaker and the vial loaded onto a Gerstel autosampler. The samples were extracted by HS/SPME (PDMS, 100  $\mu\text{m}$ ) and analyzed by GC/MS according to the conditions described by the authors. A mixture of ethyl-d5 butyrate, ethyl-d5 hexanoate, ethyl-d5 octanoate, and ethyl-d5 cinnamate in 20 mg/L in ethanol was used as the internal standard.

*Additional Volatile Compounds (Liquid–Liquid Extraction and GC/MS Analysis).* The method developed and validated by Antalick, Perello and de Revel (2012) allows five polar esters and ethyl acetate to be quantified. In accordance with this method, 50 mL of wine previously spiked with 10  $\mu\text{L}$  of internal standard solution (hydroalcoholic solution of octan-2-one at 1 g/L) was successively extracted once with 4 mL and twice with 2 mL of dichloromethane. The extract was then analyzed by GC/MS under the conditions described by the authors.

*Free monoterpenes (Liquid–Liquid Extraction and GC/MS Analysis).* The method was carried out according to Falcão et al. (2008) with modifications. A volume of 50 mL of wine previously spiked with 10  $\mu\text{L}$  of internal standard solution (hydroalcoholic solution of 3-octanol at 400 mg/L) was successively extracted once with 4 mL and twice with 2 mL of ether:isohexane (1:1, v/v). The extract was then analyzed by GC/MS using a Carbowax 20 M capillary column (50 m x 0.22 mm). The oven temperature was maintained at 40 °C for 1 min and then increased at 33 °C/min to 200 °C and maintained under this condition for 30 min. The injector and detector temperatures were 250 and 280 °C, respectively. Helium was used as the carrier gas (20 psi) with a linear velocity of 4.1 mL/min.

*C13-Norisoprenoids and Lactones (SBSE-GC/MS).* This method was developed and validated by Antalick et al. (2012) and allows four C13-norisoprenoids and four lactones to be quantified. In accordance with the method, 25  $\mu\text{L}$  of internal standard solution (ethyl-d5 cinnamate at 20 mg/L in ethanol) was added to 25 mL of wine. An aliquot of 20 mL of this wine was introduced into a 25 mL adapted vial. A 20 mm x 1 mm (length x film thickness) PDMS stir bar (Twister, 126  $\mu\text{L}$  coating) (Gerstel, Müllheim der Ruhr, Germany) was dropped into the vial which was then capped with a PTFE-faced rubber stopper. The closed

vials were stirred for 1 h at 900 rpm and room temperature. Each stir bar was then transferred into a glass tube for thermal desorption (Gerstel) followed by GC/MS analysis under the conditions described by the authors.

*Higher alcohols and hexanol.* These compounds were determined by GC coupled to a flame ionization detector (FID) (Agilent Tech. 5890, France). A CP-WAX 57 CB capillary column (50 m x 0.25 mm x 0.2 µm diameter) was used. A wine sample (0.4 µL) was injected in split mode (1/60). The carrier gas was hydrogen with a flow of 2 mL/min. The oven temperature was kept at 40 °C for 5 min and then raised to 200 °C at 4 °C/ min. The injector and detector temperatures were 200 and 240 °C, respectively. The internal standard was a hydroalcoholic solution of 4-methyl 2-pentanol at 4 g/L (FALCÃO et al., 2008).

*Methionol (Liquid-liquid extraction - GC/MS analysis).* The method was carried out according to Beloqui and Bertrand (1995) with modifications. A volume of 50 mL of the wine sample the following were added: 50 µL of internal standard (4-methylsulfanyl phenol at 700 mg/L), 6 g of anhydrous ammonium sulfate and 300 µL of phosphoric acid solution (1:3 v/v). The wine extraction was carried out twice consecutively with 5 mL of dichloromethane for 5 min. The organic phase was concentrated under nitrogen flow to a quarter of the initial volume. A volume of 2 µL was injected and the analyte separation was performed using a FFAP-type column (50 m x 0.32 mm x 0.25 µm). The oven temperature was kept at 40 °C for 1 min and then raised to 220 °C at 3 °C/ min. The carrier gas was helium using a linear velocity of 4.1 mL/min.

## 2.6 STATISTICAL ANALYSIS

All analysis was carried out in triplicate and results expressed as mean values. The coefficient of variation (%) was calculated for all compounds and values of < 5% were considered to be acceptable. One-way analysis of variance and the Student's *t*-test were performed to find significant differences between the concentrations of the analytes for the must settled for 12 and 30 h. Multivariate significance tests were performed and two-way analysis of variance was used to test the effects of grape variety and clarification time. Correlation analysis and principal component analysis (PCA) were also performed to differentiate between samples on the basis of must and wine

composition. These analyses were carried out using the STATISTICA v. 8.0 (2007) (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) software program.

### **3. RESULTS AND DISCUSSION**

#### **3.1 ENOLOGICAL PARAMETERS OF MUSTS AND WINES**

The two clarification times (12h and 30 h) applied to the Sauvignon Blanc, Vermentino and Viogner musts allowed musts with different turbidity values to be obtained (Table 1). The musts with 50 and 150 NTU, for all varieties, showed no significant difference in relation to the enological parameters determined. The same behavior of the musts as a function of the clarification time was also observed for the respective wines. Moreover, the time applied in the clarification of the musts did not affect the alcohol and volatile acidity of the wines. Valdés et al. (2011) also observed that of the physico-chemical parameters determined for must and wines of the Cayetana variety, only the turbidity was affected by the clarification process.

Table 1 - General analysis of musts and wines after clarification process applying two different settling times.

	Settling time	Turbidity (NTU)	pH	TA	VA	Alcohol (%)	Tartaric Acid*	Malic acid*	Succinic Acid*
<i>Musts</i>									
SB	12h	150	3.2	8.4	---	---	5.7	2.5	0.3
	30h	50	3.2	8.4	---	---	5.8	2.5	0.2
Verm	12h	150	3.0	8.2	---	---	4.4	3.9	0.3
	30h	50	3.1	8.1	---	---	4.5	3.8	0.3
Viog	12h	150	3.3	6.8	---	---	3.8	2.5	0.2
	30h	50	3.3	6.9	---	---	3.8	2.4	0.2
<i>Wines</i>									
SBW <sub>30</sub>		---	3.0	6.1	0.11	11.0	5.5	2.4	0.2
SBW <sub>12</sub>		---	3.1	6.2	0.12	11.2	5.7	2.5	0.2
VermW <sub>30</sub>		---	3.0	6.2	0.16	11.0	4.0	3.6	0.2
VermW <sub>12</sub>		---	3.0	6.5	0.17	11.1	4.7	3.8	0.2
ViogW <sub>30</sub>		---	3.2	5.8	0.15	10.5	3.3	2.3	0.2
ViogW <sub>12</sub>		---	3.3	6.0	0.15	10.5	3.9	2.5	0.2

Results are expressed as mean values ( $n = 3$ ). SB, Sauvignon Blanc; Verm, Vermentino; Viog, Viogner.

TA, total acidity (g/L of tartaric acid).

VA, volatile acidity (g/L acetic acid).

\*expressed as g/L.

### 3.2 NITROGEN COMPOUNDS OF THE MUSTS AND VOLATILE PROFILE OF THE WINES

The nitrogen compounds determined in the musts were amino acids, biogenic amines, ammonium ions and proteins, as shown in Table 2.

Table 2 - Free amino acids, ammonium ion, protein nitrogen and biogenic amine content (mg/L) in the white musts after the clarification process applying two different settling times: 12 and 30 h.

Aminoacid	Sauvignon Blanc				Vermentino				Viognier				
	M <sub>30</sub>		M <sub>12</sub>		M <sub>30</sub>		M <sub>12</sub>		M <sub>30</sub>		M <sub>12</sub>		p-value
	(50 NTU)	(150 NTU)	(150 NTU)	(50 NTU)	(50 NTU)	(150 NTU)	(150 NTU)	(50 NTU)	(50 NTU)	(150 NTU)	(150 NTU)		
Asparticacid	2.5(0.1)	3.9(0.3)	*	26.6(1.1)	29.9(0.6)	*	2.9(0.5)	4.5(1.0)	*			*	
Glutamicacid	68.4(0.6)	77.2(1.1)	**	92.2(3.2)	104.1(3.7)	**	50.6(5.5)	70.0(4.2)	**			**	
Asparagine	5.1(0.0)	7.0(0.5)	**	4.7(0.2)	6.3(0.5)	**	9.1(0.6)	11.5(0.2)	*			*	
Serine	44.1(0.1)	48.5(1.2)	**	51.1(4.2)	56.9(3.1)	ns	48.6(1.1)	53.0(0.2)	*			*	
Glutamine	144.5(1.0)	166.8(2.1)	**	158.8(5.7)	179.6(3.9)	**	150.6(4.9)	173.3(7.1)	*			*	
Histidine	2.3(0.0)	11.9(0.6)	***	11.2(1.4)	19.9(0.6)	***	16.8(2.0)	22.6(1.7)	**			**	
Glycine	3.2(0.1)	3.9(0.2)	ns	5.3(1.1)	6.5(1.2)	ns	5.0(0.4)	7.1(1.2)	*			*	
Citrulline	4.5(0.2)	5.6(0.3)	**	4.7(0.4)	4.9(0.1)	ns	6.5(0.3)	8.3(0.1)	*			*	
Treonine	50.1(0.5)	52.1(1.0)	ns	37.0(2.3)	40.4(0.3)	ns	54.2(2.3)	64.9(3.6)	*			*	
Arginine	434.1(1.9)	471.8(2.4)	**	258.7(6.3)	292.5(2.9)	*	630.1(7.1)	782.6(9.2)	**			**	
Alanine	82.3(1.2)	91.3(3.6)	*	137.8(5.4)	156.1(6.7)	*	99.2(2.5)	117.9(5.6)	**			**	
GABA	42.2(0.8)	45.4(1.4)	ns	<0.06 <sup>†</sup>	<0.06 <sup>†</sup>		40.0(0.2)	43.1(0.3)	ns			ns	
Proline	21.4(0.3)	28.9(1.8)	*	18.4(2.5)	29.9(3.7)	*	35.1(1.4)	43.1(0.9)	*			*	
Tyrosine	6.1(0.0)	6.2(0.2)	ns	5.4(0.3)	5.5(0.2)	ns	9.3(0.3)	10.0(0.2)	ns			ns	
Valine	15.3(0.9)	26.1(3.4)	**	13.9(0.6)	20.2(1.1)	*	31.3(0.5)	39.1(0.7)	*			*	
Methionine	2.6(0.1)	3.9(0.4)	*	3.1(0.2)	6.6(1.5)	*	4.3(0.0)	5.9(0.2)	*			*	
Cysteine	2.5(0.2)	6.2(0.7)	**	1.3(0.0)	2.4(0.2)	*	5.9(0.2)	7.7(0.2)	**			**	
Isoleucine	1.7(0.0)	1.9(0.1)	ns	2.4(0.3)	2.5(0.1)	ns	2.4(0.0)	2.6(0.1)	ns			ns	
Triptophane	38.1(1.5)	45.1(3.2)	ns	23.6(1.7)	29.1(1.9)	ns	61.0(2.9)	74.3(6.3)	*			*	
Leucine	22.6(2.1)	29.3(1.9)	**	11.4(1.9)	13.7(0.3)	ns	40.6(0.9)	48.4(1.1)	**			**	
Phenylalanine	13.7(1.7)	16.7(2.0)	**	15.3(2.4)	21.6(0.9)	**	33.1(2.1)	38.3(1.5)	*			*	
Ornithine	0.8(0.1)	0.9(0.1)	ns	1.7(0.1)	1.8(0.2)	ns	1.7(0.1)	1.9(0.3)	ns			ns	
Lysine	2.7(0.3)	4.0(1.1)	***	3.0(0.2)	3.2(0.1)	ns	8.5(0.2)	9.0(0.1)	ns			ns	
Sum	1010.8	1154.6		888.6	1033.6		1346.8	1639.1					

Table 2 -Continuation

NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> <sup>2</sup>	98.0(1.1)	135.4(2.7)	**	100.1(4.8)	140.2(5.5)	**	121.7(4.1)	173.9(3.9)	**
PN <sup>3</sup>	85.6(2.6)	110.4(5.7)	**	50.2(5.8)	73.3(3.2)	*	69.2(2.7)	94.6(3.8)	**
<i>Biogenicamine</i>									
Histamine	20.2(2.1)	20.8(1.8)	ns	9.8(0.5)	10.9(1.1)	ns	13.7(8.9)	15.0(0.5)	ns
Putrescine	1.6(0.1)	2.3(0.2)	**	0.5(0.2)	1.2(0.0)	**	1.3(0.2)	2.2(0.1)	**
Triptamine	0.02(0.01)	0.10(0.11)	**	0.10(0.0)	0.29(0.0)	**	0.04(0.02)	0.13(0.03)	**
Cadaverine	<0.05 <sup>4</sup>	<0.05 <sup>4</sup>		<0.05 <sup>4</sup>	<0.05 <sup>4</sup>		<0.05 <sup>4</sup>	<0.05 <sup>4</sup>	
Spermidine	<0.05 <sup>4</sup>	<0.05 <sup>4</sup>		0.03(0.01)	0.04(0.01)	ns	<0.05 <sup>4</sup>	<0.05 <sup>4</sup>	
Tyramine	<0.09 <sup>4</sup>	<0.09 <sup>4</sup>		<0.09 <sup>4</sup>	<0.09 <sup>4</sup>		<0.09 <sup>4</sup>	<0.09 <sup>4</sup>	

Results are expressed as mean values (standard deviation) ( $n = 3$ ).

M<sub>30</sub> and M<sub>12</sub>, must settling times of 30 and 12 h.

<sup>1</sup>No significant effect, ns ( $p > 0.05$ ); \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$

<sup>2</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ammonium ions (mg/L)

<sup>3</sup>PN, protein nitrogen, expressed as mg/L of BSA.

<sup>4</sup>Value less than detection limite of the method.

All amino acids evaluated in this study were affected by the clarification time, with higher concentrations in the musts with higher turbidity (150 NTU); however, the difference in the concentration was not always significant. The highest concentration of amino acids in musts with higher solids content was observed to be below 50 % for all samples, and the clarification time had the greatest influence on the amino acids valine, histidine, aspartic acid, glutamic acid and cysteine. For all three grape varieties, tyrosine, GABA, isoleucine and ornithine showed no significant differences between the musts settled for 12 and 30 h, demonstrating that they were not affected by the clarification time. When comparing the musts settled for the different times, it can be observed that there is no general pattern for the 3 grape varieties, for example, the treonine, glycine and triptophane content showed significant differences only for Viogner musts. Thus, considering that during the clarification process insoluble materials tend to precipitate out, the amino acids that were not affected by the clarification time, for the Sauvignon Blanc and Viogner varieties, could be solubilized in the must and not eliminated by the process. Of the 23 amino acids determined, only GABA was not detected in the Vermentino variety.

In considering the total amount of free amino acids, which represents the content of amino nitrogen present in the musts, it was observed that the musts of the three grape varieties settled for 12 h, and consequently with higher turbidity (150 NTU), showed higher total amino acid contents. Ferrando et al. (1998) studied the effect of three different must clarification processes: static sedimentation, centrifugation and filtration under vacuum, and found that the amino acid composition changed according to the clarification process. The same authors observed that the process that provided musts with the lowest turbidity (vacuum filtration) also induced the greatest reduction in the amino acid content.

The ammonium ion, which is an important, and the first, inorganic source of nitrogen used by yeast, showed a significant change in concentration according to the clarification time, with an increase of around 30% in the concentration for the musts with 150 NTU compared with 50 NTU (Table 2). This difference in the concentration of ammonium ions in the musts could influence the fermentation kinetics, as well as the volatile composition of the wine (LOSADA et al., 2011). The content of protein nitrogen (PN) (Table 2) was also significantly influenced by the must clarification time; on comparing the musts with 150 and 50 NTUs, the concentrations of PN were 32, 26 and 22%

lower in the latter case for the varieties Vermentino, Sauvignon Blanc and Viogner, respectively.

It was observed that among the biogenic amines, putrescine and tryptamine were influenced by the clarification time of the must for all varieties. The reduction in the concentration of these amines was 80, 65 and 41% for the varieties Sauvignon Blanc, Vermentino and Viogner, respectively, comparing the musts with 150 NTU to those with 50 NTU. However, the histamine content was not altered significantly by the clarification time. Cadaverine and tyramine were not detected in any of the samples obtained from the different grape varieties. The absence of these amines is in agreement with the results obtained by other researchers who proposed that they are mainly formed during the wine fermentation process by decarboxylation of the corresponding amino acid precursor (YILDIRIM; ÜREN; YÜCEL, 2007).

The study of the volatiles responsible for primary aromas in the wine, such as terpenols and norisoprenoids, showed that, for most compounds, their concentrations in these experimental white wine samples were significantly affected by the must clarification time (Table 3). ANOVA effects showed that the contents of these varietal compounds were influenced by the grape variety as well as the must clarification time. It was observed that all wines showed a higher concentration for varietal volatile compounds when produced from musts with higher turbidity, with the exception of  $\beta$ -citronellol for terpene and  $\beta$ -ionone for C13-norisoprenoides, which showed no significant difference in relation to the clarification time. Through analysis of the Pearson's correlation (R) it was possible to observe that most of the levels of varietal volatile compounds in the wines were significantly correlated with the ammonium nitrogen content of the must ( $R > 0.75$ ), notably, nerol ( $R = 0.89$ ) and  $\alpha$ -ionone ( $R = 0.9$ ).

Table 3 - Concentration of varietal volatile compounds for experimental wines obtained by fermentation of musts settled for 30 and 12 h.

Compounds ( $\mu\text{g/L}$ )	Sauvignon Blanc				Vermentino				Viogner				Multivariate test <sup>1</sup>		Selected Ions <sup>2</sup>	
	WSB <sub>30</sub>		WSB <sub>12</sub>		Wver <sub>30</sub>		Wver <sub>12</sub>		Wviog <sub>30</sub>		Wviog <sub>12</sub>		Grape variety	Clarification time		Grape variety x Clarification time
	WSB <sub>30</sub>	WSB <sub>12</sub>	p-value	Wver <sub>30</sub>	Wver <sub>12</sub>	p-value	Wviog <sub>30</sub>	Wviog <sub>12</sub>	p-value	Wviog <sub>30</sub>	Wviog <sub>12</sub>	p-value				
<i>Terpene</i>																
Geraniol	1.8	4.3	**	1.4	2.0	**	0.5	0.7	*	0.000001	0.00003	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001	93/69
Linalol	42.3	54.6	*	9.1	13.1	**	20.5	32.4	**	0.000001	0.00001	0.00001	0.00001	0.002	0.002	71/93
$\alpha$ -Terpineol	14.7	19.5	*	10.8	20.3	**	1.8	28.1	***	0.00001	0.001	0.001	0.0001	0.0001	0.0001	81/43
$\beta$ -citronellol	1.8	2.0	ns	3.2	3.2	ns	5.1	5.5	ns	0.001	0.11	0.11	0.098	0.098	0.098	69/41/95
Nerol	8.1	10.2	*	10.4	15.6	*	15.4	20.4	*	0.0001	0.0001	0.0001	0.00001	0.00001	0.00001	69/93/41
<i>Cl3-norisoprenoid</i>																
$\alpha$ -ionone	0.05	0.41	***	0.01	0.38	***	0.05	0.45	***	0.00001	0.000001	0.000001	0.000001	0.000001	0.000001	136/121
$\beta$ -ionone	0.03	0.04	ns	0.03	0.04	ns	0.04	0.04	ns	0.54	0.06	0.23	0.23	0.23	0.23	177/192
$\beta$ -damascenone	4.2	5.1	**	2.5	4.8	*	3.1	5.3	*	0.01	0.000001	0.000001	0.000001	0.000001	0.000001	190/121
$\beta$ -damascone	0.01	0.01	ns	<0.006 <sup>3</sup>	<0.006 <sup>3</sup>	ns	0.01	0.02	ns	0.156	0.071	0.231	0.231	0.231	0.231	192/123

Results are expressed as mean values ( $n = 3$ ). For all compounds the coefficient of variation was < 5%. ANOVA was performed separately for samples from each grape variety to compare wines produced from musts settled for 30 and 12 h. No significant effect, ns ( $p > 0.05$ ); \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

<sup>1</sup>Multivariate test: results for the two-way analysis of variance. Significance of the effects of the two factors and of their interaction.

<sup>2</sup>Ions monitored in SIM detection for each compound. Quantitative ions are marked in bold and qualitative ions are marked in normal character.

<sup>3</sup>Value less than detection limit of the method.

Moio et al. (2004) also observed that the concentrations of terpenes and their glycosylated precursors were higher in wines obtained from musts with a higher solids content in the medium. Other researchers have demonstrated that the decrease in turbidity of musts obtained through a clarification process also leads to the elimination of the precursors of these varietal aromas from the grape must (SWIEGERS et al., 2005). Carrau et al. (2005) demonstrated the potential of some yeast strains to contribute to the floral aroma of wine by synthesizing monoterpenes, enhanced by certain fermentation conditions, for instance, using musts with higher concentrations of nitrogen.

The complex relationship between the terpenes and isoprenoids and the nitrogen content of the fermentation medium suggests that several metabolic routes are involved, which are affected differently by the must nitrogen concentration. Researchers have speculated that the terpene biosynthesis during alcoholic fermentation is related to nitrogen-induced changes in the glycosidase activity, such as those due to increased biomass yield (CARRAU et al., 2005), which could explain the higher concentration in wines produced from musts with higher nitrogen content (Table 2). Insufficient information is available to hypothesize about the role of nitrogen in the formation of norisoprenoids.

Wine esters, with pleasant floral and fruity aroma, are largely derived from the metabolism of sugars and aminoacids by yeast (SWIEGERS et al., 2005). Table 4 shows the wine concentrations of the 37 esters originating from musts with different solids content in the medium, settled for 12 and 30 h. Multivariate tests showed that the content of most of the volatile fermentation products in the experimental wines were influenced by the grape variety and by the must clarification time. The results demonstrate that only 7 compounds (ethyl butyrate, octyl acetate, butyl acetate, ethyl dihydrocinnamate, ethyl cinnamate, methyl butyrate and isoamyl octanoate) were not influenced significantly by the factor 'clarification time'. As a general rule, the use of static settling for 30 h gives rise to wines with larger quantities of ethyl esters than the use of musts subjected to 12 h of settling. Thus, ethyl esters of fatty acids and branched acids, in general, were present in higher concentrations in the wines produced from musts with lower nitrogen content (Table 4), exceptions being ethyl valerate and ethyl heptanoate. These results can be explained considering that the must clarification stimulates the formation of mid-chain fatty acids by yeasts (which are not able to make use of the sterols or unsaturated fatty acids

in the insoluble solids, because these are eliminated by settling), leading to a concentration of esters of fatty acids being observed in the wines (DELFINI et al., 1992). According to the literature, the ethyl fatty acid esters are mainly responsible for the aromatic characteristics of white wines and it has been shown that the formation of these compounds is favored by slow fermentation and stress conditions for the yeast, such as employing clarified must (BERTRAND, 1983).

Researchers have observed that the total concentration of ethyl esters varied significantly as a function of the must nitrogen for Albariño (VILANOVA et al., 2012) and Chardonnay (TORREA et al., 2011) varieties, as result of nitrogen addition to the must in concentrations of between 350 and 450 mg N/L. However, the observation of a strong influence of the must nitrogen content on the formation of esters during alcoholic fermentation suggests the need for further research on the factors controlling the production of branched-chain ethyl esters and their precursor acids by wine yeasts.

Similarly to the ethyl esters, the concentrations of polar esters, such as ethyl lactate, ethyl 3-hydroxybutyrate, ethyl 2-hydroxyhexanoate and diethyl succinate, can increase in wine produced from must settled for 30 h (Table 4). Results contrary to those obtained in the present study were observed by Losada et al. (2011) in must of the Godello variety, clarified for a longer period, which led to wines with higher contents of ethyl lactate and diethyl succinate.

Table 4 - Concentration of volatile yeast fermentation products in experimental white wines obtained by fermentation of musts settled for 30 and 12 h.

Compounds	Sauvignon Blanc						Vermentino						Viognier						Multivariate test <sup>2</sup>			Selected ions <sup>3</sup>
	WSB <sub>30</sub>		WSB <sub>12</sub>		p-value <sup>1</sup>		Wver <sub>30</sub>		Wver <sub>12</sub>		p-value <sup>1</sup>		Wviog <sub>30</sub>		Wviog <sub>12</sub>		p-value <sup>1</sup>		Grape variety	Clarification time	Grape variety x Clarification time	
	WSB <sub>30</sub>	WSB <sub>12</sub>	WSB <sub>30</sub>	WSB <sub>12</sub>	p-value <sup>1</sup>	p-value <sup>1</sup>	Wver <sub>30</sub>	Wver <sub>12</sub>	Wver <sub>30</sub>	Wver <sub>12</sub>	p-value <sup>1</sup>	p-value <sup>1</sup>	Wviog <sub>30</sub>	Wviog <sub>12</sub>	Wviog <sub>30</sub>	Wviog <sub>12</sub>	p-value <sup>1</sup>	p-value <sup>1</sup>				
<b>Ethyl fatty acid esters (µg/L)</b>																						
Ethyl propanoate	290.3	219.3	*	390.9	200.8	**	453.4	320.8	***	0.0002	0.001	0.001	0.0003	102/57/75								
Ethyl butyrate	221.6	221.7	Ns	319.8	361.0	ns	196.8	162.3	ns	0.001	0.120	0.055	88/71/60									
Ethyl octanoate	1141.3	760.1	***	1249.4	983.8	**	1130.0	754.0	***	0.0001	0.00003	0.0001	88/101/127									
Ethyl decanoate	327.2	100.9	****	289.1	226.1	*	332.9	121.3	***	0.0003	0.002	0.0002	88/101									
Ethyl dodecanoate	19.4	7.4	**	19.4	10.1	**	27.2	15.6	*	0.001	0.041	0.001	88/101									
Ethyl hexanoate	1021.7	658.2	**	965.3	638.1	*	742.3	512.4	***	0.0001	0.0001	0.0007	88/99/60									
Ethyl valerate	2.2	14.3	***	3.8	6.5	*	5.4	13.4	*	0.002	0.007	0.111	85/88/10									
Ethyl heptanoate	1.7	2.4	**	0.8	0.9	*	1.9	2.4	**	0.0004	0.002	0.002	88/101									
Ethyl nonanoate	0.5	0.5	Ns	0.8	0.4	**	1.2	0.7	**	0.0003	0.0003	0.0002	88/101									
<i>Sum</i>	3025	1985		3239	2427		2891	1902														
<b>Acetates (µg/L)</b>																						
Propyl acetate	<0.4 <sup>1</sup>	<0.4 <sup>1</sup>		43.1	64.8	**	37.4	100.8	***	0.0001	0.0001	0.0002	61/43									
Isobutyl acetate	2.4	5.5	*	15.7	19.9	**	18.7	29.1	***	0.0005	0.004	0.004	56/43									
Octyl acetate	1.7	1.6	ns	0.2	0.3	ns	1.6	1.5	ns	0.003	0.069	0.56	56/43									
Hexyl acetate	10.6	67.8	***	50.0	60.2	**	28.4	34.2	*	0.00008	0.004	0.0001	56/43									
Butyl acetate	8.5	8.6	ns	1.5	2.0	ns	10.1	9.0	ns	0.013	0.532	0.361	56/43									
Isomyl acetate	311.3	1055.6	**	457.8	837.4	**	545.5	923.9	***	0.0006	0.005	0.043	70/55/43									
Ethyl acetate	80.9	131.3	**	117.5	145.7	*	150.6	210.1	**	0.0005	0.0001	0.0002										
<i>Sum</i>	415	1270		685	1130		792	1308														
<b>Aromatic esters (µg/L)</b>																						
Ethyl phenylacetate	10.2	28.1	**	5.2	11.5	**	12.1	14.5	**	0.013	0.001	0.131	91/105									
Phenylethyl acetate	67.9	105.7	**	46.5	70.1	***	69.0	80.7	**	0.047	0.036	0.086	104/91/43									

Table 4 - Continuation

Ethyl dihydrocinnamate	3.9	4.1	2.9	3.2	ns	1.9	1.9	1.9	0.100	0.870	0.139	104/91/178
Ethyl cinnamate	0.6	0.5	0.9	1.0	ns	0.9	1.0	1.0	0.051	0.148	0.056	106/131
<i>Sum</i>	83	138	55	86		84	98					
<b>Ethyl branched acid esters (µg/L)</b>												
Ethyl isobutyrate	45.2	27.5	**	45.2	*	46.1	30.1	30.1	<b>0.0008</b>	<b>0.0003</b>	<b>0.006</b>	<b>116/88/71</b>
Ethyl 2-Methylbutyrate	8.2	5.9	**	3.7	**	4.9	3.6	3.6	<b>0.0001</b>	<b>0.023</b>	<b>0.009</b>	<b>102/57/85</b>
Ethyl isovalerate	14.9	13.1	*	6.5	*	10.9	7.2	7.2	<b>0.006</b>	<b>0.039</b>	0.254	<b>88/85/57</b>
<i>Sum</i>	68	46		55		62	41					
<b>Methyl fatty acid esters (µg/L)</b>												
Methyl octanoate	1.2	1.9	***	0.8	*	1.2	1.4	1.4	<b>0.0001</b>	<b>0.008</b>	<b>0.001</b>	<b>74/87/127</b>
Methyl decanoate	0.3	0.1	*	0.1	*	0.2	0.1	0.1	<b>0.03</b>	<b>0.002</b>	<b>0.006</b>	<b>74/87</b>
Methyl hexanoate	0.9	1.3	**	1.5	**	0.9	1.6	1.6	<b>0.002</b>	<b>0.011</b>	<b>0.010</b>	<b>74/87/99</b>
Methyl butyrate	36.3	30.8	ns	<0.1 <sup>†</sup>		35.8	32.2	32.2	0.07	0.077	0.059	<b>74/87/71</b>
<i>Sum</i>	38	34		2.4		38	35					
<b>Isoamyl esters of fatty acids (µg/L)</b>												
Isoamyl hexanoate	0.4	1.7	***	2.0	***	0.5	0.8	0.8	<b>0.045</b>	<b>0.01</b>	0.961	<b>99/70</b>
Isoamyl octanoate	2.8	3.0	ns	1.8	ns	1.6	1.7	1.7	<b>0.029</b>	0.215	0.372	<b>127/70</b>
Isoamyl butyrate	0.2	0.4	**	0.5	**	0.4	0.5	0.5	0.652	<b>0.044</b>	0.485	<b>71/70/55</b>
<i>Sum</i>	3.4	5.2		4.4		2.5	3.0					
<b>Miscellaneous esters (µg/L)</b>												
Ethyl trans-2-hexenoate	4.3	3.2	*	3.1	**	4.8	2.8	2.8	<b>0.024</b>	<b>0.049</b>	0.098	<b>99/97/55</b>
Methyl trans-geranate	2.3	1.6	**	1.2	***	2.3	1.1	1.1	<b>0.03</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	<b>114/69</b>
<i>Sum</i>	6.6	4.8		4.3		5.1	3.9					
<b>Polar esters (µg/L)</b>												
Ethyl lactate	5657.2	5061.7	***	4401.3	**	2844.2	2684.5	2684.5	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>45/75</b>
Ethyl 3-hydroxybutyrate	163.0	114.7	**	53.7	*	66.2	43.4	43.4	<b>0.00006</b>	<b>0.010</b>	0.138	<b>87/88/117</b>

Table 4 - Continuation.

Ethyl 2-hydroxyhexanoate	0.4	0.2	*	<0.1 <sup>1</sup>	<0.1 <sup>1</sup>	*	0.8	0.4	**	0.00004	0.035	0.005	69/87
Diethyl succinate	832.8	618.7	**	537.9	502.6	*	638.9	525.8	***	0.014	0.039	0.173	101/129
Ethyl 6-hydroxyhexanoate	0.1	0.9	**	0.01	0.1	**	0.1	0.2	**	0.0012	0.006	0.00005	88/97/101
<b>Lactones (µg/L)</b>													
γ-octalactone	2.3	2.9	**	3.1	3.5	*	2.4	2.8	*	0.00001	0.00001	0.000001	85/100
γ-nonalactone	1.1	1.7	*	1.1	1.3	*	1.0	1.8	*	0.0002	0.00005	0.000007	85/99
γ-decalactone	0.7	0.7	ns	0.6	1.1	**	0.5	0.7	*	0.001	0.01	0.001	85/128
γ-dodecalactone	0.2	0.1	**	0.2	0.1	**	0.1	0.1	ns	0.02	0.01	0.001	85/100/128
<b>Alcohols (mg/L)</b>													
1-propanol	72.2	60.5	*	55.4	39.4	*	118.4	88.4	*	0.01	0.000001	0.00002	
2-methyl-1-propanol	16.1	12.6	*	25.3	18.7	*	18.3	13.6	*	0.00001	0.001	0.0001	
2-methyl-1-butanol	22.1	14.3	*	19.1	15.0	*	15.4	10.5	*	0.001	0.01	0.004	
3-methyl-1-butanol	157.8	107.4	**	107.3	88.4	**	135.8	106.7	**	0.0008	0.0001	0.0002	
1-Hexanol (µg/L)	1.4	2.2	**	0.1	0.9	**	0.6	1.3	**	0.00001	0.000001	0.0003	
Methionol (µg/L)	109.0	198.2	**	197.3	240.5	*	150.6	220.4	**	0.0005	0.0003	0.004	61/106

<sup>1</sup>Results are expressed as mean values (n = 3). For all compounds the coefficient of variation was < 5%.

<sup>2</sup>ANOVA was performed separately for samples from each grape variety to compare wines produced from musts settled for 30 and 12 h. No significant effect, ns (p > 0.05); \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.

<sup>3</sup>Multivariate test: results of the two-way analysis of variance. Significance of the effects of the two factors and of their interaction.

<sup>4</sup>Ions monitored in SIM detection for each compound.

<sup>5</sup>Value less than detection limit of the method.

Although derived directly from the corresponding higher alcohol through condensation with acetyl-CoA, the production of acetate esters differed significantly from that of alcohols in relation to the nitrogen content of the must. Studies on the formation of acetates of branched-chain alcohols have shown that the final concentration of these compounds is the result of the balance between of alcohol acyl transferase enzymes promoting acetate biosynthesis and esterase enzymes promoting their hydrolysis (VIANNA; EBELER, 2001). Yoshimoto et al. (2002) observed that increased nitrogen availability promotes the expression of the ATF1 and ATF2 genes, which encode the alcohol acyl transferase enzymes. This can partially explain the results observed in our study regarding the higher content of acetate esters (Table 4) in musts settled for 12 h, which consequently had higher nitrogen content, for all varieties (Table 3). Other authors also have found a direct relation between the formation of acetate and the must nitrogen concentration, particularly in the case of ethyl acetate, which is positively related to the nitrogen concentration in the medium (GUITART et al., 1999). The contents of isoamyl acetate and 2-phenylethyl acetate were also directly proportional to the must nitrogen content, as also observed by other authors (GARDÉN-CERDAN; ANCÍN-AZPILICUETA, 2008).

Four different lactones were identified (Table 4), although in low concentrations. However, it was possible to observe that the must clarification time influenced the concentration of these lactones in the wines, musts clarified for 12 h leading to wines with higher contents of  $\gamma$ -lactones. The formation of lactones can occur through chemical cyclization, although enzymatic formation is generally more frequent in nature. Glutamic acid is the presumed precursor for  $\gamma$ -lactones formation during alcoholic fermentation. This higher concentration of glutamic acid observed in the musts settled for 12 h (Table 3) may have influenced the greater concentration of  $\gamma$ -lactones present in the respective wines.

The concentration of higher alcohols showed significant variation depending on the insoluble solids content of the must, with lower concentrations in the wine produced from musts settled for 12 h, for all grape varieties (Table 4). The regulation of the formation of individual higher alcohols appears to vary due to the different relationships between the concentration of the respective amino acid precursor and total nitrogen concentration in the must (BELL; HENSCHKE, 2005).

Data in the literature show that musts with a high concentration yeast assimilable nitrogen, which can be mainly associated with the ammoniacal nitrogen content of the must, causes a reduction in alcohol production, since most of the ketoacids produced are directly converted into the corresponding amino acids (UGLIANO; HENSCHKE, 2009). This may explain the higher concentration found for wines produced from musts clarified for 30 h, which showed low levels of ammonium ions. Other research studies have also evidenced this inverse relationship between alcohol content and initial nitrogen concentration, where for musts with a high concentration of all amino acids fewer higher alcohols were synthesized (ANCÍN et al., 1995).

According to the literature, the synthesis of higher alcohols during the fermentation process can occur via two pathways, where the main route is through the Ehrlich process with the use of amino acids, or they can be produced anabolically from sugar (LÓPEZ-RITUERTO et al., 2010). In this study, a significant correlations ( $p < 0.05$ ) were observed between leucine and 3-methyl-1-butanol and between threonine and 1-propanol. These correlations were also observed by López-Rituerto et al. (2010) and Ancín et al. (1995) who investigated the transformation of several amino acids into their corresponding higher alcohols during the alcoholic fermentation. However, no correlation was observed between the concentration of 2-methyl-1-butanol and its precursor (isoleucine). Garde-Cerdán and Ancín-Azpilicueta (2008) also observed no correlation between the concentration of precursor and the synthesis of higher alcohols. The same authors suggest that the formation of some alcohols during the fermentation can proceed via a secondary route from sugar. No correlation was observed between the concentration of ammonium ions in the must and the content of higher alcohols in the wine.

In relation to 1-hexanol (C6-alcohols) and methionol (sulfur compounds) (Table 4), which contribute with herbaceous and potato odors, respectively, there was a significant reduction in the concentration in wines produced from musts with a lower content of insoluble solids (30 h settling). Ferreira et al. (1995) observed that the settling of Chardonnay must for different time intervals before alcoholic fermentation also induced a decrease in the hexanol concentration, probably due to the loss of the C6 precursors in the initial settling stages. From the sensory point of view, a decrease in the content of these compounds would be positive, because these families contribute aromas with nuances that are negative when they are present in high concentrations. Significant correlation ( $p < 0.05$ ) between methionine

content of the must and methionol concentration of the wine ( $R = 0.89$ ) was observed, since methionine is the direct precursor of methionol.

### 3.3 CHEMOMETRIC ANALYSIS

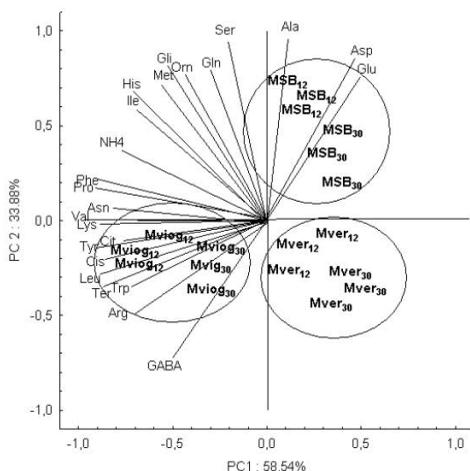
In order to assess the influence of the factors grape variety and clarification time, and their interaction (grape variety  $\times$  clarification time), on the composition of musts and wines, two-way analysis (ANOVA) was carried out. The multivariate results, considering the amino acid profile of the musts (data not shown) and the varietal (Table 3) and fermentative compounds (Table 4) of the wines, showed that for most of the compounds evaluated in this study both factors had a significant influence on their concentrations, as also their interaction. In order to confirm the significance of the factors evaluated and verify which variables are associated with a greater power of discrimination between samples, the Wilk's Lambda test was carried out. These tests revealed values of  $<1$  and  $p < 0.05$  for all cases: grape variety, clarification time and their interaction. However, it should be noted that the clarification time gave values more close to zero, indicating a strong power for discrimination among the musts and wines.

Based on the multivariate results, principal components analysis (PCA) was performed separately for the grapes and wines, considering that both the amino acid profile of the musts and the volatile profile of the wines were significant in the multivariate test. Before performing the PCA, the level of correlation (and its significance) between the variables studied was verified, with the aim determining which variables contribute to the two principal components. Through the correlation between the original variable and the principal components it was possible to observe that there are a considerable number of values higher than 0.500, which means correlations between the variables ranging from moderate to strong (MONTGOMERY, 2001). Thus, the variables that showed values of less than 0.500 in relation to the two principal components were excluded from the PCA.

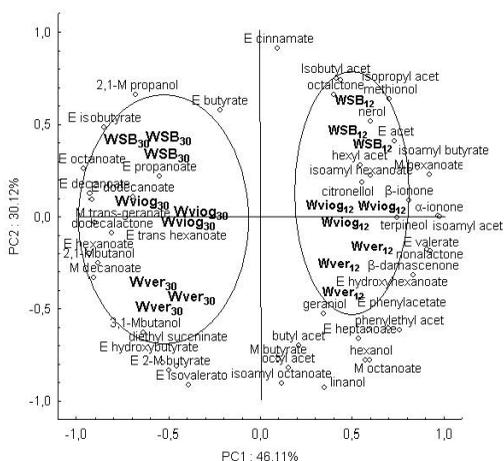
To establish which compounds provided the greatest ability to differentiate between the musts according to nitrogen content (aminoacid and ammonium), PCA was carried out (Figure 1A) and the two principal components explained 92.4% of the total variance (PC1  $\times$  PC2).

Figure 1 - Principal component analysis for the aminoacids and ammonium ions in the must (A) and volatile profile of the wines (B). Mver12 and Mver30, MSB12 and MSB30, Mviog12 and Mviog30: musts of Vermentino, Sauvignon Blanc, Viogner settled for 12 and 30 h, respectively. Wver12 and Wver30, WSB12 and WSB30, Wviog12 and Wviog30: wines of Vermentino, Sauvignon Blanc, Viogner made from musts settled for 12 and 30 h, respectively. Abbreviations for volatile compounds: E, ethyl; M, methyl; acet, acetate.

A)



B)



It was possible to observe that the musts were grouped according to the grape variety, in different quadrants of the plane, regardless of the settling time, with the predominance of the factor 'grape variety'. It was observed that the Sauvignon Blanc must was positively correlated with the amino acids alanine, aspartic acid and glutamic acid, whereas the Viogner must showed a strong correlation with arginine, leucine, tyrosine, cysteine, tryptophan and threonine. No correlation was observed for the Vermentino must. The amino acid profiles of grapes and wines are frequently used as a tool to identify and differentiate the grape varieties.

In Figure 1B, PCA was used to identify the varietal characteristics and yeast volatile compounds that best discriminated between the wines produced from musts settled for 12 and 30 h. The experimental wines were clearly separated by two functions (PC1 x PC2), which explained 76.3% of the total data variability. It can be noted that the wines were separated according to must settling time, considering PC1, which explained most of the variability of the data. Wines produced from musts settled for 12 h were positively located in relation to CP1, while wines produced from musts settled for 30 h were negatively located. Regarding the variables analyzed, there was a clear separation along the first component, where the varietal wine volatile compounds, such as terpenes and C13-norisoprenoids, were strongly correlated with the wines produced from musts with a higher nitrogen content (12 h of settling). Furthermore, these wines were also correlated with the aromatic esters and ester acetates. In relation to the wines produced from musts settled for 30 h, there was a strong correlation with ethyl fatty acid esters, mainly responsible for the fruity notes of white wines. In addition, higher alcohols and polar esters were also positively correlated with the wines produced from musts with lower solids content (30 h of settling).

#### 4. CONCLUSIONS

The results showed that the must clarification time, for the three white grape varieties evaluated, influenced significantly the nitrogen compounds content, especially the amino acids concentration, where the total amino acid content was higher in musts clarified for a shorter time. It can be assumed that the clarification time influenced the wine aroma complexity by affecting the amount of aroma precursors in the must. Based on the results obtained it appears that the yeast metabolism is stimulated to the greatest extent by the nitrogen content of the must,

since the aromatic profile of these experimental wines was clearly influenced by the must clarification time.

The multivariate tests demonstrated that both the grape variety and the clarification time influenced in the amino acid content of the must as well as the volatile profile of the wines. Principal component analysis showed that the musts were grouped according to the grape variety considering the aminoacid profile, predominantly the varietal characteristics. However, considering the volatile profile of the wines, a strong influence of the must clarification time on the separation of the wines was observed.

The results confirm that the management of the nitrogen content of the musts can be used as a tool to obtain wines with different flavors. Given the importance of the aminoacid content of the must in terms of the wine aroma, further studies are being conducted in our laboratory on the behavior of nitrogen compounds during alcoholic fermentation.

### **Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledge CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the financial support of a doctoral sandwich program, as well the ISVV (Institut des Sciences de la Vigne et du Vin) of the University of Bordeaux, France, and Epagri (Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina, Brazil) for technical support.



## CAPÍTULO 4

### **INFLUÊNCIA DO AGENTE CLARIFICANTE NA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E NITROGENADA DO MOSTO E O EFEITO NA COMPOSIÇÃO VOLÁTIL E NÃO VOLÁTIL DO VINHO**

Vívian Maria Burin<sup>1,2</sup>, Gilles de Revel<sup>2</sup>, Jean Pierre Rosier<sup>3</sup>, Marilde T. Bordignon-Luiz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos CAL/CCA, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, CEP 88034-001, Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>2</sup>Université de Bordeaux, ISVV, EA 4577, Unité de Recherche Oenologie, 33882 Villenave d'Ornon, France.

<sup>3</sup>Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina (EPAGRI-SC) Estação Experimental de Videira SC, 89560-000, Brasil.

## RESUMO

A clarificação do mosto é uma etapa pré-fermentativa que tem como principal função precipitar os compostos insolúveis presentes no meio. Agentes clarificantes são adicionados neste processo para aumentar a eficiência da clarificação. Dentre os compostos eliminados com a clarificação estão os compostos nitrogenados, importante nutriente para as leveduras durante a fermentação, os quais influenciam a composição final do vinho. O objetivo deste trabalho foi comparar o efeito dos agentes clarificantes no processo de clarificação do mosto em relação a composição química, principalmente nitrogenada e fenólica, e a influência da ação destes agentes na composição volátil e não volátil do vinho. Foram aplicados separadamente três agentes clarificantes, bentonite, enzima comercial e sílica gel, em mostos da uva Chardonnay. Os mostos e os vinhos foram avaliados quanto ao perfil de aminoácidos, polifenóis individuais por cromatografia líquida e nos vinhos também foi determinado o perfil volátil por cromatografia gasosa. Foi possível observar influência significativa dos agentes clarificantes na composição dos mostos e dos vinhos. O mosto clarificado com bentonite apresentou menor concentração de nitrogênio, enquanto que com a adição de enzima o efeito foi contrário. Durante o processo de fermentação foi observado haver diferença significativa na taxa de consumo de cada aminoácido em função do agente clarificante. Com relação a composição volátil dos vinhos, observou-se que o agente clarificante utilizado no mosto originou vinhos com características aromáticas distintas, o qual foi confirmado pela separação das amostras na análise de componentes principais. Assim, estes resultados apresentam importantes aplicações práticas para a seleção do agente clarificante em função do vinho que se quer elaborar.

**Palavras-chave:** agente clarificante; aminoácidos; polifenóis; composição volátil; vinho.

## 1. INTRODUÇÃO

Durante o processo de vinificação de uvas brancas (fermentação da fase líquida, sem contato com as cascas), a fração sólida desempenha importante papel no processo de fermentação. Esta fração é composta principalmente por substâncias sólidas, que são mantidas na parte líquida após a prensagem das uvas, contendo compostos nitrogenados, polissacarídeos e lipídeos (UGLIANO; HENSCHKE, 2009). Estes compostos são normalmente eliminados antes da fermentação alcoólica em diferentes concentrações durante o processo de clarificação do mosto, com o objetivo de aumentar a qualidade dos vinhos (RIBEREAU-GAYON; LAFON-LAFOURCADE; BERTRAND, 1975).

A clarificação do mosto pode ser realizada pelo uso de equipamentos como centrífugas ou somente pela sedimentação espontânea a baixa temperatura, a qual é uma etapa padrão para remover materiais sólidos presentes no mosto das uvas, principalmente das variedades brancas. Paralelo a esta etapa, pode-se adicionar no mosto determinadas substâncias, denominadas de agentes clarificantes, com a finalidade de aumentar a eficiência da clarificação. Muitos compostos são empregados com esta função, dos quais bentonite, sílicas e enzimas são muito utilizados pelos enólogos. Bentonite e sílica atuam através de um mecanismo de adsorção, precipitando as substâncias insolúveis do meio, como também compostos que estão naturalmente adsorvidas neste precipitado, como os polifenóis. As enzimas comerciais utilizadas para a clarificação apresentam atividade pectolítica que degradam as pectinas do mosto por hidrólise, o qual resulta em diminuição da viscosidade do mosto devido à decantação dos sólidos do meio (ARMADA; FERNÁNDEZ; FALQUÉ, 2010). A relação do uso destes compostos no mosto com o perfil aromático do vinho ainda é desconhecida.

O nitrogênio é um dos mais abundantes macronutrientes derivado do solo e desempenha papel importante tanto nas funções biológicas da videira como também para os microrganismos fermentativos. Na uva e no mosto o conteúdo de nitrogênio está presente na forma inorgânica (sais de amônio) e orgânica (proteínas, peptídeos e principalmente os aminoácidos). Os aminoácidos presentes no mosto, excluindo prolina, constituem o que é comumente referido como nitrogênio assimilável pelas leveduras (NAL). A prolina, é um predominante aminoácido secundário em muitas variedades de uvas, que não pode ser assimilada sob condições anaeróbias (BELL; HENSCHKE, 2005). A importância do conteúdo nitrogenado no processo de fermentação tem sido estudada

por pesquisadores, os quais demonstram que o tipo e a concentração de nitrogênio no mosto influenciam vários fatores relacionados ao processo de vinificação, como no crescimento das leveduras e na cinética de fermentação, influenciando consequentemente na qualidade do vinho, principalmente para os vinhos brancos (HENSCHKE; JIRANEK, 1993; VILANOVA et al., 2007).

Para um adequado desenvolvimento da fermentação alcoólica é requerido que os mostos apresentem determinada quantidade de compostos nitrogenados, o que possibilita uma rápida multiplicação das leveduras logo no início da fermentação, estimulando as leveduras a sintetizar os compostos presentes no vinho. Alterações no teor e na composição nitrogenada do mosto exercem impacto, tanto positivo como negativo, na composição volátil e não volátil do vinho (BELL; HENSCHKE, 2005). Insuficiente concentração de compostos nitrogenados no mosto resulta na diminuição da produção de biomassa e consequentemente em taxas fermentativas mais lentas podendo originar fermentações incompletas, e vinhos com menor concentração de aromas varietais, que muitas vezes são mascarados pelos produtos da fermentação. Por outro lado, mostos com alta concentração de nitrogênio podem originar vinhos com predomínio de aromas herbáceos e até o desenvolvimento de aromas indesejáveis denominados de *off flavours* (RIBEREAU-GAYON; LAFON-LAFOURCADE; BERTRAND, 1975; ANCÍN; AYESTARAN; GARRIDO, 1996; BELL; HENSCHKE, 2005).

Considerando que os aminoácidos são a principal fonte nitrogenada para as leveduras e que são precursores de muitos compostos voláteis, qualquer alteração na sua composição no mosto irá originar vinhos com diferentes características aromáticas. Álcoois superiores e ésteres são compostos voláteis originados durante o processo de fermentação que contribuem para o *bouquet* de fermentação do vinho. Estes compostos são originados principalmente como metabólitos das leveduras a partir do metabolismo dos açúcares e dos aminoácidos. Assim, a concentração de aminoácidos do mosto influencia num caminho decisivo, devido os principais grupos de compostos voláteis que formam este *bouquet* serem dependentes do tipo e da concentração de nitrogênio (ANCÍN et al., 1996; LOSADA et al., 2011).

Vários estudos na literatura foram realizados para correlacionar o efeito da suplementação de mostos com compostos nitrogenados com o perfil volátil do vinho (HERNÁNDEZ-ORTE et al., 2006; TORREA et al., 2011; VILANOVA et al., 2012). No entanto, a suplementação de

mostos com substâncias nitrogenadas pode acarretar alterações nas características varietais da uva, principalmente aquelas relacionadas com a composição aromática. Uma alternativa seria controlar o conteúdo natural de substâncias nitrogenadas do mosto pela adição de agentes clarificantes durante o processo de clarificação. Considerando que poucos estudos tem sido realizados para avaliar o efeito da adição de agentes clarificantes no mosto em relação à composição do vinho, o objetivo deste trabalho foi comparar o efeito de diferentes agentes clarificantes no mosto em relação a composição química, principalmente nitrogenada e fenólica, e a influência da ação destes agentes na composição volátil e não volátil do vinho.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 REAGENTES QUÍMICOS

Os compostos fenólicos individuais, os ácidos orgânicos, e os aminoácidos 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). Os compostos voláteis foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France), com exceção de butirato de metila, hexanoato de metila, butirato de isoamila, trans-hexanoato de etila (Alfa Aesar A Johnson Matthey Company, Bischheim, France), acetato de isoamila (VWR-Prolabo, Fontenay-sous-bois, France); lactato de etila (Fischer Scientific Labosi, Elancourt, France). Acetonitrila e metanol de grau HPLC foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany) e os outros reagentes apresentavam grau analítico. Foi utilizada água ultrapura (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).

### 2.2 AMOSTRAS

O experimento foi realizado com uvas Chardonnay (*Vitis vinifera*), safra 2011, provenientes da Região de Água Doce, Santa Catarina, Brasil. As uvas foram colhidas quando atingiram a maturação tecnológica (com valores médios de 20 °Brix, pH de 3,2 e acidez total de 7,5 g/L de ácido tartárico). Após a colheita as uvas foram desengaçadas e esmagadas para obtenção do mosto. O mosto da uva foi dividido em tanques de fermentação e então adicionados os agentes

clarificantes, sendo: Tanque 1: 7 mL/L de uma solução de bentonite 10% (m/v) (Major Benton, AEB Bioquímica Latino Americana S.A); Tanque 2: 1 mL/L de enzima pectolítica (Endoenzym® Active Liquid, AEB Bioquímica Latino Americana S.A); e Tanque 3: 2 mL/L de sílica gel (Baykisol 30: gelasil (1:1 v/v), AEB Bioquímica Latino Americana S.A). As concentrações adicionadas foram de acordo com o recomendado pelo fabricante. Os mostos foram clarificados através de sedimentação estática durante 24 h, a 4 °C. As amostras foram coletadas após o processo de clarificação e imediatamente congeladas para posterior análise.

Após o processo de clarificação, os mostos foram microvinificados. As microvinificações foram realizadas na EPAGRI (Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina), Videira, SC. A fermentação alcoólica foi realizada pela adição de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (20 g/100 Kg) (Fermol Blanc, Pascal Biotech) a 17 °C. Durante a fermentação alcoólica foram realizadas 5 coletas de amostras: 2, 4, 6, 10, e 15 dias. Os vinhos experimentais foram estabilizados em câmara fria por 30 dias e então adicionados de SO<sub>2</sub> livre (40 mg/L) (Noxitan, AEB), posteriormente foram realizadas a trasfega, filtração e o engarrafamento dos vinhos.

### 2.3 ANÁLISES DO MOSTO E VINHO

As análises físico-químicas realizadas foram pH (pH meter 220 MP Metler-Toledo), acidez total (g/L ácido tartárico), sólidos solúveis totais (°Brix), turbidez (Unidade Nefelométrica de Turbidez, NTU), densidade (g/L) acidez volátil (g/L ácido acético) e teor alcoólico (ebuliometria) (OIV, 2012).

Polifenóis totais (PT) foram determinados através do método de Folin-Ciocalteu por espectrofotometria UV-VIS (Hitachi U 2010, CA, USA) e os resultados foram expressos em mg/L de ácido gálico, através da construção de curva de calibração por adição de padrão (SINGLETON; ROSSI, 1965).

O teor de nitrogênio protéico (NP) foi determinado pelo método de Bradford, com o resultado expresso em mg/L de BSA (soro albumina bovina) através da construção de curva de calibração por adição de padrão (BRADFORD, 1976). O teor de nitrogênio total foi determinado através do método de Kjeldahl (AOAC, 2005).

## 2.4 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), Shimadzu (Kyoto, Japan), equipado com degaseificador (DGU-20A), bomba quaternária (LC-20AT), forno de coluna (CTO-20A), detector de arranjo de diodo (SPD-M20A) e injetor manual de 20  $\mu\text{L}$ , com software LC Solution. Foram utilizadas coluna (4,6 mm x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$  tamanho de partícula) e pré-coluna (4,6 mm x 12,5 mm) C18 (Shimadzu, Kyoto, Japan).

A identificação de cada composto foi realizada pela comparação do tempo de retenção e espectro dos picos cromatográficos UV-VIS das amostras com aqueles obtidos pela injeção dos padrões.

Para todas as análises cromatográficas foram determinados os seguintes parâmetros analíticos: linearidade, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), repetibilidade (desvio padrão relativo), exatidão (% recuperação) (Apêndice A). As curvas de calibração, a repetibilidade e a recuperação dos analitos foram realizadas no mosto e no vinho.

### *Ácidos orgânicos*

O método utilizado para análise dos ácidos orgânicos (ácidos tartárico, málico, cítrico e succínico) foi de acordo com Escobal com modificações (1998). A separação cromatográfica foi realizada através de eluição isocrática, e detecção em 212 nm. A fase móvel consistiu de água ultrapura (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. O tempo da corrida cromatográfica foi de 35 minutos.

As amostras, mosto e vinho, foram centrifugadas a 4.000 rpm (Jaetzi k24, Jena, Alemanha) durante 15 minutos, o sobrenadante foi diluído 10 vezes em água ultrapura (Milli-Q), filtrado em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore) e injetado no cromatógrafo (20  $\mu\text{L}$ ). O resultado foi expresso em g/L.

### *Compostos fenólicos individuais*

Os compostos fenólicos derivados do ácido hidroxibenzoico (ácidos gálico, protocateico, vanílico, siringico e elágico), derivados do ácido hidroxicinâmicos (ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico e caftarico), flavanóis (catequina e epicatequina), flavonóis (miricetina, quercetina, kampferol), trans-resveratrol e tirosol foram determinados de

acordo Burin et al. (2014). Para a análise dos mostos e dos vinhos foram realizadas extrações líquido-líquido conforme descrito por Burin et al. (2014).

### *Compostos nitrogenados*

Os compostos nitrogenados, aminoácidos e íon amônio, foram determinados através de método descrito no Capítulo 3.

A análise de glutatona reduzida (GSH) e glutatona oxidada (GSSG) foram realizadas de acordo com Marchand e de Revel (2010) com modificações. Para a análise foi utilizado um UHPLC (UltiMate<sup>®</sup> 3000 Rapid Separation LC) (DIONEX, Estados Unidos), equipado com duas bombas em séries, auto injetor com controle de temperatura, forno de coluna e detector de fluorescência. A coluna cromatográfica foi C18 (5 µm) (Purospher STAR<sup>®</sup>) associada com uma coluna de guarda (250 × 4,6 mm d.i) (Purospher STAR<sup>®</sup>) da Merck (Darmstadt, Germany). A fase móvel A consistiu de tampão fosfato de sódio (10 mM, pH = 8,6) adicionada de β-ciclodextrina (3 mM) e a fase B foi metanol. Os analitos foram eluídos em condição isocrática: 90% de solvente A e 10% de solvente B, durante 10 minutos. O fluxo do solvente foi 0,8 mL/min. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 467 and 525 nm, respectivamente. Para a quantificação da glutatona 100 µL de amostra de vinho (ou solução padrão) foi misturada com 900 µL de tampão fosfato (0,01 mM, pH 7,4) e então foi realizado uma reação de derivatização com o naftaleno 2,3-dicarboxialdeído (NDA): um volume de 4 µL da amostra diluída foi misturado com 5 µL de tampão borato e então adicionado 1 µL da solução de NDA (1 mg/mL), homogenizados e mantido por 4 minutos para a reação de derivatização e então injetado diretamente no cromatógrafo. A temperatura do injetor foi mantida em 20 °C.

Para determinar a concentração de glutatona total é necessário realizar uma reação de redução da glutatona oxidada (GSSG), e para isto foi utilizado como agente redutor o tris (2-carboxietil) fosfana (TCEP) (0,35 mM). A reação para a quebra da molécula de GSSG foi realizada conforme descrito: em 5 µL de TCEP foram adicionados 5 µL da amostra diluída, homogenizado, mantido por 2 minutos para ocorrer a reação, e então injetado no cromatógrafo. Com esta reação obtém-se o conteúdo total de glutatona no meio. A quantificação de GSH foi realizada através de curva de calibração pelo método de adição de padrão e o resultado expresso em mg/L. Para calcular glutatona oxidada

(GSSG) é utilizado a concentração de GSH menos a concentração de GSH reduzida dividido por 2.

O teor de nitrogênio assimilável pelas leveduras (NAL) presentes no mosto após o processo de clarificação e durante a fermentação alcoólica foi calculado pela soma da contribuição do nitrogênio de cada aminoácido primário livre com exceção de prolina (LEE; SCHREINER, 2010).

## 2.5 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Foram determinados por cromatografia gasosa (CG) 8 compostos varietais (5 terpenos e 3 C13-norisoprenóides), 36 ésteres, 4 alcoóis superiores e hexanol nas amostras de vinhos obtidos de mostos clarificados com os 3 agentes clarificantes (bentonite, enzima e sílica gel), de acordo com os métodos descritos no Capítulo 3. Além destes compostos, também foram determinados compostos voláteis sulfurados pesados e leves, conforme descritos abaixo.

Os compostos sulfurados pesados (3-(metiltio)propanoato de etila, 3-(metiltio)propil acetato, methionol, e 2-mercaptoetanol) foram determinados de acordo com método descrito por Beloqui e Bertrand (1995) com adaptações. Em 50 mL de vinho foram adicionados 50 µL de padrão interno (4-metilsulfanil fenol, 700 mg/L), 6 g de sulfato de amônio anidro e 300 µL de solução de ácido fosfórico (1:3, v/v). A extração da amostra foi realizada, duas vezes consecutivas, com 5 mL de diclorometano durante 5 min. Na fase orgânica foi adicionado sulfato de amônio e posteriormente foi concentrada sob fluxo de nitrogênio a um quarto do volume inicial. Foram injetados 2 µL do extrato em cromatógrafo gasoso (Agilent 6890, serie II) acoplado a espectrometria de massas (Agilent 5972), utilizando coluna tipo FFAP (50 m x 0,32 mm x 0,25 µm). O programa de temperatura foi: 40 °C durante 1 min, aumentando 3 °C/min até atingir 220 °C, mantido por 20 min. O gás de arraste utilizado foi Hélio (18,06 psi; 2 mL/min). Para a identificação dos analitos foi utilizado o método SCAM por comparação dos espectros de massas e a quantificação foi realizada no modo SIM (m/z). Os íons utilizados para quantificação e identificação estão descritos no Apêndice B.

Os compostos voláteis sulfurados leves, sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), 2-mercaptoetanol e dimetilsulfona (DMS) foram identificados e quantificados utilizando 100 mL de vinho adicionado de 100 µL de padrão interno (solução alcoólica de tiofeno, 300 mg/L) em frasco de vidro de 125 mL específico para extração em *headspace*. O frasco foi

fechado hermeticamente com tampa de silicone e com cápsula de metal, e mantido ao abrigo da luz durante 24 h à 22 °C. Após este tempo, foi retirado 1 mL da fase gasosa com uma seringa e imediatamente injetado no CG. Para a análise utilizou-se cromatógrafo gasoso acoplado a detector de fotometria de chama (FPD) (Agilent 5890). A coluna cromatográfica foi HP 5 (30 m x 5 mm x 0,53 mm) (SGE, Courtaboeuf, França). A temperatura do forno foi mantida a 32 °C por 1 minuto e programado para aumentar 2 °C/min até atingir 80 °C, e após aumentar 10 °C/min até 180 °C. O gás de arraste foi hidrogênio 5,0 (1,5 mL/min). A taxa de fluxo da chama foi de 65 mL/min e uma mistura de nitrogênio/oxigênio (80/20) a 80 mL/min foi utilizada. A temperatura do injetor e do detector foram 70 e 150 °C, respectivamente.

A identificação dos compostos foi realizada por comparação com o tempo de retenção dos padrões analíticos e/ou pelo espectro de massas (Biblioteca NIST). Específicas massas (m/z) para identificação e quantificação de cada analito estão descritos no Apêndice B. Todos os métodos utilizados foram desenvolvidos e validados no laboratório do *Institut des Sciences de la Vigne et du Vin* (ISVV), Universidade de Bordeaux 2, França. De acordo com o desempenho analítico dos métodos por cromatografia gasosa (ICH, 1994) todos os compostos apresentaram boa linearidade ( $R^2 > 0.97$ ), repetibilidade (desvio padrão relativo < 5%) e exatidão (recuperação dos analitos > 80%). A performance analítica dos métodos foram realizadas utilizando uma amostra de vinho branco.

## 2.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante dos mostos e vinhos foi avaliada através do método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico) de acordo com o proposto por Re et al. (1999). O radical ABTS $\cdot$  foi adicionado nas amostras de vinho e realizada leitura espectrofotométrica em 754 nm no tempo inicial (tempo zero) e após 6 minutos de reação. Os resultados foram expressos em mM de Trolox por litro.

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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 componentes principais (ACP) e análise de

correlação. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como valor médio.

### 3. RESULTADO E DISCUSSÃO

#### 3.1 PARÂMETROS CLÁSSICOS DO MOSTO E VINHO

A Tabela 1 apresenta as análises clássicas dos mostos e vinhos, e pode-se observar que o processo fermentativo ocorreu de forma correta, independente do agente clarificante utilizado.

Tabela 1- Parâmetros físico-químicos e teor de ácidos orgânicos dos mostos clarificados com diferentes agentes clarificantes e dos respectivos vinhos.

	Mosto			Vinho		
	bentonite	enzima	silica gel	bentonite	enzima	silica gel
Turbidez (NTU)	175a	195b	180c	---	---	---
pH	3,2a	3,2a	3,2a	3,2a	3,0a	3,1a
AT	6,7a	6,6a	6,7a	7,5a	7,5a	7,5a
°Brix	18,0a	18,2a	18,1a	---	---	---
Densidade (g/L)	---	---	---	0,999	0,995	0,996
AV	---	---	---	0,13a	0,15b	0,15a
Álcool (%)	---	---	---	12,0a	11,0b	11,5c
Ácido tartárico (g/L)	7,4b	5,4c	5,0d	3,3a	2,8b	2,5c
Ácido málico (g/L)	3,1a	2,4b	2,1c	2,8a	2,3b	2,0c
Ácido succínico (g/L)	0,5b	0,4a	0,3c	0,2a	0,2a	0,1b
Ácido láctico (g/L)	<0,02 <sup>1</sup>					

Resultados são expressos como valor médio ( $n = 3$ ); nd: não detectado.

Análise de variância (ANOVA) foi realizada separadamente para mosto e vinho. Letras diferentes em mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

AT: acidez total (g/L de ácido tartárico).

AV: acidez volátil (g/L de ácido acético).

<sup>1</sup>Valor menor que limite de detecção do método.

Dentre os parâmetros físico-químicos avaliados no mosto, somente a turbidez foi influenciada significativamente pelos diferentes agentes clarificantes, em que o mosto clarificado com enzima apresentou maior turbidez. Todos os vinhos apresentaram valores de pH similares e menor que 3,6, considerado como valor máximo para uma correta fermentação (AMERINE; OUGH, 1976). A acidez volátil e o teor alcoólico dos vinhos foram influenciados pelo agente clarificante. O mosto clarificado com bentonite que apresentou o menor teor de sólidos (175 NTU) originou um vinho com maior teor alcoólico. Esta mesma relação foi encontrada por Karagiannis e Lanaridis (2002) entre o conteúdo de sólidos do mosto de variedades de uvas brancas e a acidez volátil e teor alcoólico do vinho. Metabolicamente, pode-se associar que o menor teor de sólidos do meio diminui a disponibilidade de nitrogênio podendo ocasionar uma mudança na utilização de carbono dentro da célula, resultando em concentrações maiores de etanol (KUTYNA et al., 2010). A densidade obtida no final do processo de fermentação (quinze dias) foi similar para os mostos clarificados com enzima e sílica gel, no entanto, aqueles clarificados com bentonite apresentaram densidade maior neste mesmo período. Este fato indica que o mosto adicionado de bentonite apresentou menor taxa de fermentação, o que pode estar relacionada à menor turbidez.

O teor de ácidos orgânicos, que é um importante indicador da qualidade do vinho, foi influenciado significativamente pelo tipo de agente clarificante utilizado. Dados da literatura ainda são discordantes em relação a clarificação do mosto e do conteúdo de nitrogênio disponível com a concentração dos ácidos orgânicos no vinho. Enquanto que alguns pesquisadores demonstram que mostos com maior teor de nitrogênio tendem a originar vinhos com maior concentração de ácidos orgânicos (UGLIANO et al., 2007; TORREA et al., 2011), outros pesquisadores destacam que não há relação entre a concentração nitrogenada do mosto e o conteúdo de ácidos orgânicos no vinho (VILANOVA et al., 2012). No presente trabalho foi observado que mostos clarificados com bentonite, que apresentaram menor concentração de nitrogênio total (Tabela 2), originaram vinhos com maior concentração de ácidos orgânicos, com destaque para os ácidos tartárico e málico. Considerando que a concentração de nitrogênio interfere no balanço dos ácidos orgânicos, também pode influenciar no *flavour* do vinho (SOWALSKY; NOBLE, 1998). O ácido láctico não foi detectado em nenhuma amostra, o que está de acordo pois este é originado durante a fermentação malolática pela metabolização do ácido

málico, e as amostras de vinho avaliadas não foram submetidos a este processo.

### 3.2 INFLUÊNCIA DOS AGENTES CLARIFICANTES NO CONTEÚDO NITROGENADO DOS MOSTOS

De maneira geral, todos os mostos independente do agente clarificante adicionado durante o processo de clarificação apresentaram a arginina como o aminoácido majoritário, seguido de alanina para o mosto clarificado com bentonite e de prolina para os mostos clarificados com enzima e sílica gel (Tabela 2). Os aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina) foram detectados em baixas concentrações em todos os mostos, no entanto, estes valores estão de acordo com dados da literatura para mosto de uvas brancas (HENSCHKE; JIRANEK, 1993; VALDÉS et al., 2011). A alta concentração de arginina observada também foi evidenciada por outros pesquisadores que determinaram o perfil de aminoácidos de variedades de uvas brancas *Vitis vinifera*, como as uvas Cayetana (VALDÉS et al., 2011), o qual é positivo para o bom desenvolvimento da fermentação alcoólica, pois este aminoácido é uma importante fonte de nitrogênio assimilável pelas leveduras (BELL; HENSCHKE, 2005).

Dentre os 22 aminoácidos determinados nos mostos (Tabela 2) somente glicina e isoleucina não apresentaram diferenças significativas na concentração ( $p > 0,05$ ) em função do agente clarificante utilizado. De maneira geral, o mosto em que foi realizado o processo de clarificação utilizando a enzima apresentou a maior concentração de aminoácidos, o que pode ser observado pela soma total dos aminoácidos (1662 mg/L). O contrário foi observado para o mosto adicionado de bentonite, que apresentou menor concentração da maioria dos aminoácidos. De acordo com a literatura, a bentonite apresenta alta especificidade na precipitação de substâncias nitrogenadas presentes nos mostos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a; LAMBRI et al., 2010). Esta redução na concentração de aminoácidos foi fortemente evidenciada para o ácido glutâmico e o triptofano que apresentaram uma redução da concentração superior a 50% quando comparado aos mostos clarificados com enzima e sílica gel.

Tabela 2 - Composição nitrogenada de mostos após o processo de clarificação com diferentes agentes clarificantes e percentual de consumo dos compostos nitrogenados durante a fermentação alcoólica.

(mg/L)	Agentes clarificantes				% consumo <sup>2</sup> (k)				Valor-p <sup>1</sup>
	Bentonite	Enzima	Sílica gel	Valor-p <sup>1</sup>	Bentonite	Enzima	Sílica gel	Valor-p <sup>1</sup>	
Ácido aspártico	15,6±1,1a	18,3±0,5b	16,9±0,7ab	*	96,1 (0,54)	95,2 (0,55)	95,7 (0,58)	*	
Ácido glutâmico	7,7±1,3a	30,4±1,5b	24,9±2,1c	***	80,3 (0,27)	75,8 (0,23)	78,2 (0,29)	**	
Asparagina	21,5±0,3ab	22,4±0,7b	20,7±1,0a	*	86,9 (0,34)	84,1 (0,34)	85,9 (0,35)	**	
Serina	76,9±2,4a	65,0±1,9b	71,1±0,5c	***	90,9 (0,40)	94,7 (0,48)	92,2 (0,43)	***	
Glutamina	69,2±1,3a	81,2±2,2b	78,3±1,0c	**	96,4 (0,55)	89,4 (0,53)	88,1 (0,53)	***	
Histidina	18,3±0,6a	17,1±1,3b	11,6±2,0c	***	96,9 (0,58)	98,3 (0,59)	98,9 (0,60)	**	
Glicina	8,6±1,0	8,4±0,8	8,2±0,5	ns	35,4 (0,08)	40,3 (0,12)	44,1 (0,11)	***	
Citrulina	16,5±1,3a	29,1±2,1b	14,3±1,5a	***	94,6 (0,65)	96,4 (0,62)	93,8 (0,60)	**	
Treonina	45,1±2,7a	58,2±1,0b	53,3±1,6c	***	76,5 (0,09)	80,1 (0,11)	79,8 (0,12)	***	
Alanina	119,4±2,1a	170,3±3,6b	125,1±1,8c	***	95,5 (0,21)	94,9 (0,22)	94,2 (0,21)	**	
Arginina	500,4±3,1a	899,0±5,7b	768,8±4,2c	***	90,9 (0,16)	86,9 (0,15)	89,3 (0,16)	***	
Prolina	98,8±1,9a	149,6±2,3b	178,9±3,1c	***	-101(-0,1)	-100(-0,1)	- 100 (-0,1)	ns	
Tirosina	5,3±1,3a	8,1±0,9b	7,2±1,0c	**	93,7 (0,19)	97,2 (0,23)	95,9 (0,22)	***	
Valina	22,4±1,0a	28,9±1,2b	26,1±0,4c	*	98,8 (0,74)	99,1 (0,80)	99,2 (0,80)	*	
Metionina	2,0±0,5a	3,9±0,2b	3,2±0,6c	**	84,9 (0,31)	99,5 (0,57)	99,3 (0,56)	***	
Cisteína	4,1±1,3a	2,7±0,7b	1,2±1,0c	***	98,8 (0,29)	99,5 (0,30)	99,2 (0,31)	*	
Isoleucina	4,3±0,3	4,5±0,6	4,2±0,5	ns	94,7 (0,49)	95,2 (0,51)	96,4 (0,52)	**	
Triptofano	12,7±2,1a	39,1±1,9b	26,8±3,1c	***	94,9 (0,20)	85,3 (0,15)	90,8 (0,17)	***	

Tabela 2 – *Continuação*

Leucina	15,7±0,8a	9,1±1,4b	12,2±1,1c	***	97,3 (0,60)	99,1 (0,72)	98,2 (0,70)	**
Fenilalanina	7,8±0,9a	8,5±1,2a	10,3±1,0b	**	96,7 (0,60)	98,3 (0,68)	97,5 (0,65)	**
Omitina	4,7±1,1a	5,1±1,1a	6,8±1,1b	**	75,7 (0,16)	77,3 (0,25)	75,9 (0,23)	**
Lisina	3,5±0,5a	4,4±0,5b	3,3±0,2a	**	30,8 (0,04)	24,5 (0,04)	28,9 (0,05)	***
GABA	<0,06 <sup>3</sup>	<0,06 <sup>3</sup>	<0,06 <sup>3</sup>					
Soma	1082a	1662b	1476c	***				
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	103,9	104,8	103,7	ns	70,2 (0,33)	68,5(0,30)	66,9 (0,29)	**

Resultados são expressos como valores médios ± desvio padrão ( $n = 3$ ). nd, não detectado.

<sup>1</sup>Análise de variância (ANOVA) foi realizada para cada aminoácido para comparar o efeito do agente clarificante. Ns, não significante ( $p > 0,05$ ); \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Letras diferentes representam diferença significativa entre as amostras (Teste de Tukey).

<sup>2</sup>Porcentagem de consumo (%) de cada aminoácido considerando a concentração inicial e a concentração mínima de cada aminoácido durante a fermentação alcoólica.

k, constante da velocidade da reação do consumo dos aminoácidos individuais (dias<sup>-1</sup>).

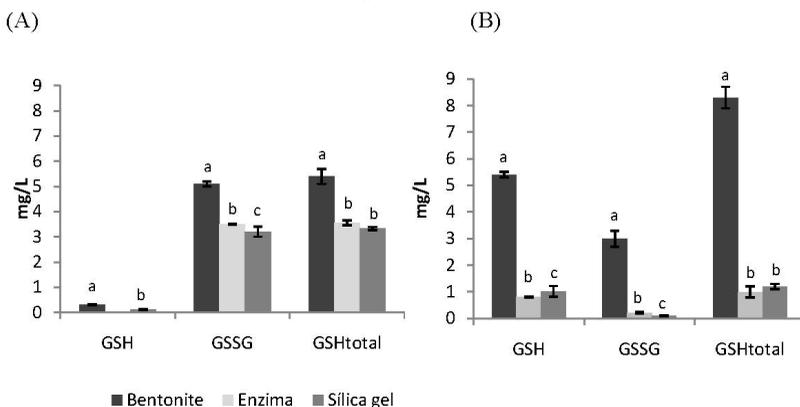
NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, íon amônio

<sup>3</sup>Valor menor que o limite de detecção do método.

O íon amônio, que também é utilizado como fonte de nitrogênio para as leveduras durante o processo de fermentação, não apresentou alteração significativa na sua concentração em função dos diferentes agentes adicionados no mosto (Tabela 2). Esta falta de significância pode ser atribuída ao fato que a maior parte do íon amônio pode estar solúvel no mosto, e uma pequena porção somente presente no meio das substâncias insolúveis que são precipitadas e eliminadas pelos agentes clarificantes (AYESTARAN et al., 1995). Dados da literatura demonstram que o tempo de clarificação pode alterar a concentração do íon amônio (LOSADA et al., 2011), enquanto outro trabalho demonstrou que diferentes processos de clarificação, como centrifugação e vácuo não modificaram sua concentração no mosto (ANCÍN et al., 1996). No entanto, existem poucos dados na literatura que comparam o efeito da adição de diferentes agentes clarificantes na concentração do íon amônio no mosto.

Outros compostos nitrogenados avaliados nos mostos após a clarificação foram a glutatona nas formas reduzidas (GSH), oxidadas (GSSG) e total (GSH total) (Figura 1). Todos os mostos apresentaram maior concentração da glutatona oxidada que da forma reduzida (Figura 1A). Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na concentração de GSH, GSSG nos mostos clarificados com os diferentes agentes clarificantes. O mosto que apresentou maior concentração de glutatona foi clarificado com bentonite, o qual também apresentou maior concentração de cisteína (Tabela 2), que é um dos aminoácidos presentes na molécula de glutatona. Em relação aos vinhos, observou-se que a concentração de GSH foi majoritária (Figura 1B). O vinho obtido da clarificação com bentonite também apresentou maior concentração de glutatona quando comparado as outras amostras de vinhos. Estes resultados indicaram que ao contrário da maioria dos aminoácidos, a concentração de glutatona não é afetada pela clarificação com bentonite. A maior concentração de glutatona no vinho, quando comparado ao mosto, está de acordo com pesquisadores que afirmam que há um aumento na concentração durante o processo de fermentação (PARK; BOULTON; NOBLE 2000; LAVIGNE et al., 2007; FRACASSETI, 2010).

Figura1- Glutaciona reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e glutaciona total (GSH total) em mostos clarificados com agentes clarificantes bentonite, enzima e sílica gel (A) e nos respectivos vinhos (B).



Resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ).

Letras diferentes em mesmo composto indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os agentes clarificantes.

### 3.2.1 Consumo dos compostos nitrogenados durante a fermentação alcoólica e cinética de fermentação

Durante a transformação do mosto em vinho através do processo de fermentação alcoólica ocorrem diferentes alterações na composição química, devido às reações de síntese e degradação dos compostos presentes no meio pelas leveduras. O tempo do processo de fermentação dos mostos adicionados dos 3 agentes clarificantes, foi de 15 dias.

Neste estudo foi observado para todos os mostos, independente do agente clarificante utilizado, um comportamento similar da evolução dos compostos nitrogenados durante a fermentação alcoólica (dados não mostrados). O mínimo de concentração obtido para cada aminoácido foi no sexto dia de fermentação (primeira metade do processo), com exceção de treonina, arginina, alanina, cisteína e triptofano, que foram consumidos até o décimo dia, mantendo esta mesma concentração até o final da fermentação alcoólica (15 dias). Todos os aminoácidos que apresentaram concentração mínima no sexto dia da fermentação, foram marcados por um aumento da concentração até o final do processo de fermentação (15 dias). No entanto, a concentração dos aminoácidos no vinho foi menor que a encontrada para o mosto, com exceção de glicina e ornitina que apresentaram aumento de 90 e 50%, respectivamente. O

ion amônio apresentou um mínimo de concentração no quarto dia, e esta concentração permaneceu estável até o final da fermentação. A concentração de prolina foi marcada por uma diminuição até o quarto dia da fermentação, e após este período a concentração de prolina aumentou até o décimo quinto dia da fermentação. A concentração de prolina no vinho foi aproximadamente 100% maior que sua concentração no mosto. Este comportamento da prolina é observado por outros pesquisadores que atribuem o aumento da concentração em consequência da utilização pelas leveduras de outros aminoácidos, como por exemplo a arginina, que é assimilada e após é excretada para o meio como prolina e uréia. Além disto, proteínas e peptídeos que apresentam prolina na sua estrutura quando parcialmente degradados liberam prolina para o meio (ANCÍN et al., 1996; VALDES et al., 2011). Similares resultados foram encontrados por Moreno-Arribas, Pueyo e Polo (1996) e Valdés et al. (2011) que afirmam ocorrer simultaneamente formação e degradação dos compostos nitrogenados durante o processo de fermentação.

De acordo com a literatura, o aumento no conteúdo de aminoácidos durante a fase final da fermentação pode ser atribuído à maior concentração de etanol no meio. O álcool que é produzido gradativamente durante a fermentação aumenta a permeabilidade da membrana plasmática, que conduz a um aumento na excreção de aminoácidos presentes no citoplasma por meio de um processo passivo (BIDAN; FEUILLAT; MOULIN, 1986). Além disto, este aumento da concentração de aminoácidos livre pode ser em função da ocorrência de autólise celular das leveduras no final do processo fermentativo, liberando os aminoácidos para o vinho (ARNOLD, 1981). Uma vez que não resta praticamente nenhum açúcar residual no final da fermentação, os compostos nitrogenados não são reabsorvidos e permanecem no vinho influenciando na qualidade final. Comportamento similar da evolução dos aminoácidos durante a fermentação alcoólica também foi observado por Valdés et al. (2011) ao avaliar dois processos de clarificação do mosto de uvas Cayetana e por Hernández-Orte et al. (2006) ao avaliar o consumo de aminoácidos de mostos da variedade Merlot adicionados de compostos nitrogenados antes da fermentação.

A evolução dos aminoácidos durante a fermentação pode ser atribuída ao fato que estes compostos são rapidamente acumulados pelas leveduras nos primeiros dias da fermentação durante o qual armazenam os aminoácidos necessários para a síntese de proteínas e para o seu desenvolvimento, e o que não é utilizado é armazenado nos vacúolos

celulares e durante a autólise celular é extravasado para o meio (BISSON, 1991).

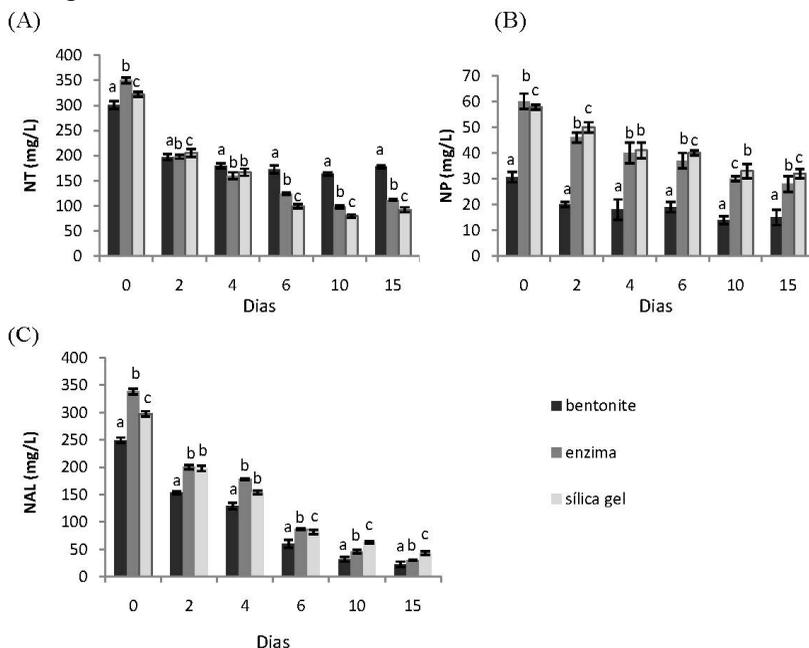
A Tabela 2 demonstra a porcentagem de consumo de cada aminoácido durante a fermentação alcoólica nos mostos clarificados com bentonite, enzima e sílica gel. Para o cálculo da porcentagem de consumo de cada composto foi utilizado a concentração inicial do aminoácido no mosto e a mínima concentração observada durante o processo de fermentação. A partir destes resultados, a análise de variância (ANOVA) demonstrou que existe diferença significativa entre a porcentagem de consumo dos aminoácidos ao longo da fermentação entre os mostos clarificados com bentonite, enzima e sílica gel. Para a maioria dos aminoácidos o consumo foi maior que 80% ao longo da fermentação em todos os mostos. Os aminoácidos mais consumidos durante a fermentação, valina, leucina, fenilalanina e cisteína, não apresentaram maior concentração no mosto inicial. Esta falta de correlação observada, pode ser justificada por diferentes fatores que inferem no consumo dos aminoácidos, como a composição físico-química do meio, a maturação da uva e o processo de clarificação (ANCÍN-AZPILICUETA et al., 2005; BELL; HENSCHKE, 2005). Nenhum aminoácido foi 100% consumido durante a fermentação alcoólica. O íon amônio foi consumido aproximadamente 70% da concentração inicial. Esta forma nitrogenada foi rapidamente consumida no início da fermentação alcoólica (4 dias) e após este período, sua concentração foi mantida praticamente constante. Este padrão de evolução também foi observado por outros pesquisadores que afirmam que o íon amônio é a primeira fonte de nitrogênio inorgânico a ser utilizada pelas leveduras durante a fase de crescimento (fase inicial da fermentação) (ANCÍN; AYESTARAN; GARRIDO, 1996).

Ao considerar a concentração inicial no mosto e a concentração mínima de cada aminoácido foi possível observar para todos os mostos, independente do agente clarificante utilizado, que o consumo dos compostos nitrogenados ao longo da fermentação apresentou uma cinética de primeira ordem, onde a velocidade da reação foi dependente exclusivamente do consumo dos compostos nitrogenados. A cinética de primeira ordem foi confirmada pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ), obtido pelo gráfico considerando a concentração inicial e a concentração mínima, que foi maior que 0,98 para todos os aminoácidos e de 0,95 para o íon amônio, o qual confirma o ajuste do modelo proposto para a ordem da reação estabelecida. Valdés et al. (2011) também observaram reação de primeira ordem para o consumo dos aminoácidos durante a fermentação alcoólica para a variedade Cayetana. Foi determinado a

constante de velocidade ( $k$ ) para o consumo de cada aminoácidos e do íon amônio usando a seguinte Equação (1):  $\ln(C_m / C_i) = -k.t$ , onde  $C_m$  = concentração mínima durante a fermentação;  $C_i$  = concentração inicial no mosto;  $t$  = tempo (dias);  $k$  = constante cinética. Com relação ao valor  $k$  (Tabela 2), pode-se observar que os aminoácidos valina, citrulina, leucina e fenilalanina apresentaram maior valor de  $k$  em todos os mostos ( $k > 0,60$ ), indicando maior velocidade de consumo destes aminoácidos. A clarificação com bentonite também resultou em menores concentrações iniciais de aminoácidos no mosto, o que está de acordo com a literatura, que demonstram que concentrações iniciais menores de aminoácidos no mosto podem induzir a uma taxa mais lenta de fermentação e conseqüentemente a uma menor velocidade de consumo dos compostos nitrogenados (BELL; HENSCHKEN, 2005; HERNÁNDEZ-ORTE et al., 2006). O mosto clarificado com bentonite apresentou maior valor de  $k$  para o íon amônio demonstrando que em mostos com menor conteúdo de aminoácidos as leveduras utilizaram primeiro o íon amônio como fonte nitrogenada.

A Figura 2 demonstra a evolução do conteúdo total de nitrogênio durante a fermentação alcoólica. Foi possível observar que o teor de nitrogênio total (NT) nos mostos (Figura 2 A) foi menor naquele clarificado com bentonite, o que está de acordo com a menor concentração total de aminoácido encontrado neste mosto (Tabela 2). Durante o processo de fermentação observou-se um comportamento diferenciado entre os mostos, onde aquele clarificado com bentonite, após o quarto dia de fermentação, não apresentou variação significativa ( $p < 0,05$ ) na concentração de NT. No entanto, as outras amostras apresentaram diminuição na concentração de NT até o décimo dia da fermentação.

Figura 2 - Alterações no conteúdo de nitrogênio total (NT) (A), nitrogênio protéico (NP) (B) e nitrogênio assimilável pelas leveduras (NAL) (C) durante o processo de fermentação alcoólica dos mostos clarificados com os diferentes agentes clarificantes: bentonite, enzima, sílica gel.



Resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ).

Letras diferentes em mesmo tempo indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os agentes clarificantes.

Os mostos clarificados com bentonite também apresentaram a menor concentração de nitrogênio protéico (Figura 2 B) (30,7 mg/L) evidenciando uma redução aproximada de 50% em comparação com os outros agentes clarificantes utilizados no experimento. Esta diminuição está de acordo com a literatura, que a bentonite apresenta alta especificidade em precipitar as proteínas presentes no mosto (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b). Ao longo do processo fermentativo observou-se diminuição do teor de NP durante os 10 primeiros dias, sendo mantido praticamente inalterado até o final da fermentação. Ayestarán et al. (1995) também observaram redução de nitrogênio protéico ao longo da fermentação alcoólica. Os mesmos

autores sugerem que esta redução pode ser devido a precipitação no mosto, uma vez que as proteínas não são assimiladas pelas leveduras durante o processo de fermentação.

Com relação ao teor de nitrogênio assimilável pelas leveduras (NAL) (Figura 2 C) observou-se que os mostos após o processo de clarificação ( $t = 0$ ) apresentaram valores de 249,2 mg N/L, 335,3 mg N/L e 297,4 mg N/L para os mostos clarificados com bentonite, enzima e sílica gel, respectivamente. De acordo com a literatura, os mostos devem apresentar a concentração de NAL variando entre 150 e 400 mg N/L para o adequado desenvolvimento da fermentação alcoólica, sendo que mostos com valores abaixo de 150 mg N/L podem não completar todo o processo de fermentação (BELY; SABLAYROLLES; BARRE, 1990; BLATEYRON; ORTIZ-JULIEN; SABLAYROLLES, 2003). O conteúdo de NAL foi consumido até o final da fermentação alcoólica independente do agente clarificante, sendo que a maior taxa de consumo de NAL (%) foi no sexto dia de fermentação. Os valores de NAL encontrados no final da fermentação indicam que independente do agente clarificante utilizado, todos os mostos completaram a fermentação alcoólica, sendo que os valores finais são superiores aos encontrados por Valdés et al. (2011) para uvas brancas da variedade Cayetana e por Ayestáran et al. (1995) para uvas Chardonnay.

A fim de verificar a contribuição (%) aminoácidos para o teor total de NAL consumido durante o processo de fermentação (tempos: 2, 4, 6, 10 e 15 dias) (Figura 2C), foi calculado a contribuição de cada aminoácido de acordo com a Equação (2):  $CAN = 100 \times (C_{i\ NAL} - C_{m\ NAL}) / C_{NAL}$ , onde: CAN = contribuição de cada aminoácido no consumo total de nitrogênio assimilável;  $C_{i\ NAL}$  = concentração inicial do aminoácido presente no nitrogênio assimilável pela levedura durante a fermentação;  $C_{m\ NAL}$  = concentração mínima do aminoácido presente no nitrogênio assimilável pela levedura durante a fermentação;  $C_{NAL}$  = consumo total de nitrogênio assimilável durante a fermentação. Dentre todos os aminoácidos a arginina foi o que mais contribuiu para o NAL durante a fermentação, com valores de 49,6% para o mosto clarificado com bentonite, 60,1% para mosto clarificado com enzima e 58,3% para mosto clarificado com sílica gel, seguida de alanina com 25,6%, 30,2% e 28,6%, respectivamente. A contribuição dos outros aminoácidos variou de 0,05 a 5% para todos os mostos. Com base nestes resultados, observa-se uma relação entre a concentração inicial do aminoácido no mosto e sua contribuição para o nitrogênio assimilável pelas leveduras, onde arginina e alanina foram os aminoácidos majoritários nos mostos. Valdés et al. (2011) também observaram ser a arginina o aminoácido

que mais contribuiu durante o consumo de nitrogênio assimilável na fermentação. Os mesmo autores também afirmam haver uma relação entre a concentração inicial de aminoácido no mosto e sua participação como fonte de nitrogênio assimilável.

### 3.3 INFLUÊNCIA DOS AGENTES CLARIFICANTES NA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS MOSTOS E VINHOS

Os compostos fenólicos são importantes constituintes das uvas e dos vinhos. Estão relacionados com as propriedades sensoriais, incluindo cor, sabor e sensações gustativas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a) como também contribuem para a atividade antioxidante, sendo responsáveis por diversos efeitos benéficos à saúde (GRIS et al., 2011). A concentração dos polifenóis no vinho depende de vários fatores relacionados ao local de produção, à variedade de uva, como também das técnicas de vinificação empregadas. Uma das etapas essenciais na vinificação de variedades de uvas brancas é a clarificação do mosto que reflete na qualidade final do vinho. Neste trabalho, ao utilizar diferentes agentes clarificantes no mosto, foi possível observar diferença significativa na concentração dos compostos fenólicos nos mostos após a clarificação (Tabela 3), com exceção do ácido vanílico, mirecitina, tirosol e campferol. De maneira geral, o mosto clarificado com enzima apresentou maior concentração de polifenóis individuais, o que também foi evidenciado pelo maior conteúdo de PT. As enzimas atuam durante a clarificação hidrolisando as substâncias pécticas, que muitas vezes estão na forma de colóides no mosto e assim podem ser liberado para o meio os compostos que estavam complexados a estes colóides, como por exemplo os polifenóis, o que aumenta sua concentração no meio. O mosto clarificado com bentonite apresentou menor concentração da maioria dos polifenóis, principalmente dos ácidos caftárico, cafeico e da catequina. A menor concentração destes compostos pode ser benéfica para a qualidade final do vinho, pois são substratos para as enzimas polifenoloxidasas e participam das reações de oxidação que ocorrem nos vinhos brancos, levando ao escurecimento dos mesmos (CHEYNIER; SILVA, 1991; GÓMEZ-MÍGUEZ et al., 2007).

Tabela 3-Concentração dos compostos fenólicos individuais (mg/L) polifenol total (mg/L) e atividade antioxidante (mM) dos mostos obtidos após o processo de clarificação com diferentes agentes clarificantes e dos respectivos vinhos.

	Mosto				Vinho			
	Bentonite	Enzima	Silica gel	Valor-p <sup>1</sup>	Bentonite	Enzima	Silica gel	valor-p <sup>1</sup>
<i>Ácidos Hidroxi benzóicos</i>								
Gálico	0,19(0,03)a	0,60(0,09)b	0,49(0,12)c	***	1,43(0,82)a	4,10(0,67)b	5,45(0,19)c	***
Protocateico	0,28(0,02)a	0,29(0,04)b	0,27(0,02)a	*	4,18(1,03)a	4,98(0,87)b	4,05(0,92)a	*
Vanílico	4,79(0,11)	4,7(0,09)	4,59(0,02)	ns	2,54(0,42)a	3,25(0,35)b	3,75(0,22)b	*
Siringico	1,28(0,22)a	0,95(0,30)b	0,77(0,14)b	**	0,38(0,08)	0,34(0,14)	0,37(0,34)	ns
Elágico	<0,02 <sup>4</sup>	0,51(0,09)a	0,44(0,11)b	**	<0,02 <sup>4</sup>	0,11(0,04)a	0,19(0,03)b	*
<i>Ácidos hidroxicimâmicos</i>								
Caféico	11,72(1,49)a	22,8(2,09)b	28,56(0,87)c	***	9,53(1,26)a	18,5(0,65)b	20,5(1,08)c	***
Cafeico	1,14(0,19)a	4,1(1,06)b	2,85(0,74)c	***	4,18(0,54)a	7,52(0,72)b	5,25(0,18)a	*
p-cumárico	1,35(0,61)a	0,12(0,05)b	0,21(0,07)b	***	1,44(0,09)a	0,32(0,14)b	0,45(0,09)b	**
Ferulico	0,08(0,02)b	0,14(0,07)a	0,05(0,01)b	**	0,30(0,10)a	0,91(0,09)b	0,65(0,21)c	*
<i>Flavanois</i>								
Catequina	7,53(0,38)a	9,7(0,83)b	8,44(0,52)c	***	2,89(0,62)a	9,25(1,10)b	5,35(1,01)c	**
Epicatequina	0,56(0,17)a	0,88(0,22)b	0,06(0,02)c	**	0,75(0,06)a	1,05(0,14)b	0,25(0,08)c	**
<i>Flavonois</i>								
Mirricetina	1,19(0,23)	1,18(0,18)	1,18(0,20)	ns	<0,04 <sup>4</sup>	<0,04 <sup>4</sup>	<0,04 <sup>4</sup>	
Quercetina	1,87(0,41)a	2,13(0,66)b	1,86(0,39)a	*	2,27(0,72)a	3,8(0,16)b	3,5(0,21)b	*
Campferol	0,12(0,07)	0,11(0,10)	0,11(0,11)	ns	0,13(0,05)	0,12(0,06)	0,13(0,05)	ns

Tabela 3 -Continuação

<i>Estilbenos</i>									
<i>trans</i> -resveratrol	0,84(0,08)a	1,80(0,22)b	1,01(0,19)c	**	1,05(0,36)a	2,20(0,42)b	1,09(0,52)a	**	
Tirosol	0,81(0,15)	0,85(0,20)	0,88(0,17)	ns	0,52(0,12)a	2,41(0,98)b	1,25(0,32)c	**	
PT <sup>2</sup>	536,1(8,0)a	585,9(5,2)b	530,2(9,0)c	***	415,2(0,2)a	501,2(0,0)b	459,3(0,2)c	*	
Atividade antioxidante <sup>3</sup>	0,51(0,12)a	0,55(0,23)b	0,49(0,09)c	*	1,22(0,18)a	1,58(0,31)b	1,33(0,07)c	**	

Resultados são expressos como valores médios (desvio padrão) ( $n = 3$ ).

<sup>1</sup>Análise de variância (ANOVA) foi realizada para cada aminoácido para comparar o efeito do agente clarificante no mosto e vinho separadamente. Ns, não significante ( $p > 0,05$ ); \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Letras diferentes em mesma linha representam diferença significativa entre os mostos e entre os vinhos (Teste de Tukey).

<sup>2</sup>PT, polifenóis totais, mg/L de ácido gálico.

<sup>3</sup>expresso em mM TEAC/L.

<sup>4</sup>Valor menor que limite de detecção do método.

Pesquisadores avaliaram o efeito da clarificação do mosto de variedades de uvas brancas Neuburger, Gruner Veltliner, Welschrieslinge Palava, adicionado de diferentes concentrações de gelatina quanto ao teor de polifenóis totais, ácido gálico, catequina, ácido caftárico e de *trans*-resveratrol glicosilado. Os autores observaram que somente para PT houve uma relação inversa entre a concentração e a dose do agente clarificante utilizada (BALÍK et al., 2008). Escassos estudos são apresentados na literatura sobre a influência dos tratamentos pré-fermentativos, como a clarificação do mosto, no perfil de compostos fenólicos. No entanto, a maior parte das pesquisas que são realizadas com agentes clarificantes, avaliam o efeito destes agentes quando adicionados diretamente no vinho após a fermentação alcoólica. Pesquisadores demonstraram que a adição de agentes clarificantes em vinhos brancos e tintos no final da fermentação alcoólica induz a uma diminuição no conteúdo fenólico e na coloração dos vinhos tintos (SIMS; EASTRIDGE; BATES, 1995; CASTILLO-SÁNCHEZ et al., 2008). Villaño et al. (2006) demonstraram que diferentes processos de clarificação do vinho não afetaram significativamente a composição fenólica dos vinhos brancos da variedade Palomino.

Durante o processo de fermentação foram determinados os polifenóis individuais e totais nos tempos 2, 4, 6, 10 e 15 dias de fermentação alcoólica (dados não mostrados), e então observado que não houve uma relação clara entre o teor inicial no mosto clarificado com o seu respectivo vinho (Tabela 3). No entanto, a análise de variância (ANOVA) demonstrou que o agente clarificante influenciou significativamente no conteúdo fenólico final dos vinhos. A maioria dos compostos fenólicos tiveram sua concentração aumentada ao longo da fermentação alcoólica, com exceção dos ácidos caftárico, vanílico, siríngico e elágico (dados não mostrados). De maneira geral, a concentração de polifenóis em todos os vinhos é semelhante a concentração encontra em estudos realizados com uva e vinho de variedades brancas provenientes de países como Grécia e Espanha (MAKRIS et al., 2003; HERNANZ et al., 2009).

Com base nos dados da literatura, o método ABTS fornece os maiores valores de atividade antioxidante de mostos e vinhos, quando comparado a outros métodos como DPPH e FRAP (GÜLÇİN, 2010; XU et al., 2010; BURIN et al., 2011). Assim, justificou-se a escolha do método ABTS no presente estudo. A Tabela 3 demonstra que a atividade antioxidante dos mostos e vinhos apresentou diferenças significativas em relação ao agente clarificante utilizado, e os maiores valores foram observados no mosto clarificado com enzima, que

também apresentou maior concentração de compostos fenólicos. A capacidade antioxidante dos vinhos foi semelhante aos valores encontrados por Quirós, Lage-Yusty e López-Hernández (2009) para vinhos brancos comerciais procedentes de diferentes regiões da Espanha (0,7 - 2,01 mM). Análise de correlação ( $p < 0,05$ ) foi realizada separadamente para os mostos e os vinhos. Nos mostos a atividade antioxidante foi fortemente correlacionada com o ácido gálico ( $R = 0,82$ ), enquanto que nos vinhos foi observado fortes correlações com a catequina ( $R = 0,99$ ) e com o *trans*-resveratrol ( $R = 0,96$ ). Balík et al. (2008) avaliaram mostos de uvas brancas clarificados com diferentes concentrações de gelatina, não observaram correlações significativas entre a atividade antioxidante e a concentração de compostos fenólicos obtidos após a etapa de clarificação do mosto.

### 3.4 INFLUÊNCIA DOS AGENTES CLARIFICANTES E DA COMPOSIÇÃO NITROGENADA DO MOSTO NO PERFIL VOLÁTIL DO VINHO

O processo de fermentação pelas leveduras gera uma variedade de metabólitos voláteis que contribuem para o perfil sensorial dos vinhos. Dentre estes compostos pode-se destacar aqueles responsáveis pelos aromas varietais do vinho, como terpenos e norisoprenóides, e os aromas de fermentação como ésteres, alcoóis superiores, e compostos sulfurados voláteis. O acúmulo destes compostos no vinho depende da disponibilidade de nutrientes no mosto para as leveduras (composição nitrogenada). Pesquisas demonstram que controlar a concentração dos compostos nitrogenados do mosto influencia na elaboração de vinhos com características aromáticas distintas (ARMADA; FALQUÉ, 2007; TORREA et al., 2011; VILANOVA, et al., 2012).

#### *Terpenos e norisoprenóides*

Terpenos e norisoprenóides são compostos voláteis responsáveis pelos aromas varietais do vinho. Apresentam como precursores compostos conjugados (glicoconjugados) presentes naturalmente na uva, e durante o processo de fermentação as leveduras interagem com estes compostos conjugados induzindo a um aumento na concentração destes metabólitos voláteis no vinho (CARRAU et al., 2005). Pesquisas também demonstram que o conteúdo nitrogenado do mosto pode influenciar no metabolismo destes aromas primários pelas leveduras durante o processo de fermentação, (BELL; HENSCHKE, 2005;

CARRAU et al., 2005) no entanto, ainda não se conhece como ocorre esta interferência.

Neste estudo observou-se que a concentração de terpenos e C13-norisoprenóides nos vinhos foi influenciada significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo agente clarificante utilizado no mosto (Tabela 4). O vinho obtido a partir do mosto clarificado com a enzima apresentou maior concentração de terpenos individuais (Tabela 4). O linalol, responsável por conferir aromas florais ao vinho, foi o terpeno majoritário em todos os vinhos analisados, seguido do  $\beta$ -citronelol. O geraniol não foi detectado nos vinhos obtidos a partir do mosto clarificado com bentonite e sílica gel, como também neste último não foram detectados nerol e  $\alpha$ -terpineol. Esta diminuição na concentração destes aromas varietais nos vinhos elaborados com mostos clarificados com bentonite e sílica gel, pode ser devido a uma direta interação entre o agente clarificante e os compostos glicosilados presentes no mosto, como também por ação indireta, devido a uma interação entre estes compostos e as substâncias insolúveis que são adsorvidas pelo agente clarificante. Moio et al. (2004) observaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na concentração de terpenos livres e conjugados (glicosilados) de acordo com o agente clarificante utilizado no mosto de uva branca da variedade Falanghina. Os autores observaram que o mosto clarificado com enzima apresentou maior concentração de todos os terpenos conjugados e assim maior concentração de terpenos livres no vinho.

Tabela 4 - Concentração de compostos voláteis primários, terpenos e C13-norisoprenóides, nos vinhos obtidos de mostos clarificados com 3 agentes clarificantes.

µg/L	Vinhos			Valor-p <sup>1</sup>
	Bentonite	Enzima	Sílica gel	
<i>Terpenos</i>				
Geraniol	<0,11 <sup>2</sup>	15,23(1,65)	<0,11 <sup>2</sup>	***
Linalol	10,71(1,25)a	32,80(2,18)b	28,24(1,40)c	***
α-Terpineol	0,76(0,31)a	1,95(0,50)b	<0,15 <sup>2</sup>	***
β-Citronelol	5,54(1,29)a	15,90(2,83)b	6,13(1,49)a	**
Nerol	0,67(0,58)a	1,51(0,81)b	<0,10 <sup>2</sup>	***
<i>C13-norisoprenóides</i>				
α-Ionona	0,02(0,01)a	0,12(0,06)b	0,04(0,02)c	**
β-Ionona	0,04(0,01)a	0,10(0,03)b	0,06(0,01)c	**
β-Damascenona	0,38(0,05)a	0,68(0,06)b	0,49(0,04)c	***

Resultados são expressos como valores médios (desvio padrão) ( $n = 3$ ).

<sup>1</sup>Análise de variância (ANOVA) foi realizada para cada aminoácido para comparar o efeito do agente clarificante no mosto e vinho separadamente.

ns, não significativa ( $p > 0,05$ ); \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Letras diferentes em mesma linha representam diferença significativa entre os vinhos obtidos de mostos clarificados com os diferente agente clarificante (Teste de Tukey).

<sup>2</sup>Valor menor que o limite de detecção do método.

Outra possível relação entre o teor de terpenos no vinho e o tratamento realizado no mosto é com o teor de nitrogênio assimilável pelas leveduras (NAL), em que algumas cepas de leveduras sintetizam maior concentração de monoterpenos influenciadas pelo conteúdo de nitrogênio do mosto (CARRAU et al., 2005). Assim, no presente trabalho, observou-se que o mosto clarificado com enzima que apresentou maior NAL (Figura 2B) também apresentou maior concentração de todos terpenos livres. Estes resultados foram confirmados pela análise de correlação de Pearson (R), que demonstrou forte correlação significativa ( $p < 0,05$ ) entre o conteúdo de terpenos do vinho e o teor de NAL dos mostos ( $R > 0,86$ ), com exceção do nerol que a correlação embora positiva ( $R = 0,54$ ) não foi significativa.

Considerando que a maior parte dos C13-norisoprenóides também estão presentes na uva e mosto na forma conjugada (glicoconjugados) (JACKSON, 2008), foi observada influência significativa ( $p < 0,05$ ) dos agentes clarificantes na concentração destes compostos no vinho (Tabela 4). O mosto clarificado com enzima

originou vinhos com maior concentração de norisoprenóides, sendo aproximadamente 50% maior que bentonite e sílica gel. A  $\beta$ -damascenona, responsável por conferir aromas frutados e/ou florais aos vinhos, foi o composto majoritário em todas as amostras de vinho independente do agente clarificante utilizado. A mesma relação observada para os terpenos também foi evidenciada para os C13-norisoprenóides, onde o mosto com maior NAL originou vinhos com maior concentração desta classe de compostos. Análise de correlação (R) demonstrou forte correlação significativa ( $p < 0,05$ ) entre o conteúdo nitrogenado e os C13-norisoprenóides, com destaque para NAL ( $R > 0,96$ ), NT ( $R > 0,98$ ) e a soma total de aminoácidos ( $R > 0,85$ ). Considerando que são escassos os dados na literatura em relação a síntese e metabolização dos norisoprenóides durante o processo de fermentação alcoólica, pode-se atribuir a menor concentração destes compostos em vinhos originados a partir de mostos clarificados com bentonite e sílica gel devido a maior afinidade destes agentes clarificantes aos precursores glicosilados, os quais são precipitados junto com as substâncias sólidas do mosto durante a clarificação.

Pesquisadores avaliaram o efeito da clarificação do mosto de uvas brancas da variedade Albariño e Loureira com dois agentes clarificantes, bentonite e sílica gel, em relação à concentração dos aromas varietais do vinho e observaram que de maneira geral, o uso de bentonite provocou significativa diminuição do conteúdo de terpenos e C13-norisoprenóides (ARMADA; FALQUÉ, 2007). Os mesmos autores concluíram que o uso de bentonite influenciou negativamente na extração dos compostos e assim diminuiu as características aromáticas varietais dos vinhos, refletindo na perda da tipicidade.

#### *Alcoóis Superiores e Hexanol*

A concentração dos alcoóis superiores determinados nos vinhos foi influenciada significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo agente clarificante utilizado no mosto (Tabela 5).

Tabela 5 - Concentração de alcoóis superiores e hexanol nos vinhos obtidos de mostos clarificados com 3 agentes clarificantes: bentonite, enzima e sílica gel.

	Vinhos			Valor- <i>p</i> <sup>1</sup>
	Bentonite	Enzima	Sílica gel	
<i>Alcoóis superiores</i> (mg/L)				
1-Propanol	39,32(3,01)a	49,15(2,12)b	33,80(1,11)c	**
2-Metil-1-propanol	16,29(0,92)a	21,71(0,53)b	17,83(1,63)a	**
2-Metil-1-butanol	64,43(4,39)a	37,55(3,21)b	45,31(2,80)c	***
3-Metil-1-butanol	188,28(4,81)a	159,61(1,02)b	152,1(2,08)c	**
Hexanol (µg/L)	9,56(1,50)a	16,62(1,04)b	19,97(1,22)c	**

Resultados são expressos como valores médios (desvio padrão) ( $n = 3$ ).

<sup>1</sup>Análise de variância (ANOVA) foi realizada para cada aminoácido para comparar o efeito do agente clarificante no mosto e vinho separadamente.

Ns, não significativa ( $p > 0,05$ ); \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Letras diferentes em mesma linha representam diferença significativa entre os vinhos obtidos de mostos clarificados com diferente agente clarificante (Teste de Tukey).

Observou-se que o vinho proveniente de mosto clarificado com bentonite apresentou maior concentração do 2-metil-1-butanol (alcoól amílico) (64,3 mg/L) e do 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico) (188,2 mg/L), enquanto que os vinhos obtidos do mosto clarificado com enzima apresentaram maior concentração 1-propanol (49,1 mg/L) e do 2-metil 1-propanol (21,7 mg/L). Considerando que os alcoóis superiores podem ser formados pelas leveduras a partir da descarboxilação ou redução dos aminoácidos do mosto pela via de Ehrlich (LÓPEZ-RITUERTO et al., 2010), foi observado neste estudo uma relação direta entre a concentração dos alcoóis superiores e seu precursor. Assim, comparando o mosto clarificado com bentonite e o respectivo vinho observa-se que este mosto apresentou maior concentração de leucina (Tabela 2) que é precursor do álcool isoamílico, enquanto para o mosto clarificado com enzima foi observado maior concentração de valina e treonina, que são precursores 2-metil 1-propanol e 1-propanol, respectivamente. Análise de correlação (R) do dados demonstrou uma forte e significativa correlação entre o álcool superior e seu precursor, onde leucina e álcool isoamílico apresentaram  $R = 0,98$ , valina e 1-metil 1-propanol com  $R = 0,95$  e treonina e 1-propanol apresentaram  $R = 0,99$ . Não foi observado correlação significativa entre o precursor isoleucina e o 2 metil 1-butanol, uma vez que este aminoácido não apresentou diferença significativa entre os mostos (Tabela 2). Estas

correlações entre o álcool superior e o aminoácido precursor tem sido confirmada por outros autores que investigaram a metabolização de diversos aminoácidos até o seu correspondente álcool durante a fermentação alcoólica (ANCÍN et al., 1995; LÓPEZ-RITUERTO et al., 2010). Não foi encontrada correlação significativa entre o teor de nitrogênio assimilável pelas leveduras e nitrogênio amônio do mosto com a concentração de alcoóis superiores do vinho.

Com relação ao hexanol (álcool-C6), um composto de origem pré-fermentativa que confere ao vinho aromas herbáceos, foi observado que o mosto clarificado com bentonite originou vinhos com menor concentração deste composto. Esta redução foi de aproximadamente 50% quando comparado ao vinho obtido de mosto clarificado com sílica gel, o qual apresentou a maior concentração de hexanol (Tabela 5). Armada e Falqué (2007) também observaram uma diminuição no teor de hexanol e de outros compostos-C6 (3-hexanol, *trans*-3-hexanol e *cis*-3-hexanol) em vinho branco elaborado a partir de mosto clarificados com bentonite. Isto pode estar relacionado com a bentonite causar maior limpidez do mosto absorvendo componentes aromáticos que estão ligados as glicoproteínas e que então são eliminados juntos com as substâncias insolúveis do meio (VOILLEY et al., 1990).

### Ésteres

A Tabela 6 apresenta o perfil dos ésteres identificados nos vinhos (36 ésteres divididos em diferentes classes). Foi possível observar que a clarificação do mosto com os diferentes agentes influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) na concentração dos ésteres do vinho. Análise de variância (ANOVA) demonstrou que somente a concentração do 2 metil butirato de etila não foi influenciada significativamente pelos agentes clarificantes utilizados no mosto.

Tabela 6 - Perfil de ésteres dos vinho obtidos de mostos clarificados com 3 agentes clarificantes.

µg/L	Vinhos			Valor-p <sup>1</sup>
	Bentonite	Enzima	Silica gel	
<b>Ésteres polares</b>				
Lactato de etila	3831,74(10,12)a	4120,20(9,34)b	4582,05(10,12)c	***
Succinato de dietila	637,76(15,44)a	590,80(7,62)b	567,81(4,59)c	**
3-Hidroxibutirato de etila	116,10(2,75)a	110,78(3,09)b	101,63(5,41)c	*
<b>Ésteres etílicos superiores</b>				
Propionato de etila	244,97(12,05)a	209,99(5,61)b	176,91(4,11)c	***
Butirato de etila	229,21(5,98)a	200,95(5,09)b	224,44(4,10)a	**
Octanoato de etila	674,93(11,01)a	773,42(10,32)b	719,38(9,02)c	**
Decanoato de etila	243,77(8,52)a	198,17(5,43)b	161,50(7,05)c	***
Dodecanoato de etila	22,23(2,10)a	14,35(1,95)b	13,47(1,53)b	*
Hexanoato de etila	636,41(12,77)a	548,81(10,09)b	506,74(9,12)c	**
<b>Ésteres de acetatos de alcoóis superiores</b>				
Acetato de isobutila	3,77(1,10)a	4,86(0,53)b	3,70(0,60)a	**
Acetato de octila	<0,004 <sup>2</sup>	4,33(1,32)a	2,39(0,71)b	***
Acetato de hexila	9,69(0,80)a	13,32(0,55)b	10,06(0,25)a	**
Acetato de butila	14,75(1,61)a	20,49(1,09)b	13,38(0,50)a	**
Acetato de isoamila	304,92(15,10)a	523,06(10,05)b	425,07(9,15)c	***
Acetato feniletila	59,39(1,59)a	76,11(1,62)b	63,06(1,01)c	**
<b>Ésteres aromáticos</b>				
Fenilacetato de etila	11,48(0,54)a	10,32(0,60)b	10,44(0,28)b	*
Dihidrocínamate de etila	6,41(0,67)a	5,17(0,35)b	6,21(0,51)a	*
Cínamate de etila	33,38(1,56)a	29,18(1,10)b	28,06(0,70)b	*
<b>Ésteres metílicos</b>				
Octanoato de metila	0,83(0,10)a	1,29(0,12)b	1,03(0,25)c	**
Decanoato de metila	0,20(0,11)a	0,35(0,05)b	0,27(0,05)c	*
Hexanoato de metila	0,86(0,13)a	1,15(0,19)b	0,96(0,04)c	*
Butirato de metila	<0,23 <sup>2</sup>	0,46(0,09)a	0,34(0,07)b	**
<b>Ésteres isoamílicos secundários</b>				
Hexanoato de isoamila	0,59(0,10)a	2,51(0,18)b	1,24(0,11)c	***
Octanoato de isoamila	1,03(0,21)a	2,71(0,08)b	2,50(0,09)c	**
Butirato de isoamila	0,22(0,05)a	0,40(0,06)b	0,30(0,08)c	*

Tabela 6 -*Continuação*

<b>Ésteres etílicos de ácidos com número ímpar de carbono</b>				
Valerato de etila	5,65(0,56)a	6,24(0,42)b	7,92(0,38)c	***
Heptanoato de etila	0,82(0,04)a	0,95(0,08)b	1,01(0,02)c	**
Nonanoato de etila	0,68(0,10)a	0,86(0,05)b	1,78(0,09)c	***
<b>Ésteres etílicos de ácidos alifáticos ramificados</b>				
Isobutirato de etila	66,05(2,01)a	55,57(1,90)b	49,83(0,88)c	**
Isovalerato de etila	24,51(2,44)a	10,53(1,12)b	15,49(1,15)c	***
2-metilbutirato de etila	11,99(0,55)	11,45(0,51)	11,71(0,70)	ns
<b>Ésteres diversos</b>				
<i>trans</i> -2-Hexanoato de etila	1,96(0,23)a	1,41(0,11)b	0,94(0,31)c	***
Hexanoato de isobutila	<0,001 <sup>2</sup>	2,08(0,12)a	1,27(0,07)b	***
<i>trans</i> -Geranato de metila	0,20(0,05)a	0,25(0,06)b	0,12(0,06)c	**
3-hidróxi hexanoato de etila	0,74(0,15)	<0,007 <sup>2</sup>	<0,007 <sup>2</sup>	*
6-hidróxi hexanoato de etila	<0,02 <sup>2</sup>	0,71(0,03)a	0,15(0,02)b	***

Resultados são expressos como valores médios (desvio padrão) (n = 3).

<sup>1</sup>Análise de variância (ANOVA) foi realizada para cada aminoácido para comparar o efeito do agente clarificante no mosto e vinho separadamente.

Ns, não significante (p>0,05); \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

Letras diferentes em mesma linha representam diferença significativa entre os vinhos obtidos de mostos clarificados com diferente agente clarificante (Teste de Tukey).

<sup>2</sup>Valor menor que o limite de detecção do método.

Considerando que os ésteres são originados pelas leveduras durante o processo de fermentação, pode-se atribuir que as alterações observadas nas concentrações dos ésteres em função do agente clarificante utilizado no mosto, são diretamente relacionadas ao conteúdo nitrogenado do mosto obtido após a clarificação, principalmente da concentração de nitrogênio assimilada pelas leveduras (NAL). No entanto, os resultados da literatura são divergentes ao considerar a influencia do teor de NAL na concentração dos ésteres dos vinhos, enquanto pesquisadores afirmam haver uma relação inversa outros consideram haver uma correlação direta, conforme citado a seguir.

Pesquisadores têm afirmado que, de maneira geral, os ésteres tendem a aumentar sua concentração nos vinhos quando elaborados com

mostos com maior teor de nitrogênio assimilável (NAL) (VILANOVA et al., 2007; UGLIANO et al., 2010). No presente trabalho, esta relação entre NAL e os ésteres somente foi observada ao considerar a concentração total dos ésteres identificados nos vinhos, em que o vinho elaborado com mosto clarificado com bentonite, que apresentou menor NAL (Figura 2C), também apresentou menor concentração total de ésteres, e o mosto clarificado com enzima com maior teor de NAL originou vinhos com maior concentração total de ésteres.

No entanto, ao avaliar os ésteres individualmente ou considerando cada classe separadamente, não foi possível observar o mesmo comportamento. Neste estudo, os vinhos originados de mostos clarificados com bentonite apresentaram alta concentração dos ésteres majoritário do vinho, como os ésteres polares e os ésteres etílicos (Tabela 6), com exceção do lactato de etila e octanoato de etila que foram detectados em maior concentração nos vinhos elaborados com mostos clarificados com sílica gel e enzima, respectivamente. O mesmo resultado foi evidenciado por Armada e Falqué (2007) que demonstraram haver diferença na concentração dos ésteres nos vinhos elaborados com mostos clarificados com bentonite e sílica gel, onde o uso da bentonite no mostos resultou em vinhos com menor concentração de ésteres. Os mesmos autores afirmam que esta diferença pode ser atribuída ao teor de nitrogênio do mosto decorrente da clarificação. Losada et al. (2011) realizaram diferentes tratamentos pré-fermentativos no mosto da variedade Godello, e observaram que o vinho com maior concentração de ésteres foi aquele que apresentou menor nitrogênio assimilável pelas leveduras no mosto inicial.

Contrário ao observado para os ésteres etílicos e polares, os acetatos de alcoóis superiores (Tabela 6) apresentaram maior concentração no vinho elaborado com mosto clarificado com enzima, que apresentou maior teor de NAL. Pesquisadores também observaram um aumento na concentração dos acetatos de alcoóis superiores em mostos Chardonnay em função do conteúdo de NAL do mosto (TORREA et al., 2011). Yoshimoto et al. (2001) afirmam que quanto maior o teor de NAL disponível favorece a expressão de determinados genes das leveduras (ATF1 e ATF2) responsáveis pela atividade das enzimas aciltransferases. Estas enzimas participam da síntese dos acetatos a partir da condensação do correspondente álcool superior com acetil-CoA. Dentre estes compostos, o acetato de isoamila, que confere aromas de banana ao vinho, apresentou alta correlação com o teor de NAL do mosto ( $R = 0,96$ ). Esta relação entre a concentração nitrogenada do mosto e do acetato de isoamila no vinho também foi

evidenciada em pesquisas com uvas Mazuelo (GARDÉN-CERDAN; ANCÍN-AZPILICUETA, 2008). No presente trabalho também foi observado que o vinho com maior concentração de acetato de isoamila (originado de mosto clarificado com enzima) apresentou menor concentração do álcool superior correspondente (3-metil 1-butanol) (Tabela 5).

Com relação as outras classes dos ésteres identificados nos vinhos, observou-se que para os ésteres metílicos, isoamílicos e ésteres etílicos de número ímpar de carbono (Tabela 6), o uso de bentonite no mosto resultou em menor concentração de todos estes compostos no vinho, sendo que o butirato de metila não foi detectado. No entanto, ésteres aromáticos e ésteres etílicos de ácidos alifáticos ramificados (Tabela 6) apresentaram maior concentração nos vinhos elaborados a partir do mosto clarificado com bentonite.

Considerando que os dados da literatura são divergentes quanto a formação dos ésteres durante o processo de fermentação em relação a composição nitrogenada do mosto, é observado que o conteúdo de nitrogênio disponível para as leveduras, a composição de aminoácidos do mosto e a taxa de consumo de cada aminoácido também podem influenciar no acúmulo dos ésteres voláteis durante a fermentação (GUITART et al. 1999; VILANOVA et al. 2007; CARRAU et al., 2008).

Foi realizado análise de correlação de Pearson (R) ( $p < 0,05$ ) entre o conteúdo nitrogenado do mosto (aminoácidos individuais e total, nitrogênio assimilável pelas leveduras e nitrogênio total) e todos os ésteres quantificados nos vinhos. De maneira geral, os aminoácidos que apresentaram maior correlação com a maioria dos ésteres foram na ordem decrescente: arginina, alanina, valina, leucina, fenilalanina e glutamina, todos com  $R > 0,90$ . Cabe ressaltar que arginina e alanina foram os aminoácidos que mais contribuíram (%) para o nitrogênio assimilável pelas leveduras durante a fermentação. Além disto, todos os aminoácidos destacados, apresentaram as maiores taxas de consumo (%) pelas leveduras durante o processo de fermentação alcoólica (Tabela 2).

Ao analisar cada classe dos ésteres separadamente, observou-se forte correlação com os aminoácidos. Para a classe dos ésteres etílicos a leucina apresentou forte correlação ( $R > 0,89$ ), com exceção do octanoato de etila que foi correlacionado com valina, alanina e arginina ( $R > 0,97$ ). Os acetatos de alcoóis superiores foram correlacionados com alanina, arginina, valina, citrulina e tirosina ( $R > 0,96$ ) com exceção do acetato de isobutila com forte correlação com leucina ( $R = 0,99$ ) e acetato de isoamila com fenilalanina, glicina e ornitina ( $R > 0,92$ ). Os ésteres

aromáticos apresentaram forte correlação com leucina ( $R>0,95$ ) e os ésteres metílicos além da arginina, alanina e leucina também apresentaram forte correlação com ácido aspártico e ácido glutâmico ( $R>0,93$ ). Os ésteres isoamílicos secundários foram correlacionados com alanina, valina, glutamina ácido aspártico e ácido glutâmico ( $R>0,92$ ). As outras classes de ésteres estudadas neste trabalho, apresentaram correlações principalmente com alanina, fenilalanina, glicina e leucina ( $R>0,89$ ).

### *Compostos sulfurados voláteis*

Os compostos sulfurados voláteis presentes no vinho são principalmente originados durante a fermentação alcoólica pelo metabolismo das leveduras. O mecanismo de síntese destes compostos são variados e complexos, e são influenciados principalmente pela concentração e tipo de nitrogênio disponível para as leveduras (UGLIANO et al., 2009; BARBOSA; MENDES-FAIA; MENDES-FERREIRA, 2012).

Foram pesquisados 6 compostos sulfurados no vinhos sendo identificados 4 compostos (Tabela 7), dimetilsulfona (DMS) e 2-mercaptoetanol não foram detectados em nenhuma amostra. Foi observado diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre a concentração dos 4 compostos detectados no vinho em relação ao agente clarificante utilizado no mosto.

Tabela 7 - Compostos sulfurados voláteis nos vinhos obtidos de mostos clarificados com bentonite, enzima e sílica gel.

µg/L	Vinhos			Valor- $p$ <sup>1</sup>
	Bentonite	Enzima	Sílica gel	
3 (metiltio)-propanoato de etila	1,55(0,21)a	1,52(0,15)a	1,52(0,25)a	ns
3 (metiltio)-propil acetato	10,31(0,12)a	12,81(0,11)b	9,65(0,05)a	*
Metionol	100,2(3,67)a	221,90(5,22)b	205,78(2,89)c	***
Sulfeto de hidrogênio	0,35(0,03)	<0,01 <sup>2</sup>	<0,01 <sup>2</sup>	**
Dimetilsulfona	<0,01 <sup>2</sup>	<0,01 <sup>2</sup>	<0,01 <sup>2</sup>	
2-Mercaptoetanol	<0,01 <sup>2</sup>	<0,01 <sup>2</sup>	<0,01 <sup>2</sup>	

Resultados são expressos como valores médios (desvio padrão) ( $n = 3$ ).

<sup>1</sup>Análise de variância (ANOVA) foi realizada para cada aminoácido para comparar o efeito do agente clarificante no mosto e vinho separadamente.

Ns, não significante ( $p>0,05$ ); \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Letras diferentes em mesma linha representam diferença significativa entre os vinhos obtidos de mostos clarificados com diferente agente clarificante (Teste de Tukey).

<sup>2</sup>Valor menor que o limite de detecção.

O sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) é um tiol altamente volátil que confere ao vinho odores desagradáveis associados a 'ovo podre' (SIEBERT; BRAMLEY; SOLOMON, 2009). Este composto foi detectado apenas no vinho elaborado com mosto clarificado com bentonite. Este mosto apresentou maior concentração de cisteína, um aminoácido sulfurado, que pode ter participado da formação de  $H_2S$ . Foi observado forte correlação significativa ( $p < 0,05$ ) entre a cisteína e o  $H_2S$  ( $R = 0,9$ ). Esta correlação está de acordo com a literatura, que demonstra que durante a fermentação do vinho o  $H_2S$  pode ser produzido a partir do metabolismo da cisteína, pelas leveduras (JIRANEK; LANGRIDGE; HENSCHKE, 1995). Moreira et al. (2002) avaliaram a influência da adição de aminoácidos no mosto das uvas antes do processo de fermentação e observaram que a presença de cisteína está relacionada a presença de  $H_2S$  no vinho e que a adição de metionina não influenciou significativamente na concentração de  $H_2S$ .

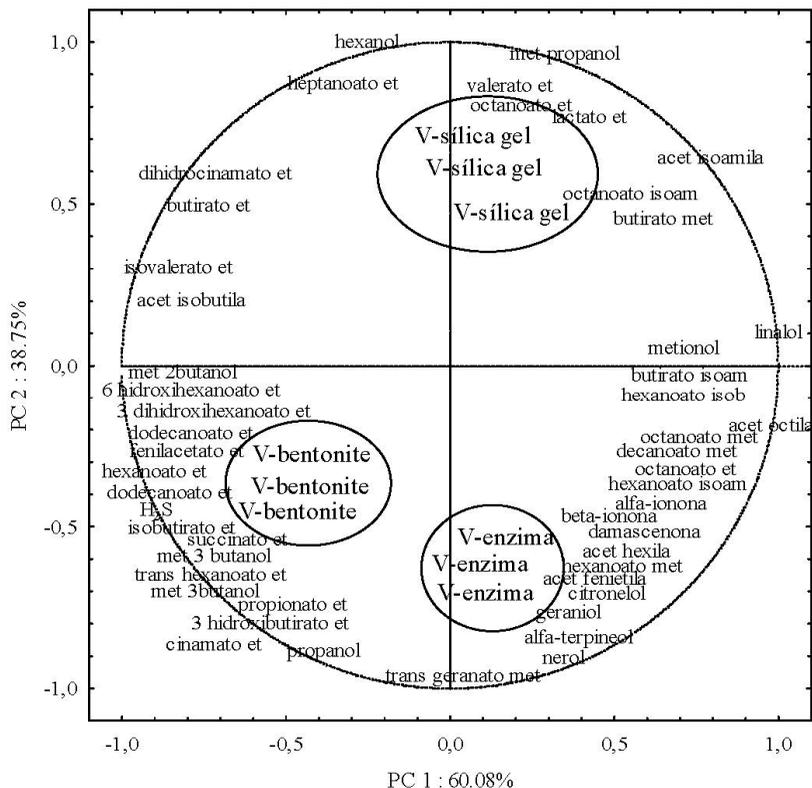
O principal composto sulfurado pesado detectado nos vinhos brancos e tintos é o metionol (3-(metiltio) 1-propanol), frequentemente encontrado em concentração acima do seu limiar olfativo (4500  $\mu\text{g/L}$  em vinho branco) o qual confere aromas de batata cozida e couve-flor aos vinhos (LAVIGNE; BOIDRON; DUBOURDIEU, 1992). Foi observado que o agente clarificante, especialmente bentonite, alterou significativamente o teor de metionol dos vinhos. O mosto que foi clarificado com bentonite apresentou menor turbidez e menor concentração de metionina, que é o aminoácido precursor da síntese de metionol pelas leveduras durante a fermentação. Correlação significativa ( $p < 0,05$ ) foi observada entre a metionina e o metionol ( $R = 0,98$ ). Outros autores também observaram que o aumento da turbidez do mosto acarreta no aumento da concentração de metionol (KARAGIANNIS; LANARIDIS, 2002). De fato, a concentração dos aminoácidos, como a metionina, é maior na fração sedimentada que na parte líquida do mosto após a clarificação (GUITAR et al., 1998). O composto 3-(metiltio)-propil acetato apresentou maior concentração no vinho obtido de mosto clarificado com enzima, não apresentando diferença significativa entre o bentonite e a sílica gel. O agente clarificante não apresentou influência significativa no teor do 3-(metiltio)-propanoato de etila nos vinhos.

### 3.5 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

Os dados deste trabalho demonstram que o conteúdo de nitrogênio do mosto exerce forte influência no perfil volátil do vinho. No

entanto, a falta de conhecimento em definir o conteúdo nitrogenado dos mostos em relação aos compostos aromáticos dos vinhos tem induzido a consideráveis divergências na literatura. Considerando que os agentes clarificantes utilizados durante o processo de clarificação originaram mostos com diferentes concentrações de compostos nitrogenados e com alterações significativas no perfil volátil dos vinhos, foi realizado uma Análise de Componentes Principais (ACP) para verificar a capacidade de diferenciar os vinhos de acordo com a clarificação do mosto. A ACP foi realizada com todos os compostos voláteis (51 compostos) que apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os agentes clarificantes (Figura 3). A ACP demonstrou que os vinhos foram claramente separados por duas componentes (CP1 x CP2), que explicaram 98,8% da variabilidade total dos dados. A primeira componente representou 60,08 % e a segunda componente 38,75 % da dispersão total. Pode-se observar que os vinhos foram separados de acordo com o agente clarificante utilizado no mosto. Os vinhos obtidos com mosto clarificado com enzima apresentaram forte correlação positiva principalmente com os compostos voláteis varietais, como terpenos e C13-norisoprenóides. Os vinhos elaborados a partir da clarificação do mosto com bentonite apresentaram forte correlação com a maioria dos compostos voláteis de origem fermentativa, com destaque para os ésteres etílicos. Os vinhos elaborados com adição de sílica gel no mosto apresentaram correlação com menor número de compostos voláteis, com destaque para acetato de isoamila, octanoato de isoamila, lactato de etila e octanoato de etila, os quais dependendo da concentração no vinho, podem conferir notas aromáticas frutadas, como de banana para o acetato de isoamila como também notas aromáticas de cera e leite, característico dos compostos octanoato de isoamila e lactato de etila, respectivamente.

Figura 3 - Análise de componentes principais do perfil volátil (compostos primários e de fermentação) dos vinhos obtidos de mostos clarificados com 3 agentes clarificantes (bentonite, enzima, sílica gel).



Os resultados foram obtidos da análise em triplicata com duas repetições. Abreviações para os compostos voláteis: Et, etil; acet, acetato; met, metil.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostraram que os diferentes agentes clarificantes adicionados no mosto durante o processo de clarificação provocaram diferenças significativas na composição dos mostos e dos vinhos. A composição nitrogenada do mosto foi influenciada pelo agente clarificante, com exceção do íon amônio, em que o uso de bentonite resultou em mosto com menor concentração de compostos nitrogenados enquanto que mosto clarificado com a enzima a concentração nitrogenada foi maior. Durante o processo de fermentação

foi observado haver diferença significativa na taxa de consumo de cada aminoácido em função do agente clarificante, no entanto foram os mesmos aminoácidos que apresentaram as maiores taxas de consumo em todos os mostos.

Foi observado que os agentes clarificantes utilizados no mosto influenciaram no perfil volátil dos vinhos. Esta relação é principalmente associada a composição de nitrogênio do mosto obtida após a clarificação, principalmente aminoácidos e nitrogênio assimilável. Vinhos obtidos da clarificação do mosto com enzima apresentaram maior concentração de aromas varietais, como terpenos e norisoprenóides como também de alguns ésteres, como os acetatos de álcoois superiores, ésteres metílicos e isoamílicos secundário. A clarificação do mosto com bentonite resultou em maior concentração dos ésteres majoritários do vinho e de sulfeto de hidrogênio. Estes dados foram confirmados pela análise de componentes principais. Foi observado uma relação entre os aminoácidos que mais contribuíram como fonte de nitrogênio assimilável pelas leveduras, arginina e alanina, com a formação dos compostos voláteis nos vinho, principalmente para os ésteres.

Estes resultados apresentam importante aplicação prática para a seleção do agente clarificante em função do vinho que se quer elaborar. No entanto, estudos futuros devem ser realizados com diferentes concentrações de agentes clarificantes utilizando diferentes variedades de uvas.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior) pelo apoio financeiro para realização deste trabalho e para realização do doutorado 'Sanduíche' na *Université de Bordeaux 2*, França. Também agradecemos o *Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV)* da *Université de Bordeaux 2*, França e a Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina (Epagri-Videira) pelo suporte técnico. Os autores agradecem Marie-Claire Perello pelo suporte técnico durante a análise dos compostos voláteis.



## CAPÍTULO 5

### **DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD FOR HETEROCYCLIC COMPOUNDS IN WINE: OPTIMIZATION OF HS-SPME CONDITIONS APPLYING A RESPONSE SURFACE METHODOLOGY**

Vívian Maria Burin<sup>a,b,c</sup>, Stéphanie Marchand<sup>a,b</sup>, Gilles de Revel<sup>a,b</sup> and  
Marilde T.  
Bordignon-Luiz<sup>c\*</sup>

<sup>a</sup>Univ. de Bordeaux, ISVV, EA 4577, Unité de Recherche Oenologie, 33882 Villenave d'Ornon, France.

<sup>b</sup>INRA, ISVV, USC 3666 oenologie, 33882 Villenave d'Ornon, France.

<sup>c</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos CAL/CCA, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, CEP 88034-001, Florianópolis, SC, Brazil.

\*Corresponding author. Tel.: +55 (0) 48 3721 5376; fax: +55 (0) 48 3331 9943.

*E-mail addresses:* marilde.bordignon@ufsc.br, viburin@gmail.com (M.T. Bordignon-Luiz).



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/talanta](http://www.elsevier.com/locate/talanta)

## Development and validation of method for heterocyclic compounds in wine: Optimization of HS-SPME conditions applying a response surface methodology



Vívian Maria Burin<sup>a,b,c</sup>, Stéphanie Marchand<sup>a,b</sup>, Gilles de Revel<sup>a,b</sup>,  
Marilde T. Bordignon-Luiz<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Bordeaux, ISVV, EA 4577, Unité de Recherche Oenologie, 33882 Villenave d'Ornon, France

<sup>b</sup> INRA, ISVV, USC 3666 oenologie, 33882 Villenave d'Ornon, France

<sup>c</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos CAJ/CCA, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, CEP 88034-001 Florianópolis, SC, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 31 May 2013

Received in revised form

7 August 2013

Accepted 23 August 2013

Available online 30 August 2013

#### Keywords:

Wine

Heterocyclic compounds

Method validation

Response surface methodology

HS-SPME optimization

### ABSTRACT

Considering the importance of the heterocyclic compounds in terms of wine flavor, this study aims to propose a new rapid and solvent free method to quantify different classes of heterocyclic compounds, such as furans, thiophenes, thiazols and pyrazines, which are products of the Maillard reaction, in wines. The use of a central composite design and the response surface methodology to determine the best conditions allows the optimum combination of analytical variables (pH, NaCl and extraction time) to be identified. The validation was carried out using several types of wine as matrices. The method shows satisfactory repeatability (2.7% < RSD < 12%), reproducibility (2.8% < RSD < 12%), accuracy and specificity. The optimized method was applied to 29 French wines and significant concentrations of the different heterocyclic compounds were determined, mainly for red wines.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Wine aroma originates from a large number of volatile compounds belonging to heterogenic chemical groups, which may be classified as primary (derived from grape), secondary (formed during the fermentation) and/or tertiary aromas (from chemical reactions or physical interactions with containers, such as barrels) [1]. However, the origins of many odorous molecules present in wines are still not well defined. Some wines have aromatic notes close to those of "coffee", "toasted", "roasted", which are associated with the Maillard reaction. The Maillard reaction is responsible for the characteristic flavor and color of many processed food products (baked, fried or roasted) [2]. Typically, a carbonyl compound derived from carbohydrate degradation reacts with a single amino acid. This well-known reaction occurs between a reducing sugar and an amino acid, and the mechanism can be divided into the Amadori and Heyns rearrangement or into the Strecker degradation and melanoidin formation. The most odorous products of the Maillard reaction are heterocyclic compounds with

5 or 6 members, which contain nitrogen-, sulfur- and oxygen-, notably including the compounds belonging to 4 different classes: furans, thiazoles, thiophenes and pyrazines [3].

In wines, some of these compounds have been identified and quantified and in some cases their chemical generation pathways and origins have been studied. Pripis-Nicolau et al. [4] showed that some carbonyl compounds mixed with amino acids in wine-like solutions reacted, even if kept in a reducing medium and under mild conditions similar to those of in bottle wine aging (pH close to 3.5, temperature close to 20 °C, and aqueous medium). The authors observed that the most interesting molecules were produced in the presence of the sulfur amino acids, in particular cysteine, with the production of heterocycles such as pyrazines, alkylpyrazines, methylthiazoles, acetylthiazole, acetylthiazoline, acetylthiazolidine, trimethyloxazole, and dimethylethyloxazoles. These mixes generate notes described as 'popcorn', 'hazelnut', 'toasted' and 'roasted' which are known to contribute to the aged wine bouquet [5]. Later, Marchand, de Revel and Bertrand [6] also studied the products of the reaction between cysteine and dicarbonyl compounds, under similar conditions. The compounds formed in solution included five of the most abundant and odorous compounds, that is, thiazol, 2-acetylthiazole, trimethyloxazole, 2-furanmethanethiol and thiophene-2-thiol, which were identified and quantified in French wines from different origins.

\* Corresponding author. Tel.: +55 48 3721 5376; fax: +55 48 3331 9943.

E-mail addresses: [viburin@gmail.com](mailto:viburin@gmail.com) (V.M. Burin), [marilde.bordignon@ufsc.br](mailto:marilde.bordignon@ufsc.br), [marildebordignon@gmail.com](mailto:marildebordignon@gmail.com) (M.T. Bordignon-Luiz).

These are known products of the Maillard reaction that occurs in several agribusiness processes and leads to roasted food flavors. These molecules were described for the first time in the wines by these authors, and may play an important role in their flavor. Researchers studied the reaction between diacetyl and cysteine, and proposed new pathways for the generation of odorous heterocyclic compounds under wine-like physicochemical conditions [7,8].

Considering the importance of these compounds in terms of the flavor of wines, and that no analytical method to identify and quantify of 4 different families of heterocyclic compounds in single chromatographic run could be found in the literature, this study aimed to propose a new rapid and solvent-free quantification method to quantify different classes of heterocyclic compounds, such as furans, thiophenes, thiazoles and pyrazines, which are products of the Maillard reaction. However, there are several methods for their quantification described in the literature using gas chromatography (GC) and various detectors: GC/FPD, GC/NPD, GC/FID, and GC/MS [9,4], thus a method using GC coupled to mass spectrometry was developed and validated. In relation to the extraction method for the compounds, researchers have been using liquid-liquid extraction (LLE), solid-phase extraction (SPE) and solid-phase microextraction (SPME) [10–12]. In this study SPME was used because it offers many advantages over conventional sample preparation techniques. Simplicity, speed, solvent-free extraction and minimal sample manipulation are amongst the advantages offered by this technique [13]. As many factors can influence SPME extraction, a central composite design (CCD) using the response surface methodology (RSM) was applied to determine the best conditions. This methodology represents a combination of mathematical and statistical techniques aimed at optimizing the final response. The main advantage of this method is the reduced number of experiments required to provide sufficient information to obtain statistically acceptable results.

The RSM and CCD provide a complete factorial investigation of the simultaneous, systematic and efficient variation of important components, identifying the possible interactions, main effects and optimal conditions of operation [14].

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals and Standards

Standard compounds (numbers given in Table 1) were obtained from commercial sources as follows: numbers 1 to 13, 16 and 18 to 24 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France); 15 (Alfa Aesar A Johnson Matthey Company, Bischheim, France); and 14, 17 and 22 (Acros organics, Geel, Belgium). The internal standard (25) was supplied by CDN Isotopes (Quebec, Canada). All solvents were HPLC grade. Absolute ethanol and methanol (purity > 99%) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Milli-Q water was obtained from a Milli-Q Plus water system (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Sodium chloride (99%) was supplied by VWR-Prolabo (Fontenay-sous-bois, France).

### 2.2. Sample preparation and spiking

The optimization of the type of fiber, sample dilution and the optimization of extraction of heterocyclic compounds were carried out on red wines spiked with  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  of the standard solutions, prepared at  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  in water/ethanol solution (50% v/v).

Liquid-liquid extractions (LLE) was carried out with dichloromethane, 50 mL samples of wine were extracted 3 times with 5 mL of solvent. The combined extracts were dried over anhydrous

**Table 1**  
Flavor description, boiling point and ions monitored in SIM detection for each compound.

No	Compounds	Flavor description	BP (°C) <sup>a</sup>	Selected ions <sup>b</sup>
<b>N,S-heterocycle</b>				
1	Thiazole	Popcorn, peanut	117–118 °C	<b>85/58</b>
2	4-Methylthiazole	Green, nutty	133–134 °C	<b>99/71/72</b>
3	2-Ethylthiazole	Green, nutty	148 °C	<b>113/112/98</b>
4	Benzothiazole	Rubber	231 °C	<b>135/108</b>
5	2-Acetylthiazole	Nutty, popcorn	89–91 °C/12 mmHg	<b>127/99/112</b>
6	2-Methylthiazole	Green vegetable	129 °C	<b>58/99</b>
<b>N,O-heterocycle</b>				
7	2,4,5-trimethyloxazole	Very ripe fruit, nutty	133–134 °C	<b>111/96/82</b>
<b>O-heterocycle</b>				
8	3-Acetyl-2,5-dimethylfuran	–	62 °C/0.25 mmHg	<b>123/138/91</b>
9	2,3-Dihydrobenzofuran	–	188–189 °C	<b>91/121</b>
10	2-Acetylfuran	Powerful, balsamic, burning, sweet	67 °C/10 mmHg	<b>110/95</b>
11	5-Methylfurfural	Sweet, caramel, nutty, spicy	187 °C	<b>110/53/81</b>
<b>S-heterocycle</b>				
12	3-Acetylthiophene	–	208–210 °C/748 mmHg	<b>111/126</b>
13	2-Acetylthiophene	Mustard-like, onion, malty, roasted	214 °C	<b>111/126/83</b>
14	2,3-Dimethylthiophene	–	142 °C	<b>97/111/112</b>
15	2,5-Dimethylthiophene	Green-like	134 °C/740 mmHg	<b>111/95</b>
<b>N-heterocycle</b>				
16	2-methylpyrazine	Nutty	135 °C/761 mmHg	<b>94/67</b>
17	Acetylpyrazine	Roasted, sweet	78–79 °C/8 mmHg	<b>80/122/43</b>
18	2-Ethylpyrazine	Nutty, roasted	152–153 °C	<b>107/108/80</b>
19	2,6-Dimethylpyrazine	Nutty, sweet, roasted, chocolate	154 °C	<b>42/108/67</b>
20	2,3-Diethylpyrazine	Roasted, earthy	180–182 °C	<b>121/136/80</b>
21	2-Ethyl-3-methylpyrazine	Potato, burnt nutty, roasted, cereal	57 °C/10 mmHg	<b>121/122/94</b>
22	2-Acetyl-3-methylpyrazine	–	90 °C/20 mmHg	<b>93/136/94</b>
23	2,3,5-Trimethylpyrazine	Nutty, roasted peanut, cocoa, burnt	171 °C	<b>81/122/42</b>
24	2,3,5,6-Tetramethylpyrazine	Green, nutty, cocoa, musty, potato	190 °C	<b>54/136</b>
25	2-Methylpyrazine-d <sub>6</sub>	–	–	<b>100</b>

<sup>a</sup> BP: Boiling point (not specified) was 760 mm Hg.

<sup>b</sup> Quantitative ions are marked in bold text and control ions are marked in regular character.

sodium sulfate, filtered and concentrated under a gentle nitrogen flow.

For the Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) 10 samples of red wine have been spiked with the heterocycles compounds at 10 levels (10, 20, 50, 80, 100, 150, 250, 500, 750 and 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). The spiked samples were submitted to extraction using a PDMS stir bar (Twister, 63  $\mu\text{L}$  coating) (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Germany) during 1 h at 20 °C and desorption at 280 °C during 10 min.

For the validation, the linearity and range were determined for white and red Bordeaux wine matrices. Repeatability assays were carried out with a red wine spiked at 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  with all of the compounds studied. Reproducibility assays were carried out on spiked (10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) red wine, carrying out the analysis at 2-day intervals for 21 days. The samples were individually frozen on the day of the first measurement. For the accuracy and specificity assays, the analytes were spiked (10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) in synthetic wine (hydroalcoholic solution (12% v/v), pH 3.5, tartaric acid 3 g  $\text{L}^{-1}$ ), and white and red Bordeaux wines. Limits of detection (LOD, concentration for signal/noise=3) and quantification (LOQ, concentration for signal/noise=10) were calculated using the Chemstation data analysis software (Agilent Technologies, France). The identification of heterocyclic compounds in wines was performed by comparing retention times and mass spectra with those of pure standards and with the NIST mass spectra database. For the quantitative study 10  $\mu\text{L}$  of internal standard solution, pyrazine- $\text{d}_6$  at 700  $\text{mg L}^{-1}$  in ethanol solution (50% v/v), was added to 10 mL of the samples.

### 2.3. Solid-phase microextraction (SPME)—experimental design

The fibers used (Supelco, Bellefonte, PA, USA) were coated with various stationary phases and film thicknesses: divinylbenzene-carboxen-polydimethylsiloxane 50/30  $\mu\text{m}$  (DVB/CAR/PDMS), polydimethylsiloxane-divinylbenzene 65  $\mu\text{m}$  (PDMS/DVB), carboxen-polydimethylsiloxane 85  $\mu\text{m}$  (CAR/PDMS), polydimethylsiloxane 7  $\mu\text{m}$  and 100  $\mu\text{m}$  (PDMS-7 and PDMS-100, respectively) and polyacrylate 85  $\mu\text{m}$  (PA). They were conditioned before use by insertion into the GC injector as recommended by the manufacturer. To a 20 mL headspace vial was an added 10 mL sample of either wine, spiked wine or a blank hydroalcoholic solution of 12% (v/v). The solution was loaded onto an autosampler (see below). The basic program for the fiber selected consisted of swirling the vial at 250 rpm for 5 min at 40 °C, then inserting the fiber into the headspace for 40 min at 40 °C as the solution was swirled again, then transferring the fiber to the injector for desorption at 250 °C for 5 min.

The parameters tested in the experimental design to determine the best conditions for the extraction experiment were: pH, ionic strength and extraction time. To evaluate the effects and the interactions of these three variables, the response surface methodology was used together with a central composite design. The independent variables and their levels (−1, 0, 1) used for the experimental design were: pH (3.5, 5.5, 7.5), NaCl (0, 1.5, 3.5 g) and time extraction (20, 40, 60 min).

The design was constructed based on 3<sup>3</sup> factorial designs with 4 replications of the center point to estimate the experimental error, leading to 18 experiments, carried out in random order. All runs were carried out with 10 mL of spiked wine (100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), a Carboxen/PDMS fiber was used, which was selected in preliminary tests, and the extraction temperature was fixed at 40 °C to avoid the formation of new products of the Maillard reaction in the wine.

The response selected ( $y$ ) was the geometric mean of all the areas of the individual peaks of all analytes, in order to obtain a unique set of optimum conditions for the extraction of all the target analytes. In order to estimate the response, an empirical model composed of

a second-order polynomial was constructed (Eq. (1)):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (1)$$

where  $y$  is the predicted response,  $\beta_0$  the model constant,  $\beta_i$  the coefficients of the linear effects,  $\beta_{ii}$  the coefficients of the quadratic effects,  $\beta_{ij}$  the coefficients of the interaction between the factors,  $x_j$  and  $x_i$  the independent coded variables,  $\varepsilon$  the error,  $k$  the number of variables considered, and  $i$  and  $j$  the coded factors of system.

The coefficients were calculated by regression analysis and their significance was verified using analysis of variance (ANOVA) with the Statistic (version 7.0) software program.

### 2.4. GC–MS analysis

All of the analysis was carried out using an HP 6890N (Agilent) gas chromatograph, coupled to a quadrupole mass spectrometer equipped with a Gerstel MPS2 autosampler. An HP5capillary column was used (30 m  $\times$  0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness, SGE, Courtaboeuf, France) and the carrier gas was helium (N55), at a flow rate of 1.0 mL/min. The column oven temperature program was: initial temperature 40 °C for 4 min, then raised at 2 °C/min to 160 °C and held for 1 min, and finally ramped to 230 °C at a rate of 5 °C/min and held for 5 min. For the quantitative determination the selective-ion monitoring (SIM) mode was used. The interface was kept at 280 °C and the ionization mode was electron impact (70 eV). The analytes and internal standard (IS) were monitored according to the ions shown in Table 1. Prior to quantification in the SIM mode, the full scan mode ( $m/z$  40–250) was used for the identification of all target compounds based on their mass spectra and GC retention times.

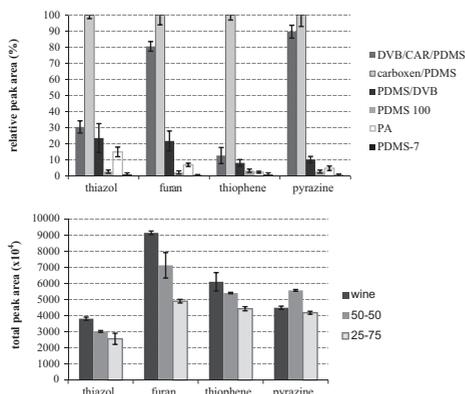
## 3. Results and discussion

### 3.1. Method optimization

#### 3.1.1. Extraction mode and sample dilution

The heterocyclic compounds that are extracted with this method are from different families of compounds with distinct chemical characteristics, mainly in terms of polarity. Thus, it was necessary to compare various SPME fibers to find a compromise that would provide the best option for the entire set of heterocyclic compounds studied. In addition to solid-phase microextraction (SPME), liquid-liquid extraction (LLE), with different proportions of sample:dichloromethane (5:1, 5:3 and 5:5 v/v), and SBSE with a PDMS-coated stir bar were tested. LLE has been abandoned because of the time and solvent consumption and SBSE system was abandoned because of the low sorption rate of heterocycles on stir bar. The SBSE results showed that for levels lower to 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  the 4-methylthiazole, trimethylxazole are not detected and the linearity was not good for the two other compounds ( $R^2=0.73$  for 2-acetylthiazole and  $R^2=0.13$  for ethylpyrazine). Considering the heterocycles levels in wines (most of time lower to 10  $\mu\text{g/L}$ ), the PDMS SBSE extraction technique is not efficient. When the compounds evaluated were not extracted by dichloromethane, it was not used to compare LLE with SPME fibers.

Fig. 1A shows that the Carboxen/PDMS fiber is the best option for all heterocyclic compounds and it presents greater specificity for thiophenes and thiazols. Yu et al. [15] used this same fiber for the analysis of sulfur heterocyclic compounds, produced through the Maillard reaction between cysteine and ascorbic acid. Pérez-Palacios et al. [16] also used the Carboxen/PDMS fiber for the extraction of furanic compounds from coated deep-fried products. Fan et al. [10] showed that Carboxen/PDMS fiber was the most sensitive type of fiber for pyrazines extraction of the Chinese liquor. However, there are not research that demonstrate



**Fig. 1.** Optimization on the extraction efficiency of heterocyclic compounds. Mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ). (a) Relative peak area as a function of type of fiber for the extraction of heterocyclic compounds from wine, with the corresponding standard deviations. For each group, the ratio between the absolute peak area and the highest absolute area peak is presented along the Y-axis; (b) effect of the wine dilution using the headspace SPME method (50:50 and 25:75 water:wine).

its use for heterocyclic compounds extraction from different families (furan, thiophene, thiazol and pyrazine), determined in single chromatographic run.

The influence of ethanol on the adsorption of compounds by the SPME fiber is considered to result from the individual characteristics of each compound, such as the molecular weight, boiling point, molecular structure, solubility in the liquid matrix, and affinity for the fiber coating [17–19]. Because ethanol is one of the major constituents of wines, it was used to determine the extractability of the other compounds. Previous results in the literature describe the influence of the ethanol content on the efficiency of the SPME method [20,21]. A preliminary study was carried out on the possible effect of the ethanol content on the headspace SPME technique. For this, hydroalcoholic solutions (water:ethanol, pH 3.5, 3 g L<sup>-1</sup> tartaric acid) with different ethanol contents (6, 12, 18 and 24% v/v), spiked with 50  $\mu$ g L<sup>-1</sup> of the standard compounds, were analyzed. A consistent decrease in the extraction yield (%) was observed with increasing ethanol content for all compounds available (data not show). Based on previous HS-SPME optimization studies it has been suggested that this reduced efficiency is due to ethanol directly competing with analytes for SPME binding sites [22,23].

Thus, to verify the influence of the ethanol in the wine with an alcohol level of approximately 12%, samples of white and red wine were diluted in water in two proportions, 50:50 and 25:75 water: wine sample, respectively, and compared with the undiluted wine samples (Fig. 1B). The maximum response for the more polar compounds (alkylpyrazines) was obtained when the solutions were diluted by a factor of 50% (v/v). However, for most compounds (furan, thiophene and thiazoles) the peak responses decreased with increasing dilution. Since in this method the aim is to determine 4 different classes of heterocyclic compounds in samples of white and red wine in a single chromatographic run, and based on the results obtained, samples were analyzed without dilution.

### 3.1.2. Response surface methodology

Once the SPME fiber had been chosen, and decided to analyze the wines without dilution, it was realized a central composite design (CCD) (3<sup>3</sup>) with the objective of defining the best

parameters for the extraction of compounds. The values for the total sum of the chromatographic area for all compounds analyzed (furan, thiophene, thiazole and pyrazine families) were considered as the dependent variables. The significant regression coefficients were negative, indicating that a response surface with a maximum point was obtained in the experimental design. A quadratic model was built through regression analysis described the mathematic relation between the independent and response variables (Eq. (2)).

$$\begin{aligned} \text{Total surface} = & 248117739 + 10238520^* \text{pH} - 8466366^* \text{pH}^2 \\ & + 31409833^* \text{NaCl} - 21449796^* \text{NaCl}^2 \\ & + 50089132^* \text{time} - 27032639^* \text{time}^2 \end{aligned} \quad (2)$$

The significance of the factors was confirmed by ANOVA, where it was possible to observe for all factors (pH, time (min) and NaCl (g)) that linear and quadratic effects were significant. The time of extraction was shown to have the weakest influence on the responses, and interactions between the variables were not observed (Table 2). These results showed that the model was significant ( $F=42.7$  and  $p < 0.05$ ) and the lack-of-fit was not significant ( $p > 0.05$ ), indicating that the quadratic model was valid for this study. Moreover, the  $R_{pred}^2$  and  $R_{adj}^2$  values obtained (0.9382 and 0.9045, respectively) confirm this result.

For the graphical representation of the functions of this design, graphs are used which describe the individual and cumulative effects of the variables tested and their effect on the response. Fig. 2 shows the response surface graph in a three-dimensional plane for the regression model fitted to the data. The maximum response (surface area for all compounds) was obtained at pH 5.5 with 3 g of NaCl and applying an extraction time of 55 min, which represent the best conditions for the solid-phase microextraction.

It is important to assess the fitted model to ensure that it provides a sufficient approximation to the results obtained under the experimental conditions. The normality of the data was analyzed using a normal probability plot of the residuals and the difference between the observed values and those predicted from the regression. It was found that the experimental points were normally distributed around the curve, indicating that the normality assumption was satisfied. A determination coefficient ( $R^2$ ) of 0.94 was obtained for this model, which indicates a good fit between the observed and the predicted response values. The plots of the residual versus the predicted values (plots not shown) showed that the residuals were scattered randomly around zero and did not have outliers, because all of the values are within the accepted range ( $-3$  to  $+3$ ) for the validation of the model [24]. Thus, the analysis of variance results were valid, since the model assumptions were satisfied.

**Table 2**

Analysis of variance for response surface quadratic model for the sum of the peak areas for the heterocyclic compounds in wine.

Source	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F-value	p-value
pH (L)	2.0247E+15	1	2.0247E+15	5.26241	0.017095
pH <sup>2</sup> (Q)	3.7201E+15	1	3.7201E+15	5.80572	0.025412
NaCl (L)	1.1443E+16	1	1.1443E+16	22.68695	0.001421
NaCl <sup>2</sup> (Q)	3.8174E+15	1	3.8174E+15	10.59867	0.011604
Time (L)	3.9615E+16	1	3.9615E+16	76.26895	0.000023
Time <sup>2</sup> (Q)	1.6010E+16	1	1.6010E+16	29.89885	0.000596
pH.NaCl	4.2823E+11	1	4.2823E+11	0.00076	0.978613
pH.time	1.3567E+12	1	1.3567E+12	0.00242	0.961945
NaCl.time	4.4744E+14	1	4.4744E+14	0.79919	0.397432
Lack of fit	4.4404E+15	5	8.8808E+14		0.452171
Pure Error	3.8520E+13	3	1.2840E+13		
Total	7.1714E+16	17			

Bold line shows significant difference ( $p < 0.05$ ).

L, linear effect.

Q, quadratic effect.

### 3.2. Analytical performance

#### 3.2.1. Linearity and limits of detection and quantification

The linearity was evaluated, in a concentration range appropriate for wine contents according to Marchand et al. [6]. A Bordeaux white and red wine were spiked with the target compounds as listed in

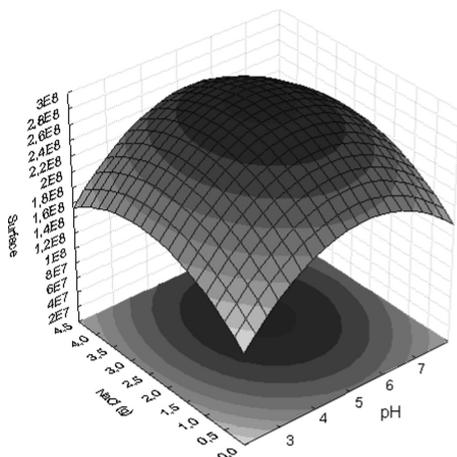


Fig. 2. Response surface graph for solid-phase microextraction of the heterocyclic compounds, using pH versus NaCl (g), at a fixed extraction time of 55 min.

Table 3

Linearity, detection and quantification limits, repeatability, reproducibility and accuracy of the method.

Compounds	Range ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$R^2$	LOD <sup>a</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ <sup>a</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Repeatability (RSD%) <sup>b</sup>		Reproducibility (RSD %)		Recovery (%)		
					WW <sup>c</sup>	RW <sup>d</sup>	Wine	Slope <sup>e</sup>	SW <sup>f</sup>	WW <sup>c</sup>	RW <sup>d</sup>
Thiazole	99.5–0.1	0.997	0.263	0.534	3.2	4.6	10.9	2.8	93.1	82.7	92.8
4-Methyl thiazole	110.0–0.01	0.998	0.387	1.09	4.9	3.5	9.8	9.5	91.8	85.7	98.7
2-Ethyl thiazole	90.8–0.01	0.997	0.096	0.211	6.5	3.7	7.9	5.5	99.2	107.5	121.9
Benzothiazol	112.0–0.01	0.995	0.056	0.157	5.3	5.3	8.9	11.4	90.3	88.4	72.5
2-Acetyl thiazole	96.9–0.01	0.994	0.469	1.406	7.9	5.8	9.9	9.4	87.3	79.7	72.9
2-Methyl thiazole	76.1–0.009	0.998	0.277	0.523	4.5	9.9	6.1	8.7	100.3	104.9	109.1
2,4,5-Trimethylloxazole	88.0–0.05	0.999	0.786	2.056	5.5	5.6	6.5	9.1	97.4	83.2	99.7
5-Methyl furfural	84.1–0.05	0.998	0.081	0.208	5.7	3.5	7.0	10.1	93.4	89.4	77.5
3-Acetyl-2,5-dimethylfuran	109.2–0.01	0.998	0.054	0.356	4.7	4.8	8.8	10.4	86.2	85.3	75.9
2,3-Dihydrobenzofurane	62.1–0.01	0.996	0.043	0.113	4.8	3.7	7.5	8.6	91.9	92.1	86.7
Acetyl furan	121.0–0.01	0.995	0.776	2.167	5.4	8.1	9.8	9.4	88.1	76.8	81.3
3-Acetyl thiophene	94.6–0.01	0.998	0.423	1.983	5.7	3.7	9.9	12.4	95.4	97.8	81.5
2-Acetyl thiophene	84.7–0.05	0.995	0.295	0.982	6.3	3.8	7.5	12.3	91.6	83.3	80.1
2,3-Dimethyl thiophene	97.6–0.05	0.997	0.102	0.345	8.3	4.8	8.2	3.9	98.7	104.8	115.2
2,5-Dimethyl thiophene	89.0–0.01	0.998	0.132	0.402	7.2	5.2	8.9	5.5	99.2	98.6	101.5
2-Methyl pyrazine	83.8–0.01	0.996	0.367	1.222	5.6	5.0	5.7	2.8	96.5	101.6	109.4
2-Acetylpyrazine	88.7–0.05	0.994	0.673	1.352	8.8	8.1	7.9	11.9	80.3	82.9	90.3
2-Ethylpyrazine	90.2–0.05	0.994	0.523	1.097	5.4	8.6	7.1	5.3	98.2	94.6	98.7
2,6-Dimethyl pyrazine	78.4–0.04	0.996	0.154	1.719	5.8	12.0	10.5	12.5	93.7	118.5	90.5
2,3-Diethyl pyrazine	73.9–0.009	0.996	0.189	0.629	6.7	4.7	6.0	7.7	80.2	79.5	91.9
2-Ethyl-3-methyl pyrazine	76.5–0.05	0.996	0.229	0.765	5.7	6.3	9.6	11.2	94.8	90.1	87.9
2-Acetyl-3-methyl pyrazine	76.4–0.05	0.997	0.251	0.819	6.9	8.9	9.1	10.4	88.5	85.3	80.0
2,3,5-Trimethyl pyrazine	76.4–0.009	0.996	0.281	0.732	4.6	2.7	7.9	10.2	94.9	108.1	92.8
2,3,5,6-Tetramethyl pyrazine	48.5–0.1	0.998	0.304	0.854	6.1	6.13	9.5	8.9	100.4	116.0	98.2

<sup>a</sup> Limits of detection and quantification, respectively.

<sup>b</sup> Relative standard deviation.

<sup>c</sup> White wine.

<sup>d</sup> Red wine.

<sup>e</sup> Angular coefficient of calibration curve.

<sup>f</sup> Synthetic wine (hydroalcoholic solution (12% v/v), pH 3.5, tartaric acid 3 g/L).

Table 1, using 7 levels of concentration prepared in duplicate. A correction was applied by subtracting the peak area ratios of the non-spiked wine sample (reference) from the spiked wine samples. The calibration curves were plotted as the relative peak areas (solute versus the corresponding internal standard) as a function of the concentration ratio (compound concentration versus internal standard concentration). The linearity for white and red wines was satisfactory, with coefficients of determination of greater than 0.99 in all cases.

#### 3.2.2. Repeatability

To evaluate the repeatability of the determination, ten identical samples of spiked wine (white and red wine) ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) were analyzed. The relative standard deviation of the area ratios was lower than 10% in all cases except for 2,6-dimethyl pyrazine (12.0%) for red wine; for most of the heterocyclic compounds the coefficient of variation was below 5%, which verifies the good precision of the method.

#### 3.2.3. Reproducibility

The reproducibility of the method was tested using two determinations: (1) a spiked red wine (that used for the repeatability study) was measured 11 times at 2-day intervals over a 3 week period. The results are shown in Table 3 and the values are in most cases better than 10%, ranging from 5.7% to 10.9%. The reproducibility was also determined from the slopes of the curves, with 5 calibration curves being constructed on different days, and the RSD% was calculated based on the average slope value. The results were below 13%, varying from 2.8% to 12.7%.

#### 3.2.4. Accuracy and specificity

The accuracy of the analytical method was evaluated by calculating the recoveries for the spiked samples. The analytes

were spiked ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) in synthetic wine, white and red Bordeaux wines. The recoveries for almost all samples were around 100% indicates good accuracy and specificity of the method.

These results for the validation of the method show good agreement with data from other researchers who also developed and validated methods for the determination of heterocyclic compounds in different food and beverages matrices. Keim et al. [9] developed and validated a method for the determination of 5 nitrogenous heterocyclic compounds in samples of red and white wines. Marchand et al. [6] validated a method to analyze 7 heterocyclic compounds of different chemical families present in red and white wines. The results for both of these validation methods are in good agreement with those observed in this study, although they used liquid–liquid extraction to extract the compounds. The SPME, provides several benefits compared to conventional extraction methods such as LLE, including elimination of the use of (often toxic) solvents, higher sensitivity and easy automation. Research carried out to develop and validate a method for the quantification of heterocyclic compounds produce from the Maillard reaction in some food products, such as potato chips [25], fish fried [16] and palm sugar [26], provided data consistent with those obtained in our study in terms of analytical performance. It should be emphasized, that in these studies cited previously only some heterocyclic compounds were optimized applying the proposed method. Also, no analytical method to identify and quantify of 4 different families of heterocyclic compounds in single chromatographic run could be found in the literature.

### 3.3. Wine analysis

The optimized and validated method described above was applied to 29 French wine samples of different origins, types and vintages (Table 4). The quantification of heterocyclic compounds was based on the calibration curves obtained in the linearity

experiments for each heterocycle. Mostly, the wines analyzed presented significant concentrations of the different heterocyclic compounds, mainly for red wines. Note that the threshold of these compounds in wine is still unknown, except for the thiazole ( $38 \mu\text{g L}^{-1}$ ), 4-methylthiazole ( $55 \mu\text{g L}^{-1}$ ), acetylthiazole ( $3 \mu\text{g L}^{-1}$ ), trimethyloxazole ( $17 \mu\text{g L}^{-1}$ ), and 2-thiophenethiol ( $0.8 \mu\text{g L}^{-1}$ ) [6]. Although some compounds were identified in the wines at relatively low concentrations and lower than the sensory threshold, researchers have demonstrated a possible synergy between the molecules present in concentrations lower than their sensory threshold when they are chemically similar [27].

All of the molecules investigated in this study are known to be products of the Maillard reaction [28]. They all present odorous notes close to those which develop in roasted food. The presence of some compounds, such as thiazoles, pyrazines, trimethyloxazole and 2-acetylthiazole, has already been reported by other researchers [4,6,8], produced through reactions between amino acids and carbonyl compounds under wine aging conditions. The values found in this study were lower than those reported by other researchers [6], who identified compounds such as thiazole, 2-acetylthiazole and trimethyloxazole in French wines, in concentrations higher than those obtained in our study. The same authors reported the presence of considerable amounts of 2-acetylthiazole for wines from Pomerol and Saint-Emilion, which contained  $> 3 \mu\text{g L}^{-1}$  on average, which is the odor threshold value in water. White Burgundy wines, Champagne and Alsace contained on average between 1.4 and  $1.8 \mu\text{g L}^{-1}$  of these compounds. On the other hand, red wines from Médoc, Burgundy and Provence wines and fortified wines contained  $< 1 \mu\text{g L}^{-1}$  of 2-acetylthiazole. Researches also identified nitrogenous compounds in different wines, with levels close to those identified in our study [9]. These authors observed that the concentrations varied as follows: trimethyloxazol  $0.2\text{--}0.7 \mu\text{g L}^{-1}$ , 4 methylthiazol  $0.2\text{--}0.9 \mu\text{g L}^{-1}$  and 2-acetylthiazol  $0.2\text{--}0.4 \mu\text{g L}^{-1}$ . Considering all of the wines studied, these authors affirmed that the fortified wines, such as Port, Madeira,

**Table 4**  
Range of heterocyclic compounds ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) in wine samples.

Compounds	Bordeaux (red wine) <sup>a</sup>	Bourgogne (red wine) <sup>b</sup>	Alsace (white wine) <sup>c</sup>	Bordeaux (white wine) <sup>d</sup>
Thiazole	0–8.1	0–2.9	0–0	0–1.5
4-Methyl thiazole	0–10.2	0–1.1	0–0	0–1.1
2-Ethyl thiazole	0–0.22	0–0.75	0–0	0–0
Benzothiazol	0.2–1.5	1–1.6	0.9–3.5	0–1.99
2-Acetyl thiazole	0–1.8	0–1.5	0–1.9	0–1.4
2-Methyl thiazole	0–0.4*	0–0.5	0–0.4*	0–0.4*
2,4,5-Trimethyloxazole	0–0.4*	0–0.89*	0–0	0–0
5-Methyl furfural	1.5*–17	4–27	5–9	2–250
3-Acetyl-2,5-dimethylfuran	0–0.9	0–0.9	0–0.8	0.8–0.9
2,3-Dihydrobenzofurane	0–0.7	0.6–0.67	0–0.6	0–0.6
2-Acetyl furan	6–50.2	9.9–24.5	1*–6.2	2.2–21
3-Acetyl thiophene	0–2.5	0–2.1	0–2	0–2
2-Acetyl thiophene	0–2.2	0–1.75	0–2.8	0–0
2,3-Dimethyl thiophene	0–0.3	0–0	0–0	0–0
2,5-Dimethyl thiophene	0–0.7	0–0.6	0–0.5	0–0
2-Methyl pyrazine	0–1.2	0–0.9*	0–0.4*	0–0
2-Acetylpyrazine	0–5	0–3.7	0–0	0–0
2-Ethylpyrazine	0–0.6*	0–1.18	0–0	0–0
2,6-Dimethyl pyrazine	0–4	0–3.0	0–0	0–3.5
2,3-Diethyl pyrazine	0–0.8	0–0.7	0–0.6	0–0.6
2-Ethyl-3-methyl pyrazine	0–0.8	0–0.7	0–0	0–0
2-Acetyl-3-methyl pyrazine	0–1.15	0–0.98	0–0	0–0
2,3,5-Trimethyl pyrazine	0–0	0–0.94	0–0.8	0–0.8
2,3,5,6-Tetramethyl pyrazine	0–1.1	0–0	0–0	0–0

<sup>a</sup> n = 10.

<sup>b</sup> n = 6.

<sup>c</sup> n = 6.

<sup>d</sup> n = 7.

\* LOD < value < LOQ; 0: value < LOD.

and Rivesaltes, in general, had the highest concentrations of nitrogenous heterocyclic compounds. The most abundant heterocyclic compounds in these types of wines have been found to be 2,4,5-trimethylxazole, 2,4-dimethylthiazole and 2-acetylthiazole. Mo et al. [12] identified different classes of heterocyclic compounds that contribute to the aroma of Chinese rice wine, including benzothiazol, trimethylpyrazine, tetramethylpyrazine and 2,3-dimethylpyrazine, which were also identified in our study in different French wine samples.

#### 4. Conclusions

This study shows the development of an HS-SPME method and its validation by GC-MS. The method allows the simultaneous determination of 24 heterocyclic compounds in the wine in the single chromatographic run. The use of a central composite design and the response surface methodology allowed the optimum combination of the analytical variables (pH, NaCl and extraction time) to be determined. The reliability is reported using validation criteria considering the linearity, repeatability, reproducibility and accuracy.

This method constitutes a fundamental tool for gathering useful information concerning the identification of the main heterocyclic compounds in wines and their potential influence on the wine odor.

#### Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the financial support of a doctoral sandwich program, as well the ISVV (Institut des Sciences de la Vigne et du Vin) of the University of Bordeaux, France. The authors gratefully acknowledge Miss Melanie Lagarone for technical support during method initiation.

#### References

- [1] G. Styger, B. Prior, F.F. Bauer, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 38 (2011) 1145–1159.
- [2] R.P. Potman, Th.A. van Wijk, Mechanistic studies of the Maillard reaction with emphasis on phosphate-mediated catalysis, ACS Symposium Series 409, American Chemical Society, Washington, 1989, pp.182–195.
- [3] G. Vermin, J. Metzger, Bull. Soc. Chim. Belg. 90 (1981) 553–587.
- [4] L. Pripis-Nicolau, G. de Revel, A. Bertrand, A. Maujean, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 3761–3766.
- [5] E. Peynaud, J. Blouin, Le Gout du vin: Le grand livre de la Dégustation, fourth ed, 2006.
- [6] S. Marchand, G. de Revel, A. Bertrand, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 4890–4895.
- [7] S. Marchand, G. de Revel, J. Vercauteren, A. Bertrand, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 6160–6164.
- [8] S. Marchand, J. Almy, G. de Revel, J. Food Sci. 76 (2011) 861–868.
- [9] H. Keim, G. de Revel, S. Marchand, A. Bertrand, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 5803–5807.
- [10] W. Fan, Y. Xu, Y. Zhang, J. Agric. Food Chem. 55 (2007) 9956–9962.
- [11] A.C.S. Ferreira, S. Reis, C. Rodrigues, C. Oliveira, P.G. Pinho, J. Food Sci. 72 (2007) 314–318.
- [12] X. Mo, Y. Xu, W. Fan, J. Agric. Food Chem. 58 (2010) 2462–2469.
- [13] H.H. Jelen, M. Majcher, M. Dziadas, Anal. Chim. Acta 738 (2012) 13–26.
- [14] C.M. Anderson-Cook, C.M. Borror, D.C. Montgomery, J. Stat. Plann. Inference 139 (2009) 629–641.
- [15] A.-N. Yu, Z.-W. Tan, F.-S. Wang, Food Chem. 132 (2012) 1316–1323.
- [16] T. Pérez-Palacios, C. Petisca, A. Melo, I.M.P.L.V.O. Ferreira, Food Chem. 135 (2012) 1337–1343.
- [17] G. Antalick, M.-C. Perello, G. de Revel, Food Chem. 121 (2010) 1236–1245.
- [18] D. de la Calle García, S. Magnaghi, M. Reichenbacher, K. Danzer, J. High Res. Chromatogr. 19 (1996) 257–262.
- [19] S. Rocha, V. Ramalheira, A. Barros, I. Delgadillo, M.A. Coimbra, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 5142–5151.
- [20] J.S. Câmara, M.A. Alves, J.C. Marques, Anal. Chim. Acta 555 (2006) 191–200.
- [21] M. Zhang, Q. Pan, G. Yan, C. Duan, Food Chem. 125 (2011) 743–749.
- [22] S.E. Ebeler, M.B. Terrien, C.E. Butzke, J. Sci. Food Agric. 80 (2000) 625–630.
- [23] W. Wardenccki, P. Sowiński, J. Curyko, J. Chromatogr. A 984 (2003) 89–96.
- [24] M.S. Roriz, J.F. Osma, J.A. Teixeira, S.R. Couto, J. Hazard. Mater. 169 (2009) 691–696.
- [25] L. Lojzova, K. Riddelova, J. Hajslova, J. Zrostlikova, J. Schurek, T. Cajka, Anal. Chim. Acta 641 (2009) 101–109.
- [26] C.W. Ho, W.M. Wan Aida, M.Y. Maskat, H. Osman, Food Chem. 102 (2007) 1156–1162.
- [27] P. Schieberle, T. Hofmann, Identification of the Key Odorants in Processed Ribose-Cysteine Maillard Mixtures by Instrumental Analysis and Sensory Studies, London, RSC Special Publication-Royal Society of Chemistry, 1996, pp. 175–181.
- [28] L.J. Farme, D.S. Mottram, F.B. Whitfield, J. Sci. Food Agric. 49 (1989) 347–368.

## CAPÍTULO 6

### **APLICAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS NA CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE VINHOS FRANCESES QUANTO AO PERFIL DE AMINOÁCIDOS, GLUTATIONA E COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS-N,S,O**

Vívian Maria Burin<sup>1,2,3</sup>, Stéphanie Marchand<sup>1,2</sup>, Gilles de Revel<sup>1,2</sup> and  
Marilde T. Bordignon-Luiz<sup>3</sup>

1. Université de Bordeaux 2, ISVV, EA 4577, Unité de  
Recherche Oenologie, 33882 Villenave d'Ornon, France.

2. INRA, ISVV, USC 3666 oenologie, 33882 Villenave d'Ornon,  
France.

3. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos CAL/CCA,  
Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346,  
Itacorubi, CEP 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil.

## RESUMO

A relação entre a composição química dos vinhos e suas características sensoriais é muito complexa. Centenas de compostos tem sido identificados nos vinhos como importantes contribuintes para o 'bouquet' aromático. O objetivo deste trabalho foi identificar e quantificar o conteúdo de compostos heterocíclicos-N,S,O, glutationa e aminoácidos em vinhos procedentes de diferentes regiões vitícolas da França, de diferentes safras. Uma vez que estes compostos foram identificados, análises quimiométricas foram utilizadas para investigar a relação entre os compostos nitrogenados e os heterocíclicos, como também a influencia de fatores como safra e origem geográfica na concentração destes compostos. Foram analisados vinhos tintos procentes de três regiões vitícolas (Bordeaux, Bourgogne e Côtes du Rhône) e vinhos brancos (Bordeaux, Bourgogne, Côtes du Rhône e Alsace). A análise dos aminoácidos e glutationa reduzida e oxidada foi realizada por UHPLC acoplado ao detector de fluorescência. Para análise dos compostos heterocíclicos foi utilizado microextração em fase sólida e quantificação por CG-MS. Análise de correlação de Pearson demonstrou haver uma boa correlação entre o conteúdo de compostos heterocíclicos e o perfil de aminoácidos dos vinhos, principalmente entre os aminoácidos sulfurados e os compostos da classe dos tiazóis. Análise discriminante dos dados foi realizada separadamente para vinhos brancos e tintos e demonstrou que os vinhos foram claramente separados de acordo com a origem geográfica, tanto em relação ao perfil de aminoácidos quanto aos compostos heterocíclicos. Também, a análise de componentes principais e análise cluster demonstraram um clara separação de vinhos de uma mesma região de acordo com a safra ao considerar o conteúdo de heterocíclicos, principalmente para as safras mais antigas. A principal contribuição deste estudo foi mostrar uma triagem do perfil de compostos heterocíclicos nos vinhos Franceses, e observar a existência de correlações significativas com o conteúdo nitrogenado dos vinhos.

**Palavras-chave:** compostos heterocíclicos; vinhos; aminoácidos; glutationa.

## 1. INTRODUÇÃO

A relação entre a composição química dos vinhos e suas características sensoriais é muito complexa. Centenas de compostos têm sido identificados nos vinhos como importantes contribuintes para o aroma, sendo que a maioria deles estão presentes em concentrações muito pequenas, à nível de traços (EBELER, 2001). No entanto, mesmo em concentrações pequenas contribuem para a complexidade e a intensidade dos aromas, em alguns casos são responsáveis diretos pelos principais aromas dos vinhos (STYGER; PRIOR; BAUER, 2011), em outros participam indiretamente através de interações com outros componentes (LYTRA et al., 2012). Estes componentes que participam na percepção sensorial com os aromas compreendem diversas classes de compostos orgânicos, dos quais pode-se citar os aminoácidos, que além de ser uma fonte de nitrogênio para a levedura durante o processo de fermentação, também participam em muitas reações químicas que contribuem para as características sensoriais dos vinhos (MARCHAND; ALMY; DE REVEL, 2011).

Pripis-Nicolau et al. (2000), avaliaram a reação entre diferentes aminoácidos e compostos  $\alpha$ -dicarbonílicos sob condições estritas de baixo pH e baixa temperatura, condições estas que são encontradas durante a conservação e envelhecimento do vinho. Os autores observaram a formação de produtos odoríferos a partir destas reações, como por exemplo, compostos heterocíclicos nitrogenados, sulfurados e oxigenados, os quais são relacionados com os produtos da reação de Maillard. A reação de Maillard têm sido estudada a longo tempo e é de conhecimento que ela resulta da interação entre compostos aminos, principalmente aminoácidos, e carboidratos redutores. Os produtos originados são responsáveis por conferir notas aromáticas relacionadas com tostado, assado, enxofre, pipoca, avelã, frutas bem maduras, entre outros, que apresentam grande interesse devido sua complexidade (POTMAN; VAN WIJK, 1989). O grande número de produtos formados pela reação de Maillard tem sido frequentemente avaliado por vários autores, em uma grande diversidade de alimentos cozidos e em bebidas (MAGA; KATZ, 1975; FARMER; MOTTRAM; WHITFIELD, 1989; STARKENMANN; TROCCAZ; HOWELL, 2008).

A origem dos compostos heterocíclicos no aroma de alimentos e bebidas está relacionado com uma complexa série de reações. A formação de alguns componentes dos aromas, tais como os compostos pertencentes às classes das alquilpirazinas, dos furanos, dos tiofenos e dos tiazóis, em diferentes sistemas modelos de vinhos (baixo pH, meio

aquoso e baixa temperatura) tem sido estudados por diferentes pesquisadores, seja pela reação entre glicose com alanina, arginina e prolina (KROH, 1994) ou através da reação dos compostos carbonílicos (acetoina e acetol) e dicarbonílicos (glioal, metilglioal, diacetil e 2,3-pentanonona) com diferentes aminoácidos (PRIPIS-NICOLAU et al., 2000). Lee et al. (2001) observaram que a glutatona, um tripeptídeo que contém cisteína em sua estrutura, pode formar diversos compostos voláteis sulfurados, relacionados com sabor salgado e notas aromáticas próximas a de carne assada, ambos relatados como produtos aromáticos da reação de Maillard (LEE; JO; KIM, 2010).

Algumas bebidas alcoólicas, tais como cerveja, saquê, fermentado de arroz e alguns vinhos fortificados e licorosos contem quantidade consideráveis de substratos da reação de Maillard (MANCILLA-MARGALLI; LÓPEZ, 2002; OLIVEIRA e SILVA et al., 2008). Pesquisadores observaram que determinados vinhos, especialmente o vinho do Porto e vinhos envelhecidos, são caracterizados por notas aromáticas de tostado, grelhado e café, relatados com os principais produtos da reação de Maillard como pirazinas, furanos, tiofenos e tiazóis, que podem exercer forte influência no 'bouquet' do vinho (MARCHAND et al., 2002; OLIVEIRA e SILVA, et al. 2008; MARCHAND; ALMY; DE REVEL, 2011). Alguns destes heterocíclicos foram identificados em vinhos não oxidados (MARCHAND; DE REVEL; BERTRAND, 2000) e seu mecanismo de formação tem sido proposto por estes autores.

A partir dos anos 2000, pesquisadores identificaram seis compostos heterocíclicos sulfurados e 5 alquilpirazinas em vinhos de diferentes regiões da França (MARCHAND; DE REVEL; BERTRAND, 2000; KEIM et al., 2002). Assim, a proposta deste trabalho é suportada pela diversidade de compostos heterocíclicos propostos e pelo seu mecanismo de formação e por ter sido identificados em diversos alimentos e bebidas. Como consequência, um método de quantificação foi desenvolvido e validado (BURIN et al., 2013). Com isto, o objetivo deste estudos foi identificar a presença de novos compostos heterocíclicos em vinhos, determinar o conteúdo de glutatona e o perfil de aminoácidos dos vinhos procedentes de diferentes regiões vitícolas da França e de diferentes safras. Uma vez que estes compostos são identificados nos vinhos, através de análise estatística multivariada investigar a relação entre o perfil de aminoácidos e glutatona com a presenças dos heterocíclicos no vinhos; e avaliar a influência dos fatores safra e região vitícola na concentração dos compostos heterocíclicos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 REAGENTES QUÍMICOS

Os padrões analíticos utilizados (numerados na Tabela 2) foram obtidos das seguintes fontes comerciais: 1-36, 39, 41-44, 46-47 (Sigma–Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, França); 38 (Alfa Aesar A Johnson Matthey Company, Bischheim, França); 37, 40, 45 (Acros organics, Geel, Bélgica). O padrão interno para análise dos compostos heterocíclicos (2-metillpirazina-d<sub>6</sub>) foi obtido da CDN Isótopos (Quebec, Canadá), e para a análise dos aminoácidos, o padrão interno norvalina foi obtido da Sigma–Aldrich (St. Quentin-Fallavier, França). Todos os solventes foram grau HPLC. Etanol absoluto e metanol (pureza > 99%) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Água ultra pura (Milli-Q) foi obtida a partir do sistema Água Plus Milli-Q (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, França). Cloreto de sódio (99%) foi fornecido pela VWR-Prolabo (Fontenay-sous-bois, França). Todos os reagentes utilizados para fase móvel e para as reações de derivatização foram fornecidos pela Sigma–Aldrich (St. Quentin-Fallavier, França).

### 2.2 VINHOS

Vinhos franceses (77 amostras) de diferentes safras e procedentes de diferentes regiões vitícolas foram analisados. Vinhos brancos ( $n = 37$ ) foram obtidos de 4 regiões: Bordeaux, Bourgogne, Côtes du Rhône e Alsace, safras de 2003, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010. Vinhos tintos ( $n = 40$ ) foram obtidos de 3 regiões: Bordeaux, Bourgogne e Côtes du Rhône, safras de 1991, 1992, 1996, 1998, 1999, 2000, 2001, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008 2009, 2010. Os vinhos analisados são oriundos de garrafas independentes, obtidos diretamente de vinhedos franceses assegurando a autenticidade das amostras.

As análises enológicas clássicas dos vinhos brancos e tintos estão demonstradas na Tabela 1. Estas análises foram realizadas utilizando espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR – IRTracer-100, Shimadzu, França).

Tabela 1 - Parâmetros clássicos dos vinhos.

Análises	Vinho branco (n=37)		Vinho tinto (n=40)	
	Min.	Máx.	Min.	Máx.
pH	3,1	3,6	3,5	3,8
Acidez total (g/L ácido tartárico)	3,0	4,6	2,8	4,0
Acidez volátil (g/L ácido sulfúrico)	0,3	0,5	0,3	0,6
Açúcar total (glicose+frutose) (g/L)	0	4,8	0,1	1,5
Teor alcoólico (% v/v)	12,1	13,9	12,9	14,7

### 2.3 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (UHPLC)

As análises foram realizadas com UHPLC (UltiMate<sup>®</sup> 3000 Rapid Separation LC) (DIONEX, Estados Unidos), equipado com duas bombas em séries, auto injetor com controle de temperatura, forno de coluna e detector de fluorescência.

#### *Aminoácidos*

A análise de 21 L-aminoácidos foi realizada de acordo com método proposto por Pripis-Nicolau et al. (2001) com modificações. Foram preparados soluções estoque de cada aminoácido (500 mg/L) pela dissolução dos analitos em água ultrapura (Milli-Q) com adição de ácido, e estocadas a 4 °C sob proteção da luz. As soluções de trabalho utilizadas para a curva de calibração foram preparadas pela dissolução de cada solução estoque em diferentes concentrações. O padrão interno utilizado foi uma solução de norvalina (200 mg/L) em água ultrapura acidificada.

A fase móvel consistiu de tampão fosfato de sódio (pH = 6,65) adicionada de  $\beta$ -ciclodextrina (10 mM) como solvente A e etanol:acetonitrila:dimetilsulfoxida:água ultrapura (400:330:70:200 mL, respectivamente) como solvente B. As amostras foram primeiramente submetidas a uma reação de derivatização realizada automaticamente no sistema UHPLC, com o-ftaldeído (OPA) na presença de 2-sulfanil etanol e uma segunda reação de derivatização com iodoacético (IDA) para determinação dos aminoácidos sulfurados. Durante as reações de derivatização a temperatura do injetor foi mantida em 6 °C. Os aminoácidos foram eluídos no modo gradiente: 95-90% de solvente A durante 12 min, 90-70% durante 8 min, 70-40% durante 16 min, 40-20% por 2 min, mantendo esta condição por 5 minutos. Foi utilizado 15 minutos para recondicionar a coluna cromatográfica e preparar para uma

nova corrida cromatográfica (etapa de condicionamento). O fluxo do solvente foi 0,3 mL/min. Para a separação dos analitos foi usada coluna C18 (Xbridge TMBEH) (100 mm x 2,1mm, 3,5  $\mu$ m, Waters, França) mantendo a temperatura do forno da coluna em 40 °C. A detecção foi realizada com detector de fluorescência (FDL 3000), os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados foram de 356 e 445 nm, respectivamente.

Para a quantificação dos compostos foi utilizada curva de calibração, através do método de adição de padrão em vinho tinto e branco. Os resultados foram expressos em mg/L.

### *Glutathione*

A análise de glutathione reduzida (GSH) e glutathione oxidada (GSSG) foram realizadas de acordo com Marchand e de Revel (2010) com modificações. A coluna cromatográfica foi C18 (5  $\mu$ m) (Purospher STAR<sup>®</sup>) associada com uma coluna de guarda (250x4,6 mm) (Purospher STAR<sup>®</sup>) Merck (Darmstadt, Alemanha). A fase móvel A consistiu de tampão fosfato de sódio (10 mM, pH = 8,6) adicionada de  $\beta$ -ciclodextrina (3 mM) e a fase B foi metanol. Os analitos foram eluídos em condição isocrática: 90% de solvente A e 10% de solvente B, durante 10 minutos. O fluxo do solvente foi 0,8 mL/min. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 467 e 525 nm, respectivamente. Para a quantificação da glutathione 100  $\mu$ L de amostra de vinho ou da solução padrão, foi misturado com 900  $\mu$ L de tampão fosfato (0,01 mM, pH = 7,4) e então foi realizado uma reação de derivatização, realizada diretamente no equipamento antes de proceder a injeção, com naftaleno 2,3-dicarboxialdeído (NDA) da seguinte maneira: um volume de 4  $\mu$ L da amostra diluída foram misturados com 5  $\mu$ L de tampão borato (pH = 9,2) e então adicionado 1  $\mu$ L da solução de NDA (1 mg/mL), a qual foi homogeneizada por 5 segundos e mantida por 4 minutos para a realização da reação de derivatização e posteriormente injetado no cromatógrafo. A temperatura do injetor foi mantida durante toda a análise a 20 °C.

Para quantificar o teor de glutathione total fez-se necessário realizar uma reação de redução da glutathione oxidada (GSSG), e para isto foi utilizado como agente redutor o tris (2-carboxietil) fosfano (TCEP) (0,35 mM). A reação para a quebra da molécula de GSSG foi realizada conforme descrito: em 5  $\mu$ L de TCEP foram adicionados 5  $\mu$ L da amostra diluída em tampão fosfato, homogeneizado, mantido por 2

minutos para ocorrer a reação, e então injetado no cromatógrafo. Com esta reação é possível obter o conteúdo total de glutatona.

O teor de GSH foi determinado através de curva de calibração pelo método de adição de padrão em amostra de vinho tinto e branco, e o resultado expresso em mg/L. Para calcular glutatona oxidada (GSSG) foi utilizado a concentração de glutatona (GSH) *menos* a concentração de glutatona reduzida pelo TCEP, dividido por 2.

## 2.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Foram determinados 24 compostos heterocíclicos pertencentes a diferentes classes: pirazinas, tiofenos, furanos e tiazóis por cromatografia gasosa (CG-MS) de acordo com método descrito por Burin et al. (2013) (Capítulo 5). Para a extração dos compostos foi utilizado micro extração em fase sólida (SPME). Os parâmetros utilizados para a extração dos compostos foram determinados através de um delineamento experimental ( $3^3$ ) de acordo com o descrito em Burin et al. (2013) (Capítulo 5).

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA E QUIMIOMÉTRICAS

As análises estatísticas foram realizada usando o programa Statistica v.7 (Statsoft Inc., Tulsa, USA). Análise de variância, *one-way* (ANOVA) foi realizada com todos os resultados da composição dos vinhos. Teste de Tukey foi usado para comparação dos resultados quando estes apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Análise de variância *two-way* e Análise de Pareto foram conduzidas para verificar a influência dos fatores safra e local de produção (região vitícola) para cada composto analisado. Coeficiente de correlação de Pearson (R) foi utilizado para avaliar a força de correlação entre os compostos determinados. As análises multivariadas, análise de componentes principais (ACP), análise de Cluster e análise discriminante linear (ADL) foram realizadas com os dados autoescalados.

*Análise de Componentes Principais (ACP):* ACP foi utilizada para avaliar um grande número de variáveis originais que então foram convertidas em um novo conjunto de variáveis, denominadas de componentes. As análises foram baseadas em correlações e as variâncias calculadas como  $SS/(n-1)$ . Os autovalores maior que 1,0 foram utilizados para explicar a projeção dos ensaios no plano.

*Análise de Cluster (AC)*: a análise de Cluster foi aplicada para classificar um conjunto de dados em grupos de amostras que apresentam valores semelhantes da resposta avaliada. Para realização desta análise foi utilizado o método de Ward, e o dendograma das amostras foi construído com base na distância euclidiana (%). A fim de compara os resultados entre os grupos formados, foi realizado uma análise de variância (valor F) aplicando um método de agrupamento não hierárquico *K-means*, observando a distância a partir do centro de cada cluster. Através deste método foi possível confirmar as amostras de vinhos dentro de cada cluster sugerido pelo método de Ward. ANOVA-*one-way* e Teste de Tukey foram aplicados para identificar os contrastes. Valor-*p* acima de 0,05 foram considerados significativos.

*Análise Discriminante Linear (ADL)*: a ADL foi utilizada com objetivo de maximizar a variância entre os grupos e minimizar a variância dentro dos grupos. Assim, ADL foi utilizada para determinar quais são as variáveis que melhor discriminam entre os grupos e encontrar uma combinação linear das funções que melhor classificam estes grupos. Foram utilizadas na análise todas as variáveis a fim de usar todas as informações disponíveis para classificar as amostras de vinho. A matriz de classificação foi obtida através do método de validação cruzada. O poder discriminante de cada variável em relação a separação das amostras foi observado através do método de Wilk, usando como referência o valor de lambda.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O ponto inicial para a realização deste estudo foi determinar se os compostos heterocíclicos, glutatona e os aminoácidos presentes nos vinhos contém informações suficientes para distinguir vinhos provenientes de diferentes safras e regiões. Com esta proposta, foram avaliados amostras de vinho independentes obtidas diretamente de vinhedos franceses: Bordeaux, Bourgogne, Alsace e Côtes du Rhône. A Tabela 2 apresenta a caracterização deste vinhos quanto aos compostos heterocíclicos, glutatona e perfil de aminoácidos (valores máximos e mínimos encontrados).

Tabela 2 - Teores mínimos (Min) e máximos (Máx.) encontrados em amostras de vinhos brancos e tintos quanto ao conteúdo de aminoácidos, glutatona e compostos heterocíclicos.

Compostos	Vinho branco (n=37)		Vinho tinto (n=40)		Análise multivariada <sup>a</sup>		
	Min.	Máx.	Min.	Máx.	Safra	Região	
<i>Aminoácidos (mg/L)</i>							
1	Ácido aspártico	11,3	117,1	4,1	57,2	*	**
2	Ácido glutâmico	15,5	133,7	8,7	131,9	*	**
3	Cisteína	0,8	7,2	0,7	6,8	*	**
4	Asparagina	1,3	37,5	2,7	35,4	**	*
5	Serina	0,9	41,4	2,5	26,8	*	*
6	Glutamina	<0,1 <sup>b</sup>	3,4	<0,1 <sup>b</sup>	13,9	*	**
7	Glicina	4,9	30,9	1,6	29,3	*	*
8	Treonina	1,8	83,9	<0,8 <sup>b</sup>	17,6	*	ns
9	Arginina	3,1	73,6	3,0	66,9	**	***
10	Alanina	2,5	247,1	12,3	191,5	*	**
11	Ácido γ-aminobutírico	10,9	182,6	9,9	150,1	*	*
12	Tirosina	2,2	25,3	<0,3 <sup>b</sup>	6,5	*	ns
13	Etalonamina	14,5	4,7	3,9	19,3	ns	*
14	Valina	3,6	42,6	3,6	36,9	*	ns
15	Metionina	0,8	13,6	0,4	6,6	**	**
16	Triptofano	3,3	26,9	2,3	19,5	*	*
17	Fenilalanina	4,2	52,7	3,2	21,6	*	**
18	Isoleucina	1,53	22,4	1,0	14,3	*	**
19	Leucina	75	76,4	2,6	38,4	*	***
20	Ornitina	4,2	121,9	10,5	159,6	*	**
21	Lisina	1,0	93,9	0,9	31,6	ns	**
<i>Glutatona (mg/L)</i>							
22	GSH reduzida	<0,1 <sup>b</sup>	2,6	<0,1 <sup>b</sup>	13,9	*	*
23	GSSG	<0,1 <sup>b</sup>	0,9	<0,1 <sup>b</sup>	17,6	ns	*
<i>Compostos heterocíclicos (µg/L)</i>							
24	Tiazol	<0,2 <sup>b</sup>	3,3	<0,2 <sup>b</sup>	8,1	*	**
25	4-Metiltiazol	<0,3 <sup>b</sup>	1,2	<0,3 <sup>b</sup>	11,9	*	**
26	2-Etiltiazol	<0,1 <sup>b</sup>	0,2	<0,1 <sup>b</sup>	0,2	*	*
27	Benzotiazol	<0,1 <sup>b</sup>	6,2	0,2	3,6	*	*
28	2-Acetilozol	<0,4 <sup>b</sup>	1,9	<0,4 <sup>b</sup>	1,8	*	**
29	2-Metiltiazol	<0,1 <sup>b</sup>	0,4	<0,1 <sup>b</sup>	0,5	*	*
30	2,4,5-Trimetiloxazol	<0,1 <sup>b</sup>	0,4	<0,1 <sup>b</sup>	0,9	*	*
31	3-Acetil-2,5-dimetilfurano	<0,1 <sup>b</sup>	1,1	<0,1 <sup>b</sup>	0,9	*	*
32	2,3-Dihidrobenzofurano	<0,1 <sup>b</sup>	0,6	<0,1 <sup>b</sup>	0,8	*	**
33	2-Acetilfurano	1,3	21,0	6,2	50,2	*	*
34	5-Metil furfural	2,0	270,1	<0,1 <sup>b</sup>	27,4	**	**
35	3-Acetiltofeno	<0,4 <sup>b</sup>	2,1	<0,4 <sup>b</sup>	2,5	*	*
36	2-Acetiltofeno	<0,2 <sup>b</sup>	3,0	<0,2 <sup>b</sup>	2,2	*	*
37	2,3-Dimetiltiofeno	<0,1 <sup>b</sup>	0,2	<0,1 <sup>b</sup>	0,3	ns	*
38	2,5-Dimetiltiofeno	<0,1 <sup>b</sup>	0,5	<0,1 <sup>b</sup>	0,7	ns	*
39	2-Metilpirazina	<0,2 <sup>b</sup>	0,8	<0,2 <sup>b</sup>	1,2	*	**

Tabela 2 -*Continuação*

40	2-Acetilpirazina	<0,6 <sup>b</sup>	4,1	<0,6 <sup>b</sup>	4,8	**	**
41	2-Etilpirazina	<0,5 <sup>b</sup>	1,0	<0,5 <sup>b</sup>	1,2	*	**
42	2,6-Dimetilpirazina	<0,1 <sup>b</sup>	3,5	<0,1 <sup>b</sup>	4,0	*	*
43	2,3-Dietilpirazina	<0,1 <sup>b</sup>	0,9	<0,1 <sup>b</sup>	1,0	*	*
44	2-Etil-3-metilpirazina	<0,2 <sup>b</sup>	0,7	<0,2 <sup>b</sup>	0,8	*	*
45	2-Acetil-3-metilpirazina	<0,2 <sup>b</sup>	0,9	<0,2 <sup>b</sup>	1,2	*	*
46	2,3,5-Trimetilpirazina	<0,2 <sup>b</sup>	0,9	<0,2 <sup>b</sup>	1,0	*	*
47	2,3,5,6-Tetrametilpirazina	<0,3 <sup>b</sup>	<0,3 <sup>b</sup>	<0,3 <sup>b</sup>	1,1	ns	*

Os resultados são expressos como valores médios ( $n = 3$ ). Para todos os compostos o coeficiente de variação foi menor que 5%.

<sup>a</sup>Análise de variância realizada concomitante para todas as amostras de vinhos para avaliar o efeito de dois fatores (safra e região). ns, não significativo ( $p > 0,05$ ); \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

<sup>b</sup>Valor menor que o limite de detecção do método.

Sem dúvida, a primeira contribuição da Tabela 2 é a identificação de novos compostos heterocíclicos no vinho, que não foram antes descritos, com exceção do trabalho realizado por Burin et al. (2013) na validação do método para quantificação dos mesmos e sua aplicação em amostras de vinhos. Dentre os compostos avaliados, 16 compostos foram pela primeira vez quantificados em vinhos tranquilos brancos e tintos procedentes da França: benzotiazol, 2-metilthiazol, 3-acetil-2,5-dimetilfurano, 2,3-dihidrobenzofurano, 3-acetilthiofeno, 2,3-dimetilthiofeno, 2,5-dimetilthiofeno, 2-metilpirazina, 2-acetilpirazina, 2-etilpirazina, 2,6-dimetilpirazina, 2,3-dietilpirazina, 2-etil-3-metilpirazina, 2-acetil-3-metilpirazina, 2,3,5-trimetilpirazina e 2,3,5,6-tetrametilpirazina.

De maneira geral, os vinhos tintos apresentaram maior concentração de todos os compostos heterocíclicos avaliados neste trabalho, com exceção do benzotiazol, 3-acetil-2,5-dimetilfurano e 2-acetilthiofeno que apresentaram maior concentração em vinhos brancos. Entre os 24 compostos heterocíclicos determinados, somente a tetrametilpirazina não foi detectada em nenhuma amostra de vinho branco. Os compostos 2-acetilfurano e o 5-metil furfural, ambos heterocíclicos oxigenados, foram os compostos encontrados em maior concentração em todos os vinhos tintos e brancos analisados. Dados da literatura demonstram que o 2-acetilfurano, o qual é associado com o descritor aromático de caramelo, foi quantificado somente uma vez em vinhos Chardonnay (LEE; NOBLE, 2003). De acordo com a literatura, os compostos pertencentes a classe dos furanos contribuem para o *flavour* de alimentos e bebidas, e são responsáveis principalmente por notas aromáticas como balsâmico, caramelo, nozes e especiarias. Esta

maior concentração dos furanos identificadas nas amostras de vinhos, pode estar relacionada ao fato que os produtos da degradação de Amadori são dependentes do pH do meio, o qual deve ser igual ou inferior a 7 durante a formação destes produtos, induzindo assim sua formação (MARTINS; JONGEN; VAN BOEKEL, 2001). Também, os compostos heterocíclicos oxigenados, como o metilfurfural, têm sido detectado em sucos de frutas mantidos em temperatura entre 30 e 50 °C (DEL CASTILLO et al., 2000). Conforme proposto por Weenen (1998), as substâncias aromáticas geradas durante os primeiros estágios da reação de Maillard podem ser divididas em duas classes a partir do ponto de vista químico: aquelas que são formadas pela ciclização /condensação das deoxiosonas ou aquelas que são formadas após a fragmentação dos carboidratos. Dentre os produtos formados pela ciclização/condensação pode-se citar o 5-hidroxi metilfurfural (HMF), 5-metilfurfural e o furfural, os quais são frequentemente formados em elevadas concentrações. Dentre os produtos formados após a fragmentação dos carboidratos pode-se destacar as alquilpirazinas e tiazóis, ambos em baixas concentrações. Assim, pode-se afirmar que os resultados estão de acordo com a teoria da reação de Maillard.

Não há dados da literatura que demonstram a presença de todos os heterocíclicos detectados neste estudo em vinhos brancos e tintos. No entanto, em trabalhos anteriores, como aquele conduzido por Hashiba (1978) foram detectados alguns dos compostos do rearranjo de Amadori em vinhos brancos japoneses, sugerindo pela primeira vez que estes compostos podem ser formados em meio desfavorável, com relação a temperatura e pH do vinho. Posteriormente, Marchand, De Revel e Bertrand (2000) identificaram e quantificaram em vinhos cinco compostos heterocíclicos nitrogenados, sulfurados e oxigenados (thiazol, 4-metilthiazol, trimetiloxazol, acetiltiazol, 2-tiofenotiol) em vinho branco e tinto, champagne e vinhos fortificados franceses. Keim et al. (2002) quantificaram 5 compostos heterocíclicos nitrogenados procedentes de diferentes regiões da França e em vinhos fortificados da Região da Madeira. Todos os dados sugerem que estes compostos relacionados com a reação de Maillard, podem ser formados em condições desfavoráveis como as do vinho. É importante ressaltar que a grande maioria desses compostos ainda não apresenta valores de percepção olfativa descritos na literatura para vinhos. Mesmo que os valores detectados no presente estudo são inferiores aos limiares olfativos determinados por Marchand, De Revel e Bertrand (2000) para os compostos 2-acetiltiazole, trimetiloxazol e para o 4-metilthiazol, de acordo com Schieberle e Hofmann (1997) compostos quimicamente

similares podem atuar em sinergismo quando detectados em concentrações inferior ao seu limiar de percepção sensorial.

### *Análises Quimiométricas*

Os resultados referentes as análises estatísticas ANOVA, Teste de Tukey e Teste-F, foram realizados separadamente para as amostras de vinhos brancos e vinhos tintos, utilizando os resultados de aminoácidos, glutationa e compostos heterocíclicos. Com relação ao perfil de aminoácidos, observou-se que ambos vinhos brancos e tintos, mostraram haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os vinhos procedentes das diferentes regiões, com exceção da treonina para os vinhos tintos, serina, tirosina e valina para os vinhos brancos, que não apresentaram diferença significativa entre as regiões avaliadas. Com relação ao conteúdo de glutationa, este foi significativamente diferente entre os vinhos tintos das três regiões (Bordeaux, Borgogne e Cotês du Rhone), no entanto, nos vinhos brancos somente os aqueles da regiões da Alsace diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) das outras regiões avaliadas (Cotês du Rhône, Bordeaux e Borgogne), as quais não apresentaram diferença significativa entre si. Considerando o conteúdo de compostos heterocíclicos, foi observado que tanto nos vinhos tintos como nos brancos, os compostos pertencentes a classe dos tiazóis mostraram diferença significativa entre as regiões vitícolas. Os outros compostos heterocíclicos detectado, somente a soma total dos compostos pertencentes a cada classe (furanos, tiophenos e pirazinas) apresentaram diferença significativas ( $p < 0,05$ ) entre as amostras de vinhos de cada região.

A fim de avaliar a influência e a dependência dos fatores como safra e região vitícola na composição dos vinhos, foi realizado análise de variância (*two-way*) e também análise de Pareto. Estes testes multivariados foram realizados utilizando o perfil de aminoácidos e o conteúdo de compostos heterocíclicos que apresentaram diferença significativa em todas as amostras de vinho. De maneira geral, os teste demonstraram que a concentração da maioria dos compostos avaliados foi influenciada significativamente por ambos fatores, safra e região (Tabela 2). No entanto, para verificar a significância da interação safra  $\times$  região, foi realizado uma análise de Pareto, a qual demonstrou falta de interação entre estes fatores, tanto para os aminoácidos como para os compostos heterocíclicos presentes nos vinhos brancos e tintos (dados não mostrados).

De modo a verificar a existência de correlação entre o perfil de aminoácidos e dos compostos heterocíclicos nos vinhos, foi realizado análise de correlação de Person (R) considerando como nível de significância 5%. Os resultados mostraram haver fortes correlações entre estes parâmetros para os vinhos analisados. No vinhos tintos, foram observadas positivas e significativas ( $p < 0,05$ ) correlações entre cisteína e 4-metiltiazol (0,7) e com 2-acetiltiazol (0,5). A soma de todos os compostos heterocíclicos quantificados nos vinho foi correlacionada com o conteúdo dos aminoácidos cisteína (0,5) e metionia (0,6). Além disto, a metionina também mostrou significante correlação com o tiazol (0,8). Esta correlação entre aminoácidos sulfurados e os compostos da classe dos tiazóis (compostos heterocíclicos sulfurados) foi também evidenciada por Marchand et al. (2002) e Marchand, De Revel e Bertrand (2000). Estes autores afirmam que a cisteína apresenta interessante papel na gênese do *flavour* dos vinhos, uma vez que apresenta alta capacidade de reagir com moléculas carbonílicas e dicarbonílicas, o que induz a formação de diferentes compostos, especialmente aqueles pertencentes a classe dos tiazóis. Pripis-Nicolau et al. (2000) também observaram que ao reagir em solução modelo de vinho 14 aminoácidos e compostos carbonílicos, as moléculas odoríferas de maior relevância, como tiazóis e pirazinas, foram originadas na presença de aminoácidos sulfurados, especialmente com a cisteína. No presente estudo, os vinhos tintos também apresentaram correlação significativa entre a cisteína e as alquilpirazinas, especialmente para a trimetilpirazina (0,6). Nestes vinhos, os compostos da classe dos tiazóis tiveram maior correlação com a soma total dos aminoácidos que com cada aminoácidos individualmente. Glicina foi correlacionada com dihidrobenzofurano (0,6) e com o acetilfurano (0,5). Shen, Tseng, Wu (2007) estudaram a reação entre glicose e glicina em meio etanólico e aquoso, formação dos produtos e observaram que dentre os produtos formados, os compostos heterocíclicos da classe dos furanos foram os principais compostos originados pela glicina.

Considerando os compostos heterocíclicos nitrogenados, o 2-acetiltiazol apresentou forte correlação com os aminoácidos, com destaque para asparagina, alanina, arginina e ornitina ( $R > 0,6$ ) nos vinhos brancos, enquanto nos vinhos tintos os aminoácidos asparagina, alanina e argina foram correlacionados principalmente com o 2-acetil-3-metilpirazina e com a trimetilpirazina ( $R > 0,7$ ). Estes aminoácidos apresentam na sua estrutura química mais de uma grupo amina ligada a cadeia carbônica, o que pode estar envolvido na biossíntese das alquilpirazinas. Hwang, Hartman e Ho (1998) avaliaram a reatividade de

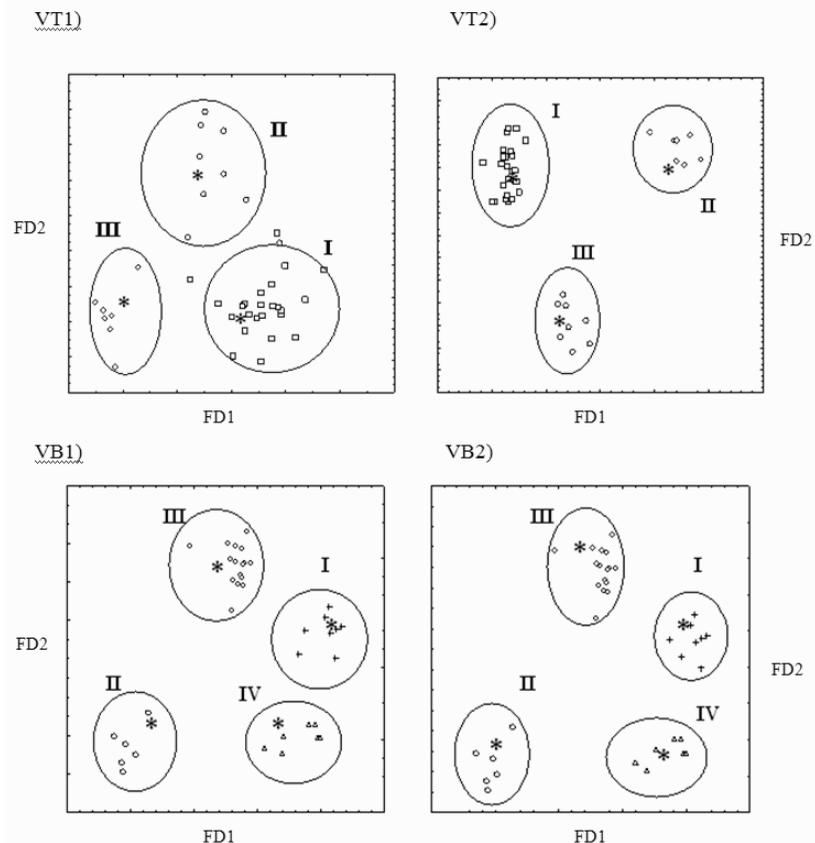
diferentes aminoácidos em solução modelo ( $\text{pH} = 7$ ) na formação das pirazinas, e observaram que o tipo de alquilpirazina formada e a concentração dependem da reatividade e do tipo de aminoácido. Os mesmos autores observaram que entre os aminoácidos avaliados, a asparagina mostrou forte contribuição para a formação da acetilpirazina.

Com base nas diferentes correlações obtidas entre os compostos individuais presentes nos vinhos brancos e tintos, observou-se a soma total de aminoácidos mostrou maior correlação com o conteúdo total de heterocíclicos ( $R > 0,8$ ) que com os aminoácidos individualmente.

Forte correlação foi observada entre glutatona e 5-metilfurfural, com valores de  $R = 0,82$  e  $0,79$  para vinhos brancos e tintos respectivamente. Lee et al. (2011) estudaram a correlação entre compostos voláteis e os atributos sensoriais dos produtos derivados da reação de Maillard com a glutatona em amostras de caldo de carne, e observaram que os compostos heterocíclicos da classe dos furanos foram os principais contribuintes para as características sensoriais das amostras.

Visto que as análises univariadas dos resultados demonstraram diferenças significativas entre as diferentes regiões vitícolas considerando o conteúdo de aminoácido, glutatona e heterocíclicos, foi aplicada análise discriminante linear (ADL) a fim de obter melhor classificação entre os grupos (Figura 1).

Figura 1 - Análise discriminante dos resultados para os vinhos tintos (VT) e vinhos brancos (VB) de acordo com a região vitícola. As variáveis utilizadas para análise foram: 1) compostos heterocíclicos; 2) aminoácidos e glutatona. (I) Bordeaux; (II) Cotês du Rhône; (III) Bourgogne; (IV) Alsace (A região de Alsace somente para vinhos brancos). Os centróides foram representados em cada região (\*).



Também foram determinados quais as variáveis que mais contribuíram para a separação das amostras. ADL foi realizado separadamente para vinhos brancos (VB) e tintos (VT) (Figura 1) utilizando como variáveis a composição de heterocíclicos dos vinhos (1) e o perfil de aminoácidos e glutatona (2), nos quais foi considerado como critério de separação as diferentes regiões vitícolas dos vinhos.

Foi possível observar boa separação entre as amostras de acordo com a origem dos vinhos. Os vinhos tintos (VT), apresentaram clara separação das amostras em três grupos, tanto ao considerar o conteúdo de compostos heterocíclicos (VT1) como também com o perfil de aminoácidos e glutatona (VT2), agrupando os vinhos de acordo com a região vitícola (Bordeaux, Borgogne e Côtes du Rhône). Considerando o peso de cada variável nas funções discriminantes, nos vinhos tintos separados de acordo com os compostos heterocíclicos (VT1), a função discriminante 1 foi principalmente relacionada com os compostos da classe dos tiazóis, todos com coeficientes de discriminação negativos, e a função discriminante 2 foi relacionada com os compostos da classe dos furanos. Em relação aos vinhos brancos (VB), os resultados foram similares aos dos vinhos tintos, onde pode-se observar boa separação das amostras de vinho em 4 grupos de acordo com a região vitícola (Bordeaux, Borgogne, Côtes du Rhône e Alsace). No entanto, as funções discriminantes nos vinhos brancos foram influenciadas por compostos heterocíclicos diferentes daquelas observadas para os vinhos tintos. Nos vinhos brancos (VB1) a função discriminante 1 foi principalmente relacionada com os compostos da classe dos tiofenos enquanto a função 2 com os furanos. Entre todos os aminoácidos e glutatona, tanto para os vinhos tintos (VT2) como para os brancos (VB2), os compostos que mais influenciaram as funções 1 e 2 foram ácido aspártico, cisteína, metionina, glicina, arginina e alanina. A similaridade entre as amostras agrupadas numa mesma região pode ser confirmada ao considerar a distância entre os centróides e as amostras de cada grupo, que foram muito próximas tanto na separação utilizando os compostos heterocíclicos como para os aminoácidos e glutatona. De acordo com a literatura, quanto menor a distância entre amostras e centróides maior é a similaridade entre as amostras de um mesmo grupo em relação a uma variável analítica (MONTGOMERY, 2001).

Outras pesquisas, assim como o presente trabalho, também demonstraram ser possível separar e classificar amostras de vinhos de acordo com sua origem de procedência ao considerar como variável o perfil de aminoácidos dos vinhos. Soufleros et al. (2003) avaliaram vinhos brancos procedentes de seis regiões vitícolas da Grécia quanto ao conteúdo de aminoácidos e observaram uma boa separação dos vinhos de acordo com a origem geográfica. Em outro estudo, Héberger, Csomos e Simon-Sarkadi (2003) também observaram uma clara separação das amostras de vinhos tintos e brancos de acordo com a região de procedência ao considerar o perfil de aminoácidos dos vinhos. No entanto, não há estudos na literatura que utilizam o perfil dos

compostos heterocíclicos como ferramenta para separação e classificação das amostras de vinho, sendo o presente trabalho o primeiro a demonstrar estes resultados.

A Tabela 3 resume os resultados da matriz de classificação obtidos da análise discriminantes, o qual mostra que a média de classificação correta foi de 98,7% e 99% para os vinhos brancos e vinhos tintos, respectivamente. Estes valores são próximos aos valores preditos pelo modelo, que foram 97,7 para vinhos brancos e 98,2% para os tintos.

Tabela 3 - Matriz de classificação dos vinhos brancos (VB) e vinhos tintos (VT) considerando os compostos heterocíclicos (CH), aminoácidos (Aa), e glutatona (GSH) de acordo com a região vitícola.

	Bx (%)		Bourg (%)		CDR (%)		Als (%)		Classification total (%)
	CH	Aa+GSH	CH	Aa+GSH	CH	Aa+GSH	CH	Aa+GSH	
<b><u>WW</u></b>									
Bx	93	96	1	0	0	0	0	0	99
Bourg	0	0	98	97	0	0	0	0	100
CDR	0	0	0	0	100	100	0	0	100
Als	2	1.5	0	0	0	0	96	100	98
<b><u>RW</u></b>									
Bx	97	100	0	0	0	0			100
Bourg	0	0	98	99	0	0			98
CDR	1	0	0	0	96	98			93

Bx: Bordeaux; Bourg: Bourgogne; CDR: Côtes du Rhône; Als: Alsace.

Todos os vinhos apresentaram boa porcentagem de classificação de acordo com a região vitícola, sendo que as amostras classificadas 100% corretas formam os vinhos brancos da região de Bourgogne e Cotês du Rhône, e os vinhos tintos da região de Bordeaux. Considerando que a porcentagem dos resultados preditos foi muito similar aos obtidos na classificação real das amostras, pode-se afirmar que os resultados desta análise são satisfatórios e aceitáveis, e que as variáveis selecionadas foram capazes de classificar e diferenciar estes vinhos de acordo com a região de origem. Para confirmar o poder discriminatório das variáveis em separar as amostras de vinhos foi realizado teste de Wilk, o qual apresentou valores para todas as variáveis utilizadas na análise discriminante (compostos heterocíclicos, aminoácidos e glutatona) menores que 1, com  $p < 0,05$ , confirmando o poder discriminatório das variáveis utilizadas (dados não mostrados). Estes resultados mostraram que os vinhos franceses das diferentes

regiões apresentam características particulares em relação a composição estudada neste trabalho.

Considerando que as amostras apresentaram boa separação de acordo com a região vitícola, a qual foi evidenciada pela análise discriminante, utilizou-se análise de componentes principais (ACP) para avaliar a separação das amostras em relação a safra e correlacionar quais variáveis mais contribuíram para esta separação. No entanto, para evitar a interferência da região vitícola, ACP foi realizada com vinhos de diferentes safras procedentes de mesma região. Assim, ACP foi aplicado para amostra de vinhos tintos da região de Bordeaux utilizando o perfil de compostos heterocíclicos.

Antes de realizar a análise de componentes principais, foram verificados os níveis de correlação e significância entre as variáveis de estudo (compostos heterocíclicos) através de análise fatorial dos dados (dados não mostrados). A matriz de correlação dos dados demonstrou que a maioria das variáveis apresentaram valores superiores a 0,500, o qual demonstra que a correlação entre as variáveis variou de moderada a forte (MONTGOMERY, 2001).

A distribuição das variáveis nas componentes principais (*factor loadings*) demonstraram que entre todas as variáveis, a soma total dos compostos pertencentes a classe dos heterocíclicos (furanos, tiofenos, tiazóis e pirazinas) foram os que mais contribuiu para a formação das duas componentes principais (*factor loading* > 0,7;  $p < 0,05$ ). Assim, foram utilizados para ACP a soma total dos compostos detectados na classe dos furanos, tiofenos, tiazóis e pirazinas (Figura 2A). ACP demonstrou que as duas primeiras componentes principais foram capazes de separar os vinhos de acordo com a safra, representando 80% da variabilidade total dos dados. Esta porcentagem aumenta para 90,1% quando uma terceira componente é adicionada. Os vinhos referentes as safras mais antigas (safras entre os anos de 1991 e 2000) foram localizados no lado esquerdo da componentes 1 (CP1), enquanto que os vinhos de safras mais jovens foram localizados no lado direito desta componente. Os resultados indicam que todas as classes de heterocíclicos apresentaram maior correlação com a CP1 e foram relacionados com a discriminação das amostras, apresentando forte correlação com as safras mais antigas.

Figure2- Análise estatística das amostras de vinhos tintos procedentes da Região de Bordeaux, de diferentes safras. (A) Análise de componentes principais utilizando como variáveis a soma dos compostos heterocíclicos detectados em cada classe: furanos, tiazóis, tiofenos e pirazinas definidos pelas duas primeiras componentes (CP1 x CP2); (B) Dendrograma da análise de Cluster usando todos os compostos heterocíclicos individuais, realizado pelo método de Ward.

(A)

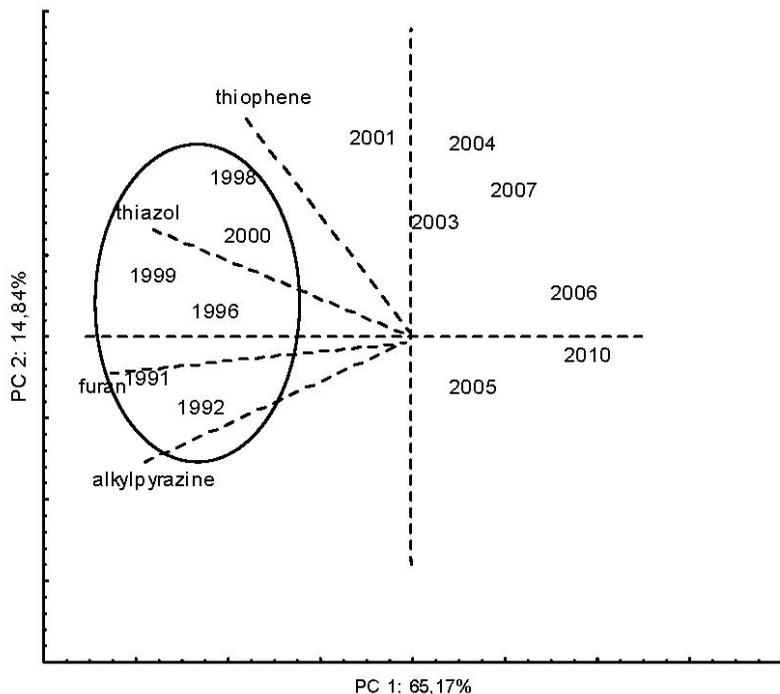
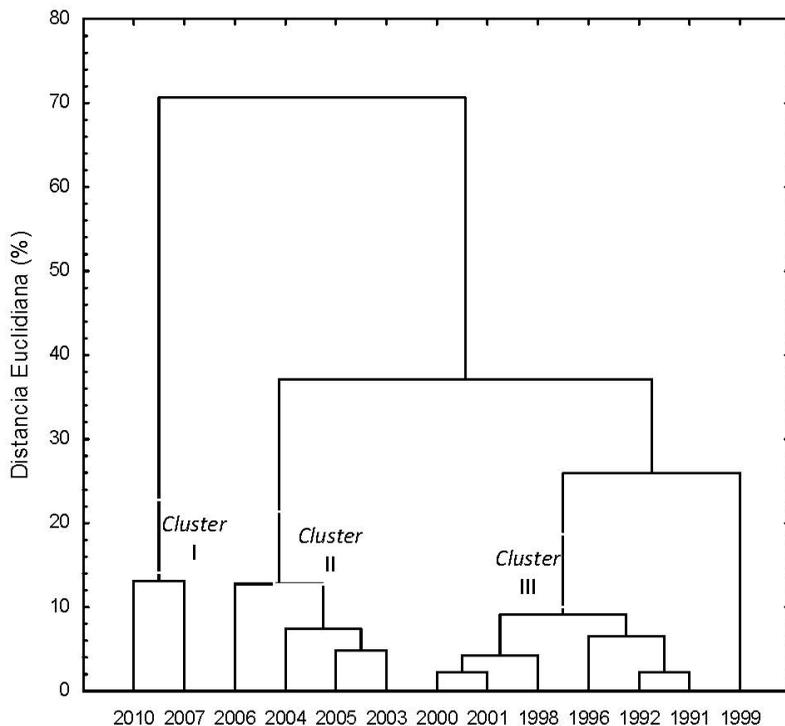


Figura 2 -*Continuação*  
(B)



A análise de agrupamento hierárquico (análise de cluster) também foi aplicada aos vinhos tintos da região de Bordeaux de diferentes safras (Figura 2B). Para esta análise também foram utilizados os compostos heterocíclicos, e com base na distância euclidiana (%) foi observado a formação de 3 grupos de amostras, denominados de *cluster*. No grupo I foram agrupadas as amostras de vinho referentes as safras mais jovens (2010 e 2007), enquanto que o grupo III foi formado pelas safras mais antigas (safras entre os anos de 1991 e 2000). Esta separação consiste essencialmente no mesmo resultado obtido quando aplicado ACP. A fim de certificar que as variáveis utilizadas para a separação das amostras em grupos foram significativas foi aplicado uma outra análise de agrupamento não hierárquico denominada de *K-means*,

a qual demonstrou através da análise de variância (valor-F) que todos as variáveis utilizadas (compostos heterocíclicos) foram significativos na separação dos grupos ( $p < 0,05$ ), e que a maior contribuição para a formação destes grupos foi devido a presença dos compostos da classe dos furanos, seguido dos tiazóis e pirazinas, com valores-F de 23, 18 e 10, respectivamente.

#### 4. CONCLUSÃO

A análise de correlação demonstrou que os compostos heterocíclicos apresentaram boa correlação com o perfil de aminoácidos dos vinhos, principalmente entre os aminoácidos sulfurados e os compostos tiazóis. No geral, pode-se concluir que as amostras de vinhos de diferentes regiões geográficas da França mostraram diferenças significativas na composição de aminoácidos e compostos heterocíclicos, como também, os vinhos foram separados de acordo com a origem. Além disto, vinhos procedentes da região de Bordeaux, de diferentes safras foram separados de acordo com o perfil de heterocíclicos, principalmente os vinhos de safras mais antigas, que foram correlacionados com as diferentes classes de compostos heterocíclicos estudadas. A principal contribuição deste estudo foi mostrar uma triagem do perfil de compostos heterocíclicos nos vinhos Franceses, e observar a existência de correlações significativas com o conteúdo nitrogenado dos vinhos. No entanto, como foi o primeiro estudo realizado para identificação de 17 novos compostos heterocíclicos em vinhos franceses, faz-se necessário estudos futuros com maior número de amostras e maior homogeneidade, como por exemplo, avaliar vinhos de diferentes safras procedentes de outras regiões vitícolas da França.

#### Acknowledgements

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior) pelo apoio financeiro para realização deste trabalho e para realização do doutorado 'Sanduíche' na *Université de Bordeaux 2*, França. Também agradecemos o *Institut des Sciences de la Vigne et du Vin* (ISVV) da *Université de Bordeaux 2*, França. Os autores agradecem Céline Franc pelo suporte técnico durante a análise dos compostos voláteis.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos de extração para a determinação de compostos bioativos avaliados foram ELL, SPE, QuEChERS e ultrassom. A extração líquido-líquido mostrou os melhores resultados de precisão e repetibilidade. Este método é caracterizado por ser fácil, simples e empregar curto tempo de análise. Com a caracterização de compostos fenólicos em variedades de uvas tintas e brancas das espécies de *Vitis vinifera* e *Vitis labrusca* cultivadas no Brasil, observou-se que o tipo e a concentração destes compostos são mais dependentes da variedade de uva do que da espécie. Uvas de *V. labrusca* apresentaram alto potencial atividade associado a presença dos compostos bioativos.

O processo de clarificação exerceu forte influência na composição química dos mostos como também na composição volátil e não volátil dos vinhos. Os resultados demonstraram que o tempo de clarificação do mosto alterou significativamente o conteúdo nitrogenado do mosto, especialmente a concentração de aminoácidos, que foi maior no menor tempo de clarificação (12 h). O tempo de clarificação do mosto também influenciou significativamente na composição volátil do vinho. Os mostos clarificados durante menor tempo, que apresentaram maior conteúdo de nitrogênio, foram correlacionados principalmente com os aromas varietais, monoterpenos e C13-norisoprenóides, enquanto mosto clarificado durante maior tempo (30 h) originou vinho com predomínio de aromas fermentativos, como os ésteres.

Os agentes clarificantes acarretaram diferenças significativas na composição dos mostos e dos vinhos. A composição nitrogenada do mosto foi influenciada pelo agente clarificante, com exceção do íon amônio. O uso de bentonite resultou em mosto com menor concentração de nitrogênio enquanto a adição de enzima no mosto provocou efeito contrário. Durante o processo de fermentação foi observado haver diferença significativa na taxa de consumo de cada aminoácido em função do agente clarificante. Além disto, os agentes clarificantes utilizados no mosto influenciaram no perfil volátil dos vinhos. Esta relação é principalmente associada à composição de nitrogênio do mosto obtida após a clarificação, principalmente aminoácidos e nitrogênio assimilável. Vinhos obtidos da clarificação do mosto com enzima apresentaram maior concentração de aromas varietais, como terpenos e norisoprenóides, enquanto que a clarificação com bentonite resultou em vinhos com maior concentração dos ésteres majoritários e de sulfeto de hidrogênio. Foi observado uma relação entre os aminoácidos, arginina e

alanina, que mais contribuíram como fonte de nitrogênio assimilável pelas leveduras, com a formação dos compostos voláteis nos vinhos, principalmente para os ésteres.

Foi desenvolvido e validado um método por CG-MS com microextração em fase sólida para a determinação simultânea de 24 compostos heterocíclicos sulfurados, nitrogenados e oxigenados em vinhos. O uso de um delineamento central composto ( $3^3$ ) e metodologia de superfície resposta, permitiu obter as melhores condições de extração que foram empH de 5,5 com 3 g de NaCl e a extração realizada durante 55 minutos. O método apresentou excelente precisão, exatidão, e limites de detecção e quantificação.

A análise de vinhos tintos e brancos de diferentes safras e regiões vitícolas da França quanto ao perfil de aminoácidos, glutatona e compostos heterocíclicos sulfurados, nitrogenados e oxigenados, mostrou que os compostos heterocíclicos apresentaram boa correlação com o perfil de aminoácido dos vinhos, principalmente entre os aminoácidos sulfurados e os tiazóis (heterocíclicos sulfurados). Os vinhos provenientes de diferentes origens geográficas foram separados de acordo com a composição de aminoácido e também de compostos heterocíclicos-S,N,O. Vinhos tintos de uma mesma região foram separados de acordo com a safra ao considerar o perfil de compostos heterocíclicos. Este trabalho identificou pela primeira vez em única corrida cromatográfica 24 compostos heterocíclicos em vinhos, os quais influenciam no *bouquet*.

## REFERÊNCIAS

AMERINE, M. A.; OUGH, C. S. *Análisis de vinos y mostos*. Zaragoza: Acribia. 1976. 158p.

ANCÍN, C.; AYESTARIN, B.; CORROZA, M.; GARRIDO, J.; GONZÁLEZ, A. Influence of prefermentation clarification on the higher alcohol contents of wines. *Food Chemistry*, v.55, p.241-249, 1995.

ANCÍN, C.; AYESTARAN, B.; GARRIDO, J. Clarification by vacuum filtration of Grenache must. Utilization of free amino acids during fermentation and bottle-aging of wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.47, p.313-322, 1996.

ANCÍN, C.; AYESTARÁN, B.; CORROZA, M.; GARRIDO, J.; GONZÁLEZ, A. Influence of prefermentation clarification on the higher alcohol contents of wines. *Food Chemistry*, v.55, p.241-249, 1996.

ANCÍN-AZPILICUETA, C.; FRAILE-JIMÉNEZ DE MAQUIRRIAIN, P.; GARDE-CERDÁN, T.; TORREA-GOÑI, D. *Influence of inoculation of selected yeast on the quality of rosé and white wines*. In: RILEY, A. P. (Ed.). *Food research, safety and policies*. New York: Nova Science Publishers, 2005, p.57-92.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid phase extraction” for the determination of pesticides residues in produce. *Journal of AOAC International*, v.86, p.412-431, 2003.

ANTALICK, G. *Bilan biochimique et sensoriel des modifications de la note fruitée des vins rouges lors de la fermentation malolactique: Rôle particulier des esters*. Thèse de doctorat, Bordeaux, França. 2010. p.265.

ANTALICK, G.; PERELLO, M-C.; DE REVEL, G. Development, validation and application of a specific method for the quantitative determination of wine esters by headspace-solid-phase microextraction-

gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, v.121, p.1236-1245, 2010.

ANTALICK, G.; PERELLO, M-C.; DE REVEL, G. Characterization of Fruity Aroma Modifications in Red Wines during Malolactic Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.60, p.12371-12383, 2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

AOAC. *Official methods of analysis of AOAC International*. (18 ed.) Mayland: AOAC International, 2005.

ARDREY, R. E. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*. Huddersfield: Wiley, 2003.

ARMADA, L.; FALQUÉ, E. Repercussion of the clarification treatment agents before the alcoholic fermentation on volatile composition of white wines. *European Food Research and Technology*, v.225, p.553-558, 2007.

ARMADA, L.; FERNÁNDEZ, E.; FALQUÉ, E. Influence of several enzymatic treatments on aromatic composition of white wines. *LWT - Food Science and Technology*, v.43, p.1517-1525, 2010.

ARNOLD, W. N. *Autolysis*. In: ARNOLD, W. N. (Ed.). *Yeast Cell Envelopes. Biochemistry, Biophysics and Ultrastructure*. vol. 2. Boca Raton: CRC Press. 1981. p. 93-103.

AYESTARAN, B. M.; ANCÍN, M. C.; GARCIA, A. M.; GONZALEZ, A.; GARRIDO, J. J. Influence of Prefermentation Clarification on Nitrogenous Contents of Musts and Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.43, p.476-482, 1995.

BADERSCHNEIDER, B.; WINTERHALTER, P. Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, p.2788-2798, 2001.

BALÍK, J.; KYSELÁKOVÁ, M.; TRÍSKA, J.; VRCHOTOVÁ, N.; VEVERKA, J.; HÍC, P.; TOTUŠEK, J.; LEFNEROVÁ, D. The Changes of Selected Phenolic Substances in Wine Technology. *Czech Journal of Food Sciences*, v.2, S3-S12, 2008.

BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; JANSSEN, H. -G.; CRAMERS, C. A. Study into the Equilibrium Mechanism between Water and Poly(dimethylsiloxane) for Very Apolar Solutes: Adsorption or Sorption? *Analytical Chemistry*, v.71, p.5213-5216, 1999.

BARBOSA, C.; MENDES-FAIA, A.; MENDES-FERREIRA, A. The nitrogen source impacts major volatile compounds released by *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v.160, p.87-93, 2012.

BARNABÉ, D.; VENTURINI, W. G.; BOLINI, H. M. A. Análise Descritiva Quantitativa de Vinhos Produzidos com Uvas Niágara Rosada e Bordô. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.10, p.122-129, 2007.

BARRE, P.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; FEUILLAT, M.; SABLAYROLLES, J.M.; SALMON, J.M. La levure de fermentation alcoolique. In: FLANZY, C. (Ed.) Oenologie: fondements scientifiques et technologiques. Paris: Tec Doc Lavoisier. 1998. p.454-497.

BELL, S.J.; HENSCHKE, P.A. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, v.11, p.242-295, 2005.

BELOQUI, A. A.; BERTRAND, A. Study of sulfur compounds in wine: Preliminary results. *Italian Journal of Food Science*, v.3, p.279-288, 1995.

BELY, M.; SABLAYROLLES, J.-M.; BARRE, P. Automatic Detection of Assimilable Nitrogen Deficiencies during Alcoholic Fermentation in Oenological Conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.70, p.246-252, 1990.

BERTRAND, A. Volatiles from grape must fermentation. In E. Horwood (Ed.),

*Flavour of distilled beverages. Origin and development* (pp. 93–109).  
Chichester:  
Pigott, J.R. 1983.

BETÉS-SAURA, C.; ANDRÉS-LACUEVA.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Phenolics in white free run juices wines from Penedès by High-Performance Liquid Chromatography: Changes during vinification. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v.44, p.3040-3046, 1996.

BÉZIER, A.; LAMBERT, B.; BAILLIEU, F. Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, v.108, p.111-120, 2002.

BIDAN, P.; FEUILLAT, M.; MOULIN, J. P. Les vins mousseux. Rapport français. 65eme assemblee Generales de l'OIV. Bulletin de l'Office International de la vigne et du vin, p.563-626, 1986.

BISSON, L. (1991). *Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes*. In: Rantz, J.; Davis, C. A. (Eds.). Proceedings of the international symposium on nitrogen in grapes and wines. American Society for Enology and Viticulture. 1991. p. 178–189.

BLATEYRON, L.; ORTIZ-JULIEN, A.; SABLAYROLLES, J. M. (2003). Stuck fermentations: Oxygen and nitrogen requirements - Importance of optimising their addition. *Australian and New Zeland Grapegrower Winemaker*, 478, 73–79.

BOULTON, R.; SINGLETON, V. L.; BISSON, L. F.; KUNKEE, R. E. *Principles and Practices of Winemaking*. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc. 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.

BURIN, V. M.; COSTA, L. L. F.; ROSIER, J. P.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Cabernet Sauvignon wines from two different clones, characterization and evolution during bottle ageing. *LWT - Food Science and Technology*, v.44, p.1931-1938, 2011.

BURIN, V. M.; MARCHAND, S.; De REVEL, G.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Development and validation of method for heterocyclic compounds in wine: Optimization of HS-SPME conditions applying a response surface methodology. *Talanta*, v.117, p.87–93, 2013.

BURIN, V. M.; FERREIRA-LIMA, N. E.; PANCERI, C. P.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. *Microchemical Journal*, v.114, p.155–163, 2014.

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.

CANTOS, E.; GARCÍA-VIGUERA, C.; DE PASCUAL-TERESA, S.; TOMÁS-BARBERÁ, F.A. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.4606-4612, 2000.

ČAPOUNOVÁ, D.; DRDÁK, M. Comparison of some commercial pectic enzyme preparations applicable in wine technology. *Czech Journal of Food Sciences*, v.20, p.131-134, 2002.

CARRAU, F.; MEDINA, K.; FARINA, L.; BOIDO E.; HENSCHKE, P.; DELLACASSA, E. Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Res*, v.8, p.1196–1207, 2008.

CARRAU, F. M.; MEDINA, K.; BOIDO, E.; FARINA, L.; GAGGERO, C.; DELLACASSA, E.; VERSINI, G.; HENSCHKE, P. A. De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, v.243, p.107-115, 2005.

CASTILLO-SÁNCHEZ, J. X.; GARCÍA-FALCÓN, M. S.; J. GARRIDO, J.; MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; MARTINS-DIAS, L. R.; MEJUTO, X. C. Phenolic compounds and colour stability of Vinhão

wines: Influence of wine-making protocol and fining agents. *Food Chemistry*, v.106, p.18-26, 2008.

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.

CHEYNIER, V.; BASIRE, N.; RIGAUD, J. Mechanism of *trans*-caffeoyltartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 37, p.1069-1071, 1989.

CHEYNIER, V.; SILVA, J. M. R. Oxidation of grape procyanidins in model solutions containing *trans*-caffeoyltartaric acid and polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.39, p.1047-1049, 1991.

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

CLARKE, R. J.; BAKKER, J. *Wine Flavor Chemistry*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2004.

COLNAGO, L. C.; ALMEIDA, F. C. L.; VALENTE A. P.. Espectrometria de massa e RMN multidimensional e multinuclear: Revolução no estudo de macromoléculas biológicas. *Química Nova*, v.16, p.9-14, 2002.

COOPER, T.G. *Nitrogen metabolism in 'Saccharomyces cerevisiae'*. In: STRATHERN, J. N.; JONES, E.W.; BROACH, J. R. (Eds.). *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 1982. p.39-99.

COOKE, R.C.; VAN LEEUWEN, K. A.; CAPONE, D.L.; GAWEL, R.; ELSEY, G. M.; SEFTON, M. A. Odor Detection Thresholds and Enantiomeric Distributions of Several 4-Alkyl Substituted  $\gamma$ -Lactones in Australian Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, p.2462-2467, 2009.

COSTANTINI, A.; GARCÍA-MORUNO, E.; MORENO-ARRIBAS, V. *Biochemical Transformations Produced by Malolactic Fermentation*. In: MORENO-ARRIBAS, V.; POLO, C. (Eds.). *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York:Springer Science Business. 2009. p.27-58.

COVAS, M. I.; MIRÓ-CASAS, E.; FITÓ, M.; FARRÉ-ALBADALEJO, M.; GIMENO, E.; MARRUGAT, J.; DE LA TORRE, R. Bioavailability of tyrosol, an antioxidant phenolic compound present in wine and olive oil, in humans. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, v.29, p. 203-206, 2003.

CULLERE, L.; ESCUDERO, A.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Gas Chromatography-Olfactometry and Chemical Quantitative Study of the Aroma of Six Premium Quality Spanish Aged Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, p.1653-1660, 2004.

DAMBROUCK, T.; MARCHAL, R.; MARCHAL-DELAHAUT, L.; PARMENTIER, M.; MAUJEAN, A.; JEANDET, P. Immunodetection of proteins from grapes and yeast in a white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.2727-2732, 2003.

DAUDT, C. E., BOEIRA, L. S., PEREIRA, C. N. Influência da adubação nitrogenada e de linhagens de leveduras nos teores de vinhos de *Vitis vinifera* c.v. Cabernet Sauvignon. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v.15, p.166-169, 1995.

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.

DEL CASTILLO, M. D.; VILLAMIEL, M.; OLANO, A.; CORZO, N. Use of 2-furoylmethyl derivatives of GABA and arginine as indicators of the initial step of Maillard reaction in orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48. p. 4217-4220, 2000.

DELFINI, C.; CONTERNO, L.; GIACOSA, D.; COCITO, C.; RAVAGLIA, S.; BARDI, L. Influence of clarification and suspended solid contact on the oxygen demand and long-chain fatty acid contents

of free run, macerated and pressed grape musts, in relation to acetic acid production. *Viticultural and Enological Sciences*, v.47, p.69-75, 1992.

DELGADO-ZAMARREÑO, M. M.; PÉREZ-MARTÍN, N. L.; BUSTAMANTE-RANGEL, M.; CARABIAS-MARTÍNEZ, R. A modified QuEChERS method as sample treatment before the determination of isoflavones in foods by ultra-performance liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, v.100, p.320-328, 2012.

DELOIRE, A.; VAUDOURE, 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.

DEL PRETE, V., COSTANTINI, A., CECCHINI, F., MORASSUT, M., & GARCIA-MORUNO, E. Occurrence of biogenic amines in wines: The role of grapes. *Food Chemistry*, v.112, p.474-481, 2009.

DIAZ-MAROTO, M. C.; SCHNEIDER, R.; BAUMES, R. "Formation Pathways of Ethyl Esters of Branched Short-Chain Fatty Acids during Wine Aging." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.3503-3509, 2005.

Di STEFANO, R. Advances in the study of secondary metabolites occurring in grapes and wines. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, v.25, p. 53-56, 1999.

DUBOURDIEU, D.; LAVIGNE-CRUEGE, V. The role of glutathione on the aromatic evolution of dry white wine. *Wine Internet Technical Journal*, v. 2, p.1-9, 2004. Disponível em: <http://www.infowine.com>. Acesso em: 20 dez. 2013.

DU TOIT, W. J.; LISJAK, K.; STANDER, M.; PREVOO, D. Using LC–MS to assess glutathione levels in South African white grape juices and wines made with different levels of oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.2765–2769, 2007.

DOWNEY, M.; HARVEY, J.; ROBINSON, S. Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape

berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera L.*). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, v.9, p.110-121, 2003.

EBELER, S.E. Analytical Chemistry: Unlocking the Secrets of Wine Flavor. *Food Reviews International*, v.17, p.45–64, 2001.

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.

ESCUADERO, A.; CAMPO, E.; FARINA, L.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Analytical Characterization of the Aroma of Five Premium Red Wines. Insights into the Role of Odor Families and the Concept of Fruitiness of Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.4501-4510, 2007.

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, C<sub>13</sub>-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.; DE REVEL, G.; PERELLO, M-C.; RQUIER, L.; ROSIER, J. P.; UBERTI, A. A.A.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Volatile Profile characterization of young Cabernet Sauvignon wines from a new growing Region in Brazil. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, v.42, p.133-144, 2008.

FARMER, L. J.; MOTTRAM, D. S.; WHITFIELD, F. B. Volatile Compounds Produced in Maillard Reactions Involving Cysteine, Ribose and Phospholipid. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , v.49, p.347–368, 1989.

FAZZALARI, F. A. *Compilation of Odor and taste threshold Values Data*. ASTM Data Series DS 48A. American Society for Testing and Materials: Philadelphia, PA, 1978.

FERNANDEZ, X.; KERVERDO, S.; DUÑACH, E.; LIZZANI-CUVELIER, L. Les hétérocycles dans la chimie des arômes. *L'actualité chimique*, 2002.

FERNÁNDEZ-ZURBANO, P.; FERREIRA, V.; PEÑA, C.; ESCUDERO, A.; CACHO, J. Effects of maceration time and pectolytic enzymes added during maceration on the phenolic composition of must. *Food Science and Technology International*, v. 5, p. 319-325, 1999.

FERRANDO, M.; GÜELL, C.; LÓPEZ, F. Industrial Wine Making: Comparison of Must Clarification Treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, p.1523-1528, 1998.

FERREIRA, B.; HORY, C.; BARD, M.H.; TAISANT, C.; OLSSON, A.; LE FUR, Y. Effects of skin contact and settling on the level of the C18:2, C18:3 fatty acids and C6 compounds in Burgundy Chardonnay musts and wines. *Food Quality and Preference*, v.6, p.35-41, 1995.

FERREIRA, V.; LOPEZ, R.; CACHO, J. Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.80, p.1659-1667, 2000.

FERREIRA, R. B.; PIÇARRA-PEREIRA, M. A.; MONTEIRO, S.; LOUREIRO, V. B.; TEIXEIRA, A. R. The wine proteins. *Trends in Food Science and Technology*, v.12, p. 230-239, 2002.

FISHER, U. *Wine aroma*. In: BERGER, R. G. (Ed.). *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Berlin Heidelberg. 2007. p. 241-267.

FRACASSETTI, D.; N. LAWRENCE, N.; TREDoux, A. G. J.; TIRELLI, A.; NIEUWOUDT, H. H.; DU TOIT, W.J. Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method. *Food Chemistry*, v.128, p.1136-1142, 2011.

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.

FUGELSANG, K. C.; EDWARDS, C. G. *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. 2 Ed. New York: Springer, 2007.

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.

GARDEN-CERDÁN, T.; LORENZO, C.; LARA, J. F.; PARDO, F.; ANCÍN-AZPILICUETA, C.; SALINAS, M. R. Study of the Evolution of Nitrogen Compounds during Grape Ripening. Application to Differentiate Grape Varieties and Cultivated Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, p.2410-2419, 2009.

GARDE-CERDÁN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, v.41, p.501-510, 2008.

GARCÍA-VILLAR, N.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S.; SAURINA, J. Characterization of Wines through the Biogenic Amine Contents Using Chromatographic Techniques and Chemometric Data Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.7453-7461, 2007.

GLÓRIA, M. B. A.; VIEIRA, S. M. Technological and toxicological significance of bioactive amines in grapes and wines. *Food*, v.1, p. 258-270, 2007.

GUITART, A.; HERNANDEZ-ORTE, P.; CACHO, J. Effect of Different Clarification Treatments on the Amino Acid Content of Chardonnay Musts and Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 49, p. 389-396, 1998.

GUITART, A.; HERNANDEZ-ORTE, P.; FERREIRA, V.; PENA, C.; CACHO, J. Some Observations About the Correlation Between the Amino Acid Content of Musts and Wines of the Chardonnay Variety and Their Fermentation Aromas. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 50, p. 253-258, 1999.

GÓMEZ-ALONZO, S.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; GARCÍA-ROMERO, E. Simultaneous HPLC Analysis of Biogenic Amines, Amino Acids, and Ammonium Ion as Aminoenone Derivatives in Wine and Beer Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.608-613, 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-MÍGUEZ, M. J.; GÓMEZ-MÍGUEZ, M.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. Assessment of colour and aroma in white wines vinifications: effects of grape maturity and soil type. *Journal of Food Engineering*, v.9, p.758-764, 2007.

GRIS, E. F.; MATTIVI, F.; FERREIRA, E. A.; VRHOVSEK, U.; WILHELM, D.; PEDROSA, R. C.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Stilbenes and Tyrosol as Target Compounds in the Assessment of Antioxidant and Hypolipidemic Activity of *Vitis vinifera* Red Wines from Southern Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, p.7954-7961, 2011.

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

GUITART, A.; HERNÁNDEZ-ORTE, P.; FERREIRA, V.; PEÑA, C.; CACHO, J. Some Observations about the Correlation Between the Amino Acid Content of Musts and Wines of the Chardonnay Variety and Their Fermentation Aromas. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.50, p.253-258, 1999.

GÜLÇİN, I. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.11, p.210-218, 2010.

- GUTH, H. Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.45, p.3027-3032, 1997.
- 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.
- HASHIBA, H. Isolation and identification of Amadori compounds from miso, white wine and Sake. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.42, p.1727-1731, 1978.
- HÉBERGER, K.; CSOMOS, E.; SIMON-SARKADI, L. Principal component and Linear Analysis of free Amino Acids and Biogenic Amines in Hungarian Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.8055-8060, 2003.
- HENSCHKE, P. A.; JIRANEK, V. *Yeast-metabolism of nitrogen compounds*. In: FLEET, G. H. (Ed.). *Wine Microbiology and Biotechnology*. Chur: Harwood Academic Publishers. 1993. p. 77-164.
- 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.
- HERNÁNDEZ-ORTE, P.; IBARZ, M. J.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Addition of amino acids to grape juice of the Merlot variety: Effect on amino acid uptake and aroma generation during alcoholic fermentation. *Food Chemistry*, v.98, p.300-310, 2006.
- HEYWOOD, V.H. *Flowering plants of the world*. London: Barsford Ltd. 1993.
- HOFMANN, T.; SCHIEBERLE, P. Flavor Contribution and Formation of the Intense Roast-Smelling Odorants 2-Propionyl-1-pyrroline and 2-Propionyltetrahydropyridine in Maillard-Type Reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 2721–2726, 1998.

HUANG, Z.; OUGH, C. S. Effect of vineyard locations, varieties, and rootstocks on the juice amino acid composition of several cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.40, p.135–139, 1989.

HWANG, T. C.; HARTMAN, L. Z.; HO, C. T. Mechanistic studies on thiasolidine formation on aldehyde/cysteamine model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, p.224-227, 1998.

ICH. Harmonised Tripartite Guideline, Q2(RI), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, 1995.

INMETRO. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos - DOQ-CGCRE-008. Rio de Janeiro, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. (IBGE). *Levantamento sistemático da produção agrícola*. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Brasília: IBGE, 2012. 126 p.

JACKSON, R.S. *Wine Science: Principle and Application*, California: Academic Press, 3ed., 2008, 751 p.

JANES, L.; LISJAK, K.; VANZO, A. Determination of glutathione content in grape juice and wine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, v.674, p.239-242, 2010.

JIRANEK V.; LANGRIDGE P.; HENSCHKE P. A. Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.461-467, 1995.

KARAGIANNIS, S.; LANARIDIS, P. Insoluble Grape Material Present in Must Affects the Overall Fermentation Aroma of Dry White Wines Made from Three Grape Cultivars Cultivated in Greece. *Journal of Food Science*, v.67, p.369-374, 2002.

KEIM, H.; DE REVEL, G.; MARCHAND, S.; BERTRAND, A. Method for Determining Nitrogenous Heterocycle Compounds in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.5803-5807, 2002.

KENNEDY, J. A.; MATTHEWS, M. A.; WATERHOUSE, A. L. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, v.55, p.77-85, 2000.

KOTSERIDIS, Y. *Etude de l'arôme des vins de Merlot et Cabernet-Sauvignon de la région bordelaise*. Thèse de doctorat. Université Victor Segalen Bordeaux 2: Bordeaux, France. 1999.

KROH, L.W. Caramelisation in Food and Beverages. *Food Chemistry*, v.51, p.373-379, 1994.

KUTYNA, D. R.; VARELA, C.; HENSCHKE, P. A.; CHAMBERS, P. J.; STANLEY, G. A. Microbiological approaches to lowering ethanol concentration in wine. *Trends and Food Science and Technology*, v.21, p.293-302, 2010.

LAGO-VANZELA, E. S.; DA-SILVA, R.; GOMES, E.; GARCÍA-ROMERO, E.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Phenolic Composition of the Edible Parts (Flesh and Skin) of Bordô Grape (*Vitis labrusca*) Using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, p.13136-13146, 2011.

LAMBRI, M.; DORDONI, R.; SILVA, A.; DE FAVERI, D. M. Effect of Bentonite Fining on Odor-Active Compounds in Two Different White Wine Styles. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.61, p. 225-233, 2010.

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.

LANDAUD, S.; HELINCK, S.; BONNARME, P. Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.77, p.1191-1205, 2008.

LANÇAS, F. M. *Cromatografia líquida de moderna: HPLC/CLAE*. Campinas: Editora Átomo, 2009.

LAVIGNE, V.; BOIDRON, J. N.; DUBOURDIEU, D. Formation des composés soufrés lourds au cours de la vinification des vins blancs secs. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, v.26, p.75–85, 1992.

LAVIGNE V.; PONS A.; DUBOURDIEU, D. Assay of glutathione in must and wines using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection: Changes in concentration in dry white wines during alcoholic fermentation and aging. *Journal of Chromatography A*, v.1139, p.130-135, 2007.

LEE, S.-J.; NOBLE, A. C. Characterization of Odor-Active Compounds in Californian Chardonnay Wines Using GC-Olfactometry and GC-Mass Spectrometry.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p. 8036-8044, 2003.

LEE, S. M.; JO, Y. -J.; KIM, Y. S. Investigation of the Aroma-Active Compounds Formed in the Maillard Reaction Between Glutathione and Reducing Sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.58, p.3116-3124, 2010.

LEE, J.; SCHREINER, R. P. Free amino acid profiles from ‘Pinot noir’ grapes are influenced by vine N-status and sample preparation method. *Food Chemistry*, v.119, p.484-489, 2010.

LEE, S. M.; KWON, G.Y.; KIM, K.-O.; KIM, Y.-S. 2011. Metabolomic Approach for Determination of Key Volatile Compounds Related to Beef Flavor in glutathione-Maillard Reaction Products. *Analytica Chimica Acta*, v.703, p.204–211, 2011.

LEITÃO, M. C.; MARQUES, A. P.; SAN ROMÃO, M. V. A survey of biogenic amines in commercial Portuguese wines. *Food Control*, v.16, p.199-204, 2005.

LEITE, Flávio. *Validação em análise química*. 4.ed. Campinas: Átomo. 2002. 278 p.

LIPKA, Z. Qualité des bentonites utilisées pour le traitement des moûts et des vins. *Revue suisse de viticulture*, VI, p.147-155, 1974.

LÓPEZ-RITUERTO, E.; AVENOZA, A.; BUSTO, J. H.; PEREGRINA, J. M. Evidence of Metabolic Transformations of Amino Acids into Higher Alcohols through  $^{13}\text{C}$  NMR Studies of Wine Alcoholic Fermentation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.58, p.4923-4927, 2010.

LOSADA, M. M.; ANDRÉS, J.; CACHO, J.; REVILLA, E.; LÓPEZ, J. F. Influence of some prefermentative treatments on aroma composition and sensory evaluation of white Godello wines. *Food Chemistry*, v.125, p.884-891, 2011.

LOSCOS, N.; HERNANDEZ-ORTE, P.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Release and Formation of Varietal Aroma Compounds during Alcoholic Fermentation from Nonfloral Grape Odorless Flavor Precursors Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.6674-6684, 2007.

LOUW, L.; TREDoux, A. G. J.; VAN RENSBURG, P.; KIDD, M.; NAES, T.; NIEUWOUDT, H. H. Fermentation-derived Aroma Compounds in Varietal Young Wines from South Africa. *South African Journal for Enology and Viticulture*, v.31, p.213-225, 2010.

LYTRA, G.; TEMPERE, S.; De REVEL, G.; BARBE J.-C. Impact of Perceptive Interactions on Red Wine Fruity Aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.60, p.12260-12269, 2012.

MAGA, J. A.; KATZ, I. The Role of Sulfur Compounds in Food Flavor Part I: Thiazoles. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.6, p.153-176, 1975.

MAGASANIK, B.; KAISER, C. A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, v. 290, p. 1-18, 2002.

MAKRIS, D. P.; PSARRA, E.; KALLITHRAKA, S.; KEFALAS, P. The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines. *Food Research International*, v.36, p.805-814, 2003.

MALOVANÁ, S.; GARCÍA MONTELONGO, F. J.; PÉREZ, J. P.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Optimisation of sample preparation for the determination of *trans*-resveratrol and other polyphenolic

compounds in wines by high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, v.428, p.245-253, 2001.

MANCILLA-MARGALLI, N. A.; LÓPEZ, M. G. Generation of Maillard Compounds from Inulin during the Thermal Processing of *Agave tequilana* Weber Var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.806-812, 2002.

MARCHAL, R.; JEANDET, P. *Use of Enological Additives for Colloid and Tartrate Salt Stabilization in White Wines and for Improvement of Sparkling Wine Foaming Properties*. In: MORENO-ARRIBAS, V.; POLO, C. (Eds.). *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York:Springer Science Business. 2009. p.127-160.

MARCHAND, S.; DE REVEL, G.; BERTRAND, A. Approaches to Wine Aroma: Release of Aroma Compounds from Reactions between Cysteine and Carbonyl Compounds in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.4890-4895, 2000.

MARCHAND, S. *Formation d'heterocycles aromatiques des vins a partir de la cysteine et des composés carbonyles*. Thèse doctorat de l'université Bordeaux 2, 2002.

MARCHAND, S.; DE REVEL, G.; VERCAUTEREN, J.; BERTRAND, A. Possible Mechanism for Involvement of Cysteine in Aroma Production in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.6160-6164, 2002.

MARCHAND, S.; DE REVEL, G. A HPLC fluorescence-based method for glutathione derivatives quantification in must and wine. *Analytica Chimica Acta*, v. 660, p. 158-163, 2010.

MARCHAND, S.; ALMY, J.; DE REVEL, G. The Cysteine Reaction with Diacetyl Under Wine-Like Conditions: Proposed Mechanisms for Mixed Origins of 2-Methylthiazole, 2-Methyl-3-thiazoline, 2-Methylthiazolidine, and 2,4,5-Trimethyloxazole. *Journal of Food Science*, v.76, C861–C868., 2011.

MARQUES, A.P.; LEITÃO, M.C.; SANROMÃO, M.V. Biogenic amines in wines: Influence of oenological factors. *Food Chemistry*, v.107, p.853-860, 2008.

MARTIN, B.; ETIÉVANT, P. X.; LE QUÉRÉ, J.-L. More clues of the occurrence and flavor impact of solerone in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.39, p.1501–1503, 1991.

MARTINS, S. I. F. S.; JONGEN, W. M. F.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. A Review of Maillard Reaction in Food and Implications to Kinetic Modelling. *Trends in Food Science and Technology*, v.11, p.364–373, 2001.

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.

MATTIVI, F. Resveratrol content in red and rose wines produced in Trentino (Italy) and currently available on the market. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, v.1, p.37-45, 1993.

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.

MELLO, L. M. R. *Vitivinicultura brasileira: panorama 2012*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013.

MENDES-FERREIRA, A.; BARBOSA, C.; FALCO, V.; LEÃO, C.; MENDES-FAIA, A. Hydrogen sulphide and other aroma compounds production by wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in synthetic media with different nitrogen concentrations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.36, p.571-583, 2009.

MESTRES, M.; BUSTO, O.; GUASCH, J. Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *Journal Chromatography A*, v.881, p.569–581, 2000.

MIRNAGHIA, F. S.; MOUSAVIA, F.; ROCHAB, S. M.; PAWLISZYN, J. Automated determination of phenolic compounds in wine, berry, and grape samples using 96-blade solid phase microextraction system coupled with liquid chromatography–tandem

mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1276, p.12-19, 2013.

MOIO, L.; UGLIANO, M.; GAMBUTI, A.; GENOVESE, A.; PIOMBINO, P. Influence of Clarification Treatment on Concentrations of Selected Free Varietal Aroma Compounds and Glycoconjugates in Falanghina (*Vitis vinifera* L.) Must and Wine. *American journal of Enology and Viticulture*, v.55, p.7-12, 2004.

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

MONTGOMERY, D. C. *Design and Analysis of Experiments*, 5 edition, John Wiley & Sons: New York, p.286. 2001.

MOREIRA, N.; MENDESA, F.; PEREIRA, O.; GUEDES DE PINHO, P.; HOGGA, T.; VASCONCELOS, I. Volatile sulphur compounds in wines related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts. *Analytica Chimica Acta*, v.458, p.157-167, 2002.

MORENO-ARRIBAS, M. V.; PUEYO, E.; POLO, M.C.; Peptides in Musts and Wines. Changes during the Manufacture of Cavas (Sparkling Wines). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.44, p.3783-3788, 1996.

MORENO-ARRIBAS, M. V.; PUEYO, E.; POLO, M.C.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J. Changes in the Amino Acid Composition of the Different Nitrogenous Fractions during the Aging of Wine with Yeasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, p.4042-4051, 1998.

MORENO-ARRIBAS, V.; POLO, C. Amino Acids and Biogenic Amines. In: Moreno-Arribas, V.; Polo, C. (Eds.). *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York: Springer Science Business, 2009. p.163-190.

MONTGOMERY, D. C. *Design and Analysis of Experiments*, 5th ed. New York: John Wiley & Sons. 2001. p.286.

MÜLLER C. J.; KEPNER R. E.; WEBB A. D. Lactones in wine - a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.24, p.5-9, 1973.

NIKÄNEN, L. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.37, p.84-96, 1986.

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

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Simultaneous measurement of foliar glutathione,  $\gamma$ -glutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione. *Analytical Biochemistry*, v.264, p.98-110, 1998.

OIV. International Organisation of Vine and Wine. (2012). *Compendium of international methods of wine and must analysis*. Edition 2012. OIV 18, Rue d'Aguesseau - 75008, Paris.

OLIVEIRA e SILVA, H.; GUEDES DE PINHO, P.; MACHADO, B. P.; HOGG, T.; MARQUES, J. C.; CÂMARA, J. S.; ALBUQUERQUE, F.; FERREIRA, A. C. S. Impact of Forced-Aging Process on Madeira Wine Flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 11989-11996, 2008.

PARK, S. K.; BOULTON, R. B.; NOBLE, A. C. Automated HPLC analysis of glutathione and thiol-containing compounds in grape juice and wine using pre-column derivatization with fluorescence detection. *Food Chemistry*, v.68, p.475 – 480, 2000.

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.

PATEL, P.; HERBST-JOHNSTONE, M.; LEE, S. A.; GARDNER, R.C.; WEAVER, R.; NICOLAU, L.; KILMARTIN, P. A. Influence of juice pressing conditions on polyphenols, antioxidants and varietal aroma of Sauvignon blanc microferments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.58, p.7280-7288, 2010.

PAWLISKYN, J. Solid Phase Micro extraction: Theory and Practice, Wiley-VHC, New York (USA), 1997.

PEINADO, R. A.; MORENO, J.; BUENO, J. E.; MORENO, J. A.; MAURICIO, J. C. Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to prefermentative cryomaceration. *Food Chemistry*, v.84, p.585-590, 2004.

POTMAN, R. P.; VAN WIJK, TH. A. *Mechanistic studies of the Maillard reaction with emphasis on phosphate-mediated catalysis*. In: ACS Symposium Series 409. Phosphate-Mediated Catalysis. Washington: American Chemical Society. 1989. p 182-195.

POZO-BAYÓN, M.A.; ALEGRÍA, E.G.; POLO, M.C.; TENORIO, C.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; CALVO DE LA BANDA, M.T.; RUIZ-LARREA, F.; MORENO-ARRIBAS, M.V. Wine Volatile and Amino Acid Composition after Malolactic Fermentation: Effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* Starter Cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.8729-8735, 2005.

PRIPIS-NICOLAU, L.; DE REVEL, G.; BERTRAND, A.; MAUJEAN, A. Formation of Flavor Components by the Reaction of Amino Acid and Carbonyl Compounds in Mild Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.3761-3766, 2000.

PRIPIS-NICOLAU, L.; DE REVEL, G.; MARCHAND, S.; BELOQUI, A.; BERTRAND, A. Automated HPLC method for the measurement of free amino acids including cysteine in must and wines; first application. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.81, p.1-8, 2001.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A. *Vitivinicultura brasileira: panorama setorial de 2010*. 110p. 2011.

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.

RAPP, A.; VERSINI, G. *Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines*. In: Proceeding of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine. The American Society for Enology and Viticulture. Seattle, Washington, USA. 1991. p.156-164.

RAPP, A.; VERSINI, G. Influence of nitrogen on compounds in grapes on aroma compounds in wines. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, v.51, p.193–203, 1996.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGEMNTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology Medicine*, v.26, p.1234-1237, 1999.

REINECCIUS, G. *Flavor Chemistry and Technology*. 2 ed. London: Taylor & Francis Group. 2006.

RENTZSCH, M.; WILKENS, A.; WINTERHALTER, P. *Non-flavonoid Phenolic Compounds*. In: MORENO-ARRIBAS, V.; POLO, C. (Eds.). *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York: Springer Science Business. 2009. p 509-528.

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.; LAFON-LAFOURCADE, S.; BERTRAND, A. Le debourbage des moilts de vendange blanche. *Journal International des Sciences de la Vigne et du vin*, v.9, p.117-139, 1975.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÉCHE, B.; LONVAUD, A. *Handbook of Enology: the Chemistry of wine Stabilization and Treatments*. 2ed. vol. 2. Wiley & Sons, 2006a. 441 p.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÉCHE, B.; LONVAUD, A. *Handbook of Enology: the microbiology of wine and vinifications*. 2ed. vol. 1. Wiley & Sons, 2006b. 429 p.

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.

RICHARD, H.; MULTON, J. L. *Les arômes Alimentaires*, Lavoisier, Paris, 1992.

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.

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

SAERENS, S.; DELVAUX, F.; VERSTREPEN, K.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J.; DELVAUX, F. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.74, p.454-461, 2008.

SALMON, J. M. Sluggish and stuck fermentations: some actual trends on their physiological basis. *Viticulture and Enology of Science*, v.51, p.137-140, 1996.

SCHIEBERLE, P.; HOFMANN, T. *Identification of the key odorants in processed cysteine Maillard mixtures by instrumental analysis and sensory studies*. In: TAYLOR, A. J.; MOTTRAM, D. S. (Eds.). *Flavour Science, Recent Developments*. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 1997. p.175-181.

SCHNEIDER, R.; RAZUNGLES, A.; AUGIER, C.; BAUMES, R. Monoterpenic and norisoprenoidic glycoconjugates of *Vitis vinifera* L. cv. Melon B. as precursors of odorants in Muscadet wines. In: *ExTech 2005 - 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies*, v. 936, p.145-157, 2001.

SHEN, S.-C.; TSENG, K.-C.; WU, J. S.-B. An analysis of Maillard reaction products in ethanolic glucose–glycine solution. *Food Chemistry*, v.102, p.81-287, 2007.

SIEBERT, T.; BRAMLEY, B.; SOLOMON, M. Hydrogen sulfide: aroma detection threshold study in white and red wine. *Technology Review*, v. 183, p. 14-16, 2009.

SIMS, C. A.; EASTRIDGE, J. S.; BATES, R. P. Changes in phenols, color and sensory characteristics of muscadine wines by pre- and postfermentation additions of PVPP, casein, and gelatine. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.46, p.155–158, 1995.

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.

SMITH, R. M. Before the injection - modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A*, v.1000, p.2-27, 2003.

SMIT, A.Y.; TOIT, W.J.; TOIT, M. Biogenic Amines in Wine: Understanding the Headache. *South African Journal for Enology and Viticulture*, v.29, p.109 -127, 2008.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. *Practical HPLC method development*. 2ed. New York: John Wiley & Sons Inc.,1997. 745p.

SOUFLEROS, E. H.; BOULOUMPASI, E.; TSARCHOPOULOS, C.; BILIADERIS, C. G. Primary amino acids profiles of Greek white wines and their use in classification according to variety, origin and vitage. *Food Chemistry*, v.80, p.261-273, 2003.

SOWALSKY, R.A.; NOBLE, A.C. Comparison of the effects of concentration, pH and anion species on astringency and sourness of organic acids. *Chemical Senses*, v.23, p.343-349, 1998.

SPÁCIL, Z.; NOVÁKOVÁ, L.; SOLIDH, P. Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography. *Talanta*, v.76, p.189-199, 2008.

STARZENMANN, C.; TROCCAZ, M.; HOWELL, K. The Role of Cysteine and cysteine-S Conjugates as Odour Precursors in the Flavour and Fragrance Industry. *Flavour and Fragrance Journal*, v.23, p.369-381, 2008.

STRAUSS, C. R.; WILSON, B.; ANDERSON, R.; WILLIAMS, P.J. Development of precursors of C13 norisoprenoid flavorants in Riesling grapes. *American journal of Enology and Viticulture*, v.38, p.23-27, 1987.

STYGER, G.; BERNARD, P.; BAUER, F. F. Wine Flavor and Aroma. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.38, p.1145–1159, 2011.

SWIEGERS, J. H.; BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A.; PRETORIUS, I.S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Reserach*, v.11, p.139-173, 2005.

Ter SCHURE, E. G.; VAN RIEL, N. A. W.; VERRIPS, C. T. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 24, p. 67-83, 2000.

TOMINAGA ,T.; FURRER, A.; HENRY, R.; DUBOURDIEU, D. Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var Sauvignon blanc wines. *Flavour and Fragrance Journal*, v.13, p.159-162, 1998.

TORREA, D.; CRISTIAN VARELA, C.; UGLIANO, M.; ANCIN-AZPILICUETA, C.; FRANCIS, I. F.; HENSCHKE, P. A. Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice – Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Food Chemistry*, v.127, p.1072–1083, 2011.

UGLIANO, M.; HENSCHKE, P. A.; HERDERICH, M. J.; PRETORIUS, I. S. Nitrogen management is critical for wine flavour and style. *Wine Industry Journal*, v.22, p.24-30, 2007.

UGLIANO, M. *Enzymes in Winemaking*. In: MORENO-ARRIBAS, V.; POLO, C. (Eds.). *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York:Springer Science Business, 2009. p.103-126.

UGLIANO, M.; HENSCHKE, P. A. *Yeasts and Wine Flavour*. In: MORENO-ARRIBAS, V.; POLO, C. (Eds.). *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York:Springer Science Business. 2009. p 313-392.

UGLIANO, M.; FEDRIZZI, B.; SIEBERT, T.; TRAVIS, B.; MAGNO, F.; GIUSEPPE VERSINI, G.; HENSCHKE, P. A. Effect of Nitrogen Supplementation and *Saccharomyces* Species on Hydrogen Sulfide and

Other Volatile Sulfur Compounds in Shiraz Fermentation and Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, p.4948-4955, 2009.

UGLIANO, M.; TRAVIS, B.; FRANCIS, I. L.; HENSCHKE, P. A. Volatile Composition and Sensory Properties of Shiraz Wines As Affected by Nitrogen Supplementation and Yeast Species: Rationalizing Nitrogen Modulation of Wine Aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.58, p.12417-12425, 2010.

VALDÉS, E.; VILANOVA, M.; SABIO, E.; BENALTE, M. J. Clarifying agents effect on the nitrogen composition in must and wine during fermentation. *Food Chemistry*, v.125, p.430-437, 2011.

VALENTE, I. M.; SANTOS, C. M.; MOREIRA, M. M.; RODRIGUES, J. A. New application of the QuEChERS methodology for the determination of volatile phenols in beverages by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.1271, p. 27-32, 2013.

VALERO, E.; MILLÁN, C.; ORTEGA, J.; MAURICIO, J. Concentration of amino acids in wine after the end of fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.83, p.830-835, 2003.

VAN RENSBURG, P.; PRETORIUS, I.S. Enzymes in winemaking: Harnessing natural catalyts for efficient biotransformations: a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, v.21, p.52-73, 2000.

VARELA, C.; PIZARRO, F.; AGOSIN, E. Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, p.3392-3400, 2004.

VERNIN, G.; VERNIN, G. *Heretocyclic aroma compounds in foods: occurence and organoleptic properties*. In: VERNIN, G. (Ed.). *Chemistry of heterocyclic compounds in flours and aromas*. Chichester GB: Ellis Horwood Ltd. 1982. p.72-140.

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

VERSTREPEN K.J.; DERDELINCKX G.; DUFOUR J-P.; WINDERICKX J.; THEVELEIN J. M.; PRETORIUS I.S.; DELVAUX F. R. Flavour-active esters: adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 96, p.110-118, 2003.

VIANNA, E.; EBELER, S.E. Monitoring Ester Formation in Grape Juice Fermentations Using Solid Phase Microextraction Coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, p.589-595, 2001.

VILANOVA, M.; UGLIANO, M.; VARELA, C.; SIEBERT, T.; PRETORIUS, I. S.; HENSCHKE, P. A. Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.77, p.145-157, 2007.

VILANOVA, M.; SIEBERT, T. E.; VARELA, C.; PRETORIUS, I. S.; HENSCHKE, P. A. Effect of ammonium nitrogen supplementation of grape juice on wine volatiles and non-volatiles composition of the aromatic grape variety Albariño. *Food Chemistry*, v.133, p.124-131, 2012.

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.; FERNANDEZ-PACHON, M. S., TRONCOSO, A. M.; GARCIA-PARRILLA, M. C. Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. *Food Chemistry*, v.95, p.394-404, 2006.

VILLIERS, A.; ALBERTS, P.; TREDoux, A. G. J.; NIEUWOUDT, H. H. Analytical techniques for wine analysis: An African perspective; a review. *Analytica Chimica Acta*, v.730, p.2- 23, 2012.

VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. A comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction coupled to liquid chromatography for the rapid analysis of resveratrol isomers in wines, musts and fruit juices. *Analytica Chimica Acta*, v. 611, p. 119-125, 2008.

VOILLEY, A.; LAMER, C.; DUBOIS, P.; FEUILLAT, M. Influence of Macromolecules and Treatments on the Behavior of Aroma Compounds in a Model Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.38, p.248–251, 1990.

VRHOVSEK, U. Extraction of hydroxycinnamoyltartaric acids from berries of different grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 4203-4208, 1998.

WATERS, E.J.; WALLACE, W.; WILLIAMS, P.J. Heat haze characteristics of fractionated wine proteins. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.42, p.123-127, 1991.

WEBBER, V.; LEONARDELLI, S.; ADAMI, L.; CARNIELI, G. J.; VANDERLINDE, R. Efeito da glutatona na prevenção da oxidação de vinhos brancos. *Revista Brasileira de Viticultura e Enologia*, p. 80-88, 2012.

WEENEN, H. Reactive Intermediates and Carbohydrate Fragmentation in Maillard Chemistry. *Food Chemistry*, v.62, p.393-401, 1998.

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

YILDIRIM, H.K.; ÜREN, A.; YÜCEL, U. Evaluation of Biogenic Amines in Organic and Non-Organic Wines by HPLC OPA derivatization. *Food Technology and Biotechnology*, v.45, p.62-68, 2007.

YOKOTSUKA, K.; EBIHARA, T. SATO, T. Comparison of soluble proteins in juice and wine from Koshu grapes. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.71, p.248-253, 1991.

YOSHIMOTO, H.; FUKUSHIGE, T.; YONEZAWA, T.; SONE, H. Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.59, p.501-508, 2001.

ZAMORA, F. *Biochemistry of alcoholic fermentation*. In: MORENO-ARRIBAS, V.; POLO, C. (Eds.). *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York:Springer Science Business. 2009. p 3-26.

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.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A - Parâmetros analíticos de validação dos compostos determinados por cromatografia líquida.

	Linearidade (R <sup>2</sup> )	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Repetibilidade (RSD%)		Recuperação (%)	
				Mosto	Vinho	Mosto	Vinho
<i>Aminoácidos</i>							
Ácido aspártico	0,999	0,11	0,78	2,0	1,8	89	90
Ácido glutâmico	0,999	0,08	0,29	1,4	1,1	91	90
Asparagina	0,998	0,33	0,87	3,8	2,2	90	92
Serina	0,997	0,14	0,54	2,8	3,4	95	98
Glutamina	0,999	0,07	0,11	3,2	3,0	90	95
Histidina	0,998	0,42	1,02	5,0	5,2	88	88
Glicina	0,999	0,05	0,12	3,9	3,2	90	91
Citrulina	0,999	0,11	0,93	4,1	3,6	101	98
Treonina	0,999	0,05	0,13	1,9	2,5	89	94
Alanina	0,999	0,10	0,32	2,2	2,8	96	98
Arginina	0,999	0,06	0,10	3,8	3,0	95	101
GABA	0,998	0,06	0,11	2,7	2,2	93	96
Prolina	0,999	0,12	0,25	1,5	1,9	89	90
Tirosina	0,997	0,07	0,18	4,8	4,0	94	103
Valina	0,999	0,05	0,09	2,6	2,5	97	99
Metionina	0,999	0,02	0,08	3,9	3,8	105	96
Cisteína	0,996	0,01	0,06	5,3	4,9	89	90
Isoleucina	0,998	0,03	0,12	5,1	5,0	95	95
Triptofano	0,999	0,06	0,50	3,3	4,6	95	93
Leucina	0,999	0,10	0,36	2,8	3,6	93	95
Fenilalanina	0,999	0,08	0,14	4,1	3,2	97	99
Ornitina	0,998	0,02	0,05	3,7	2,9	91	97
Lisina	0,999	0,07	0,21	3,9	4,1	96	99
Íon amônio	0,999	0,12	0,49	4,1	4,0	98	103
<i>Aminas biogênicas</i>							
Histamina	0,999	0,1	0,23	5,1	4,5	88	90
Tiraminas	0,999	0,09	0,13	3,6	2,8	97	99
Putrescina	0,999	0,10	0,22	4,9	4,1	99	104
Triptamina	0,998	0,01	0,02	4,0	3,9	106	103
Cadaverina	0,999	0,05	0,10	2,2	1,9	105	106
Espermidina	0,997	0,05	0,11	5,5	5,1	101	99

## APÊNDICE A (Continuação)

*Ácidos orgânicos*

Acido tartárico	0,999	22	74	4,2	3,1	98	98
Acido málico	0,999	37	99	2,8	2,9	92	95
Ácido láctico	0,999	23	78	4,1	3,5	95	97
Acido succínico	0,999	25	85	5,1	3,8	90	96

LOD e LOQ foram calculados com base no *sloop* da curva de calibração ( $n = 5$ ).

Repetibilidade foi realizada em mosto e vinho separadamente, sem adição e com adição de 5 mg/L dos padrões, e expressa como desvio padrão relativo (RSD%) ( $n = 10$ ).

Recuperação (%) foi realizada em mosto e vinho separadamente, adicionados de 5 mg/L dos padrões ( $n = 7$ ).

**APÊNCICE B** - Compostos voláteis determinados nos vinhos com os descritores aromáticos, limiar de percepção e íons utilizados para identificação e quantificação dos compostos por CG-MS.

	<b>Descritor aromático</b>	<b>Limiar olfativo (µg/L)</b>	<b>Íons selecionando*</b>
<i>Ésteres</i>			
Propionato de etila	Solvente, morango	2100 <sup>1</sup>	<b>102/57/75</b>
Butirato de etila	Kiwi, morango, queijo	20 <sup>2</sup>	<b>88/71/60</b>
Octanoato de etila	Abacaxi, casca de maçã	580 <sup>3</sup>	<b>88/101/127</b>
Decanoato de etila	Grape, saponáceo, frutado	200 <sup>2</sup>	<b>88/101</b>
Dodecanoato de etila	Cera, sabão	---	<b>88/101</b>
Hexanoato de etila	Abacaxi, maçã	65 <sup>3</sup>	<b>88/99/60</b>
Acetato de isobutila	Solvente, frutado	1600 <sup>4</sup>	<b>56/43</b>
Acetato de octila	Ceroso, frutado	800 <sup>1</sup>	<b>56/43</b>
Acetato de hexila	Pera	670 <sup>1</sup>	<b>56/43</b>
Acetato de butila	Solvente, frutado	1800 <sup>4</sup>	<b>56/43</b>
Acetato de isoamila	Banana	30 <sup>2</sup>	<b>70/55/43</b>
Acetato de feniletila	Rosa, mel, tabaco	250 <sup>5</sup>	<b>104/91/43</b>
Acetato de propila	Solvente, frutado	---	<b>61/43</b>
Fenilacetato de etila	Floral, rosa, vinho	73 <sup>4</sup>	<b>91/105</b>
Dihidrocinnamato de etila	Frutado, abacaxi	1,6 <sup>2</sup>	<b>104/91/178</b>
Cinamato de etila	Cereja, figo, frutado	1,1 <sup>3</sup>	<b>106/131</b>
Octanoato de metila	Ceroso, casca de maçã, kiwi	---	<b>74/87/127</b>
Decanoato de metila	Ceroso, sabão, frutado	1200 <sup>4</sup>	<b>74/87</b>
Hexanoato de metila	Abacaxi, maçã, frutado	---	<b>74/87/99</b>
Butirato de metila	Queijo, kiwi bem maduro	---	<b>74/87/71</b>
Hexanoato de isoamila	Banana, abacaxi, furtado	---	<b>99/70</b>
Octanoato de isoamila	Cera, sabão, pera	125 <sup>3</sup>	<b>127/70</b>
Butirato de isoamila	Banana, maçã, abacaxi	---	<b>71/70/55</b>
Valerato de etila	Morango, abacaxi, queijo	---	<b>85/88/10</b>
Heptanoato de etila	Abacaxi, frutado	220 <sup>4</sup>	<b>88/101</b>
Nonanoato de etila	Ceroso, frutado	---	<b>88/101</b>
Isobutirato de etila	Morango, kiwi, frutado	15 <sup>2</sup>	<b>116/88/71</b>
2-Metilbutirato de etila	Frutado, kiwi	18 <sup>2</sup>	<b>102/57/85</b>
Isovalerato de etila	Queijo, frutado	3 <sup>2</sup>	<b>88/85/57</b>
<i>Trans</i> -2-hexanoato de etila	Abacaxi, frutado	---	<b>99/97/55</b>
Hexanoato de isobutila	Frutado, ceroso	---	<b>99/56/71</b>
<i>Trans</i> -geranato de metila	Pera	---	<b>114/69</b>
3-Hidroxi hexanoato de etila	Amora silvestre	2400 <sup>1</sup>	<b>69/87</b>
6-Hidroxi hexanoato de etila	Frutado	12001	<b>88/97/101</b>
3-Hidroxi butirato de etila	Morango, frutado	18001	<b>87/88/117</b>
Lactato de etila	Frutado, leite	1540004	<b>45/75</b>
Succinato de dietila	Frutado	2000004	<b>101/129</b>
Acetato de etila	Frutado, solvente, doce	122645	---
<i>Monoterpenos</i>			
Geraniol	Flor de gerânio	303	<b>69/93/41</b>
Linalol	Floral, frutado, Muscat	256	<b>93/71</b>
$\alpha$ -Terpineol	Floral, anis	2506	<b>81/136/43</b>
$\beta$ -Citronelol	citronela	186	<b>69/81/95</b>
Nerol	Floral, rosa, doce	4006	<b>93/49</b>

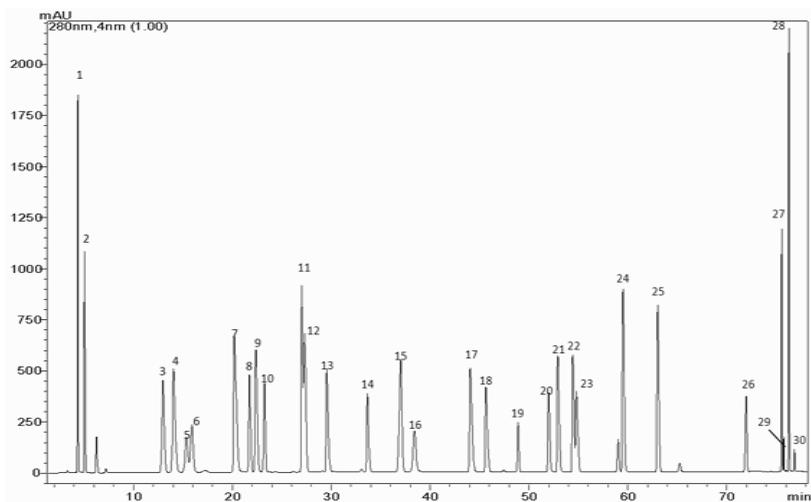
## APENDICE B. (Continuação)

<i>C13-norisoprenóides</i>			
$\alpha$ -Ionona	Violeta, framboesa	0,4 <sup>7</sup>	<b>136/121/93</b>
$\beta$ -Ionona	Violeta, framboesa	0,09 <sup>1</sup>	<b>177/192</b>
$\beta$ -Damascenona	Maçã cozida, floral, mel	0,05 <sup>5</sup>	<b>190/121/69</b>
$\beta$ -Damascona	Rosa, ameixa, cassis	---	<b>192/123</b>
<i>Sulfurados</i>			
3 (metiltio)-propanoato de etila	Vegetal, enxofre	---	<b>148/74/53</b>
3 (metiltio)-propil acetato	Cogumelo, alho, cebola	115 <sup>11</sup>	<b>88/73/36</b>
Metionol	Batata crua, repolho cozido	1500 <sup>3</sup>	<b>106/61</b>
Sulfeto de hidrogênio	Ovo podre, gás	1,6 <sup>8</sup>	---
Dimetilsulfona	Enxofre, cebola, frutos do mar	---	---
2-Mercaptoetanol	Casca de árvores, aves, fazenda	600 <sup>11</sup>	---
<i>Lactonas</i>			
$\gamma$ -octalactone	Coco	---	<b>85/100</b>
$\gamma$ -nonalactone	Coco, pêssego	30 <sup>3</sup>	<b>85/99</b>
$\gamma$ -decalactone	Coco, pêssego	88 <sup>9</sup>	<b>85/128</b>
$\gamma$ -undelactone	Pêssego, coco	---	<b>85/128</b>
$\gamma$ -dodecalactone	Pêssego	---	<b>85/100/128</b>
$\delta$ -decalactone	Pêssego, coco	386 <sup>3</sup>	<b>99/70/114</b>
<i>Álcoóis</i>			
1-propanol	Alcool, fruta madura	306000 <sup>10</sup>	---
2-metil 1-propanol	Alcool, doce	30000 <sup>3</sup>	---
2-metil 1-butanol	Oleo de fúsel, doce	30000 <sup>5</sup>	---
3-metil 1-butanol	Banana, verde, mate, doce	40000 <sup>5</sup>	---
Hexanol	Vegetação, grama cortada	8000 <sup>3</sup>	---

\* Ions marcados em negrito foram utilizados para quantificação e os outros como ions qualitativos.

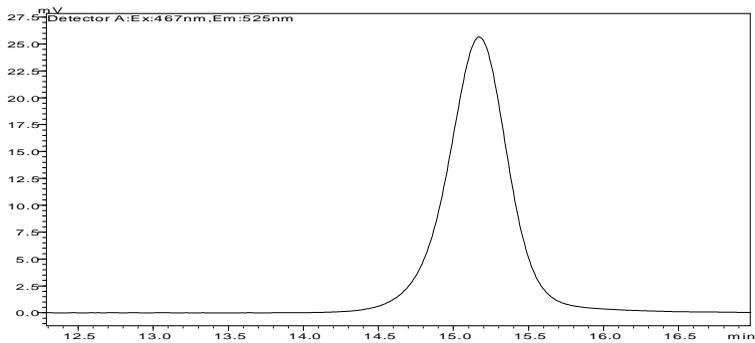
1, Kotseridis, 1999; 2, Cullere et al., 2004; 3, Ferreira et al., 2000; 4, Antalick; Perello; de Revel, 2010; 5, Guth, 1997; 6, Ribéreau-Gayon et al., 2006b; 7, Fazzalari, 1978; 8, Siebert; Bramley; Solomon, 2009; 9, Santos et al., 2010; 10, Peinado et al., 2004; 11, Lavigne; Boidron; Dubourdiu, 1992.

**APÊNDICE C** - Cromatograma de mosto contaminado com solução padrão de todos os aminoácidos, ion amônio e aminos biogênicas.

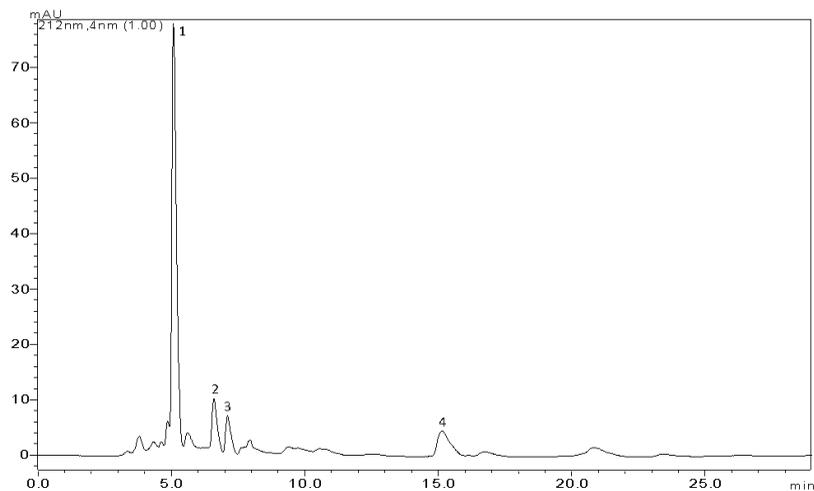


1, ácido aspártico; 2, ácido glutâmico; 3, asparagina; 4, serina; 5, glutamina; 6, histidina; 7, glicina; 8, citrulina; 9, treonina; 10, arginina; 11, alanina; 12, ácido aminobutírico; 13, prolina; 14, tirosina; 15, íon amônio; 16, histamina; 17, valina; 18, metionina; 19, cisteína; 20, isoleucina; 21, triptofano; 22, leucina; 23, fenilalanina; 24, ornitina; 25, lisina; 26, tiramina; 27, putrescina; 28, triptamina; 29, cadaverina; 30, espermidina.

**APÊNDICE D** - Cromatograma da glutatona (GSH) de uma amostra de vinho branco adicionada de solução padrão.



## APÊNDICE E - Cromatograma dos ácidos orgânicos de uma amostra de vinho branco.



1, ácido tartárico; 2, ácido málico; 3, ácido láctico; 4, ácido succínico.

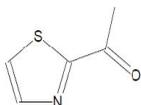
## ANEXO

## ANEXO A - Estrutura química dos compostos heterocíclicos sulfurados, nitrogenados e oxigenados

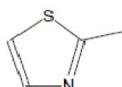
## Heterocíclicos-N,S



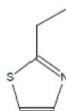
tiazol



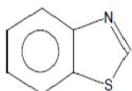
2-acetil tiazol



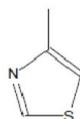
2-metil tiazol



2-etil tiazol

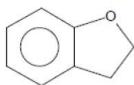


benzotiazol

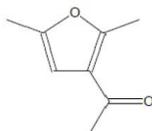


4-metil tiazol

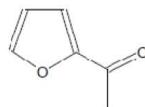
## Heterocíclicos-O



2,3-dihidrobenzofurano



3-acetil-2,5-dimetilfurano

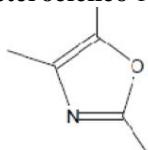


2-acetilfurano

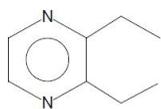


5-metilfurfural

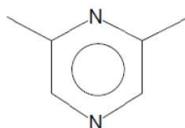
## Heterocíclico-N,O



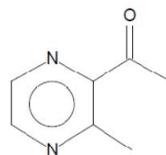
trimetiloxazol



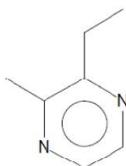
2,3-diethylpirazina



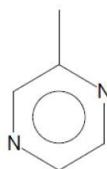
2,6-dimetilpirazina



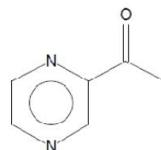
2-acetil 3-metilpirazina



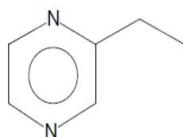
2-etil 3-metilpirazina



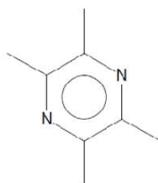
2-metilpirazina



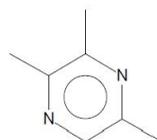
2-acetilpirazina



2-etilpirazina

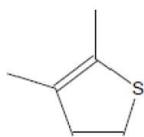


2,3,5,6-tetrametilpirazina

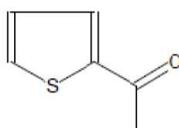


2,3,5-trimetilpirazina

### Heterocíclicos-S



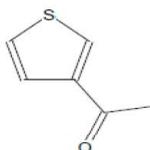
2,3-dimetiltiofeno



2-acetiltiofeno

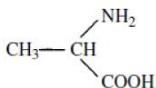
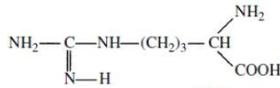
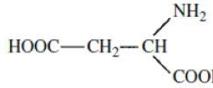
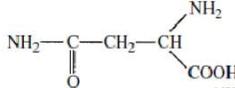
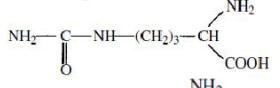
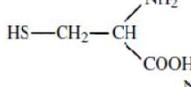
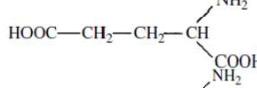
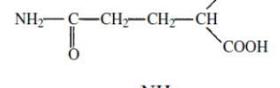
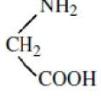
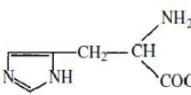
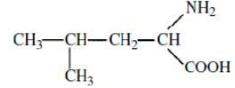
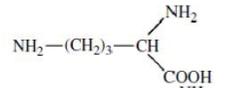
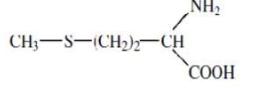


2,5-dimetiltiofeno



3acetiltiofeno

## ANEXO B - Estrutura química dos aminoácidos presentes em uva e vinho.

Aminoácido	Estrutura	Abreviatura
Alanina		Ala
Arginina		Arg
Ácido aspártico		Asp
Asparagina		Asn
Citrulina		Cit
Cisteína		Cis
Ácido glutâmico		Glu
Glutamina		Gln
Glicina		Gli
Histidina		His
Leucina		Leu
Lisina		Lis
Metionina		Met

ANEXO B - *Continuação*

Ornitina		Orn
Fenilalanina		Fen
Prolina		Pro
Serina		Ser
Treonina		Ter
Triptofano		Trp
Tirosina		Tir
Valina		Val

Fonte: Ribereau-Gayon et al., 2006a.