

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**UVAS E VINHOS TINTOS FINOS DA CAMPANHA GAÚCHA:
COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA**

LETÍCIA FLORES DA SILVA

Porto Alegre, 2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**UVAS E VINHOS TINTOS FINOS DA CAMPANHA GAÚCHA:
COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Tese apresentada por **Letícia Flores da Silva**
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR
em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dr. Ana Maria Bergold
Coorientador: Dr. Celito Crivellaro Guerra

Porto Alegre, 2016

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 15.08.2016, pela Banca Examinadora constituída por:

Dr. Giuliano Elias Pereira

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Profa. Dr. Cláudia Alcaraz Zini

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Profa. Dr. Simone Cristina Baggio Gnoatto

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Silva, Letícia Flores da

Uvas e Vinhos Tintos Finos da Campanha Gaúcha:
Compostos Fenólicos e Atividade Biológica / Letícia
Flores da Silva. -- 2016.

232 f.

Orientador: Ana Maria Bergold.

Coorientador: Celito Crivellaro Guerra.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2016.

1. uva tinta. 2. vinho tinto. 3. compostos
fenólicos. 4. grau nutracêutico. 5. Campanha Gaúcha.
I. Bergold, Ana Maria, orient. II. Guerra, Celito
Crivellaro, coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Celso e Luíza, pelo amor, pela dedicação e por me ensinarem como percorrer os caminhos, mesmo os mais difíceis, para realizar os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

À Profa. Dr. Ana Maria Bergold, pela valiosa orientação desde a graduação até o momento, pelo incentivo constante e pelos ensinamentos na área farmacêutica.

Ao Dr. Celito Crivellaro Guerra, por acreditar em meu trabalho, mesmo frente às dificuldades ao longo desta jornada e pelos ensinamentos na área de enologia.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) e da UFRGS, por proporcionar o meu desenvolvimento acadêmico.

À Profa. Dr. Daiana Silva de Ávila e Willian Salgueiro do GBToxCe (UNIPAMPA), pela colaboração considerável na realização das atividades com nematoides.

Ao Prof. Dr. Marco Flôres Ferrão e Marcelo Caetano do Instituto de Química (UFRGS), pela contribuição em Quimiometria.

Aos colegas do LACEM e da Enoquímica (EMBRAPA Uva e Vinho), Dr. Celito Guerra, Dr. Gisele Perissutti, Magda Salvador e Celso Ruiz, pelo apoio essencial na gestão de laboratórios e pela amizade.

Aos alunos de iniciação científica do LACEM (EMBRAPA Uva e Vinho), colaboradores deste trabalho: Alana Foresti, Diandra Klein, Francisca Foresti e Leonardo Ferrari.

Às alunas de iniciação científica do LAPS (Faculdade de Farmácia, UFRGS) que apoiaram a execução deste trabalho: Jéssica Bauer e Luísa Rodrigues.

Aos colegas da EMBRAPA Uva e Vinho, pela contribuição em suas áreas de conhecimento: Dr. Ana Beatriz Czermainski, Dr. Lucimara Antonioli, Dr. Gildo Almeida da Silva, Dr. José Eduardo Monteiro, Dr. Fabio Rossi, Alessandra Russi, Rochelle Alvorcem, Raul Bem, Anevir Marin e a todos os que apoiaram e incentivaram o desenvolvimento desta tese.

A Camilo Silva e Alexandre Gomes da Waters, pelo auxílio no uso de equipamentos de cromatografia e espectrometria de massas.

Aos meus pais, Luíza e Celso, por me compreenderem sempre e me passarem o valor da busca contínua pelo aprendizado.

À Vó Castura, por me ensinar que jamais devemos desistir dos nossos sonhos.

Aos meus avós paternos, Nita e Alberto Silva, minhas madrinhas, meus padrinhos e toda minha família, por me passarem boas referências.

Aos meus irmãos, Jaqueline e Vinícius, e cunhado Cristiano Macedo, por estarem sempre ao meu lado, incentivando-me a fazer o melhor.

Ao meu sobrinho, Francisco, pela diversão e pela interação através de sua curiosidade infantil.

Ao Eduardo Bianchi Neto, pelo companheirismo, pela imensa compreensão e por possibilitar equilíbrio à minha vida.

Às famílias Bianchi e Locatelli, representadas por Mari, Ivo, Fabiane, Dilso, Pedro, João, Mônica, Cleiton, Vítor e Felipe, pela hospitalidade.

Aos meus amigos e familiares, por partilharem as conquistas e as dificuldades, especialmente: Lucas e Graciele Vargas; Camila e Luana Flores; Rosane Simon; Lucimara e Felipe Bonfanti; Ana Beatriz e Paulo Oliveira; Adriana e Thales Fialho; Christine e Eduardo Prato; Ivana Pellegrin; Ana e Guto Ulbrich; Andressa Bernardi; Giovani Faé; Carina, Eduardo e Bruno Monteiro; Bruna Agustini e João Figueredo; Fábio e Katiana Colombo; Deisi Backes; Odinéli Louzada; Beatriz Confortin; Juliana Zanon; Ivan Pinto; Marize Pozza; Sabrina Leite; Cilmara Cozzatti; Hellen e Tiago Locatelli; Juliana Toniollo e Fernando Dal Castel.

À minha sobrinha, Valentina, por chegar ao mundo trazendo muitas alegrias.

A todos os que acreditaram em mim e forneceram subsídios para que eu pudesse atingir essa meta pessoal e profissional.

EPÍGRAFE

“No momento em que nos comprometemos, a providência divina também se põe em movimento. Todo um fluir de acontecimentos surge em nosso favor. Como resultado da atitude, seguem todas as formas imprevistas de coincidências, encontros e ajudas, que nenhum ser humano jamais poderia ter sonhado encontrar. Qualquer coisa que você possa fazer ou sonhar, você pode começar. A coragem contém em si mesma, o poder, o gênio e a magia.”

Johann Goethe

RESUMO

Os compostos fenólicos presentes em uvas e vinhos apresentam atividades antioxidantes benéficas à saúde humana, além de indicarem a qualidade desses produtos. Assim, esta tese teve como objetivo desenvolver, validar e aplicar métodos para a análise dos compostos fenólicos e avaliar a atividade antioxidante de uvas e vinhos tintos finos provenientes de uma nova região vitivinícola brasileira (Campanha Gaúcha - RS, Brasil). Ao total, foram utilizadas 103 amostras de vinhos finos tintos obtidos a partir de diferentes processos de vinificação (experimentais e comerciais), variedades (10), safras (2004 a 2015) e regiões (97 das microrregiões Ocidental, Central e Meridional da Campanha Gaúcha e seis de outras regiões do RS). Além disso, foram utilizadas oito amostras de uvas finas tintas da Campanha Gaúcha, das safras 2014 e 2015. O primeiro método, por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), com propósito de dosar dois marcadores de compostos fenólicos, *trans*-resveratrol e quercetina, mostrou-se adequado para diferenciar 12 vinhos tintos do RS. O segundo método, por HPLC-DAD e espectrometria de massas de alta resolução, possibilitou o doseamento de seis fenóis bioativos (*trans*-resveratrol, quercetina, miricetina, quempferol, *trans*- ϵ -viniferina e ácido *trans*-cinâmico) em 87 amostras da Campanha Gaúcha. Os teores mais elevados de compostos fenólicos foram encontrados em: variedades Arinarnoa, Marselan, Rebo, Syrah, Tempranillo e Teroldego; microrregião da Campanha Central; safra de 2013. Os vinhos foram classificados mediante análises de agrupamento hierárquico (HCA) e de componentes principais (PCA), conforme seus respectivos processos de vinificação, variedades e microrregiões. O terceiro e último método abordado foi com o intuito de analisar um maior número de compostos fenólicos, o que foi possível através da técnica de extração em fase sólida por troca catiônica forte. Esse método foi utilizado para análises de uvas e seus vinhos experimentais correspondentes da Campanha Gaúcha, por HPLC-DAD e por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a espectrômetro de massas (UPLC-MS). Uvas com alto teor de galato de (-)-epicatequina originaram vinhos com elevada concentração de fenóis biativos. Tais amostras também foram analisadas quanto ao índice de fenóis totais e quanto à atividade antioxidante *in vitro*, demonstrando uma correlação positiva entre uvas e vinhos das mesmas variedades. Nesse mesmo estudo, foi possível atribuir atividades antioxidantes *in vivo* (modelo *Caenorhabditis elegans*) superiores

nas amostras com teores mais elevados de astilbina e flavanóis, como a (+)-catequina, a (-)-epicatequina e a (-)-epigallocatequina. Assim, esses compostos, principalmente a astilbina, poderão ser utilizados como modelos para modificações moleculares na área de química medicinal. Além disso, o estudo dos compostos fenólicos pode contribuir para a melhoria da qualidade de vinhos da Campanha Gaúcha, trazendo benefícios diretos à vitivinicultura nacional e indiretos a toda a sociedade.

Palavras-chave: uva tinta; vinho tinto; compostos fenólicos; grau nutracêutico; qualidade; Campanha Gaúcha

ABSTRACT

Title: Red Grapes and Wines from *Campanha Gaúcha* region: Phenolic Compounds and the Biological Activity

Phenolic compounds found in grapes and wines show antioxidant activities with health benefits for humans, and also indicate the quality of these products. Therefore, this thesis aimed to develop, validate and investigate methods for phenolic compound analysis, and evaluate the antioxidant activity of grapes and wines from a new Brazilian viticulture region (Campanha Gaúcha, Southern Brazil). In total, 103 red wine samples were used. These samples were obtained from different winemaking processes (experimental and commercial), varieties (10), vintages (2004 to 2015), and regions (97 from occidental, central e meridional from Campanha Gaúcha and six from other Southern Brazilian regions). Eight grape samples, 2014 and 2015 vintages, from Campanha Gaúcha were also used. The first method, using high-performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD) was used to quantify two phenolic compound markers, *trans*-resveratrol, and quercetin, and was adequate for differentiating 12 red wines from Southern Brazil. The second method, using HPLC-DAD and high-resolution mass spectrometry, enabled the quantification of six bioactive phenols (*trans*-resveratrol, quercetin, myricetin, kaempferol, *trans*- ϵ -viniferin, and *trans*-cinnamic acid) in 87 samples from Campanha Gaúcha. The highest levels of phenolic compounds were found in the Arinarnoa, Marselan, Rebo, Syrah, Tempranillo, and Teroldego varieties; central Campanha Gaúcha micro-region varieties; and the 2013 vintage. The wines were classified according to their winemaking processes, varieties, and micro-regions using hierarchical cluster and principal component analyses. The third and final method aimed to analyze a large number of phenolic compounds using a solid phase extraction technique employing strong cation exchange. This method was used to analyze grapes and their corresponding wines from Campanha Gaúcha using HPLC-DAD and ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. Grapes with high levels of (-)-epicatechin galate corresponded to wines more concentrated in bioactive phenols. The samples were also analyzed using the total phenol content index and *in vitro* antioxidant activity, showing a positive correlation between grapes and wines of the same varieties. In the same study, it was possible to attribute the *in vivo* antioxidant

activities (*Caenorhabditis elegans* model) to samples with higher levels of astilbin and flavanols such as (+)-catechin, (-)-epicatechin, and (-)-epigallocatechin. Therefore, such compounds, mainly astilbin, may be used for a molecular modification model in medicinal chemistry. Moreover, the study of phenolic compounds may contribute to the improvement of the quality of wines from Campanha Gaúcha, and can bring several direct benefits for national viticulture and indirect benefits to all society.

Keywords: red grape; red wine; phenolic compounds; nutraceutical grade; quality; Campanha Gaúcha

LISTA DE FIGURAS

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 3.1. Principais regiões vitivinícolas do Brasil	40
Figura 3.2. Estruturas químicas básicas dos flavonoides, estilbenos na posição <i>trans</i> e ácidos fenólicos	44
Figura 3.3. Biossíntese de derivados de ácido cinâmico e estilbenos	45
Figura 3.4. Biossíntese de flavonoides	46

4.2. CAPÍTULO 2

Figura 4.2.1. Cromatogramas em 340 nm, obtidos conforme método CLAE-DAD para: solução padrão de <i>trans</i> -resveratrol e quercetina, na concentração de 10 mg L ⁻¹ , com respectivas estruturas químicas e espectros UV e vinho tinto Merlot 2	81
Figura 4.2.2. Cartas controle referentes a dez curvas padrão para cada analito: intercepto relativo ao <i>trans</i> -resveratrol, inclinação relativa ao <i>trans</i> -resveratrol, intercepto relativo à quercetina, inclinação relativa à quercetina	82
Figura 4.2.3. Teores de <i>trans</i> -resveratrol e quercetina (média e desvio padrão) para as amostras de vinhos tintos elaborados com uvas do Rio Grande do Sul, safra 2012	82

4.3. CAPÍTULO 3

Fig. 4.3.1. HPLC-DAD chromatograms obtained according to parameters defined on Section <i>HPLC-DAD Conditions</i> : standard mixture with 10 µg mL ⁻¹ of each analyte at 306 nm; overlaid at 306 nm for unspiked red wine and red wine spiked with a standard mixture of analytes	96
Fig. 4.3.2. Set of UV spectra for all the analytes, with their corresponding chemical structures	98
Fig. 4.3.3. Selectivity data for a sample of red wine showing no interference of anthocyanins in SaF and <i>trans</i> -cinnamic acid: HPLC-DAD chromatogram at 525 nm; 3D graph; mass spectrum of flavanol interferences, scanned from 0 to 15 min; mass spectrum of anthocyanic interferences, scanned from 0 to 15 min; mass spectrum of anthocyanic interferences, scanned from 19 to 21.3 min; mass spectrum of anthocyanic interferences, scanned from 28 to 30 min	102

4.4. CAPÍTULO 4

Figura 4.4.1. Microrregiões vitivinícolas da Campanha Gaúcha, com indicações das cidades avaliadas no presente estudo	116
Figura 4.4.2. Mapa de calor dos teores (mg L ⁻¹), médias e desvios padrão obtidos para vinhos tintos finos da Campanha Gaúcha, com pelo menos três amostras por variedade e safra	119
Figura 4.4.3. Mapa de calor dos teores (mg L ⁻¹), médias e desvios padrão obtidos para vinhos tintos finos da Campanha Gaúcha, com menos de três amostras por variedade e safra	120
Figura 4.4.4. Gráfico de teores de fenóis bioativos em variedades de vinhos tintos finos da Campanha Gaúcha	122
Figura 4.4.5. Dendograma obtido através dos teores de cinco fenóis bioativos (<i>trans</i> -resveratrol, <i>trans</i> - ϵ -viniferina, quempferol, quercetina e miricetina) em 71 amostras de vinhos tintos finos da Campanha Gaúcha	124
Figura 4.4.6. Gráfico de escores e pesos por PCA (1 e 2) obtido para os teores de fenóis bioativos de 71 amostras de vinhos tintos finos experimentais e comerciais da Campanha Gaúcha	125
Figura 4.4.7. Gráfico de escores e pesos por PCA (3 e 4) obtido para os teores de fenóis bioativos de 71 amostras de variedades de vinhos tintos finos da Campanha Gaúcha	126
Figura 4.4.8. Gráfico de escores e pesos por PCA (2 e 3) obtido para os teores de fenóis bioativos de 45 amostras de vinhos tintos finos experimentais de diferentes variedades da Campanha Gaúcha	128
Figura 4.4.9. Gráfico de escores e pesos por PCA (1 e 3) obtido para os teores de fenóis bioativos de 45 amostras de vinhos tintos finos experimentais de diferentes microrregiões da Campanha Gaúcha	129
Figura 4.4.10. Gráfico de escores e pesos por PCA (1 e 2) obtido para os teores de fenóis bioativos de 45 amostras de vinhos tintos finos experimentais de diferentes safras da Campanha Gaúcha	130

4.5. CAPÍTULO 5

Fig. 4.5.1. Representative structures of the BP chemical classes: stilbenes: <i>trans</i> -resveratrol, flavanols: (-)-epicatechin, flavonols: quercetin, cinnamic acid derived: <i>trans</i> -cinnamic acid and flavanonol: taxifolin	157
Fig. 4.5.2. HPLC-DAD method for BP analysis: chromatograms at 278 and 320 nm, with 10 mg/L of each BP, except catechin and epicatechin (5 mg/L); chromatogram at 320 nm for Cabernet Sauvignon red wine; UV/Vis spectrum and chemical structure of malvidine-3-O-glucoside	158

Fig. 4.5.3. Contour graph of the Cabernet Sauvignon wine sample (CS1): original sample before SPE; original sample after C18 cartridge; original sample after SCXa test; fortified sample, after SCXa test	159
Fig. 4.5.4. Elution sequence of the purification process of a red wine sample with the SCXd test	160
Supplementary Fig. 4.5.1. Radar graph of recoveries for different sample preparation conditions (Cabernet Sauvignon CS1)	160

4.6. CAPÍTULO 6

Figura 4.6.1. Estrutura química do DMU-212, um análogo sintético do <i>trans</i> -resveratrol	167
Figura 4.6.2. Cromatograma em 306 nm obtido para extrato etanólico de casca de uva Arinarnoa, por HPLC-DAD II	174
Figura 4.6.3. Mapa de calor contendo os fatores de correlação (<i>r</i>) entre os teores individuais e parâmetros gerais de compostos fenólicos de oito amostras de uvas e vinhos de novas variedades potenciais da Campanha Gaúcha	181
Figura 4.6.4. Gráfico de teores de fenóis bioativos nas soluções de tratamento de nematoides com uvas e vinhos tintos finos da Campanha Gaúcha (safra 2014 e 2015)	185
Figura 4.6.5. Sobrevivência (média ± DP) de <i>C. elegans</i> frente ao estresse oxidativo causado por paraquat, UV e temperatura, tratados com extratos de uvas e respectivos vinhos da Campanha Gaúcha	187
Figura 4.6.6. Dendograma obtido através de avaliações de atividade antioxidante em nematoides frente a estresses oxidativos (paraquat, UV e temperatura elevada) em soluções de tratamentos de uvas e vinhos tintos finos experimentais da Campanha Gaúcha	189
Figura 4.6.7. Gráfico de escores e pesos por PCA (1 e 3) obtido para os teores de fenóis bioativos de oito amostras de uvas <i>Vitis vinifera</i> L. tintas da Campanha Gaúcha	190

5. DISCUSSÃO GERAL

Figura 5.1. Fluxograma para seleção de método por LC para análise de fenóis bioativos em vinhos tintos	198
---	-----

ANEXO

Figura I. Gráfico de escores e pesos por PCA (1 e 3) obtido para os teores de fenóis bioativos de 71 amostras de variedades de vinhos tintos finos da Campanha Gaúcha	230
Figura II. Gráfico de escores e pesos por PCA (1 e 2) obtido para os teores de fenóis bioativos de 71 amostras de vinhos tintos finos de microrregiões da Campanha Gaúcha	231
Figura III. Gráfico de escores e pesos por PCA (1 e 2) obtido para os teores de fenóis bioativos de 71 amostras de vinhos tintos finos de diferentes safras da Campanha Gaúcha	232

LISTA DE TABELAS

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 3.1. Compostos fenólicos bioativos presentes em uvas e vinhos de acordo com sua classificação química	44
Tabela 3.2. Lista de métodos por HPLC, e exemplos de UPLC, com detectores de UV/Vis, DAD ou MS reportados na literatura científica para análises de compostos fenólicos não antociânicos em vinhos	50

4.2. CAPÍTULO 2

Tabela 4.2.1. Condições analíticas adotadas para a determinação de <i>trans</i> -resveratrol e de quercetina em vinhos tintos	79
Tabela 4.2.2. Avaliação de possíveis interferentes no método CLAE-DAD para análise de <i>trans</i> -resveratrol e quercetina em vinhos tintos	79
Tabela 4.2.3. Figuras de mérito do método cromatográfico (CLAE-DAD) para análise de <i>trans</i> -resveratrol e quercetina em vinhos tintos	80

4.3. CAPÍTULO 3

Table 4.3.1. HPLC conditions during SaF and <i>trans</i> -cinnamic acid method development	95
Table 4.3.2. Analytical characteristics and selectivity (values \pm SD) of the HPLC-DAD method for SaF and <i>trans</i> -cinnamic acid standards	97
Table 4.3.3. Calibration values of the HPLC-DAD method for SaF and <i>trans</i> -cinnamic acid standards	99
Table 4.3.4. Precision, accuracy and robustness of the HPLC-DAD method for SaF and <i>trans</i> -cinnamic acid analysis in Cabernet Sauvignon red wine	101
Table 4.3.5. Concentration of SaF markers and <i>trans</i> -cinnamic acid in commercial red wines samples from Campanha Gaúcha	105

4.4. CAPÍTULO 4

Tabela 4.4.1. Teores médios (\pm DP) para os fenóis bioativos e somatórios de estilbenos, flavonóis e fenóis por vinho tinto varietal da Campanha Gaúcha	121
Tabela 4.4.2. Variâncias dos dados explicadas pela análise por PCA	125

4.5. CAPÍTULO 5

Table 4.5.1. HPLC-DAD and UPLC-MS parameters for the determination of bioactive phenols in red wines	154
Table 4.5.2. Recoveries from sample preparation tests and the SCXd test in real samples of red wine	155
Supplementary Table 4.5.1. SPE procedures for each optimization test with SCX cartridges	156

4.6. CAPÍTULO 6

Tabela 4.6.1. Resultados das curvas de calibração para os compostos fenólicos analisados por UPLC-MS	175
Tabela 4.6.2. Médias (\pm DP) de compostos fenólicos ($\mu\text{g g}^{-1}$ de casca seca) e parâmetros gerais obtidos para uvas <i>Vitis vinifera</i> L. tintas da Campanha Gaúcha, das safras 2014 e 2015	177
Tabela 4.6.3. Médias (\pm DP) de compostos fenólicos (mg L^{-1}) e parâmetros gerais obtidos para os vinhos tintos da Campanha Gaúcha, das safras 2014 e 2015	178
Tabela 4.6.4. Valores calculados de compostos fenólicos ($\times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$) e atividade antioxidante <i>in vivo</i> (média % sobrevivência \pm DP) das soluções de uvas <i>Vitis vinifera</i> L. tintas da Campanha Gaúcha (safras 2014 e 2015), utilizadas para tratamento	183
Tabela 4.6.5. Valores calculados de compostos fenólicos ($\times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$) e atividade antioxidante <i>in vivo</i> (média % sobrevivência \pm DP) das soluções de vinhos tintos da Campanha Gaúcha (safras 2014 e 2015), utilizadas para tratamento	184

5. DISCUSSÃO GERAL

Tabela 5.1. Resumo de métodos desenvolvidos por LC para análises de compostos fenólicos em amostras de vinhos	196
--	-----

ANEXO

Tabela I. Descrições dos padrões analíticos de compostos fenólicos utilizados .	225
Tabela II. Descrições das amostras de variedades de uvas tintas utilizadas	226
Tabela III. Descrições das amostras de variedades de vinhos tintos finos utilizados	227

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

ACN: acetonitrila

ANOVA: análise de variância, do inglês *analysis of variance*

BPs: do inglês *bioactive phenols*

C8: do inglês *octylsilane*

C18: do inglês *octadecylsilane*

C_C: Campanha Gaúcha Central

C_M: Campanha Gaúcha Meridional

C_O: Campanha Gaúcha Ocidental

DAD: detector de arranjo de diodos, do inglês *diode array detector*

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ESI: ionização por "electrospray", do inglês *electrospray ionization*

EtOH: álcool etílico

F_{calc} : valor de Fisher calculado

F_{tab} : valor de Fisher tabelado

HCA: análise de agrupamento hierárquico, do inglês *hierarchical cluster analysis*

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *high performance liquid chromatography*

TPI: índice de fenóis totais, do inglês *total phenol content index*

k : fator capacidade

LC: cromatografia líquida, do inglês *liquid chromatography*

LOD: limite de detecção, do inglês *limit of detection*

LOQ: limite de quantificação, do inglês *limit of quantification*

MeOH: álcool metílico

MS: espectrometria de massas, do inglês *mass spectrometry*

m/z : razão massa/carga

N : número de pratos teóricos

p : probabilidade

PC: componente principal, do inglês *principal component*

PCA: análise de componentes principais, do inglês *principal component analysis*

PVDF: fluoreto de polivinilideno, do inglês *polyvinylidene fluoride*

QTOF: espectrômetro de massas híbrido de quadrupolo e tempo de voo, do inglês *hybrid quadrupole time-of-flight*

R%: recuperação

R_s : resolução

RSD: desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*

SaF: estilbenos e flavonóis, do inglês *stilbenes and flavonols*

SCX: cartucho de troca catiônica forte ligado a anel benzil, do inglês *strong cation exchange linked to benzyl ring cartridge*

SD: desvio padrão, do inglês *standard deviation*

SPE: extração em fase sólida, do inglês *solid-phase extraction*

UPLC: cromatografia líquida de ultra eficiência, do inglês *ultra-performance liquid chromatography*

v/v: volume/volume

TF: fator de cauda, do inglês *tailing factor*

t_R : tempo de retenção, do inglês *retention time*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo Geral	33
2.2. Objetivos Específicos	33
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
3.1. Aspectos Gerais de Uvas e Vinhos	37
3.2. Vitivinicultura	38
3.2.1. No Mundo	38
3.2.2. No Brasil	39
3.2.3. Na Campanha Gaúcha	40
3.3. Valor Nutracêutico de Uvas e Vinhos	41
3.4. Compostos Fenólicos de Uvas e Vinhos	43
3.4.1. Classificação Geral	43
3.4.2. Biossíntese de Compostos Fenólicos	43
3.4.3. Benefícios dos Compostos Fenólicos à Saúde	47
3.4.4. Métodos Analíticos	48
4. CAPÍTULOS	51
4.1. <u>Capítulo 1</u> : Obtenção de Amostras de Uvas e Vinhos da Campanha Gaúcha e Padrões para Análises de Compostos Fenólicos	53
4.1.1. Introdução	55
4.1.2. Padrões Analíticos	55
4.1.3. Amostras	56
4.1.3.1. Uvas	56
4.1.3.2. Vinhos	57
4.1.4. Métodos Analíticos	58
4.2. <u>Capítulo 2</u> : Método HPLC-DAD para Determinação de <i>trans</i> -Resveratrol e Quercetina em Vinhos Tintos	61
4.2.1. Introdução	65
4.2.2. Artigo Submetido ao Periódico Pesquisa Agropecuária Brasileira ..	65
4.2.2.1. Introdução	66
4.2.2.2. Material e Métodos	68

4.2.2.3. Resultados e Discussão	71
4.2.2.4. Conclusões	75
4.2.2.5. Referências	75
4.3. <u>Capítulo 3</u> : Método HPLC-DAD II para Determinação de Seis Fenóis Bioativos em Vinhos Tintos	83
4.3.1. Introdução	85
4.3.2. Artigo Aceito pelo Periódico <i>Chemical Papers</i>	87
4.3.2.1. Introduction	88
4.3.2.2. Experimental	90
4.3.2.2.1. Chemicals and Standards	90
4.3.2.2.2. Samples of Red Wines	91
4.3.2.2.3. Method Development	91
4.3.2.2.4. HPLC-DAD Conditions	92
4.3.2.2.5. Method Validation	92
4.3.2.2.6. Method Application	94
4.3.2.2.7. Statistical Analysis	94
4.3.2.3. Results and Discussion	94
4.3.2.3.1. Development of HPLC-DAD Method	94
4.3.2.3.2. Method Validation	98
4.3.2.3.3. Application of HPLC Method in Red Wine	104
4.3.2.4. Conclusions	106
4.3.2.5. References	108
4.4. <u>Capítulo 4</u> : Análise e Classificação Multivariada de Vinhos Tintos Finos da Campanha Gaúcha através de Fenóis Bioativos	113
4.4.1. Introdução	115
4.4.2. Revisão Bibliográfica	115
4.4.2.1. Campanha Gaúcha como Região Vitivinícola	115
4.4.2.2. Classificação Química em Enologia	116
4.4.3. Material e Métodos	117
4.4.3.1. Amostras	117
4.4.3.2. Metodologia Analítica	117
4.4.3.3. Análises de Dados	117
4.4.4. Resultados e Discussão	118

4.4.4.1. Avaliação Geral de Teores de Fenóis Bioativos	118
4.4.4.2. Análise Multivariada	122
4.4.5. Conclusões	130
4.5. <u>Capítulo 5</u> : Limpeza de Amostras de Vinhos Tintos para Determinação de Fenóis Bioativos por HPLC-DAD II e UPLC-MS	133
4.5.1. Introdução	135
4.5.2. Artigo Submetido ao Periódico <i>Food Chemistry</i>	137
4.5.2.1. Introduction	138
4.5.2.2. Materials and Methods	140
4.5.2.2.1. Chemicals and Standards	140
4.5.2.2.2. Samples of Red Wines	141
4.5.2.2.3. Sample Preparation Tests	141
4.5.2.2.4. HPLC-DAD Method	142
4.5.2.2.5. UPLC-MS Method	143
4.5.2.3. Results and Discussion	144
4.5.2.3.1. Evaluation of Direct Injection by HPLC-DAD	144
4.5.2.3.2. Choice of SPE Adsorbent	145
4.5.2.3.3. Refinement of the SPE Procedure	146
4.5.2.3.4. Additional Analytes by UPLC-MS	147
4.5.2.3.5. Quantification of Real Samples of Red Wines	148
4.5.2.4. Conclusions	149
4.5.2.5. References	150
4.6. <u>Capítulo 6</u> : Avaliação de Compostos Fenólicos e Bioatividade em Uvas e Vinhos de Novas Variedades da Campanha Gaúcha	161
4.6.1. Introdução	163
4.6.2. Revisão Bibliográfica	165
4.6.2.1. Métodos para Fenóis Totais	165
4.6.2.2. Métodos para Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	165
4.6.2.3. <i>Caenorhabditis elegans</i> para Estudos de Atividade Antioxidante	165
4.6.2.4. Compostos Fenólicos da Uva e do Vinho e Análogos como Potenciais Fármacos	166
4.6.3. Material e Métodos	168

4.6.3.1. Reagentes	168
4.6.3.2. Amostras	168
4.6.3.3. Extração de Compostos Fenólicos de Uvas	168
4.6.3.4. Índice de Fenóis Totais	169
4.6.3.5. Método por HPLC-DAD II	169
4.6.3.6. Método por UPLC-MS	169
4.6.3.7. Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	170
4.6.3.8. Atividade Antioxidante <i>in vivo</i>	171
4.6.3.8.1. Preparo das Soluções de Tratamento	171
4.6.3.8.2. Tratamentos em <i>C. elegans</i>	171
4.6.3.9. Análise Estatística	172
4.6.4. Resultados e Discussão	172
4.6.4.1. Seleção de Método para Preparo de Amostras de Uvas	172
4.6.4.2. Teores de Compostos Fenólicos	173
4.6.4.3. Parâmetros Gerais de Avaliação dos Compostos Fenólicos	179
4.6.4.4. Correlações entre Teor de Compostos Fenólicos e Parâmetros Gerais	180
4.6.4.5. Atividade Antioxidante <i>in vivo</i>	182
4.6.4.6. Relação entre Atividade Antioxidante <i>in vivo</i> e Compostos Fenólicos	188
4.6.5. Conclusões	191
5. DISCUSSÃO GERAL	193
6. CONCLUSÕES	201
7. REFERÊNCIAS	205
ANEXO	223

1. INTRODUÇÃO

O consumo de vinho é uma prática milenar de diversas culturas e, no aspecto da saúde humana, é tradicionalmente associado a propriedades nutricionais e terapêuticas (JACKSON, 2008; RENAUD e DE LORGERIL, 1992; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b). Com uma constituição química complexa, o vinho, principalmente o tinto quando consumido moderadamente, proporciona benefícios sobre os sistemas cardiovascular e neurológico, bem como efeitos anticarcinogênicos. Tais atividades são atribuídas às elevadas concentrações de antioxidantes, sendo estes representados pelos compostos fenólicos (BARJOT et al., 2007; FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012; KIM e HE, 2013; NGUYEN et al., 2009; NIGDIKAR et al., 1998; ORSINI et al., 2004; ROUPE et al., 2006; WHELAN et al., 2004). A divulgação dessa relação de ingestão de vinho com a saúde, além de um crescente aperfeiçoamento sensorial, levam o consumidor a desenvolver, cada vez mais, critérios apurados para a escolha da sua bebida. Conseqüentemente, os produtores de uvas e as vinícolas devem estar atentos à qualidade dos seus produtos, os quais podem ser diferenciados através do seu valor nutricional (STRATIL; KUBÁŇ; FOJTOVÁ, 2008).

Apesar dos benefícios reportados, sob o ponto de vista dos profissionais da saúde, o vinho deve ser ingerido com cautela devido à presença de álcool, principalmente por indivíduos com patologias, como doenças cardíacas, hepáticas ou renais (JNC7, 2004; SBH, 2010; WHO, 2003). Entretanto, não são negligenciadas as atividades biológicas inerentes ao consumo de vinho, pois muitos desses fenóis bioativos são formados apenas durante o processo de vinificação e não estão presentes em uvas, outras frutas e sucos (BEHLING et al., 2004; GIEHL et al., 2007; MIYAGI; MIWA; INOUE, 1997). Assim, os compostos fenólicos presentes no vinho, como *trans*-resveratrol e quercetina, são alvos de pesquisas como tais ou através de modificações moleculares, com o objetivo do desenvolvimento de novos fármacos antitumorais, por exemplo (NGUYEN et al., 2009; POTTER et al., 2002a; POTTER et al., 2002b). Os vinhos com teor mais elevado de um ou mais compostos fenólicos apresentam pronunciados efeitos *in vivo* (BURNS et al., 2000; ROCKENBACH et al., 2011). O estudo dessas correlações pode ser usado como subsídio para a determinação dos compostos fenólicos mais potentes ou promissores para uso em medicina (ANDROUTSOPOULOS et al., 2011; MA et al., 2008; SALE et al., 2004).

A caracterização de compostos fenólicos em uvas e vinhos representa uma ferramenta valiosa para pesquisar os seus possíveis benefícios à saúde e curas de doenças (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a). Além disso, a determinação de tais compostos permite avaliar as diferenças entre uvas e/ou vinhos em experimentos multidisciplinares. Mediante determinações qualitativas e quantitativas, podem ser avaliados vários fatores: variedades de uvas e seu potencial enológico; grau de maturação de uvas para a elaboração de vinhos; caracterizações de regiões vitivinícolas; aprimoramento da tecnologia enológica; condições edafoclimáticas para o cultivo de videiras; sanidade de plantas; estimativa da longevidade e do valor agregado de vinhos; entre outros. O teor de compostos fenólicos, metabólitos secundários biossintetizados por videiras, é uma característica determinante em muitos desses aspectos (LORRAIN et al., 2013; SILVA et al., 2011).

Técnicas analíticas instrumentais contribuem, de forma mensurável e específica, para a exploração química de compostos fenólicos em uvas e vinhos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a). A maioria dos métodos disponíveis na literatura científica para análise de compostos fenólicos em uvas e vinhos emprega cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC), com detectores de ultravioleta/visível (UV/Vis), arranjo de diodos (DAD) ou espectrometria de massas (MS) (AZNAR et al., 2011; COTEA et al., 2012; FANG et al, 2007; FONTANA e BOTTINI, 2014; PEREIRA et al., 2010; PÉREZ-MAGARINO; ORTEGA-HERAS; CANO-MOZO, 2008; SALVATORE et al, 2013; SILVA et al., 2011; VRHOVSEK et al, 2012). Esses equipamentos são utilizados em laboratórios de vários países com o intuito de caracterizar os compostos fenólicos e, assim, direcionar a estratégia tecnológica para a elaboração de vinhos tintos finos (YOU et al., 2012). A tecnologia envolvida nesses equipamentos vem crescendo rapidamente (CIELECKA-PIONTEK et al., 2013).

No Brasil, país com polos de produção vitivinícola recentes, a aplicação de ferramentas analíticas para a análise de novos tipos e estilos de vinhos se encontra em fase de aplicação e aprimoramento (GUERRA et al., 2009). Considerando que esse segmento ainda está em desenvolvimento, poucos laboratórios brasileiros dispõem de instrumentação analítica com a tecnologia mais avançada. Os métodos disponíveis na literatura até o momento (ADRIAN et al., 2000; AZNAR et al., 2011;

COTEA et al., 2012; MALOVANÁ et al., 2001; PEREIRA et al., 2010; PÉREZ-MAGARINO; ORTEGA-HERAS; CANO-MOZO, 2008; SILVA et al., 2011; VILLIERS et al., 2004; VITRAC et al., 2005) não atendem por completo aos requisitos de tais estabelecimentos. Afinal, prioritariamente, os métodos devem ser: rápidos, para realização de análises de rotina; com baixo consumo de solventes, para preservação do meio ambiente e redução de custos; validados para o atendimento a normas técnicas laboratoriais (BRASIL, 2003; FDA, 2001; ISO, 2005); ter possibilidade de analisar o maior número possível de compostos fenólicos com a menor complexidade analítica possível; aplicação testada em diferentes tipos de amostras de uvas e/ou vinhos. Cabe, portanto, disponibilizar a esses laboratórios métodos confiáveis para a análise de compostos fenólicos em uvas e vinhos, os quais sejam passíveis de adequação a cada condição e propósito. Assim, a melhoria da qualidade dos vinhos provenientes dos novos polos vitivinícolas brasileiros é capaz de trazer benefícios à sociedade brasileira, contribuindo para a competitividade e sustentabilidade da agricultura (MELLO, 2013). No setor vitícola, é possível obter a qualificação da produção de uvas, de acordo com sua variedade, origem e safra. Adicionalmente, o conhecimento do perfil fenólico de uvas e vinhos, associado aos seus efeitos biológicos, pode contribuir para o desenvolvimento de novas terapias medicamentosas (ANDROUTSOPOULOS et al., 2011; MA et al., 2008; SALE et al., 2004).

A Campanha Gaúcha é uma das mais promissoras entre as novas regiões vitivinícolas brasileiras (GUERRA, 2014; OLIVEIRA; MARTINEZ; SANTOS, 2015; SILVEIRA, 2013; TONIETTO et al., 2012) e, conseqüentemente, as pesquisas relacionadas aos compostos fenólicos de seus produtos ainda são escassas. Conforme algumas estimativas anteriores, a Campanha Gaúcha apresenta condições climáticas favoráveis, podendo produzir uvas com altos teores de *trans*-resveratrol e quercetina (GUERRA; TONIETTO; MION-GUGEL, 2008a; GUERRA; ZUCOLOTTO; TONIETTO, 2008b) e ter alta atividade antioxidante (PAZZINI et al., 2015). Contribuindo com esses aspectos, na presente tese foram propostos métodos analíticos instrumentais passíveis de implantação em diferentes laboratórios. Além disso, foram realizadas a caracterização fenólica e a avaliação biológica de uvas e vinhos da Campanha Gaúcha. Para as análises, utilizou-se como ferramentas: a técnica de cromatografia líquida (LC), a técnica de espectrometria de massas (MS) e

a disciplina de Quimiometria. Somando-se a essa caracterização química, variedades de uvas e vinhos foram avaliadas quanto à capacidade antioxidante *in vitro* e atividades em *Caenorhabditis elegans*, um nematoide com genoma altamente correlacionado ao de humanos (BRENNER, 1994; HENRICSON et al., 2004; LIMA et al., 2014).

As atividades práticas deste trabalho foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LACEM) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Uva e Vinho, (Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul), no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Rio Grande do Sul) e no Laboratório GBToxCe da Universidade Federal do Pampa (Uruguaiana, Rio Grande do Sul).

Os resultados obtidos foram compilados objetivando, principalmente, a sua divulgação à comunidade científica e à sociedade, sendo a última representada pelos laboratórios enológicos. Assim, esta tese é apresentada na forma de capítulos. Primeiramente, no Capítulo 1 consta a definição dos compostos fenólicos a serem avaliados, das amostras de uvas e vinhos e dos métodos analíticos por LC a serem utilizados. Na sequência, são apresentados dois artigos com métodos simples, por HPLC-DAD, para determinações de dois e seis fenóis bioativos (Capítulos 2 e 3, respectivamente). No Capítulo 4, é apresentada uma classificação de vinhos da Campanha Gaúcha, após a aplicação do segundo método (HPLC-DAD II) em várias amostras. Um método para análise de um maior número de compostos fenólicos, eliminando interferentes, consta no Capítulo 5. Por fim, o Capítulo 6 correlaciona o teor de compostos fenólicos em uvas e vinhos com a sua atividade antioxidante.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Propor métodos para a determinação da composição fenólica e da atividade antioxidante de uvas e vinhos tintos finos e aplicá-los aos produtos da Campanha Gaúcha.

2.2. Objetivos Específicos

a) Desenvolver, validar e aplicar um método rápido, por HPLC-DAD, para a análise de rotina de *trans*-resveratrol e quercetina em vinhos tintos finos;

b) Desenvolver, validar e aplicar um método simples e sem necessidade de preparo de amostra, por HPLC-DAD (II), para a análise de fenóis bioativos em uvas e vinhos tintos finos;

c) Classificar vinhos da Campanha Gaúcha, com diferentes tipos de elaboração, variedades, safras e microrregiões de cultivo das uvas, de acordo com o seu teor de fenóis bioativos;

d) Propor um método para o preparo de amostras de uvas e vinhos, com a finalidade de eliminar interferentes e possibilitar análises simultâneas de vários compostos fenólicos por HPLC-DAD e UPLC-MS;

e) Estimar o potencial de novas variedades de uvas da Campanha Gaúcha para a elaboração de vinhos tintos finos com base na determinação de fenóis bioativos;

f) Avaliar a contribuição dos compostos fenólicos de uvas e vinhos correspondentes da Campanha Gaúcha para a capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aspectos Gerais de Uvas e Vinhos

A videira é uma planta vigorosa da família *Vitaceae*. Seu cultivo pode ser explorado comercialmente em grandes áreas ou em pequenas propriedades. Além do consumo *in natura* das uvas, estas são utilizadas como matérias-primas para a produção de várias bebidas e alimentos, como sucos, vinhos, destilados e geleias (CREASY e CREASY, 2009; KUHN et al., 1996; RIBÉREAU-GAYON, 2006a; RIBÉREAU-GAYON, 2006b).

As videiras do gênero *Vitis* spp. são as mais difundidas mundialmente, sendo classificadas basicamente em europeias, americanas e híbridas. As cultivares europeias (*Vitis vinifera* L.) apresentam maior valor agregado, devido à possibilidade de elaboração de vinhos finos (BRASIL, 1988; BRASIL, 2004; JACKSON, 2008). Essa espécie, porém, é mais sensível às condições edafoclimáticas e algumas variedades requerem um manejo cuidadoso para a produção de frutos com alta qualidade. As videiras americanas (ex. *Vitis labrusca* L.) são mais resistentes às doenças e toleram um manejo menos rigoroso do que as europeias. Sua qualidade sensorial é adequada para o consumo *in natura*, para a elaboração de sucos ou vinhos de mesa. As variedades híbridas (*Vitis* spp.) são plantas resultantes de cruzamentos, com os objetivos de melhorar a resistência de *Vitis vinifera* L. às pragas e/ou obter uma qualidade superior à *Vitis labrusca* L. (KUHN et al., 1996).

Em todo o mundo, o vinho é uma bebida obtida através de fermentação alcoólica do mosto simples de uvas sãs, frescas e maduras (BOULTON et al., 1996; GASSNIER, 2013; GMC, 1996; RIBÉREAU-GAYON, 1950). Vários países classificam os tipos de vinhos de acordo com regulamentos definidos para cada produto. Conforme a legislação brasileira e regulamentação vitivinícola do Mercosul, vinho fino é o vinho de teor alcoólico de 8,6% a 14% em volume e exclusivamente de variedades *Vitis vinifera* L. (BRASIL, 2004; GMC, 1996). Os vinhos são também classificados quanto à cor em brancos, tintos ou rosados, dependendo da uva que lhe deu origem (BRASIL, 2004). A qualidade de um vinho, intrínseca ou percebida, é influenciada por: potencial genético da variedade de videira; fatores naturais, como localização do vinhedo, clima e solo; fatores agrônômicos; tecnologia enológica (GUERRA, 2010; GASSNIER, 2013).

A constituição química do vinho é complexa e dinâmica ao longo de sua evolução, com metabólitos vegetais primários e secundários. Os principais compostos orgânicos do vinho tinto são: água, álcoois (cerca de 12 °GL de álcool etílico “EtOH”), ácidos orgânicos, compostos fenólicos, proteínas, polissacarídeos, açúcares e compostos aromáticos. A qualidade do vinho, tanto sob o aspecto sensorial quanto nutricional, está relacionada à presença destes compostos (GASSNIER, 2013; LONA, 2009). Além disso, estão presentes componentes inorgânicos, como sódio, potássio, cloretos, fostatos, entre outros minerais (GUERRA, 2010; RIBERÉAU-GAYON et al., 2006b).

3.2. Vitivinicultura

3.2.1. No Mundo

Os primeiros indícios de elaboração de vinhos datam de 4.000 a.C., no Egito. Posteriormente, a expansão da vitivinicultura ocorreu nas proximidades do mar Mediterrâneo. A popularização do consumo e o desenvolvimento de práticas enológicas foram iniciados a partir do desenvolvimento das civilizações grega e romana (GASSNIER, 2013).

Atualmente, a viticultura é uma das áreas agrícolas mais exploradas no mundo (CREASY e CREASY, 2009; JACKSON, 2008; RIBÉREAU-GAYON, 2006a). Conforme o relatório estatístico mundial de vitivinicultura, em 2012, as plantações de videiras ocupavam cerca de 7.528 milhões de hectares, a produção de vinho foi de 252.000 hL e o consumo de vinho foi de 243.000 hL. Isso representa um desenvolvimento estável do setor, impactando no mercado financeiro mundial (OIV, 2013).

O cultivo de videiras é concentrado em regiões situadas entre os paralelos 30 e 50° para norte ou sul, com uma faixa mais restrita ao norte e mais dispersa ao sul. De forma geral, isto está relacionado ao fato das plantas apresentarem maior potencial para a elaboração de vinhos de qualidade quando cultivadas em clima temperado, com verões e invernos bem definidos.

3.2.2. No Brasil

O cultivo da videira no Brasil foi marcado pela colonização europeia. As primeiras mudas chegaram através dos imigrantes, os quais se instalaram principalmente nas Regiões Sul e Sudeste do país (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011). Com a notável presença de imigrantes italianos na Serra Gaúcha (paralelo 29 ° sul), esta região de altitude se tornou tradicional na área de vitivinicultura, propiciando a obtenção de vinhos de qualidade (ABE, 2011; TONIETTO et al., 2012).

No país, existem mais de 1.000 vinícolas credenciadas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com uma ampla variedade de produtos. O Brasil é responsável pela elaboração de 1,15% do volume mundial de vinhos. Há espaço para crescimento dessa área, visto que os vinhos brasileiros têm pouca representatividade no comércio internacional e o consumo ainda é baixo, quando comparado a outros países, como a França e a Itália (MELLO, 2012; OIV, 2013).

Atualmente, a maior produção vitivinícola continua no Rio Grande do Sul, representando 90% da totalidade do país (MAPA, 2015; MELLO, 2013), que apresentam noites frias ou temperadas. Outras regiões vitivinícolas em crescimento no país são no Vale do Submédio do São Francisco (Pernambuco e Bahia) e Planalto Catarinense (Santa Catarina) (TONIETTO et al., 2012). Algumas indicações geográficas brasileiras foram estabelecidas na Serra Gaúcha, como a Denominação de Origem do Vale dos Vinhedos (Bento Gonçalves, RS) e Indicação de Procedência de Pinto Bandeira (RS), o que contribui para o fortalecimento e desenvolvimento econômico do setor e dessas microrregiões (ABE, 2011; CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011; PROTAS e CAMARGO, 2011; TONIETTO et al., 2012).

Novas regiões brasileiras com potencialidade para produção de uvas têm sido identificadas em estudos. Os resultados de tais pesquisas indicam que, devido à diversidade entre suas regiões e possibilidades de combinações de vários fatores, o Brasil tem grande potencial para obtenção de vinhos finos de qualidade, incluindo todas as regiões. O Rio Grande do Sul apresenta outras regiões promissoras além da tradicional Serra Gaúcha: Campanha Gaúcha, Campos de Cima da Serra e Serra do

Sudeste (Figura 3.1) (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011; GUERRA; TONIETTO; MION-GUGEL, 2008a; GUERRA; ZUCOLOTTO; TONIETTO, 2008b; TONIETTO et al., 2012).

3.2.3. Na Campanha Gaúcha

A região da Campanha Gaúcha, situada no paralelo 31° Sul vem se destacando na obtenção de vinhos finos. Essa região reúne fatores ambientais desejáveis para a obtenção de uva de alto potencial enológico, como o alto índice heliotérmico, que é um índice climático vitícola, e a menor umidade relativa do ar quando comparada às demais regiões vitivinícolas do Rio Grande do Sul (TONIETTO et al., 2012). Uma característica observada para os vinhos tintos elaborados com uvas dessa região é a intensidade do corpo e da cor (GUERRA et al., 2009). Tal atributo é considerado positivo do ponto de vista sensorial e está relacionado à composição química, inclusive compostos fenólicos (GUERRA, 2010). Por esses motivos, a região está em fase de estudos para Indicação de Procedência (GUERRA, 2014; SILVEIRA, 2013). Recentemente, um estudo comprovou o alto teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em vinhos Tannat de Itaqui (Campanha Ocidental) (PAZZINI et al., 2015).

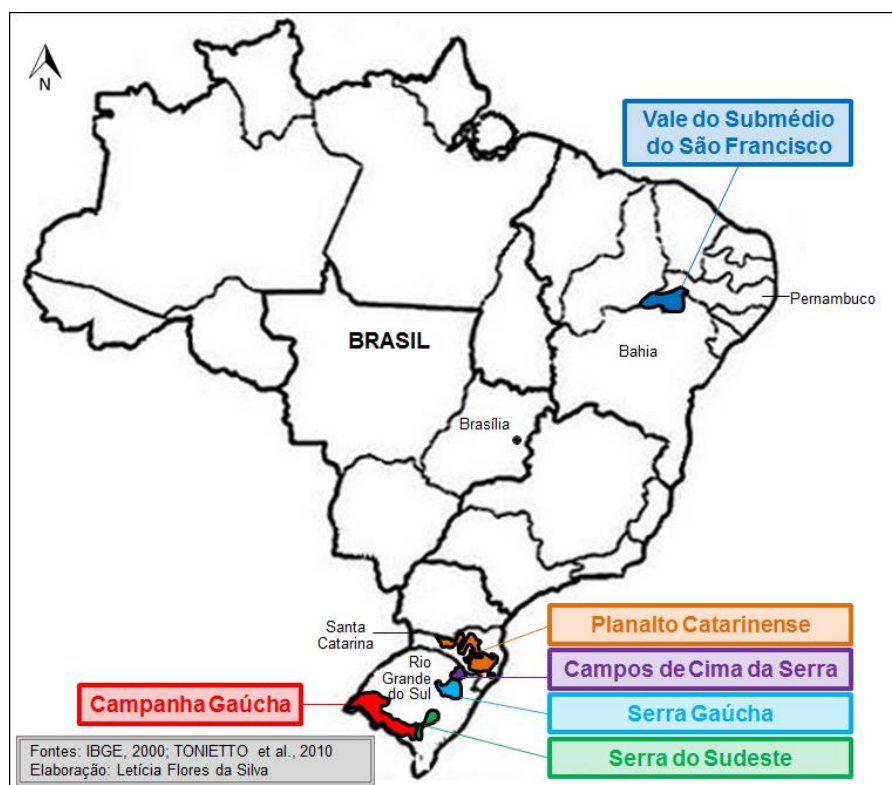


Figura 3.1. Principais regiões vitivinícolas do Brasil.

3.3. Valor Nutracêutico de Uvas e Vinhos

O termo nutracêutico foi criado pelo Dr. Stephen DeFelice, em 1989, o qual deriva das palavras nutrição e farmacêutico. Sua definição foi: “Um nutracêutico é qualquer alimento ou parte de alimento que proporciona benefícios medicinais ou à saúde, incluindo prevenção e tratamento de doenças” (FIM, 1999).

As uvas são ricas em compostos antioxidantes, vitaminas e minerais, portanto possuem elevado valor nutracêutico (BOULTON et al., 1996; GASSNIER, 2013; GUERRA, 2010; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006a). Consequentemente, seus produtos derivados, como vinhos e sucos, também representam fontes nutricionais importantes à dieta humana, quando preparados de forma a manter ou ressaltar suas características originais (SHILS et al., 2006). Assim, o seu consumo é bastante recomendado com o intuito de prevenção de doenças (MAHAN; ESCOTT-STUMP; RAYMOND, 2012; SHILS et al., 2006; SILVA e MURA, 2010). A dose diária máxima indicada é de 30 g de EtOH para homens e 10 a 15 g para mulheres, equivalentes a 300 e 150 mL de vinho, respectivamente (JNC7, 2004; SBH, 2010).

As doenças do sistema cardiovascular representam uma preocupação mundial, devido ao elevado número de mortes relacionadas às mesmas (MATHERS et al., 2005). Tais riscos são fortemente associados ao elevado consumo de alimentos com alto teor de gordura e bebidas alcoólicas (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Entretanto, uma contradição dessa relação foi evidenciada na França, onde, apesar de elevado consumo de gorduras, a morte por doenças cardiovasculares era baixa em relação a outros países com dieta similar. Assim, em 1992, foi realizado um estudo com seres humanos para estudar o “paradoxo francês”. Mediante avaliação de dados epidemiológicos e testes bioquímicos, foi confirmada a hipótese de baixa mortalidade nos franceses, atribuída principalmente ao consumo regular e moderado de bebidas alcoólicas fermentadas, como o vinho (RENAUD e DE LORGERIL, 1992). Desde então, vários trabalhos confirmaram esses resultados, agregando, ainda, outras atividades benéficas à saúde humana (FLAMINI et al., 2013; NIGDIKAR et al., 1998; WHELAN et al., 2004).

Há muitas contradições entre os profissionais da saúde quando o assunto é bebida alcoólica. Afinal, o consumo exagerado pode desencadear o alcoolismo e

patologias associadas, como cirrose e cânceres (SHILS et al., 2006). Entretanto, cabe a avaliação dos riscos e dos benefícios a cada indivíduo, já que há evidências de que o vinho apresenta alto teor de compostos com biodisponibilidade no organismo humano (SILVA e MURA, 2010). Os compostos fenólicos na fruta, por exemplo, são encontrados em maior concentração ligados a sacarídeos, como a glicose, os quais apresentam menor absorção nos tecidos gastrointestinais. Já no vinho, estão presentes as formas livres desses compostos, sendo esses mais ativos biologicamente (ANDERSEN e MARKHAM, 2006; BEHLING et al., 2004; CRESPIY et al., 1999; CRESPIY et al., 2002; CROZIER; CLOFFORD; ASHIHARA, 2006; MUROTA e TERAQ, 2003). Isso ocorre, pois no processo fermentativo os ácidos auxiliam na hidrólise dos sacarídeos e liberação dos polifenóis correspondente (ANDERSEN e MARKHAM, 2006; CROZIER; CLOFFORD; ASHIHARA, 2006). O meio etanólico, durante a produção do vinho, auxilia na extração desses compostos em células mais profundas das cascas de uva. Ainda, quando se compara uvas *Vitis labrusca* L. com uvas *Vitis vinifera* L. aptas à produção de vinho, as últimas apresentam maior teor de compostos fenólicos. Afinal, fisiologicamente, as uvas *Vitis vinifera* L. são mais susceptíveis a ataques por patógenos e, para a sua defesa, ocorre maior estímulo da biossíntese de fitoalexinas, como o *trans*-resveratrol. Conseqüentemente, as mesmas contêm concentrações mais elevadas de metabólitos secundários, como os compostos fenólicos, do que as uvas *Vitis labrusca* L. (CREASY e CREASY, 2009; JACKSON, 2008).

Sendo assim, a ingestão do vinho, além de proporcionar satisfação sensorial, pode ser ingerido por indivíduos, com finalidade nutricional, desde que esses sejam saudáveis fisicamente e psicologicamente. Para isso, é altamente recomendável que a dose de vinho esteja de acordo com a dieta, peso, altura e gênero do consumidor (WHO, 2003). Profissionais da área da saúde, como médicos, nutricionistas e farmacêuticos podem orientar a população quanto a esse aspecto. Quando houver necessidade de restrição do álcool, uvas de mesa e sucos podem ser incluídos na dieta alimentar (SHILS et al., 2006).

De acordo com a concentração dessas substâncias naturais e benéficas à saúde em uvas e seus derivados, podem ser atribuídos diferentes valores nutracêuticos. Isso pode ser influenciado por diversos fatores, que, em conjunto,

podem favorecer a produção de uvas *Vitis vinifera* L. e de vinhos com alta concentração de fenóis bioativos, bem como de alta qualidade (FERRER-GALEGO et al., 2012; TENORE et al., 2011).

3.4. Compostos Fenólicos de Uvas e Vinhos

3.4.1. Classificação Geral

Os compostos fenólicos, ou simplesmente fenóis, são responsáveis pelas principais diferenças entre os vinhos brancos e tintos, principalmente quanto à cor e ao sabor dos produtos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b). Sua concentração é maior nos tintos, pois estão presentes principalmente nas cascas e nas sementes destas uvas. Esses compostos são responsáveis por aspectos sensoriais, como cor, adstringência, corpo, assim como pela longevidade do vinho (GUERRA, 2010).

Os compostos fenólicos podem ser flavonoides, conforme estrutura básica apresentada na Figura 3.2a, ou não flavonoides. Os flavonoides (C6-C3-C6) apresentam dois anéis aromáticos, A e B. Também há um anel C fundido ao A, que forma uma ponte de três carbonos entre os anéis aromáticos, sendo que o primeiro contém o oxigênio como heteroátomo. As numerações dos anéis A e C ocorrem sequencialmente a partir do anel com oxigênio no sentido do anel aromático fundido. A numeração do anel B é diferenciada pela adição do apóstrofo ao número que se inicia na ligação com o carbono do anel C. Os diversos flavonoides são diferenciados por diferentes ligantes em diversas posições dos anéis, tais como hidroxilas ou açúcares. Os não flavonoides são pertencentes às classes de estilbenos (C6-C2-C6), encontrados principalmente na sua forma mais ativa *trans* (Figura 3.2b). Dentre os não flavonoides também estão os derivados de ácidos fenólicos (Figura 3.2c). As principais moléculas representantes de cada grupo, com relatos de bioatividade, constam na Tabela 3.1 (BBSRC, 2016; CROZIER; CLOFFORD; ASHIHARA, 2006; PIETTA; MINOGGIO; BRAMATI, 2003; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b).

3.4.2. Biossíntese de Compostos Fenólicos

As complexas biossínteses de estilbenos, derivados do ácido cinâmico (Figura 3.3) e flavonoides (Figura 3.4) envolvem as rotas do chiquimato, fenilpropanoides e

flavonoides (ANDERSEN e MARKHAM, 2006; CROZIER; CLOFFORD; ASHIHARA, 2006; DONNEZ et al., 2009; GENOMENET, 2015; TREUTTER, 2010).

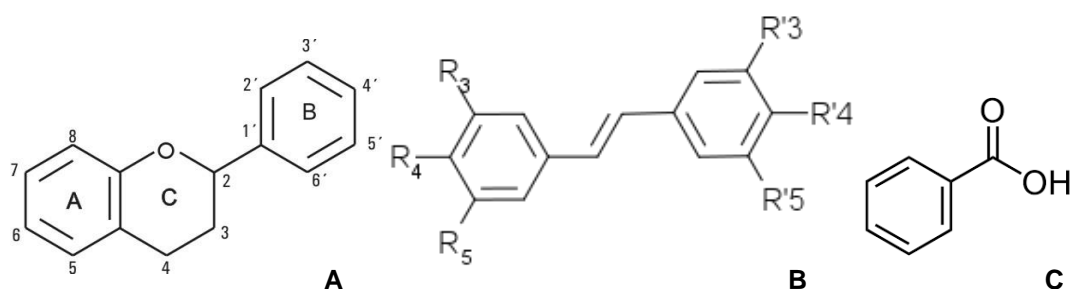


Figura 3.2. Estruturas químicas básicas dos flavonoides (A), estilbenos na posição *trans* (B) e ácidos fenólicos (C).

Tabela 3.1. Compostos fenólicos bioativos presentes em uvas e vinhos, de acordo com sua classificação química (ANDERSEN e MARKHAM, 2006; BBSRC, 2016; GUERRA, 2010; PIETTA; MINOGGIO; BRAMATI, 2003; RIBEREÁU-GAYON et al., 2006b).

Origem	Classificação	Principais Compostos Fenólicos
Flavonoides	Antocianidinas ¹	malvidina, cianidina, petunidina, peonidina, delphinidina
	Flavanóis	(+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, galatos, procianidinas, polímeros
	Flavonóis	quempferol, quercetina, miricetina, rutina, derivados ligados a sacarídeos
	Flavanonas	naringerina, eriodictiol
	Flavanonóis	(+)-taxifolina, astilbina
Não flavonoides	Estilbenos	<i>trans</i> -resveratrol, <i>trans</i> -piceido, <i>trans</i> - ϵ -viniferina
	Derivados de ácidos fenólicos	cinâmico: ácido <i>trans</i> -cinâmico, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferúlico benzoico: ácido salicílico, ácido gálico

¹ Responsáveis pela cor de uvas e vinhos tintos. Presentes principalmente na forma sacarídica, chamadas de antocianinas.

Os compostos fenólicos são metabólitos vegetais e sua biossíntese está relacionada à defesa ao ataque de patógenos. Algumas plantas apresentam genes para a produção de enzimas responsáveis pela formação desses compostos. Isso pode estar atrelado à genética ou às condições evolutivas de adaptação da planta. As uvas *Vitis vinifera* L., como informado no item 3.1, são mais susceptíveis a ataques por fungos do que as uvas *Vitis vinifera* L. ou outras variedades *Vitis* spp. Isso faz com que suas rotas biossintéticas para a produção de metabólitos antifúngicos, como a

fitoalexina *trans*-resveratrol, por exemplo, sejam ativadas (ANDERSEN e MARKHAM, 2006; CROZIER; CLOFFORD; ASHIHARA, 2006; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006b).

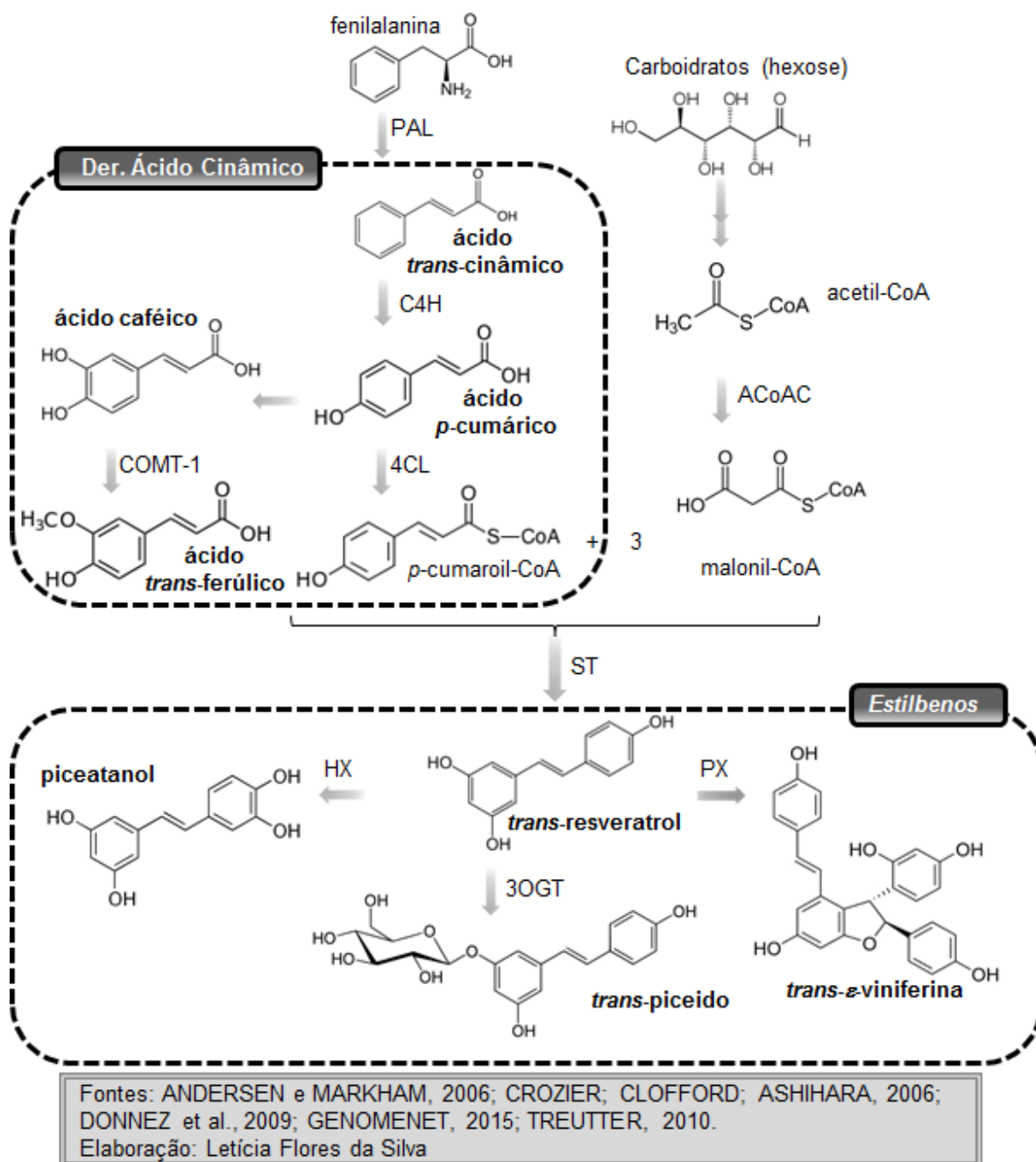


Figura 3.3. Biossíntese de derivados de ácido cinâmico e estilbenos. Enzimas envolvidas: fenilalanina amônia liase (PAL), cinamato 4-hidroxilase (C4H), *p*-cumarato:CoA-ligase (4CL), ácido caféico/5-hidroxi-ferúlico *O*-metil transferase (COMT-1), acetilCoA carboxilase (ACoAC), estilbeno sintase (ST), hidroxilase (HX), flavonoide 3'-hidroxilase (FH), flavonoide 3',5'-hidroxilase (FD), 3-*O*-glicosil transferase (3OGT) e peroxidase (PX).

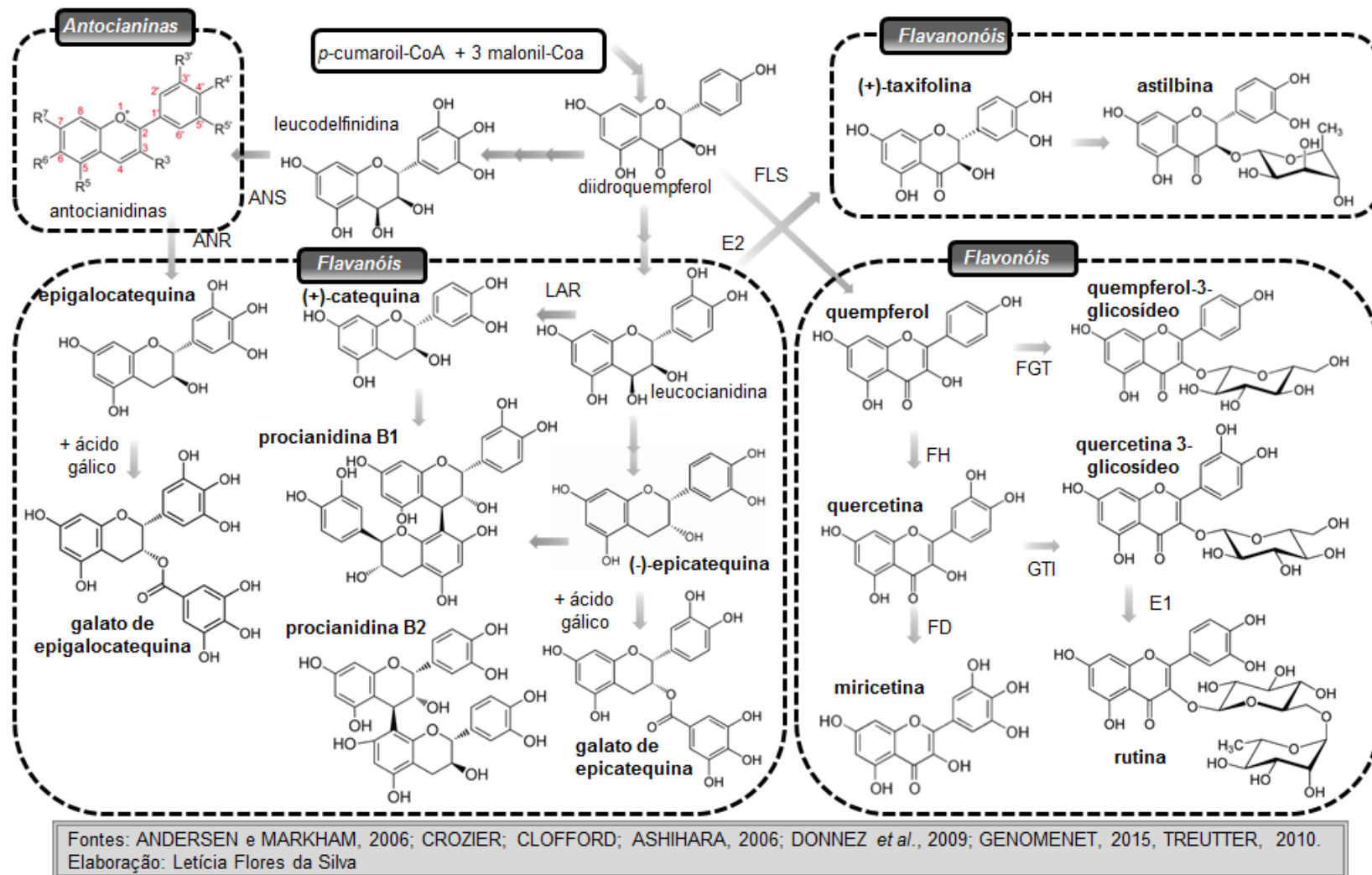


Figura 3.4. Biossíntese de flavonoides. Enzimas envolvidas: flavonol sintase (FLS), diidroquempferol 4-redutase (E2), antocianidina sintase (ANS), antocianidina redutase (ANR), flavonoideglicosil transferase (FGT), flavonoide 3'-hidroxilase (FH), flavonoide 3',5'-hidroxilase (FD), flavonol 3-O-glicosiltransferase (GTI) e flavonol-3-O-glicosídeo L-ramnosil-transferase (E1).

Os compostos fenólicos presentes nos vinhos tintos reagem ao longo do período de evolução dos mesmos. As principais reações envolvem as antocianinas, com reações dos tipos: condensação indireta entre antocianina e flavanol, polimerização indireta entre flavanóis, condensação direta entre antocianina e flavanol, degradação das antocianinas e oxidação não enzimática dos taninos. Assim, os produtos formados contribuem para a longevidade de vinhos tintos (FREITAS e MATEUS, 2011; GUERRA, 1997; GUERRA, 2010).

3.4.3. Benefícios dos Compostos Fenólicos à Saúde

Os compostos fenólicos presentes em vinhos apresentam atividades biológicas bastante diversificadas. Estudos *in vitro* e *in vivo* foram conduzidos com os compostos fenólicos isolados ou em conjunto (SHILS et al., 2006). A ação antioxidante é amplamente relatada na literatura e dela derivam outras atividades, tais como anticarcinogênica, anti-inflamatória, protetora cerebral e antienvelhecimento (BARJOT et al., 2007; FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012; NIGDIKAR et al., 1998; ROUPE et al., 2006; WHELAN et al., 2004). De forma geral, essas patologias estão envolvidas com a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), danosas para os sistemas biológicos (FINLEY et al., 2013; YU e SCHERLLHORN, 2013). Os compostos antioxidantes, como os compostos fenólicos, possuem a capacidade de captar os radicais livres, inibindo assim os processos oxidativos (FINLEY et al., 2013; MAHAN; ESCOTT-STUMP; RAYMOND, 2012; SHILS et al., 2006; SILVA e MURA, 2010).

O *trans*-resveratrol é o fenol de uvas e vinhos com maior número de comprovações científicas de atividades biológicas. Um dos possíveis mecanismos de atividade anticarcinogênica do *trans*-resveratrol é por indução específica da apoptose, ou seja, a morte celular não seguida de autólise. Outro mecanismo bastante relatado para o *trans*-resveratrol é a inibição do ciclo de células cancerígenas de pulmão, cólon, pele, mama, ovário, rim, próstata e fígado, por exemplo (ANDROUTSOPOULOS et al., 2011; BELLINA et al., 2015; CUSHMAN et al., 1991; KIM e HE, 2013; MIKSTACKA et al., 2014; NGUYEN et al., 2009; PETTIT et al., 2009; POTTER et al., 2002a). Outros estudos demonstraram que os fenóis bioativos exercem proteção cardiovascular, com modulação dos canais de potássio (ORSINI et al., 2004; WANG et al., 2012). Os compostos bioativos de uvas e vinhos também promovem a redução da agregação

plaquetária, atuando na prevenção da aterosclerose (GIEHL et al., 2007; RENAUD e DE LORGERIL, 1992). A ação antioxidante também induz a proteção cerebral mediante ativação da sinalização, transcrição, fosforilação e expressão gênica (MAHAN; ESCOTT-STUMP; RAYMOND, 2012). Além disso, há observações de que os flavonoides atuam em funções da tireoide, proporcionando a interrupção do metabolismo dos hormônios T3 e T4. Outras atividades relatadas foram: antiobesidade, antidiabético, antimicrobiano e antiviral (HOSSION et al., 2010; MAHAN ESCOTT-STUMP; RAYMOND, 2012; SILVA e MURA, 2010). Apesar das pesquisas, as doses diárias de fenóis bioativos para humanos não são bem estabelecidas ou são contraditórias.

3.4.4. Métodos Analíticos

A avaliação da qualidade e da composição química de vinhos é realizada através de análises químicas globais ou específicas, complementadas pela análise sensorial. Para tais casos, existem métodos padronizados (OIV, 2016a; OIV, 2016b). Do mesmo modo, a avaliação do potencial enológico de uvas destinadas à vinificação é feita por alguns parâmetros considerados clássicos, como dosagem quantitativa de açúcares, ácidos, pH, densidade do mosto, entre outros. No entanto, para avaliações mais aprofundadas do potencial enológico de uvas e da qualidade de vinhos, são necessários testes mais específicos. Nisso, são incluídas determinações químicas em etapas da elaboração de produtos derivados de uvas, como os compostos fenólicos, por exemplo (LORRAIN et al., 2013; SILVA et al., 2011; STRATIL; KUBÁŇ; FOJTOVÁ, 2008). Assim, podem ser empregadas em etapas do processo de vinificação e na determinação do valor nutracêutico (GARCÍA-MARINO et al., 2011; YOU et al., 2012).

Em diversos países, a análise de compostos fenólicos é uma prática de rotina, utilizando métodos analíticos como LC e MS (Tabela 3.2). Entre esses compostos fenólicos, os não antociânicos possibilitam uma avaliação mais adequada da qualidade de uvas e vinhos, uma vez que essas moléculas são mais estáveis, ou seja, apresentam baixa reatividade quando comparados às antocianinas (GUERRA, 1997; GUERRA, 2010; FREITAS e MATEUS, 2011). Entretanto, no Brasil, os procedimentos para avaliação de compostos fenólicos ainda necessitam de desenvolvimento, considerando que a ela tem sido feita, na grande maioria, por um método químico tradicional, denominado Folin-Ciocalteu ou pelo índice de fenóis totais em 280 nm

(ABE et al., 2007; RIBEREÁU-GAYON, 2006b; ZANUS et al., 2009). A limitação desses métodos é não diferenciar os compostos, gerando um resultado do conteúdo de fenóis totais (OIV, 2016a).

Os compostos fenólicos não antociânicos com maior número de doseamentos em estudos são: estilbenos (*trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol, *trans*-piceido e *trans*- ϵ -viniferina), flavonóis (quempferol, quercetina, miricetina e rutina), flavanóis ((+)-catequina, (-)-epicatequina), derivados de ácidos fenólicos (ácido *p*-cumárico, ácido *trans*-ferúlico, ácido caféico, ácido *trans*-cinâmico, ácido gálico, ácido siríngico, ácido vanílico, ácido protocatéquico e ácido salicílico).

Os métodos disponíveis na literatura (Tabela 3.2) indicam que o uso de técnicas de LC, espectrofotometria e MS permitem a identificação e a quantificação de diversas moléculas orgânicas, simultaneamente, em matrizes complexas, como o vinho (ANDERSEN e MARKHAM, 2006; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2010; SKOOG et al., 2006). A técnica de LC possibilita a separação de compostos e, com os recentes avanços em UPLC, é possível obter alta resolução e diminuição do tempo de análise (MALDANER e JARDIM, 2009). Entretanto, com base nesse levantamento da literatura, os métodos disponíveis para doseamentos de compostos fenólicos em uvas e vinhos são inadequados para o atendimento aos objetivos dessa tese. Afinal, tais métodos são longos, complexos, não foram completamente validados ou foram aplicados a um pequeno número de amostras e analitos. Assim, os capítulos a seguir apresentam os métodos analíticos para compostos fenólicos, com validação e aplicação às amostras da Campanha Gaúcha, bem como a avaliação de atividade antioxidante, desenvolvidos na tese.

Tabela 3.2. Lista de métodos por HPLC, e exemplos de UPLC, com detectores de UV/Vis, DAD ou MS reportados na literatura científica para análises de compostos fenólicos não antocianícos em vinhos.

Tempo (min)	Preparo Amostra ^a	Validação	Apl. ^b	Fenóis ^c	Referência
HPLC-UV/Vis					
52	ID	Parcial	7	M Q K	FANG et al., 2007
35	L-L	Parcial	55	Q K M 1 5 8-10 13 14 17 19 33	RODRIGUEZ-DELGADO et al., 2002
HPLC-DAD					
35	ID	NR	7	R V 28 30 36	ADRIAN et al., 2000
20	ID	Parcial	10	R Q K M 5 8 9 13 14 17 19 33 38	AZNAR et al., 2011
60	SPE	Completa	36	R Q 28 36	BAPTISTA; TAVARES; CARVALHO, 2001
35	ID	Completa	5	R Q	CARERI et al., 2003
36	ID	Parcial	5	R Q M 1 5 8 9 12 17 19 36 37	CASTELLARI et al., 2002
90	SPE	Parcial	1	R Q 1 5 12 13 17 19 37	COTEA et al., 2012
32	QuEChERS	Completa	8	R Q 1 5 8 12 13 17 19	FONTANA e BOTTINI, 2014
30	SPE	Parcial	NR	R Q 1 6 9 17	KEREM et al., 2004
100	L-L	Parcial	21	V 15 27	LANDRAULT et al., 2002
60	L-L	Parcial	120	R 16 28 36	LIMA et al., 1999
50	ID	NR	5	R Q 9 37	LÓPEZ et al., 2001
35	L-L	Parcial	19	R Q K M 5 17 19 36	MALOVANÁ et al., 2001
60	ID	Parcial	4	R Q K M AC 5 8 9 13 18 19 21 37	PEREIRA et al., 2010
140	SPE	Parcial	NR	R Q K M 1 3-6 9 10 13 14 17 19 28	PÉREZ-MAGARINO et al., 2008
35	L-L	NR	9	R Q K M	RASTIJA et al., 2009
100	ID	NR	NR	R 9 17 19 31 32 37	REVILLA e RYAN, 2000
39	SPE	Completa	12	Q M 1 5 9 13 17	SALVATORE et al., 2013
35	ID	Parcial	11	Q 1 5 9 17 19	SERUGA; NOVAK; JAKOBEK, 2011
75	SPE	Parcial	NR	R Q K M 5 17 19 37	VILLIERS et al., 2004
55	ID	Parcial	12	R V 16 28 36 39	VITRAC et al., 2005
HPLC/DAD/EM					
120	Rotavapor	NR	4	R Q M 1 3-5 9 10 13 14 17 19 24 30 31 35 36	MONAGAS et al., 2005
38	ID	Parcial	3	R AC 24 34-36	TENORE et al., 2011
UPLC-DAD					
8	SPE	Completa	4	R Q K M AC 5 8 9 10 13 19 37	SILVA et al., 2011
UPLC-MS					
15	ID	Completa	1	R Q K M V AC 1-38	VRHOVSEK et al., 2012

NR: informação não relatada na literatura.

^a Injeção direta (ID); extração em fase sólida (SPE); extração em fase líquida (L-L).

^b Aplicação: número de amostras de vinhos analisadas na literatura.

^c Compostos Fenólicos: ácido *trans*-cinâmico (AC); *trans*-resveratrol (R); *trans*- ϵ -viniferina (V); quempferol (K); quercetina (Q); miricetina (M); ácidos caféico (1), hidroxibenzoico (2), caftarico (3), coutárico (4), *p*-cumárico (5), elágico (6), fertárico (7), ferúlico (8), gálico (9), protocatéquico (10), neoclorogênico (11), salicílico (12), siríngico (13), vanílico (14); astilbina (15); astringina (16); (+)-catequina (17); galato de (+)-catequina (18); (-)-epicatequina (19); galato de (-)-epicatequina (20); (-)-epigalocatequina (21); galocatequina (22); galato de (-)-epigalocatequina (23); miricetina-3-O-glicosídeo (24); mircetina (25); naringenina (26); palidol (27); *trans*-piceido (28); piceatanol (29); polidatina (30); procianidina B1 (31); procianidina B2 (32); quercitrina (33); quercetina-3-O-glicosídeo (34); quempferol-3-O-glicosídeo (35); *cis*-resveratrol (36); rutina (37); taxifolina (38); *trans*- δ -viniferina (39).

4. CAPÍTULOS

4.1. CAPÍTULO 1

Obtenção de Amostras de Uvas e Vinhos da Campanha Gaúcha e
Padrões para Análises de Compostos Fenólicos

4.1.1. Introdução

As atividades da presente tese foram realizadas paralelamente com dois projetos multidisciplinares e interinstitucionais. Ambos os projetos, ainda em andamento, são coordenados pelo Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho da EMBRAPA (EMBRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul), e abrangem o desenvolvimento da vitivinicultura na Campanha Gaúcha.

Um dos projetos é intitulado “Tecnologias para o incremento da sustentabilidade da vitivinicultura brasileira de clima temperado e tropical, aplicadas a vinhos finos e sucos naturais” (código 02.13.14.007.00.00, financiado pela EMBRAPA), com o objetivo de “contribuir para a viabilidade, competitividade e sustentabilidade da produção brasileira de vinhos através da geração de conhecimentos e tecnologias para a melhoria significativa da qualidade dos produtos atuais e da criação de novos produtos” (GUERRA, 2014). O outro projeto é intitulado “Desenvolvimento da Indicação de Procedência ‘Campanha’ para vinhos finos e espumantes” (código 02.13.00.001.00, financiado pela Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP) e tem como objetivo “desenvolver a indicação de procedência ‘Campanha’ para vinhos finos e espumantes” (SILVEIRA, 2013).

A caracterização de fenóis bioativos em uvas e vinhos da Campanha Gaúcha, proposta nesta tese, pretende contribuir com resultados para esses projetos amplos. Para atingir cada objetivo são necessários: seleção dos fenóis bioativos a serem dosados; obtenção de amostras representativas da região; disponibilidade de métodos analíticos.

4.1.2. Padrões Analíticos

Os compostos fenólicos a serem analisados em uvas e vinhos foram selecionados considerando-se a sua indicação de bioatividade (Tabela 3.1) e relatos de doseamentos na literatura (Tabela 3.2), bem como a sua disponibilidade de aquisição comercial.

No escopo da tese foram utilizados 20 padrões de fenóis bioativos para doseamentos em uvas e vinhos, sendo os primeiros adquiridos comercialmente

(Tabela I do Anexo). Esses foram definidos mediante cruzamento de dados de bioatividade dos compostos fenólicos (Tabela 3.1), com os doseamentos disponibilizados na literatura (Tabela 3.2) e a possibilidade de aquisição comercial. Apesar de existirem poucos estudos na literatura científica sobre alguns fenóis, foram incluídos alguns padrões disponíveis no laboratório, como a astilbina e outros flavanóis. Os compostos fenólicos utilizados nesta tese abrangeram todas as classes químicas, exceto as flavanonas, devido à indisponibilidade de padrão até o momento em que as análises laboratoriais foram conduzidas. As antocianinas também não foram incluídas no escopo da tese, devido à sua alta reatividade em vinhos (item 3.4.2). Conseqüentemente, o perfil de antocianinas é dinâmico ao longo do período de evolução do vinho, tornando complexo o estabelecimento de correlação entre antocianinas e bioatividade. O *cis*-resveratrol também não foi incluído devido à sua baixa atividade biológica (MCNULTY e DAS, 2009; MORO; CARDOSO; CORREIA, 2008).

Todos os padrões foram mantidos conforme recomendação do fabricante, sob congelamento (-20 ± 5 °C), sob refrigeração (6 ± 2 °C) ou sob temperatura ambiente em dessecador (20 ± 2 °C). Alguns desses compostos são fotolábeis. O *trans*-resveratrol, por exemplo, é convertido da sua forma *trans* para *cis* quando exposto à luz por tempo prolongado (WANG et al., 2002).

De forma geral, os compostos fenólicos são solúveis em álcool metílico (MeOH) e EtOH e são apresentados na forma de pó branco a amarelado e absorvem na região do ultravioleta (O'NEIL, 2013).

4.1.3. Amostras

As amostras de uvas e vinhos tintos finos da Campanha Gaúcha, utilizadas nesta tese, foram as mesmas destinadas à execução de projetos de pesquisas da EMBRAPA (GUERRA, 2014/ SILVEIRA, 2013).

4.1.3.1. Uvas

As uvas para a elaboração de vinhos experimentais foram coletadas por colaboradores da EMBRAPA, entre 2013 e 2015. Foram utilizadas 150 plantas previamente marcadas e representativas de cada vinhedo, objetivando a maior

similaridade possível quanto à idade, produtividade, sistemas de condução e poda. Após, 50 kg de cada amostra de uva foram enviados ao Laboratório de Microvinificação da EMBRAPA Uva e Vinho e imediatamente resfriados. Nesse laboratório, foram elaborados os vinhos experimentais utilizados para análise do teor de fenóis bioativos nesta tese (item 4.1.3.2).

As amostras de oito uvas *Vitis vinifera* L. da Campanha Gaúcha foram coletadas no Laboratório de Microvinificação para análises de compostos fenólicos na tese e são apresentadas na Tabela II, em Anexo. Para tanto, 100 bagas foram amostradas aleatoriamente e enviadas ao Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas da EMBRAPA Uva e Vinho para o pré-processamento imediato até a etapa que garanta a sua estabilidade (itens 4.6.2.1 e 4.6.3.1).

4.1.3.2. Vinhos

As amostras de vinhos e os respectivos códigos utilizados no desenvolvimento da tese são apresentados na Tabela III, em Anexo. Foram analisadas 103 amostras de vinhos tintos finos de diferentes: variedades de uvas do Rio Grande do Sul, majoritariamente da Campanha Gaúcha (97); processos de vinificação; safras. As amostras da Campanha Gaúcha foram provenientes de 13 estabelecimentos vitivinícolas, sendo dois, cinco e seis localizados, respectivamente, em três microrregiões: Campanha Gaúcha Ocidental (C_O), Campanha Gaúcha Central (C_C) e Campanha Gaúcha Meridional (C_M).

As variedades de vinhos tintos incluídas no estudo apresentaram potencial enológico em pesquisas anteriores da EMBRAPA Uva e Vinho (GUERRA; TONIETTO; MION-GUGEL, 2008a; GUERRA; ZUCOLOTTO; TONIETTO, 2008b; GUERRA et al., 2009), ou foram identificadas durante a execução de projetos em andamento (GUERRA, 2014; SILVEIRA, 2013). A maioria desses vinhos foi proveniente da Campanha Gaúcha, sendo que seis foram de outras regiões e foram utilizados apenas para viabilizar o desenvolvimento de métodos em tempo hábil, ou seja, antes do início do recebimento das amostras da Campanha Gaúcha para teste.

Quanto ao processo de vinificação, os vinhos foram experimentais ou comerciais. Os vinhos experimentais (66) foram obtidos através de microvinificações, seguindo protocolos previamente estabelecidos e uniformizados para a elaboração

dos vinhos no Laboratório de Microvinificação da EMBRAPA Uva e Vinho (DELTEIL, 2004; DI STEFANO et al., 2003; GUERRA; PEREIRA; ZANUS, 2007). Os vinhos comerciais (37) foram adquiridos por pesquisadores e suas equipes, conforme projeto em andamento (SILVEIRA, 2013). As safras de vinhos experimentais variaram de 2012 a 2015, enquanto as safras dos vinhos comerciais foram entre 2004 e 2015.

O critério de seleção das amostras de vinhos para esse estudo foi a sua aprovação em análises químicas e sensoriais, realizadas nos laboratórios de Enoquímica e Análise Sensorial, respectivamente, da EMBRAPA Uva e Vinho. As análises químicas incluíram parâmetros clássicos, como pH, acidez volátil, acidez fixa, álcool, açúcar, entre outros (OIV, 2016a; OIV, 2016b). As análises sensoriais foram realizadas de acordo com os seguintes parâmetros: cor, aroma, sabor e apreciação global (LONA, 2009; OIV, 2009).

4.1.4. Métodos Analíticos

Para a seleção dos métodos analíticos a serem aplicados para a análise de fenóis bioativos em uvas e vinhos, foi realizado um levantamento da literatura científica. Os métodos mais modernos utilizam instrumentos de alta tecnologia, como a cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC), com acoplamento aos espectrômetros de massa com alta seletividade. Entretanto, tais equipamentos apresentam custo elevado e ainda são pouco difundidos em laboratórios de instrumentação (LORRAIN et al., 2013). Os cromatógrafos a líquido de alta eficiência ainda são os mais amplamente distribuídos dentro dessa categoria de equipamentos. Então, convém propor métodos alternativos, simples e validados, por HPLC para análises de fenóis bioativos em uvas e vinhos. O método deve ser escolhido de acordo com o propósito do estudo, os analitos a serem dosados e a matriz na qual estão inseridos (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2006; SKOOG et al., 2006). Além disso, a validação de métodos analíticos é imprescindível aos laboratórios para o cumprimento de normas de Boas Práticas de Laboratório (BPL) mundialmente reconhecidas (ABNT, 2005).

Para a realização de análises de rotina e uma possível disponibilização de metodologia a outros laboratórios, foram priorizadas técnicas envolvendo o uso de HPLC-UV ou HPLC-DAD. Afinal, esses equipamentos são mais facilmente

encontrados nos laboratórios brasileiros da área enológica. Entretanto, conforme informações disponíveis na Tabela 3.2, os métodos encontrados na literatura não atendem a todos os requisitos desejados para a realização de análises laboratoriais: método rápido, completamente validado, destinado à análise do maior número de compostos fenólicos e aplicado às diferentes variedades de uvas e vinhos. Por isso, previamente às análises de fenóis bioativos em uvas e vinhos da Campanha Gaúcha, foi necessário desenvolver e validar métodos analíticos por HPLC-DAD conforme os requisitos necessários para atingir os objetivos desta tese. Para possibilitar uma análise simultânea de vários compostos fenólicos, foi necessária uma limpeza preliminar das amostras e/ou o uso de UPLC-MS.

Ferramentas para o controle de qualidade são extremamente úteis para ampliar a inserção de produtos no mercado. Isso é imprescindível no caso de vinhos brasileiros, devido à sua alta potencialidade para contribuição à economia do país. Entretanto, para uma criteriosa avaliação do desempenho e da qualidade desses produtos, ainda há uma grande carência de métodos. Por isso, é fundamental que os laboratórios enológicos brasileiros disponham de uma metodologia simples, rápida, confiável e versátil para atender às crescentes demandas e exigências analíticas.

4.2. CAPÍTULO 2

Método HPLC-DAD para Determinação de
trans-Resveratrol e Quercetina em Vinhos Tintos

4.2.1. Introdução

Os dois compostos fenólicos mais estudados quanto à bioatividade e ao teor em uvas e vinhos, são o *trans*-resveratrol e a quercetina (Tabelas 3.1 e 3.2). Assim, são os analitos mais requisitados para avaliações gerais em pesquisas científicas ou da qualidade de produtos relacionados à vitivinicultura. Apesar disso, os métodos disponíveis na literatura para o doseamento desses compostos são longos, não foram validados, foram aplicados em poucas amostras reais ou requerem equipamentos muito sofisticados, como UPLC e MS.

Buscando-se encontrar um método alternativo, mas cumprindo os requisitos mencionados, vários ensaios foram conduzidos visando ao estabelecimento de um método por HPLC-DAD para análise de *trans*-resveratrol e quercetina em amostras de vinhos. Alguns métodos publicados foram utilizados como ponto de partida para a escolha de eluentes, diluentes para padrões, coluna e gradiente no HPLC (KEREM et al., 2004; RODRÍGUEZ-DELGADO et al., 2002). Assim, um meio sintético de vinho, composto por EtOH 12% v/v, ácido *L*-tartárico 5,5 g L⁻¹ e ajuste do pH para 3,5 com hidróxido de sódio 1 M, foi escolhido para a dissolução dos padrões.

Como solventes orgânicos para a eluição em HPLC-DAD, foram testados MeOH e acetonitrila (ACN), com composições variadas. O eluente aquoso foi ácido fórmico 0,1% v/v, sendo este aditivo escolhido por ser um ácido fraco e, conseqüentemente, apresenta baixo risco de danos à coluna de HPLC. Outras variáveis avaliadas foram o fluxo (0,8 a 1,2 mL min⁻¹) e o gradiente da fase móvel. Após a confirmação da eluição dos dois analitos, foram realizados testes com amostras de vinho puro, as quais foram apenas filtradas através de filtro 0,45 µm, para otimizar o gradiente (item 4.2.2).

Previamente às análises em HPLC-DAD, a coluna foi condicionada mediante passagem do gradiente estabelecido (Tabela 4.2.1), repetidamente, até atingir 30 minutos. Considerando que as amostras de vinhos foram analisadas diretamente, isto é, contendo alta concentração de compostos orgânicos, posteriormente às análises, foi realizada uma limpeza adequada da coluna de HPLC. Para tanto, foi utilizada uma solução de MeOH 90% v/v, com fluxo de 1 mL min⁻¹, durante 30 minutos. A limpeza

da coluna foi confirmada através da ausência de picos detectados através do DAD. Assim, para uma jornada de oito horas de trabalho, foi possível realizar cerca de 42 análises.

Finalmente, o método mais promissor para análise de *trans*-resveratrol e quercetina em amostras de vinhos teve duração de 10 minutos no HPLC-DAD e foi validado. Esse tempo é bastante reduzido quando comparado a métodos com propósito similar na literatura (Tabela 3.2) (BAPTISTA; TAVARES; CARVALHO, 2001; CARERI et al., 2003; PEREIRA et al., 2010; SILVA et al., 2011). Cabe salientar, que esse método pode ser adaptado para equipamentos de HPLC com detector UV/Vis, uma vez que muitos possibilitam a seleção dos dois comprimentos de onda estabelecidos para a análise de *trans*-resveratrol e quercetina.

Esse método foi a primeira abordagem no escopo desta tese, com a finalidade de realizar uma exploração preliminar de amostras de vinhos tintos finos em equipamento HPLC-DAD. A fim de disponibilizar esse método aos laboratórios brasileiros, um manuscrito foi submetido à revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB).

4.2.2. Artigo Submetido ao Periódico Pesquisa Agropecuária Brasileira

Validação de método cromatográfico para análises de rotina de *trans*-resveratrol e quercetina em vinhos tintos

Letícia Flores da Silva^(1,4), Celito Crivellaro Guerra⁽¹⁾,

Ana Beatriz Costa Czermainski⁽²⁾, Leonardo Ferrari⁽³⁾ e Ana Maria Bergold⁽⁴⁾

⁽¹⁾Embrapa Uva e Vinho, Rua Livramento, 515, CEP 95700-000 Bento Gonçalves, RS, Brasil. E-mail: leticiaflores@ig.com.br, celito.guerra@embrapa.br, ana.czermainski@embrapa.br

⁽²⁾Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Câmpus Bento Gonçalves, Avenida Osvaldo Aranha, 540, CEP 95700-000 Bento Gonçalves, RS, Brasil. E-mail: leonardo.enologo@gmail.com

⁽³⁾Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Laboratório de Química Farmacêutica, Avenida Ipiranga, 2752, CEP 90610-000 Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: ana.bergold@ufrgs.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi validar um método rápido e com baixo consumo de solventes para a análise de *trans*-resveratrol e quercetina em vinhos tintos. As amostras foram filtradas e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detector de arranjo de diodos (DAD), em 306 e 371 nm para *trans*-resveratrol e quercetina, respectivamente. Utilizou-se uma coluna octilsilano e fase móvel composta por um gradiente de metanol, água e ácido fórmico. O método foi validado de acordo com as figuras de mérito: especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez. Assim, o método de CLAE-DAD proposto pode ser facilmente implantado para análises de *trans*-resveratrol e quercetina em vinhos tintos.

Termos para indexação: *trans*-resveratrol, quercetina, cromatografia, vinho tinto, Brasil

Validation of chromatographic method to routine analysis of *trans*-resveratrol and quercetin in red wines

Abstract – The objective of this work was to validate a rapid method and with low solvents usage, for analysis of *trans*-resveratrol and quercetin in red wines. The samples were filtered and analysed by high pressure liquid chromatography (HPLC) with photodiode array detector (PDA), at 306 and 371 nm for *trans*-resveratrol and quercetin, respectively. An octylsilane column was used and the mobile phase was composed by a gradient of methanol, water and formic acid. The method was validated according to figures of merit: specificity, linearity, limit of detection, limit of quantification, precision, accuracy and robustness. Therefore, the HPLC-PDA developed method may be easily implanted for analysis of *trans*-resveratrol and quercetin in red wines.

Index terms: *trans*-resveratrol, quercetin, chromatography, red wine, Brazil

4.2.2.1. Introdução

Os polifenóis presentes em uvas e vinhos, tais como *trans*-resveratrol e quercetina, possuem potente atividade biológica e interesse em medicina, nutrição e áreas afins (Flamini et al., 2013; Ribéreau-Gayon, 2006). Por isso, esses são os dois polifenóis mais pesquisados na vitivinicultura, envolvendo diferentes variedades de vinhos, condições edafoclimáticas, regiões vitícolas ou tecnologia de elaboração de vinhos (Aznar et al., 2011; Baptista et al., 2001; Careri et al., 2003; Fontana & Bottini, 2014; Malovaná et al., 2001; Monagas et al., 2005; Pereira et al., 2010). As propriedades biológicas são dependentes da dose de polifenóis e são características de variedades ou regiões produtoras de uvas (Carbonell-Bejerano et al., 2014; Ferrer-Gallego et al., 2012; Ribéreau-Gayon, 2006; Tenore et al., 2011). Os vinhos representam uma das fontes mais ricas desses compostos na dieta humana, apresentando benefícios à saúde quando consumidos moderadamente (Fernández-Mar et al., 2013; Flamini et al., 2013). Por isso, elevados teores de polifenóis podem agregar valor aos vinhos, sendo um fator importante para o marketing e a comercialização.

Uma grande limitação das análises químicas para a detecção e a quantificação desses compostos é que vinhos são amostras complexas, principalmente quanto à

diversidade e aos altos teores de compostos orgânicos (Delcambre et al., 2013; Guerra, 2010). Esses compostos englobam metabólitos primários, como açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e carboidratos, os quais são interferentes em diversos métodos de análises de polifenóis. Por esse motivo, as técnicas instrumentais analíticas mais seletivas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), são fundamentais para realizar análises qualitativas e quantitativas de polifenóis específicos em vinhos (Aznar et al., 2011; Baptista et al., 2001; Careri et al., 2003; Fontana & Bottini, 2014; Malovaná et al., 2001; Monagas et al., 2005; Pereira et al., 2010; Ribéreau-Gayon, 2006). Já existe uma tecnologia mais avançada nessa linha de equipamentos, com uso da técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) associada a detector de arranjo de diodos (DAD) (Silva et al., 2011) ou à espectrometria de massas (Ignat et al., 2011; Vrhovsek et al., 2012). Entretanto, a CLUE ainda não está ao alcance da maioria dos laboratórios (Pereira et al., 2010), incluindo aqueles relacionados à enologia no Brasil, por se uma área em expansão no país. A escassez de publicações com doseamentos específicos de polifenóis em vinhos brasileiros indica que a maioria das avaliações tem sido realizada por técnicas genéricas e pouco seletivas, como as determinações de polifenóis totais em espectrofotômetro de absorção na região do ultravioleta (UV) (Ignat et al., 2011; Ribéreau-Gayon, 2006). Considerando isso, o emprego de CLAE-DAD, uma técnica mais acessível do que CLUE e mais confiável do que UV, possibilitaria o desenvolvimento de estratégias para o avanço da qualidade dos produtos brasileiros.

Um dos inconvenientes da CLAE-DAD é que a maioria dos métodos para análise simultânea de *trans*-resveratrol e quercetina são demorados, com duração superior a 30 minutos, a fim de promover a separação da variedade de compostos com alta similaridade química (Baptista et al., 2001; Careri et al., 2003; Fontana & Bottini, 2014; Malovaná et al., 2001; Monagas et al., 2005; Pereira et al., 2010). O provável motivo desse elevado tempo é a análise simultânea de *trans*-resveratrol, quercetina e outros marcadores de polifenóis bioativos em vinhos tintos. Em muitos desses casos, inclusive, o preparo de amostra requer um procedimento laborioso e oneroso (Baptista et al., 2001; Fontana & Bottini, 2014; Ignat et al., 2011; Malovaná et al., 2001; Monagas et al., 2005). Entretanto, observou-se que quando o objetivo for a determinação exclusiva de *trans*-resveratrol e quercetina, o tempo de análise pode ser bastante reduzido e a manipulação da amostra pode ser simplificada, mantendo-se a

confiabilidade dos resultados. Além da praticidade, essas otimizações na técnica de análise possibilitam a redução do volume de fase móvel (FM), de custos e da geração de resíduos químicos (Tobiszewski & Namiesnik, 2012). Os métodos de CLAE-DAD publicados até o momento não contemplam simultaneamente as características ideais análise de *trans*-resveratrol e quercetina nos laboratórios enológicos brasileiros, tais como: rapidez de análise, praticidade no preparo de amostras, validação conforme os requisitos da ANVISA (2003) e aplicação em amostras de vinhos tintos (Aznar et al., 2011; Baptista et al., 2001; Careri et al., 2003; Fontana & Bottini, 2014; Malovaná et al., 2001; Monagas et al., 2005; Pereira et al., 2010; Ribéreau-Gayon, 2006). Considerando tais aspectos, o objetivo desse trabalho foi validar um método rápido e com menor geração de resíduos por CLAE-DAD para a determinação dos teores de *trans*-resveratrol e quercetina em vinhos finos.

4.2.2.2. Material e Métodos

Os padrões analíticos (pureza $\geq 90,0\%$) de *trans*-resveratrol, quercetina e possíveis interferentes presentes em vinhos (*trans*-resveratrol-3- β -D-glicopiranosídeo, miricetina, quempferol e quercetina-3-O-glicosídeo) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). Foram preparadas soluções estoque de cada padrão (200 mg L^{-1}), utilizando álcool metílico (MeOH) 50% v/v como diluente. O *cis*-resveratrol foi obtido mediante exposição do *trans*-resveratrol (200 mg L^{-1}) à luz solar direta (Baptista et al., 2001; Castellari et al., 2002; Monagas et al., 2005), por 48 horas. A partir da solução estoque, foram preparadas as soluções para a validação do método, conforme descrições nas figuras de mérito a seguir. Como diluente dessas soluções, foi utilizado um vinho sintético adaptado de Malovaná et al. (2001), composto por: álcool etílico 12% v/v, $5,5 \text{ g L}^{-1}$ de ácido *L*-tartárico e pH 3,5 ajustado com hidróxido de sódio 1 M.

Acetonitrila (ACN), MeOH, ácido fórmico (AF) e ácido *L*-tartárico foram de grau adequado para CLAE (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Álcool etílico, hidróxido de sódio e ácido clorídrico foram de grau analítico (Merck, Darmstadt, Alemanha). O preparo das soluções foi realizado com água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Billerica – Massachusetts, EUA). As FM foram previamente desgaseificadas por dez minutos com auxílio de ultrassom (modelo T50, Thornton, Porto Alegre - RS), bomba de vácuo (modelo CL, Fanem, São Paulo - SP) e agitação manual.

O preparo de cada solução para análise em CLAE-DAD (Shimadzu, Quioto, Japão) consistiu de filtração de 2 mL através de membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com poros de 0,45 µm (Millipore). O sistema de CLAE-DAD foi composto pelos módulos: detector de arranjo de fotodiodos SPD-M10AVP, módulo de controle UFLC CBM-20A, duas bombas LC-10AD e injetor manual Rheodyne®. Os dados foram obtidos e analisados com o auxílio do aplicativo Class-VP, versão 6.12 (Shimadzu, Quioto, Japão). Os métodos de Kerem et al. (2004) e Malovaná et al. (2001) foram referências para a seleção de FM orgânica (MeOH ou ACN e AF 0,1% v/v como aditivo), coluna (fases estacionárias octilsilano “C8” ou octadecilsilano “C18”) e gradiente de FM orgânica (início de 0, 30 e 50%, com máximo de 70% v/v). As colunas testadas foram: C8 (4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, poros de 100 Å; VertiSep UPS, Vertical, Muang – Nonthaburi, Tailândia), C8 (4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, poros de 100 Å; 5 C8, ACE, Aberdeen – Craibstone, Escócia) e C18 (4,6 x 150 mm, partículas de 5 µm, poros de 120 Å; ODS Hypersil, Thermo, Waltham – Massachusetts, EUA).

As figuras de mérito adequadas para a validação de métodos analíticos foram avaliadas com base nas descrições de técnicas e limites de aceitação da ANVISA (2003): especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez. A variedade Merlot (amostras 1 e 2 do Rio Grande do Sul, safra 2012) foi utilizada como modelo de matriz para validação. Para as análises dos dados e obtenção de estimativas dessas figuras de mérito foi utilizado o SAS/STAT® software (SAS Institute Inc., 2008).

A especificidade foi avaliada através da análise dos polifenóis que poderiam interferir no método, incluindo o *cis*-resveratrol. Além disso, os padrões de *trans*-resveratrol e quercetina foram submetidos a estresse por hidrólise ácida, a fim de obter possíveis produtos de degradação (ANVISA, 2003) e analisados em triplicata. Para tanto, a solução padrão (20 mg L⁻¹ de cada) foi misturada com um igual volume de ácido clorídrico 0,1% v/v (pH 1,8) e exposta a 30 minutos de ultrassom. Para cada um desses ensaios de especificidade, os cromatogramas foram avaliados por DAD (ANVISA, 2003) e os resultados foram comparados com uma solução padrão íntegra.

Um ensaio adicional de especificidade foi realizado através da avaliação da estabilidade dos analitos, verificada frente às condições de conservação das amostras

Merlot (1 e 2) estocadas em microtubos a -20 °C, por 21 meses. Além disso, foi realizada uma tentativa de concentração dos analitos na amostra por aquecimento, adaptando-se o método proposto por Monagas et al. (2005), em rotavapor a 30 °C. Para tanto, a termolabilidade foi investigada por evaporação de 5 mL de cada amostra até secura, em banho-maria (50 °C), seguido de reconstituição do resíduo em 1 mL do mesmo diluente utilizado para os padrões analíticos.

A análise de variância (ANOVA) das integrações das áreas obtidas para construir as curvas padrão em três dias diferentes foi utilizada para avaliação da linearidade do método. As curvas padrão foram construídas com as soluções contendo 2,0; 10,0; 15,0; 25,0 e 35,0 mg L⁻¹ de cada analito. O coeficiente de correlação (*r*) e a equação da reta referentes a cada padrão foram determinados através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Adicionalmente, as curvas padrão foram determinadas ao longo de dois anos através de cartas controle para o monitoramento dos valores de intercepto e inclinação correspondentes a cada analito. Foi estabelecido como limite de aceitação a média $\pm 2 \sigma$ (desvio padrão) dos valores obtidos.

Foram estimados os limites de detecção e quantificação a partir de dados da linearidade, como o desvio padrão médio do intercepto de três curvas padrão e o coeficiente de correlação linear (ANVISA, 2003).

Para os ensaios de precisão e exatidão, foram adicionados à amostra Merlot 2 três níveis de concentrações dos padrões de *trans*-resveratrol e quercetina: baixo (10 mg L⁻¹), médio (15 mg L⁻¹) e alto (25 mg L⁻¹). A precisão, expressa em termos de coeficiente de variação (CV%), foi calculada com base nas quantificações de seis injeções dessas amostras fortificadas com padrões em CLAE-DAD. Para avaliação da exatidão, foi verificado o efeito da matriz em cada vinho fortificado, mediante cálculos de recuperação (%) dos padrão adicionados.

A robustez foi investigada pela avaliação de pequenas variações nas condições cromatográficas mais susceptíveis a alterações (ANVISA, 2003). Assim, foi modificada a composição das FM de 0,10 para 0,09 e 0,11% de AF. Outra modificação testada foi na marca da coluna de fase reversa C8 utilizada na validação, ou seja, troca da coluna Vertical por ACE.

Depois de validado, o método foi avaliado através de análises das doze amostras de vinhos experimentais, os quais foram elaborados por método clássico (Guerra, 2010) a partir de uvas (*Vitis vinifera* L.) de variedades tintas (Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Malbec, Merlot, Petit Verdot, Pinot Noir, Ruby Cabernet, Syrah, Tannat e Tempranillo), provenientes do Rio Grande do Sul, safra 2012. Entre essas amostras, duas foram de Merlot (1 e 2) e Petit Verdot (1 e 2) e uma das demais variedades. Os picos de *trans*-resveratrol e quercetina foram identificados nos cromatogramas das amostras por comparação dos tempos de retenção (t_R) e espectros na região do ultravioleta (UV) com os respectivos padrões. A quantificação foi realizada mediante determinação das áreas dos picos dos analitos.

4.2.2.3. Resultados e Discussão

Na etapa de desenvolvimento do método CLAE-DAD, a FM composta por MeOH apresentou valores adequados (FDA, 1994) de resolução ($> 2,0$) e assimetria de pico ($\leq 2,0$), enquanto o uso de ACN resultou em assimetria superior a 2,0. As colunas de fase C8 proporcionaram um menor tempo para eluição dos picos do que a coluna C18, sem prejuízo de resolução e assimetria. A FM orgânica iniciando em 50% proporcionou o menor tempo de análise (10 min), quando comparados a 0 e 30% (15 min). Assim, os parâmetros cromatográficos mais adequados conforme resolução e assimetria de pico, associados ao menor tempo de análise, foram obtidos com as condições cromatográficas para o método desenvolvido (Tabela 4.2.1). O método por CLAE-DAD proposto é rápido, com obtenção do cromatograma em apenas dez minutos, enquanto outros previamente estabelecidos para análise de polifenóis, consomem tempos acima de 30 minutos (Baptista et al., 2001; Careri et al., 2003; Fontana & Bottini, 2014; Malovaná et al., 2001; Monagas et al., 2005; Pereira et al., 2010). Essa redução no tempo de análise foi devido à troca da coluna tradicionalmente utilizada (C18) por outra com a fase estacionária um pouco mais polar (C8), bem como pelo uso de um gradiente com elevada proporção de FM orgânica no início do método (MeOH 50% v/v).

Os comprimentos de onda (nm) para a detecção de cada analito (10 mg L^{-1}) foram estabelecidos de acordo com os máximos (λ_{max}) obtidos para cada padrão individualmente, sem interferências dos picos vizinhos e do diluente de padrões (Figura 4.2.1a). Assim, foram estabelecidos os λ_{max} de 306 e 371 nm, para as

quantificações de *trans*-resveratrol e quercetina, respectivamente. Os t_R foram cerca de 4,1 (*trans*-resveratrol) e 8,0 minutos (quercetina), os quais são inferiores a outros relatados na literatura (Aznar et al., 2011; Baptista et al., 2001; Careri et al., 2003; Fontana & Bottini, 2014; Malovaná et al., 2001; Monagas et al., 2005; Pereira et al., 2010). Os picos de *trans*-resveratrol e quercetina do vinho Merlot 2 apresentaram separação adequada, possibilitando a integração de suas áreas (Figura 4.2.1b). O vinho tinto apresentou vários picos mais intensos que, provavelmente, são outros polifenóis em alta concentração, tais como as antocianinas (Guerra, 2010; Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Os polifenóis com características químicas semelhantes ao *trans*-resveratrol (*cis*-resveratrol e *trans*-resveratrol-3- β -D-glicopiranosídeo) e à quercetina (miricetina, quemferol e quercetina-3-O-glicosídeo), assim como os produtos de degradação ácida, não interferiram nos picos de interesse (Tabela 4.2.2). A ordem de eluição dos analitos e dos compostos interferentes foi a mesma obtida por outros autores (Baptista et al., 2001; Castellari et al., 2002; Wang et al., 2002). Os produtos de hidrólise ácida apresentaram t_R menores que os analitos, sendo, portanto mais polares que seus precursores e não interferem na sua análise (Tabela 4.2.2). A estabilidade dos analitos em meio ácido não foi determinada em trabalhos anteriores química (Baptista et al., 2001; Careri et al., 2003; Fontana & Bottini, 2014; Malovaná et al., 2001; Monagas et al., 2005; Pereira et al., 2010).

Na avaliação da estabilidade dos analitos a -20 °C, o perfil cromatográfico não foi alterado e os analitos foram reduzidos a níveis aceitáveis de $\pm 15\%$ (Tabela 4.2.3) (ANVISA, 2003). Esses resultados indicam que o armazenamento de amostras em congelador é adequado no intervalo de tempo avaliado. Entretanto, outro estudo investigou a estabilidade do *trans*-resveratrol, em solução de MeOH, a -20 °C e determinou como tempo máximo de cinco dias para estoque nessas condições (Wang et al., 2002). Idealmente, convém que cada laboratório realize os testes de estabilidade, a fim de estabelecer as melhores condições de estocagem e preparo das amostras.

As amostras apresentaram baixos valores de recuperação quando submetidas à temperatura de 50 °C (Tabela 4.2.3). Isso indica que esse método para concentrar as amostras através de aquecimento não é adequado. Além disso, foram constatados

CV% elevados, justificados pelo manuseio excessivo das amostras e pela necessidade de reconstituição do resíduo obtido em diluente. Monagas et al. (2005) realizou a concentração dos polifenóis em vinhos através de equipamento de rotavapor (30 °C). Considerando que o rotavapor nem sempre está disponível nos laboratórios e com o propósito de disponibilizar um método simples possível, esse método foi desconsiderado nesse trabalho.

O método apresentou linearidade na faixa de 2,0 a 35,0 mg L⁻¹ para cada analito, com coeficientes de correlação superiores a 0,99 (Tabela 4.2.3). A análise de variância demonstrou a alta significância do efeito da regressão linear ($p < 0,01$) e que não houve desvio significativo da linearidade ($p > 0,10$). A análise dos resíduos da regressão indicou não haver qualquer transgressão ao modelo linear simples. Para a maioria das curvas padrão utilizadas na carta controle (1 a 10), os valores de inclinação e intercepto correspondentes às equações de reta de cada analito foram mantidos dentro dos limites de normalidade (média $\pm 2\sigma$) (Figura 4.2.2). Apenas um ponto ficou fora dos limites, o qual pode ser observado no intercepto do *trans-resveratrol* (curva 4, Figura 4.2.2a). Por esse motivo, laboratórios podem utilizar ferramentas como cartas controle para o acompanhamento das curvas padrão, principalmente em casos de trocas de equipamentos, analistas e produtos químicos. Dessa forma, é possível identificar possíveis erros laboratoriais relacionados à curva padrão. Os dados da carta controle podem ser usados como subsídios para a investigação em casos de resultados de áreas fora da especificação, conforme indicado pelo FDA (2006) e Kuselman et al. (2012).

Os limites de detecção e quantificação foram determinados e são inferiores aos teores usualmente encontrados (0 a 6,5 mg L⁻¹ para *trans-resveratrol* e 0 a 8,84 mg L⁻¹ para *quercetina*), principalmente em vinhos tintos (Baptista et al., 2001; Careri et al., 2003; Fontana e Bottini, 2014; Guerra et al., 2008; Malovaná et al., 2001; Monagas et al., 2005; Pereira et al., 2010; Silva et al., 2011; Vrhovsek et al., 2012).

De acordo com os valores de CV% inferiores a 15%, o método foi considerado preciso (Tabela 4.2.3). A exatidão foi demonstrada por meio das recuperações entre 85 e 115%, indicando que a matriz não interfere na metodologia desenvolvida (Tabela 4.2.3).

O método também foi robusto frente às modificações da concentração do AF na FM e marca da coluna, uma vez que os picos não sofreram alterações consideráveis (CV <5,0%) em seus t_R e áreas (Tabela 4.2.3). O pH da FM original (AF 0,1% v/v) foi de 3,19 e sofreu uma pequena variação nas concentrações de AF 0,09% v/v (pH = 3,30) e 0,11% v/v (3,10).

Os resultados obtidos para as figuras de mérito avaliadas para esse método CLAE-DAD foram de acordo com os limites aceitáveis (ANVISA, 2003). A maioria dos estudos anteriores não apresentou ou realizou uma validação parcial (Aznar et al., 2011; Castellari et al., 2002; Kerem et al., 2004; Malovaná et al., 2001; Monagas et al., 2005; Pereira et al., 2010). Baptista et al. (2001) e Careri et al. (2003) validaram um método por CLAE-DAD, porém de 60 e 35 minutos, respectivamente. Fontana e Bottini (2014) validaram um método por CLAE-DAD, mas que requer um preparo de amostras complexo. Silva et al. (2011) e Vrhovsek (2012) validaram métodos para o doseamento de vários polifenóis em vinhos, mas com uso de CLUE.

Para cada pico de analito da maioria dos vinhos tintos foi constatada uma pureza superior a 95%, o que reduz a possibilidade de coeluição com outros compostos. Uma exceção foi observada para os vinhos das variedades Syrah, Tempranillo e Petit Verdot, com pureza de pico entre 90 e 95% para o *trans*-resveratrol. Por isso, se forem observadas purezas de picos inferiores a 90%, é recomendável utilizar um método com tempo de corrida mais prolongado para promover uma melhor separação entre o analito e interferentes (Kazakevich & Lobrutto, 2007). Assim, é possível assegurar a conformidade com os requisitos de seletividade preconizados por órgãos regulamentadores (ANVISA, 2003). Os doze vinhos tintos apresentaram variações nos teores dos compostos polifenólicos (Figura 4.2.3). Os valores variaram em função das variedades analisadas conforme esperado (Guerra et al., 2008). Os teores de *trans*-resveratrol obtidos para os vinhos variaram de 2,46 até 15,88 mg L⁻¹, enquanto a quercetina foi de 3,85 até 26,51 mg L⁻¹ (Figura 4.2.3). Tais resultados foram similares ou superiores aos obtidos em estudos anteriores de vinhos tintos de várias regiões do mundo (Baptista et al., 2001; Careri et al., 2003; Fontana e Bottini, 2014; Monagas et al., 2005; Pereira et al., 2010; Silva et al., 2011; Vrhovsek et al., 2012). Uma concentração superior de quercetina (38,55 mg L⁻¹) foi encontrada em amostras de vinhos das Ilhas Canárias (Malovaná et al., 2001).

As amostras Pinot Noir e Merlot 2 apresentaram altos valores dos dois analitos, ao contrário de Malbec (Figura 4.2.3), sendo necessárias análises de um maior número de amostras dessas variedades para verificar se esses teores são típicos da região de procedência em estudo.

4.2.2.4. Conclusões

1. Os resultados obtidos na validação indicam que o método desenvolvido por CLAE-DAD é adequado para a análise de *trans*-resveratrol e quercetina em vinhos tintos.
2. O método apresentado por CLAE-DAD é mais rápido e gera menor volume de resíduos químicos do que os disponíveis na literatura científica, o que facilita a sua implantação para o controle de qualidade de vinhos tintos em laboratórios brasileiros.
3. A análise do teor de *trans*-resveratrol e quercetina em dez variedades de vinhos tintos experimentais do Rio Grande do Sul (12 amostras) indica que o método é capaz de diferenciar o teor desses polifenóis.
4. Esse método por CLAE-DAD poderá ser utilizado como referência para análises de *trans*-resveratrol e quercetina em outros produtos derivados de uvas, como sucos.

Agradecimentos

Aos colegas Magda Beatris Gatto Salvador e Celso Guarani Ruiz de Oliveira, pelo apoio na gestão do LACEM-Embrapa. À Gisele Eliane Perissutti, do Laboratório de Enoquímica-Embrapa, pelas análises clássicas. Ao Raul Luiz Ben e ao Anevir Marin, pelas vinificações experimentais.

4.2.2.5. Referências

- ANVISA. Resolução n.899 de 29 de maio de 2003. **Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, 02 de junho. Brasília, DF, Brazil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2003.
- AZNAR, O.; CHECA, A.; OLIVER, R.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S.; SAURINA, J. Determination of polyphenols in wines by liquid chromatography with UV spectrophotometric detection. **Journal of Separation Science**, v.34, p.527-535, 2011.
- BAPTISTA, J.A.B.; TAVARES, J.F.; CARVALHO, R.C.B. Comparison of polyphenols and aroma in red wines from Portuguese mainland versus Azores Islands. **Food Research International**, v.34, p.345-355, 2001.

BISHAYEE, A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. **Cancer Prevention Research**, v.2, p.409, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária – MAPA. Instrução Normativa nº 24, de 08 de Setembro de 2005. **Aprovar o Manual Operacional de Bebidas e Vinagre**. DOU, Brasília, 20 de Setembro de 2005.

CARBONELL-BEJERANO, P.; DIAGO, M.; MARTÍNEZ-ABAIGAR, J.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M.; TARDÁGUILA, J.; NÚÑEZ-OLIVERA, E. Solar ultraviolet radiation is necessary to enhance grapevine fruit ripening transcriptional and phenolic responses. **BMC Plant Biology**, v.14, p.1-16, 2014.

CARERI, M.; CORRADINI, C.; ELVIRI, L.; NICOLETTI, I.; ZAGNONI, I. Direct HPLC Analysis of quercetin and *trans*-resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p.5226-5231, 2003.

CASTELLARI, M.; SARTINI, E.; FABIANI, A.; ARFELLI, G.; AMATI, A. Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. **Journal of Chromatography A**, v.973, p.221-227, 2002.

DELCAMBRE, A.; SAUCIER, C. High-Throughput OEnomics: shotgun polyphenomics of wines. **Analytical Chemistry**, v.85, p.9736-9741, 2013.

FDA, US Food and Drug Administration. Reviewer guidance, validation of chromatographic methods. 1994. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf>. Acesso em 09/09/2016.

FDA, US Food and Drug Administration. Guidance for industry investigating out-of-specification (OOS) test results for pharmaceutical production. 2006. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070287.pdf>. Acesso em 24/09/2015.

FERNÁNDEZ-MAR, M.I.; MATEOS, R.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; PUERTAS, B.; CANTOS-VILLAR E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. **Food Chemistry**, v.130, p.797-813, 2012.

FERRER-GALLEGO, R.; HERNÁNDEZ-HIERRO, J.M.; RIVAS-GONZALO, J.C.; ESCRIBANO-BAILÓN, M.T. Influence of climatic conditions on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv. Graciano. **Analytica Chimica Acta**, v.732, p.73-77, 2012.

FLAMINI, R.; MATTIVI, F.; ROSSO, M.D.; ARAPITSAS, P.; BAVARESCO, L. Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. **International Journal of Molecular Science**, v.14, p.19651-19669, 2013.

FONTANA, A.R.; BOTTINI, R. High-throughput method based on quick, easy, cheap, effective, rugged and safe followed by liquid chromatography-multi-wavelength detection for the quantification of multiclass polyphenols in wines. **Journal of Chromatography A**, v.1342, p.44-53, 2014.

GUERRA, C.C.; ZUCOLOTTI, M.; TONIETTO, J. Profil chimique et sensoriel de vins rouges brésiliens selon le cépage et l'origine géographique des vignobles. In: **Congrès International des Terroirs Viticoles**, 7, 2008, Nyon, Suisse. Comptes rendus. Pully, Suisse: Agroscope Changins Wädenswill, 2008. p.493-499.

GUERRA, C.C. Vinho tinto. In: VENTURINI FILHO, W.G. (Ed.) **Bebidas alcoólicas: Ciência e tecnologia**. São Paulo: Blucher, 1.ed. 2010. p.209-233.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v.126, p.1821-1835, 2011.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for pharmaceutical scientists**. New Jersey, USA: Wiley-Interscience, 2007. 1140p.

KEREM, Z.; BRAVDO, B.; SHOSEYOV, O.; TUGENDHAFT, Y. Rapid liquid chromatography-ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must. **Journal of Chromatography A**, v.1052, p.211-215, 2004.

KUSELMAN, I.; PENNECCHI, F.; BURNS, C.; FAJGELJ, A.; ZORZI, P. IUPAC/CITAC Guide: Investigating out-of-specification test results of chemical composition based on metrological concepts (IUPAC Technical Report). **Pure Applied Chemistry**, v.84, n.9, p. 1939-1971, 2012.

MALOVANÁ, S.; MONTELONGO, F.J.G.; PÉREZA, 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.

MONAGAS, M.; SUÁREZ, R.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B.. Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.56, p.139-174, 2005.

PEREIRA, V.; CÂMARA, J.S.; CACHO, J.; MARQUES, J.C. HPLC-DAD methodology for the quantification of organic acids, furans and polyphenols by direct injection of wine samples. **Journal of Separation Science**, v.33, p.1204-1215, 2010.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Handbook of enology: The chemistry of wine stabilization and treatments**. France: John Wiley e Sons, 2. ed., v.2. 2006. 441p.

SAS Institute Inc. **SAS/STAT® 9.2 User's Guide**. Cary, NC: SAS Institute Inc. 2008.

SILVA, C.L.; PEREIRA, J.; WOUTERA, V.G.; GIRÓA, C.; CÂMARA, J.S. A fast method using a new hydrophilic-lipophilic balanced sorbent in combination with ultra-high performance liquid chromatography for quantification of significant bioactive metabolites in wines. **Talanta**, v.86, p.82-90, 2011.

TENORE, G.C.; TROISI, J.; DI FIORE, R.; MANFRA, M.; NOVELLINO, E. Nutraceutical value and toxicological profile of selected red wines from Morocco. **Food Chemistry**, v.129, p.792-798, 2011.

TOBISZEWSKI, M.; NAMIESNIK, J. Direct chromatographic methods in the context of green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v.35, p.67-73, 2012.

VRHOVSEK, U.; MASUERO, D.; GASPEROTTI, M.; FRANCESCHI, P.; CAPUTI, L.; VIOLA, R.; MATTIVI, F. A versatile targeted metabolomics method for the rapid quantification of multiple classes of phenolics in fruits and beverages. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.60, p.8831-8840, 2012.

WANG, Y.; CATANA, F.; YANG, Y.; RODERICK, R. VAN BREEMEN, R.B. An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.30, n.50(3), p.431-435, 2002.

Tabela 4.2.1. Condições analíticas adotadas para a determinação de *trans*-resveratrol e de quercetina em vinhos tintos.

Condição	Descrição
Pré-coluna	Recheio C8 (Phenomenex)
Coluna	C8 VertiSep UPS (Vertical), 4,6 x 150 mm, com tamanho de partícula 5 µm e tamanho de poro de 100 Å
Fase móvel A	Ácido fórmico 0,10% v/v, diluído em água ultrapura
Fase móvel B	Ácido fórmico 0,10% v/v, diluído em MeOH
Gradiente	Linear, com concentrações de A: 50% v/v de 0 a 5 min; 30% v/v de 7 a 8 min; 50% v/v de 9 a 10 min.
Volume de injeção	20 µL
Fluxo	1,0 mL min ⁻¹
Deteção (DAD)	306 nm (<i>trans</i> -resveratrol), 371 nm (quercetina)

Tabela 4.2.2. Avaliação de possíveis interferentes no método CLAE-DAD para análise de *trans*-resveratrol e quercetina em vinhos tintos.

Possível Composto Interferente	t _R (min)	λ _{max} (nm)
Estilbenos		
<i>trans</i> -resveratrol-3-β-D-glicopiranosídeo	2,6	306
<i>cis</i> -resveratrol	8,6	285
Flavonóis		
miricetina	4,5	374
quempferol	9,3	365
quercetina-3-O-glicosídeo	3,5	354
Hidrólise ácida - <i>trans</i> -resveratrol	3,6	306
Hidrólise ácida - quercetina	7,4	371

Tabela 4.2.3. Figuras de mérito do método cromatográfico (CLAE-DAD) para análise de *trans*-resveratrol e quercetina em vinhos tintos.

Figura de Mérito	Limite	<i>trans</i>-Resveratrol	Quercetina
Especificidade (Merlot 2)			
Estabilidade ⁽¹⁾ (-20 °C)	85 - 115 (<5) ⁽⁵⁾	103,06 (4,94)	89,34 (1,81)
Estabilidade ⁽¹⁾ (50 °C)	85 - 115 (<5) ⁽⁵⁾	81,58 (10,83)	89,69 (16,08)
Linearidade			
Equação da reta ⁽²⁾	-	$y = 123723x + 8015$	$y = 109813x - 124862$
$r^{(2)}$	0,99 ⁽⁵⁾	0,9947	0,9951
Regressão linear ⁽³⁾	>9,33	1012,85	1474,19
Desvio da linearidade ⁽³⁾	<5,41	0,29	1,50
Faixa linear (mg L ⁻¹)	-	2,0 a 35,0	2,0 a 35,0
Limites			
Detecção (mg L ⁻¹)	-	0,22	0,33
Quantificação (mg L ⁻¹)	-	0,68	0,99
Precisão (CV₁%)	<5,00 ⁽⁵⁾	7,84	2,52
Exatidão^(1,4) (%)	85 - 115 ⁽⁵⁾	99,74 (4,37)	106,90 (2,22)
Robustez			
FM - % AF (CV ₂ %)	-	4,78	6,31
Marca coluna (CV ₃ %)	-	3,97	4,63

⁽¹⁾ Média (%) e CV% calculados em termos de recuperação (n = 3).

⁽²⁾ Calculada a partir de soluções padrão analisadas no mesmo período das amostras (curvas 1, 2 e 3 da Figura 4.2.2).

⁽³⁾ ANOVA ($p = 0,01$).

⁽⁴⁾ Calculado para vinho Merlot 2, nos níveis de concentrações baixo (10 mg L⁻¹), médio (15 mg L⁻¹) e alto (25 mg L⁻¹).

⁽⁵⁾ ANVISA (2003) e FDA (2001).

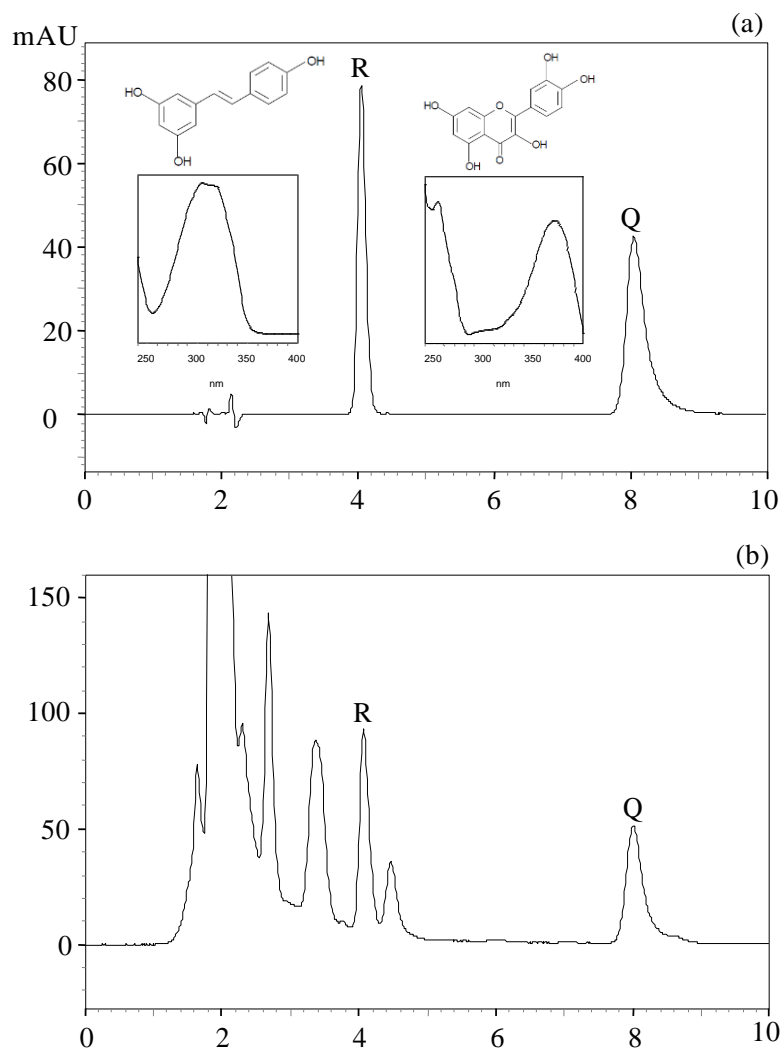


Figura 4.2.1. Cromatogramas em 340 nm, obtidos conforme método CLAE-DAD para: solução padrão de *trans*-resveratrol (R) e quercetina (Q), na concentração de 10 mg L⁻¹, com respectivas estruturas químicas e espectros UV (a) e vinho tinto Merlot 2 (b).

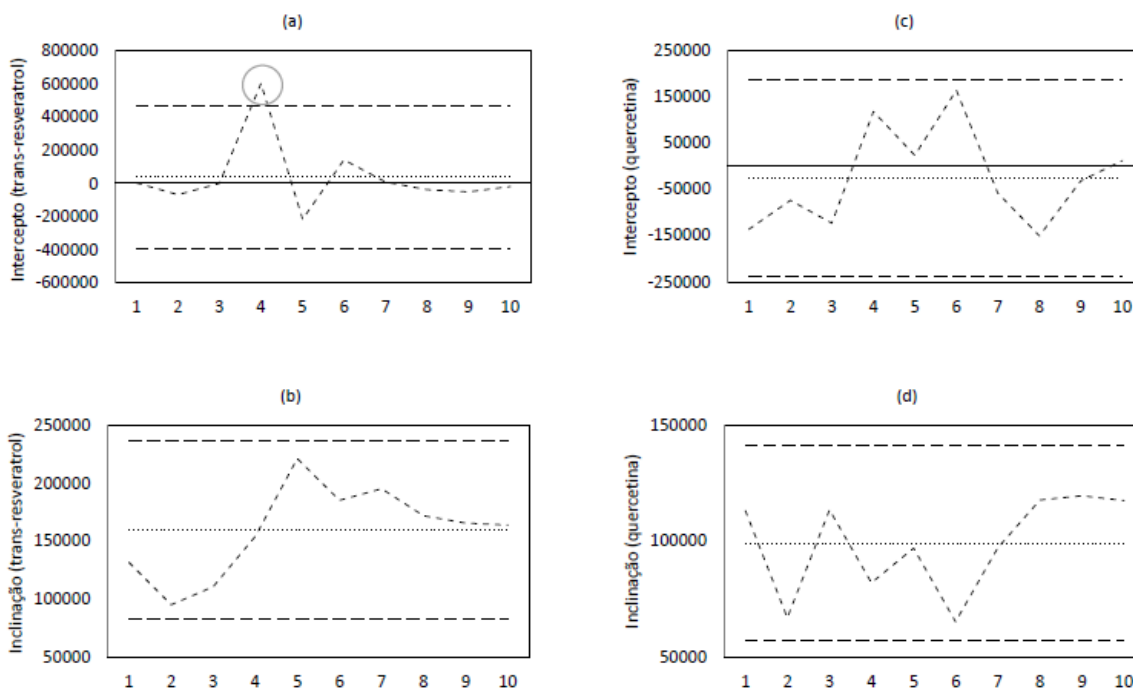


Figura 4.2.2. Cartas controle referentes a dez curvas padrão para cada analito: intercepto relativo ao *trans*-resveratrol (a), inclinação relativa ao *trans*-resveratrol (b), intercepto relativo à quercetina (c), inclinação relativa à quercetina (d). Círculo indica valor fora da especificação ($média \pm 2\sigma$), o qual foi desconsiderado. Curvas 1 a 3: usadas para cálculos da linearidade do método desenvolvido. Curvas 4 a 10: ensaios realizados ao longo de dois anos para avaliar a consistência da linearidade.

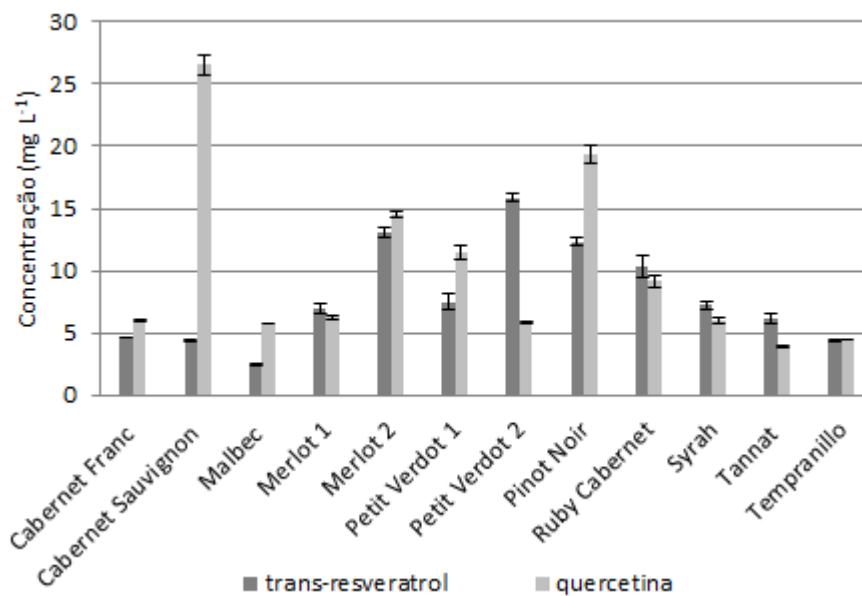


Figura 4.2.3. Teores de *trans*-resveratrol e quercetina (média e desvio padrão) para as amostras de vinhos tintos elaborados com uvas do Rio Grande do Sul, safra 2012.

4.3. CAPÍTULO 3

Método HPLC-DAD II para Determinação de Seis Fenóis Bioativos em Vinhos Tintos

4.3.1. Introdução

Pelos mesmos motivos explicitados no item 4.2.1, optou-se pelo uso de HPLC-DAD para o desenvolvimento do método II. Com base no método apresentado no Capítulo 2, foram realizadas várias tentativas para aumentar ao máximo o número de flavonóis e estilbenos com análise direta de amostras de vinhos em HPLC-DAD. Assim, novos analitos foram inseridos, totalizando nove fenóis bioativos. Entre os estilbenos, além do *trans*-resveratrol, foram avaliados: *trans*- ϵ -viniferina, *trans*-piceido e piceatanol. Entre os flavonóis, além da quercetina foram testados: quempferol, miricetina e rutina. Também foi testado o ácido *trans*-cinâmico, um precursor comum dessas classes de metabólitos de videira.

O meio sintético de vinho, descrito no item 4.2.1, foi avaliado para preparar as soluções estoque de padrões, mas este foi incapaz de solubilizar aqueles compostos menos polares, como o quempferol. Por isso, foram testados MeOH 50% v/v, EtOH 70% v/v e EtOH p.a., sendo que o EtOH 70% v/v foi escolhido por manter os padrões solúveis e estáveis por mais tempo em refrigerador (até uma semana). A partir dessas soluções, foram preparadas as soluções das curvas de calibração, com a mesma composição de solvente orgânico do início de cada gradiente testado e sem o ácido fórmico.

No método por HPLC-DAD II, foram mantidos a mesma composição qualitativa de eluentes e o mesmo fluxo (1 mL min^{-1}), conforme previamente estabelecidos para a análise de *trans*-resveratrol e quercetina (Tabela 4.2.1). A concentração de MeOH na fase móvel B foi alterada de 100% para 90% v/v, a fim de reduzir a formação de bolhas no sistema HPLC. Contudo, foi necessário avaliar novas condições de gradiente da fase móvel para a análise desse maior número de compostos. O tempo de análise foi aumentado para possibilitar a separação do maior número de compostos fenólicos. A concentração máxima de fase móvel B ao longo do gradiente foi aumentada de 70% para 90% em relação ao método descrito na Tabela 4.2.1, para viabilizar a eluição de compostos fenólicos menos polares, como o quempferol. Também foi reduzida a concentração de MeOH no início da análise de 50% para 30% v/v (sobre 90% v/v), para promover a separação preliminar de alguns compostos interferentes mais polares do que os de interesse. O ajuste final do gradiente foi

realizado frente a pequenas alterações nas concentrações de solvente orgânico no gradiente até obter a separação dos picos cromatográficos. No início e no final das análises, a manutenção da coluna de HPLC-DAD foi realizada conforme descrito no item 4.2.1. Então, para uma jornada de oito horas de trabalho, foi possível realizar cerca de 14 análises.

Para checar a seletividade do método, paralelamente ao DAD, foram conduzidas detecções em espectrômetro de massas híbrido de quadrupolo e tempo de voo (QTOF), com alta resolução. Dos nove fenóis bioativos em teste, foram quantificáveis com alta seletividade: ácido *trans*-cinâmico, *trans*-resveratrol, *trans*- ϵ -viniferina, quempferol, quercetina e miricetina. Os compostos rutina, *trans*-piceido e piceatanol apresentaram baixa pureza de pico. Sendo assim, foi proposto e validado um método de 30 minutos em HPLC-DAD para os demais seis fenóis bioativos. Este método apresentou tempo inferior a outros previamente relatados para o mesmo número de compostos fenólicos, com validação completa e com uso de HPLC-DAD (Tabela 3.2).

Apesar de usar o QTOF na validação do método HPLC-DAD II, na rotina laboratorial pode ser empregado o método com o uso de HPLC e detector DAD. Dessa forma, após a validação do método, foram analisadas 87 amostras de vinhos comerciais e experimentais da região da Campanha Gaúcha (Capítulo 4).

O método desenvolvido contribui para a realização de pesquisas relacionadas a vinhos com diferentes abordagens, como por exemplo: avaliação de variedades de uvas, novas regiões vitivinícolas, condições climáticas, sanidade de plantas, entre outras. Para essas avaliações, frequentemente, são necessários conhecimentos de peculiaridades das amostras, como a biossíntese característica de seus metabólitos primários e secundários. Os compostos fenólicos representam a classe de metabólitos secundários com maior interesse, pois apresentam alta correlação com os efeitos benéficos de uvas e vinhos na saúde humana. Portanto, o conhecimento das rotas metabólicas mobilizadas pode fornecer subsídios importantes para o desenvolvimento de produtos ou para a caracterização de produtos de regiões específicas. No item 4.3.2, o artigo aceito para publicação pelo periódico *Chemical Papers* apresenta os resultados obtidos para a validação do método HPLC-DAD II e os cromatogramas correspondentes aos padrões e às amostras de vinhos.

4.3.2. Artigo Aceito pelo Periódico *Chemical Papers*

Verification of the selectivity of a liquid chromatography method for determination of stilbenes and flavonols in red wines by mass spectrometry

^{a,b}Letícia F. da Silva, ^aCelito C. Guerra, ^{a,c}Alana Foresti, ^bAna M. Bergold

^a *LACEM - Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas, Embrapa Uva e Vinho, Rua Livramento, 515, CEP 35700-000 Bento Gonçalves, RS, Brazil*

^b *Laboratório de Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil*

^c *Tecnologia em Viticultura e Enologia, Instituto Federal do Rio Grande do Sul, Av. Osvaldo Aranha, 540, CEP 95700-000 Bento Gonçalves, RS, Brazil*

Corresponding author: M.D. Letícia Flores da Silva; e-mail address:
leticiaflores@ig.com.br

Received [Dates will be filled in by the Editorial office]

Quantification of bioactive phenols, like stilbenes and flavonols (SaF), has been conducted to evaluate the nutraceutical potential of red wines. However, there is still a lack of full validated, fast and accessible liquid chromatography methods offering high selectivity and a simple procedure. We present here the use of a high-resolution mass spectrometer to evaluate the selectivity of a feasible and traditional liquid chromatography technique (HPLC-DAD) to analyze markers of aglycone SaF in red wines. The SaF compounds were tested: *trans*-resveratrol, *trans-ε*-viniferin, quercetin, myricetin, and kaempferol, as well as *trans*-cinnamic acid, one of their precursors. System suitability and validation tests were employed for the selected conditions (octylsilane column, methanol mobile phase, and gradient elution). The validation process ensured the HPLC-DAD method was selective, linear, sensitive, precise, accurate and robust. The method was then applied to red wine samples from the

Campanha Gaúcha region, Southern Brazil. The real samples contained different SaF levels, showing that the method is applicable to routine use. Furthermore, this was the first SaF characterization of red wines from the *Campanha Gaúcha*, contributing to regional and product development.

Keywords: bioactive phenols, red wine, liquid chromatography, mass spectrometry, validation

4.3.2.1. Introduction

Biological studies, dealing with the *French Paradox*, showed that red wines are associated with increased longevity and the prevention of diseases in moderate consumers (Bidlack & Wang, 2006; Renaud & De Lorgeril, 1992), and that such responses could be mainly attributed to the wine phenol constituents (Flamini et al., 2013; Khan et al., 2013). The wide variety of phenolic compounds found in wines has as their precursor *trans*-cinnamic acid. They are derived from the secondary metabolism of grapes and may be classified into non-flavonoid and flavonoid groups (Crozier et al., 2006; Ribéreau-Gayon et al., 2006). Among these classes, the bioactive stilbenes and flavonols (SaF) are the focus of the nutritional aspects of grapes and their derived products, which are some of the major sources of such compounds in the human diet (Bidlack & Wang, 2006; Malovaná et al., 2001; Monagas et al., 2005; Pereira et al., 2010; Pérez-Magarino et al., 2008; Rodríguez-Delgado et al., 2002; Silva et al., 2011; Tenore et al., 2011; Villiers et al., 2004; Vitrac et al., 2005; Vrhovsek et al., 2012).

Stilbenes are non-flavonoid molecules, like *trans*-resveratrol, *trans*-piceid and viniferin, whereas flavonols are from the flavonoid class, like quercetin, kaempferol and myricetin (Crozier et al., 2006; Ribéreau-Gayon et al., 2006). *trans*-Resveratrol and quercetin, for example, have been extensively evaluated due to their biological activities in the cardiovascular system, brain protection, antioxidative processes, and antitumor and anti-inflammatory actions (Baur et al., 2006; Bidlack & Wang, 2006; Flamini et al., 2013; Prior, 2006; Tringali, 2012). The majority of the grape phenols naturally occur as glycosides, but the wine fermentation processes in acid media usually promote the hydrolysis of the glycoside linkage giving the corresponding

aglycone molecules, which are easier to absorb through the gastrointestinal system (Bidlack & Wang, 2006; Crespy et al., 1999, 2002; Murota & Terao, 2003).

The development of wines containing high levels of SaF may enhance the health benefits already identified in humans (Cotea et al., 2012). It may be substantially supported by a chemical characterization of the SaF biosynthetic pathways, where some SaF markers would be detected in higher doses than their common precursors (e.g. *trans*-cinnamic acid) (Baur et al., 2006; Prior, 2006). UPLC (ultra-performance liquid chromatography) coupled to a MS (mass spectrometer) is the most modern technique and, in principle, can create faster and more selective methods than HPLC (high-performance liquid chromatography) coupled to a DAD (diode array detector) (Cielecka-Piontek et al., 2013). Indeed, UPLC-MS should be the first choice for SaF quantification in wines. However, UPLC-MS is not widely available in food laboratories yet, because of the high costs associated with purchasing, and the need for maintenance and skilled personnel. Therefore, it seems clear that the HPLC-DAD may be a suitable analytical option for several laboratories, since it is still the most widespread LC (liquid chromatography) instrumentation worldwide, mainly in wineries or small research centers, where the funding and resources are sometimes restricted. Some previous publications used HPLC-DAD for SaF determination in wines (Adrian et al., 2000; Aznar et al., 2011; Cotea et al., 2012; Malovaná et al., 2001; Pereira et al., 2010; Pérez-Magarino et al., 2008; Villiers et al., 2004; Vitrac et al., 2005). A simple direct injection of the samples for analysis of resveratrol and other SaF has been described in some methods (Adrian et al., 2000; Carer et al., 2004; Castellari et al., 2002; López et al., 2001; Pereira et al., 2010; Revilla & Ryan, 2000; Vitrac et al., 2005). Complex sample preparation has been required by other procedures (Baptista et al., 2001; Cotea et al., 2012; Fontana & Bottini, 2014; Kerem et al., 2004; Lima et al., 1999; Malovaná et al., 2001; Paulo et al., 2011; Pérez-Magarino et al., 2008; Villiers et al., 2004), but they may introduce analytical errors, be expensive, cause environmental pollution due to chemical waste and be time-consuming.

The evaluation of the selectivity for each chromatographic peak is another important aspect, since it is a crucial validation requirement for such methods (ANVISA, 2003; FDA, 2001; González et al., 2014; ISO, 2005). Concerning SaF determination in wines, a full exploration of selectivity data is indispensable because

the compounds have similar chemical characteristics among themselves and with other organic compounds in the matrix, such as the high levels of red wine pigments (anthocyanins, a positively charged flavonoid class). Interfering compounds may exhibit coelution and, consequently, lead to overestimation of the content, or non-selective detection of, the analytes (González et al., 2014). The DAD detector and, mainly, high-resolution mass spectrometers (e.g. a hybrid quadrupole time-of-flight, or QTOF, instrument) may be able to provide more data through software tools, such as providing the purity index of the chromatographic peaks (ANVISA, 2003; FDA, 2001; Kazakevich & Lobrutto, 2007). Despite this, selectivity has not been extensively investigated for these analyses when DAD is the detector (Adrian et al., 2000; Aznar et al., 2011; Castellari et al., 2002; Cotea et al., 2012; Gómez-Alonso et al., 2007; Kerem et al., 2004; Lima et al., 1999; López et al., 2001; Malovaná et al., 2001; Pereira et al., 2010; Pérez-Magarino et al., 2008; Rastija et al., 2009; Revilla & Ryan, 2000; Villiers et al., 2004; Vitrac et al., 2005). A few selective and validated HPLC-DAD methods were found (Baptista et al., 2001; Careri et al., 2004; Fontana & Bottini, 2014), but they did not focus on SaF markers. In the literature, no HPLC-DAD method that combines a short analysis time (below 30 min), simple sample preparation, and full validation with high selectivity has so far been reported. Conditions like these are useful to combine time-reduction with good laboratory practices (Lorrain et al., 2013). Thus, the present study aimed to employ QTOF to check the selectivity of a feasible HPLC-DAD method for chemical characterization of the SaF biosynthetic pathways (*trans*-resveratrol, *trans*- ϵ -viniferin, quercetin, myricetin, kaempferol and *trans*-cinnamic acid) in red wines, with no sample preparation. A preliminary application of the method in routine analyses of Southern Brazilian red wines is also presented here.

4.3.2.2. Experimental

4.3.2.2.1. Chemicals and Standards

Methanol, acetonitrile and formic acid were HPLC grade and were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Reagent grade ethanol was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ultra-pure water (Milli-Q, Millipore, USA) was used to prepare all the solutions. Analytical standards of *trans*-cinnamic acid, *trans*-resveratrol, *trans*- ϵ -viniferin, quercetin, kaempferol and myricetin were purchased from Sigma-

Aldrich (St. Louis, MO, USA). Malvidin-3-*O*-glucoside and (+)-catechin were purchased from Extrasynthese (Genay, France). All standards were of at least 94% purity.

A stock solution was prepared containing 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of each analyte, whose concentrations were corrected according to respective purities, and was diluted with ethanol 70% (v/v in water). Fractions of the stock solution were kept protected from light and stored at 4 °C for a week. The working standard solutions were prepared daily.

4.3.2.2.2. Samples of Red Wines

Tests were conducted with samples of commercial red wines from the *Campanha Gaúcha* region, the grapes for which were harvested between January and February 2012. The following wine samples derived from six different varieties of grapes were used: Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Malbec, Merlot, Tannat, and Tempranillo.

Before analysis, all samples were stored at 20 ± 2 °C. Samples were filtered through a 0.45 μm hydrophilic PVDF (polyvinylidene fluoride) membrane (Millipore, USA), and used without dilution.

4.3.2.2.3. Method Development

The method conditions were optimized by testing different solvents (acetonitrile and methanol), column types (octylsilane–C8 and octadecylsilane–C18), column lengths (15 and 25 cm), column packing particle sizes (2.6 and 5.0 μm) and elution gradients. The peaks of the chromatograms were evaluated by R_s (resolution) and TF (asymmetry), following suitability recommendations (Bliesner, 2006; FDA, 1994; Kazakevich & Lobrutto, 2007; Shabir, 2003).

The settings for DAD detector were experimentally established. For this, the t_R (retention time) and λ_{max} (maximum ultraviolet absorption wavelength) were determined for each analyte. Full system suitability was also checked, considering: k (capacity factor), R_s , TF and N (number of theoretical plates).

4.3.2.2.4. HPLC-DAD Conditions

Determinations of SaF and *trans*-cinnamic acid were carried out by HPLC-DAD. A Shimadzu system (Kyoto, Japan) equipped with a DAD detector (SPD-M10AVP), two dual piston solvent delivery pumps (LC-10AD), a controller module (UFLC CBM-20A) and CLASS VP software (version 6.12) were used. The column selected was a C8 (Vertical) 150 x 4.6 mm, 5 μm particle size, carbon load of 9%, surface area of 450 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ and pore size 10 nm. It was protected with a guard column of C8 material (Phenomenex). Detection was conducted at 276, 306, 322, 365, 371 and 374 nm, according to the λ_{max} of each analyte. The injection volume was 20 μL and the flow rate was 1 mL min^{-1} . Mobile phase A consisted of formic acid and water (1:1000, v/v) and mobile phase B consisted of methanol, formic acid and water (900:1:100, v/v/v). The linear gradient was: from 30% to 45% of B in 7 min, 45% of B for 7 min, from 45% to 55% of B in 1 min, from 55% to 65% of B in 9 min, from 65% to 90% of B in 1 min, 90% of B for 2 min, from 90% to 30% of B in 0.5 min, 30% of B for 2.5 min. The total time of analysis was 30 min.

4.3.2.2.5. Method Validation

The analytical method described in the *HPLC-DAD Conditions* section was validated for its intended use. The performance characteristics defined in the validation guidelines from the Food and Drug Administration (FDA, 2001) and the Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA, 2003) were followed.

Selectivity was evaluated by assessing peak purity and R_s . Purity was determined using features of the DAD detector managed by the CLASS VP software, as follows: overlay of the spectra at different peak points; calculation of the purity index (from 250 to 600 nm); evaluation of the contour graph; and plots of three-dimensional (3D) graphs. Peaks of compounds were considered pure when the purity index was higher than 0.99.

For a more consistent evaluation of selectivity, an Ultima API Q-TOF instrument (Micromass, Manchester, UK) was used and it was controlled by Masslynx software, version 4.1 (Waters, Milford, United States). The analyses were conducted with ESI (electrospray ionization), in positive mode scanning from m/z 150 to 1000. The cone

and desolvation nitrogen supply (99.0% purity) was set at flow rates of 30 and 300 L h⁻¹, respectively. The instrument operation conditions were: capillary voltage of 2000 V, cone voltage of 100 V, source temperature of 80 °C, desolvation temperature of 150 °C. TOF was set at 9100 V, and detector voltage (MCP) was 1900 V, in V mode. The *m/z* data were registered by comparison with malvidin-3-*O*-glucoside (*m/z* 493.14) and (+)-catechin (*m/z* 291.09) standards, both of which are common wine constituents.

Linearity was performed by analyzing of three calibration curves on different days. Each solution was injected in triplicate. The stock solution was used to prepare calibration curve solutions at six concentration levels, being all of them diluted in ethanol 70% (v/v in water) (see *Chemical and Standards* section). For cinnamic acid the concentrations were 0.1, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 and 10.0 µg mL⁻¹, whereas for the other analytes (*trans*-resveratrol, *trans-ε*-viniferin, quercetin, kaempferol and myricetin) the concentrations were 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0 and 40.0 µg mL⁻¹. Linear regression equations were calculated by the least squares method. The linearity was evaluated by ANOVA.

Sensitivity was assessed by LOD (limit of detection) and LOQ (limit of quantification). They were determined by the noise level of the chromatograms obtained from linearity studies (ANVISA, 2003; FDA, 2001).

Precision was determined by an intra-day test (repeatability) and an inter-day test (intermediate precision). Repeatability was conducted by spiking a sample (Cabernet Sauvignon) with three concentration levels of SaF standards, prepared as six replicates on the same day. Concentrations were: low (L, 2.5 µg mL⁻¹ for cinnamic acid and 10.0 µg mL⁻¹ for the SaF), medium (M, 5.0 µg mL⁻¹ for cinnamic acid and 20.0 µg mL⁻¹ for the SaF) and high (H, 7.5 µg mL⁻¹ for cinnamic acid and 30.0 µg mL⁻¹ for the SaF). Intermediate precision was determined by spiking the same concentration levels, prepared in triplicate on three different days. The precision of the results was expressed by %RSD (relative standard deviation).

Accuracy was assessed by a recovery study processed in the same way as the repeatability work. Calculations of accuracy were based on comparison of the theoretical and the measured concentrations.

Robustness was corroborated by deliberate method modifications. Investigation of little differences in the elution gradient was conducted (Tests 1, 2 and 3). Test 1 was carried out as described in the *HPLC-DAD Conditions* section from 0 to 14 min and from 26 to 30 min, with changes from 50% to 65% of B in 11 min and from 65% to 90% of B in 1 min. Test 2 was performed using a change from 30% to 40% of B in 7 min, 40% of B for 7 min, from 40% to 55% of B in 1 min and then the same as described in the *HPLC-DAD Conditions* section from 15 to 30 min. Test 3 was run according to *HPLC-DAD Conditions* section from 0 to 14 min and from 26 to 30 min, varying only from 50% to 55% B in 1 min, from 55% to 65% B in 9 min, from 65% to 90% B in 1 min and keeping 40% of B over 1 min.

Another test for robustness consisted of the replacement of the column by another C8 column (ACE, 150 x 4.6 mm, 5 μm , 10 nm pore size, surface area of 300 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$). This column had similar specifications to the one used in the original method, except for its surface area and brand.

4.3.2.2.6. Method Application

The practicability of the validated method was checked with real red wine samples from the *Campanha Gaúcha* region, as described under the *Samples of Red Wines* section. All quantified analytes of these samples had their peaks compared with standards in terms of t_R , UV/VIS (ultraviolet/visible) spectra and purity.

4.3.2.2.7. Statistical Analysis

Recovery, precision, robustness, linearity assessments, ANOVA, determination of calibration curve and r^2 were calculated using Excel 2013 software (Microsoft Corp., Redmond, United States), being confirmed through OriginPro 8 software (v8.0724) (OriginLab Corp., United States).

4.3.2.3. Results and Discussion

4.3.2.3.1. Development of HPLC-DAD Method

In this study, the focus was on developing a very selective method for the analysis of the largest possible number of markers of SaF biosynthetic pathways in red wines using an accessible technique (HPLC-DAD). To accomplish this goal, the

method was exhaustively tested under the conditions presented in Table 4.3.1, and then optimized. Observations on the performance of the system suitability are also presented, namely R_S and TF for each methodological variation. R_S , which measures the separation between two peaks, is recommended to be over 2.0 (FDA, 1994). The R_S values between most analytes and the adjacent peaks were at least 2.0, ensuring an adequate chromatographic separation (Table 4.3.2). The R_S of resveratrol was close to 2.0. However, some authors recommend acceptance criteria with R_S less than 1.5 (Bliesner, 2006; FDA, 1994). Considering the high purity of the resveratrol peak, the R_S close to 2.0 did not cause error of integration.

Table 4.3.1. HPLC conditions during SaF and *trans*-cinnamic acid method development.

Column				Eluent ^b	System suitability ^d	
Phase	Dimensions (mm) ^a	Particle (µm)	Pore size (nm)	Organic ^c	TF	R_S
C18	250 x 4.6	5.0	12	ACN	> 2.0	<1.5
C18	250 x 4.6	5.0	12	MeOH	≤ 2.0	<1.5
C18	150 x 4.6	5.0	12	ACN	> 2.0	<1.5
C18	150 x 4.6	5.0	12	MeOH	≤ 2.0	<1.5
C18	150 x 4.6	2.6	10	ACN	> 2.0	<1.5
C18	150 x 4.6	2.6	10	MeOH	> 2.0	<1.5
C8	150 x 4.6	5.0	10	ACN	≤ 2.0	<1.5
C8	150 x 4.6	5.0	10	MeOH	≤ 2.0	>2.0

^a Length and internal diameter of column.

^b Same gradient conditions as described in *HPLC-DAD Conditions* section. Use of methanol (MeOH) or acetonitrile (ACN).

^c Aqueous/organic ratio was constant. Organic phase was always 90% (v/v in water), and formic acid was added to this to give 0.1% v/v. Aqueous phase was fixed (formic acid 0.1% v/v).

^d System suitability in terms of TF and R_S , with acceptable values of ≤2.0 and >2.0, respectively (FDA, 1994).

The selectivity using a DAD detector has been previously reported, but with the use of an UPLC instrument (Silva et al., 2011). In addition, the TF of a peak should be equal to, or less than, 2.0 in order not to have tailing complicate the integration (Bliesner, 2006; FDA, 1994).

Guidelines require that the system suitability is shown to be acceptable before method validation (ANVISA, 2003; FDA, 2001). The only tested method that was in compliance with this requirement was using a C8 column and an organic mobile phase composed of methanol (see *HPLC-DAD Conditions* section). Given its suitability, this method was chosen to be validated. Detection characteristics of this method, like t_R and λ_{max} are described in Table 4.3.2. Since the analytes studied all have a very strong chromophore, they also proved to have high enough molar absorptivity to be detectable by UV (Kazakevich & Lobrutto, 2007). Nevertheless, the method is suitable for the DAD detector instead of a UV/VIS one, since the specific λ_{max} of each analyte is required for their detection. SaF and *trans*-cinnamic acid have different properties of λ_{max} and polarity, evidenced by different t_R values. In the current study, such specific differences were fully explored to separate each analyte and to obtain a pure peak.

HPLC-DAD chromatograms at 306 nm demonstrated good peak separation (Fig. 4.3.1) allowing suitable identification of each peak (Fig. 4.3.2). The chromatogram of a solution containing a mixture of standards at $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ is presented in Fig. 4.3.1a. A comparison of a typical red wine chromatogram with a spiked red wine ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$ of analytical standards) is illustrated in Fig. 4.3.1b, recorded at 306 nm. The analytical profile of each analyte was then established using the developed method.

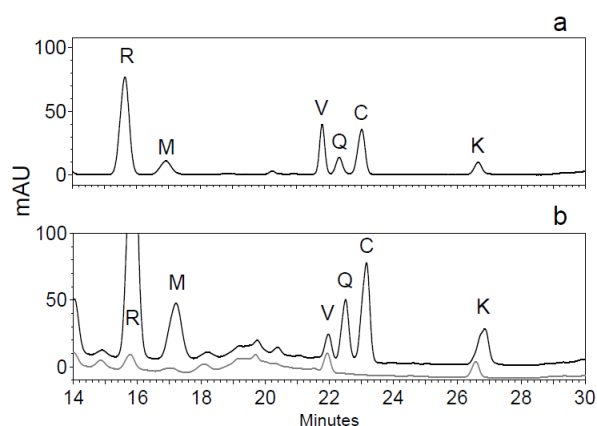


Fig. 4.3.1. HPLC-DAD chromatograms obtained according to parameters defined in *HPLC-DAD Conditions* section: standard mixture with $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ of each analyte at 306 nm (a); overlaid at 306 nm for unspiked red wine (bottom line) and red wine spiked (top line) with a standard mixture of analytes (b). Peak identifications: *trans*-resveratrol (R), myricetin (M), *trans*- ϵ -viniferin (V), quercetin (Q), *trans*-cinnamic acid (C) and kaempferol (K).

Table 4.3.2. Analytical characteristics and selectivity (values \pm SD) of the HPLC-DAD method for SaF and *trans*-cinnamic acid standards, according to Section *HPLC-DAD Conditions*.

Parameters	Recommendation ^a	<i>trans</i> -Cinnamic acid	<i>trans</i> -Resveratrol	<i>trans</i> - ϵ -Viniferin	Kaempferol	Quercetin	Myricetin
Detection characteristics^b							
t_R (min)	t_R	23.38	15.63	21.78	26.65	22.53	16.91
	± 1.0	± 0.16	± 0.20	± 0.08	± 0.21	± 0.13	± 0.32
λ_{max} (nm)	-	276	306	322	365	371	374
System suitability^c							
k	>2.0	13.23	8.57	12.50	15.47	12.67	9.37
		± 0.05	± 0.05	± 0	± 0.05	± 0.30	± 0.05
R_s	>2.0	2.25	2.18	4.38	9.22	7.13	3.05
		± 0.08	± 0.04	± 0.52	± 0.09	± 0.50	± 1.42
TF	≤ 2.0	1.0	0.97	0.92	1.05	1.03	1.02
		± 0	± 0.05	± 0.04	± 0.05	± 0.05	± 0.04
N	>2000	71202	11872	54081	41161	42283	8923
		± 764	± 461	± 3098	± 1018	± 444	± 326
Selectivity^c							
t_R (min)	t_R	23.06	15.33	21.60	26.34	22.22	16.58
	± 1.0	± 0.05	± 0.08	± 0.03	± 0.03	± 0.02	± 0.08
λ_{max} (nm)	-	276	306	322	365	371	374
Purity	-	>0.99	1.00	1.00	>0.99	>0.99	>0.99

^a According to Bliesner (2006), FDA (1994) and Shabir (2003).

^b Determined by DAD detector for each analytical standard (Fig. 4.3.2a).

^c Determined at λ_{max} of each SaF of a spiked wine ($n = 6$, low level = 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

The system suitability of parameters under the test conditions is also described in Table 4.3.2. The obtained values for all analytes in the low level spiked wine (2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for cinnamic acid, and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for other SaF) were according to recommendations (FDA, 1994).

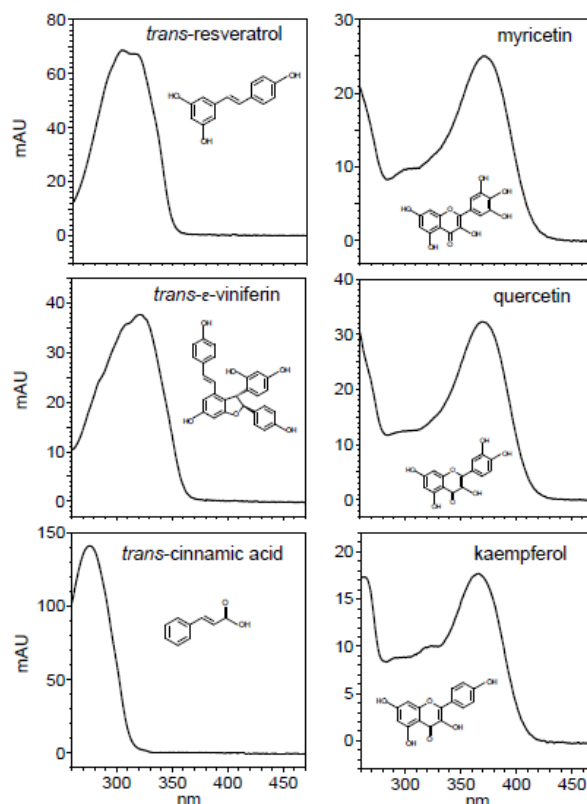


Fig. 4.3.2. Set of UV spectra for all the analytes, with their corresponding chemical structures.

The use of a C8 column for SaF and *trans*-cinnamic acid analysis is different to most published HPLC methods, that use C18 phase columns instead (Careri et al., 2004; Cotea et al., 2012; López et al., 2001; Malovaná et al., 2001; Tenore et al., 2011). Determination of *trans*-resveratrol has been conducted with a column similar to the one used in this research (Zhou et al., 2004), *i.e.* it had the same technical specifications, but that study used an isocratic elution. The columns with a C8 phase are less hydrophobic than those with a C18 phase. Compared to C18, a C8 column decreases the retention of moderately polar compounds (Kazakevich & Lobrutto, 2007), like SaF and *trans*-cinnamic acid. These characteristics were fully explored and found to give suitable separation and represented an advantage in method optimization. Then, a C8 phase column may be a good option to obtain the desirable system suitability, selectivity and a fast chromatographic run for the HPLC standards (30 min).

4.3.2.3.2. Method Validation

The method was considered suitable in terms of the performance characteristics defined by FDA (2001) and ANVISA (2003) guidelines, namely: selectivity, linearity,

LOD, LOQ, precision, accuracy and robustness. Calibration results are reported in Table 4.3.3. Precision, accuracy and robustness are exposed in Table 4.3.4.

Table 4.3.3. Calibration values of the HPLC-DAD method (defined on Section *HPLC-DAD Conditions*) for SaF and *trans*-cinnamic acid standards.

Calibration ^a	Recommendation ^a	<i>trans</i> -Cinnamic acid	<i>trans</i> -Resveratrol	<i>trans</i> - ϵ -Viniferin	Kaempferol	Quercetin	Myricetin
Range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	-	0.1–10.0	1.0–40.0	1.0–40.0	1.0–40.0	1.0–40.0	1.0–40.0
r^2	>0.99	0.9966	0.9972	0.9940	0.9954	0.9916	0.9952
Slope \pm SD	-	254231 \pm 1633	167034 \pm 4180	66919 \pm 1752	123799 \pm 4113	87227 \pm 5055	89030 \pm 1366
Intercept \pm SD	-	27071 \pm 1389	-35370 \pm 16851	-66727 \pm 4698	-182808 \pm 10076	-134573 \pm 7879	-119958 \pm 6143
Linear regression ^b	>9.33	9254.7	4739.2	3586.6	5055.0	2300.3	4599.3
Linearity deviation ^b	<5.41	4.96	0.27	2.32	2.82	1.87	2.50
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	-	0.02	0.33	0.23	0.27	0.30	0.23
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	-	0.05	1.01	0.70	0.81	0.90	0.69

^a Three calibration curves, in three different days. Calculations were performed accordingly to FDA (2001) and ANVISA (2003).

^b Calculated by least squares regression, with $p < 0.01$ ($n = 18$).

The primary method selectivity was verified by the classic crossing DAD data of UV spectra (Fig. 4.3.2), purity index (at least 0.99) and t_R (standard deviation–SD < 1) of the analytes. Previous methods have used only this simplified approach, or something even less rigorous, to check the selectivity (Castellari et al., 2002; Cotea et al., 2012; Kerem et al., 2004; Lima et al., 1999; Malovaná et al., 2001; Paulo et al., 2011; Pereira et al., 2010; Pérez-Magarino et al., 2008; Villiers et al., 2004). Some of these published chromatograms had critical regions of elution with wide unknown peaks and baseline deviation, as demonstrated in Fig. 4.3.1. This does not impair the use of the method, but during validation it is recommended that a thorough knowledge

of the interferences and their identities and t_R values be acquired (ANVISA, 2003; FDA, 2001). For these reasons, we conducted an exhaustive exploration of the DAD and QTOF data obtained from the chromatograms of red wines analyzed by the developed method. Chromatograms recorded at 525 nm (Fig. 4.3.3a), in the visible region, suggested the presence of anthocyanic pigments, according to a well know UV/VIS profile (Burns et al., 2002, OIV, 2015). The three-dimensional graph (Fig. 4.3.3b) also illustrates an intense absorption (mAU) where these interferences elute through a range of t_R : from 0 to 15.0 min, from 19.0 to 21.3 min and after 28 min. QTOF data confirmed the interference of anthocyanic pigments and other phenols in these three t_R ranges, showing higher total ion counts through the chromatogram and also their characteristic m/z for molecular ions and fragments in positive mode (ESI⁺) in accordance with previous publications (Burns et al., 2002; De Rosso et al., 2012; Flamini, 2003; Gordillo et al., 2012; OIV, 2015; Wu et al., 2005). The main interferences occurred from 0 to 15.0 min, where the combined mass spectra registered m/z 291.09, 579.13 and 867.18 which are compatible with wine flavanols (Fig. 4.3.3c). Trace levels of some nonacylated anthocyanins (m/z 479.08 and 465.09) were also detected through the first 15 min (Fig. 4.3.3d). From 19.0 to 21.3 min, a high quantity of malvidin-3-*O*-glucoside (m/z 493.14, and its fragment m/z 331.10) and peonidol-3-*O*-glucoside (m/z 462.14) were found (Fig.3e). Additionally, the sensitivity of QTOF, over that of the DAD, enabled the detection of acetylated (m/z 505.14, 535.15) and coumarylated (m/z 639.17) anthocyanins that seem to appear after 28 min (Fig. 4.3.3f).

Anthocyanins, which are responsible for the color of red wines, and flavanols were the major interfering compounds in this analysis of SaF and *trans*-cinnamic acid in red wines. To ensure system suitability, it was necessary to identify a safety region to perform selective determinations of SaF and *trans*-cinnamic acid by direct injection of red wine in HPLC, that is: from 15.0 to 19.0 min and from 21.3 to 28 min. Absorptions by the interferences did not occur in the visible range at the t_R defined for analysis.

Table 4.3.4. Precision, accuracy and robustness of the HPLC-DAD method for SaF and *trans*-cinnamic acid analysis in Cabernet Sauvignon red wine. The method is as described in the *HPLC-DAD Conditions* section.

Parameters	Recommendation ^a	<i>trans</i> -Cinnamic acid	<i>trans</i> -Resveratrol	<i>trans</i> - <i>ε</i> -Viniferin	Kaempferol	Quercetin	Myricetin
Repeatability (%RSD)*							
L	<15	1.98	1.78	1.85	3.55	4.63	4.04
M	<15	0.94	1.90	1.35	5.11	4.44	4.15
H	<15	0.51	1.27	3.36	3.52	1.88	1.17
Intermediate precision (%RSD)*							
L	<15	5.56	5.65	3.20	8.03	7.48	5.24
M	<15	4.41	3.09	5.28	8.49	7.61	6.00
H	<15	3.78	4.58	4.97	9.16	8.48	5.37
Accuracy (% Recovery)*							
L	85–115	94.66	101.30	106.27	101.32	97.94	101.52
M	85–115	102.57	102.48	100.98	103.62	98.70	99.77
H	85–115	102.07	105.86	106.95	87.40	90.12	86.70
Robustness (RT)							
Elution – Test 1	-	23.91	17.03	22.48	27.54	22.97	17.80
Elution – Test 2	-	23.15	17.76	21.72	25.74	22.98	19.02

* Spiked wine with three level of each analytical standard of SaF, defined on Section *Method Validation* (L = low, M = medium and H = high).

Linearity was observed for all analytes, over their concentration ranges and $r^2 > 0.99$. ANOVA confirmed a linear relationship ($F_{calc} > F_{tab}$, $p < 0.01$) and no deviation from linearity ($F_{calc} < F_{tab}$, $p > 0.01$). The calibration curves covered the range of analyte concentrations normally found in red wines (Adrian et al., 2000; Castellari et al., 2002; Fontana & Bottini, 2014; Lima et al., 1999; López et al., 2001; Malovaná et al., 2001;

Vitrac et al., 2005). Linearity, LOD and LOQ for each SaF and *trans*-cinnamic acid analysis are presented in the calibration curve data (Table 4.3.3).

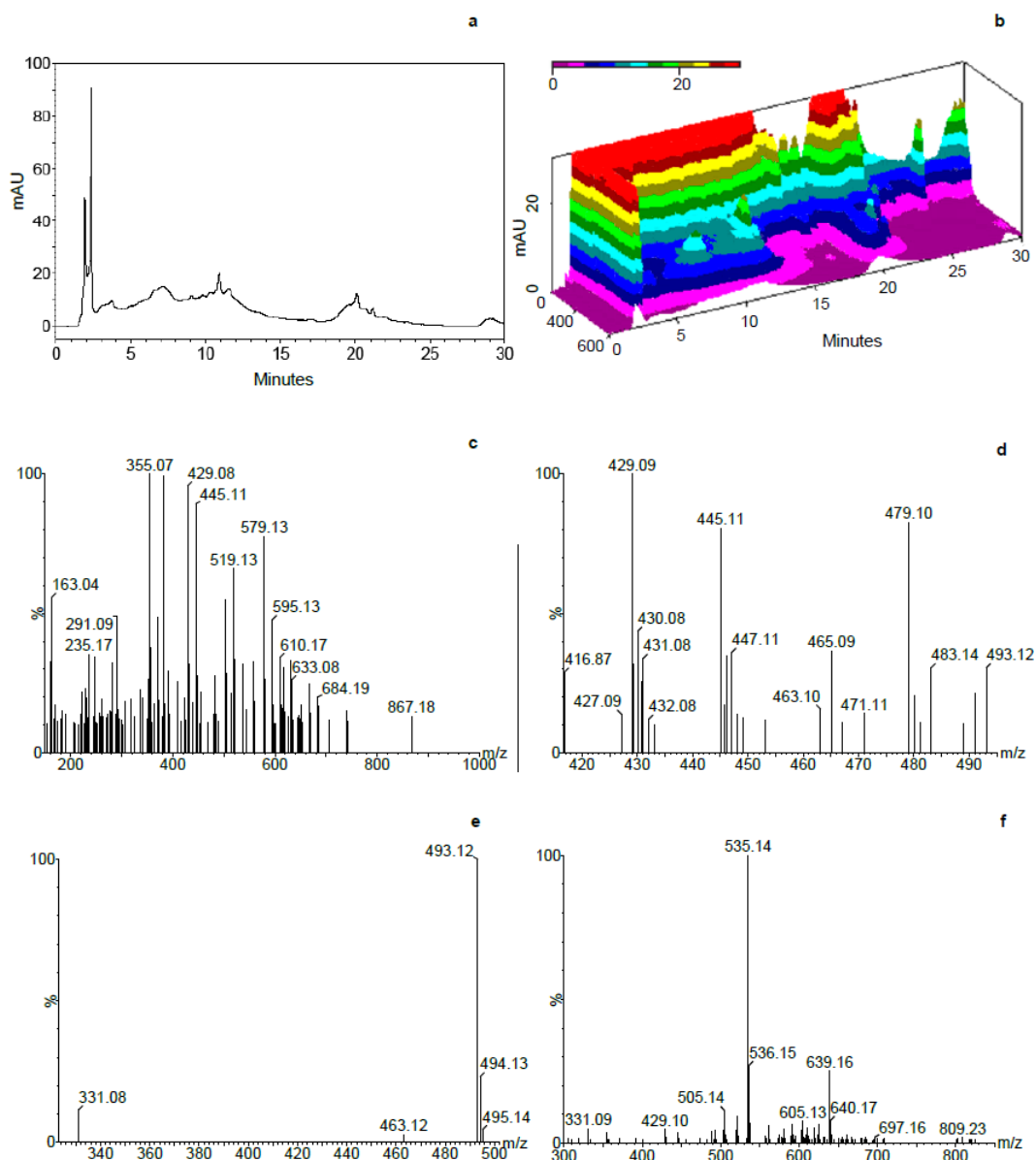


Fig. 4.3.3. Selectivity data for a sample of red wine showing no interference of anthocyanins with SaF and *trans*-cinnamic acid: HPLC-DAD chromatogram at 525 nm (a); 3D graph (b); mass spectrum of flavanol interferences, scanned from 0 to 15 min (c); mass spectrum of anthocyanic interferences, scanned from 0 to 15 min (d); mass spectrum of anthocyanic interferences, scanned from 19 to 21.3 min (e); mass spectrum of anthocyanic interferences, scanned from 28 to 30 min (f). For conditions of HPLC-DAD and QTOF, see *HPLC-DAD Conditions* and *Method Validation* sections, respectively.

Intra-day and inter-day precisions were acceptable because the %RSD between determinations did not exceed 15% (Table 4.3.4). In general, kaempferol and quercetin had higher %RSD than the other analytes. They are also the most hydrophobic of the compounds present in high concentrations, i.e. excluding cinnamic acid. Probably their solubilities in wine, with around 12% or 14% GL alcohol, were lower than those of the other analytes. However, such characteristic did not interfere in the method validation. As a result, the HPLC-DAD method was demonstrated to be precise for repeatability and intermediate precision.

Accuracy was demonstrated by suitable recoveries of all analytes (from 85% to 115%), as prescribed by the FDA (2001). The lowest determined values were for kaempferol, quercetin and myricetin, presumably for similar reasons explained above. The developed method was accurate for the required purpose, demonstrated no remarkable matrix effect (Table 4.3.4). Additionally, all identities were confirmed by UV spectra.

The developed method was robust, as some small modifications to its conditions did not affect the results (Table 4.3.4). Changing the gradient elution, the values of some t_R were modified. Nevertheless, purities were kept within acceptable values. Furthermore, quantifications did not deviate more than 5.0% (%RSD). Thus, the method was considered robust enough to be included in the routine repertoire of a laboratory.

Further and more significant alterations to the method were also tried by changing the C8 column for another one, but of a different brand and surface area. This second C8 column tested promoted separation of all compounds, except for viniferin and quercetin (Table 4.3.2). Viniferin had a t_R of 21.01 min and eluted very close to quercetin (21.18 min). UV/VIS detection of viniferin ($\lambda_{max} = 322$ nm) did not affect the detection of quercetin ($\lambda_{max} = 371$ nm). However, the opposite did not hold, since quercetin absorbs at 322 nm (Fig. 4.3.2). For this reason, viniferin could not be determined with this tested column without other alterations in the original method described under *HPLC-DAD Conditions* section.

4.3.2.3.3. Application of HPLC Method in Red Wine

In this study, the first goal was not necessarily to elucidate which of the wines from a region would be richest in their SaF markers. Before this comparison could be undertaken, it was necessary to put the current selective and validated HPLC-DAD method into practice to demonstrate its applicability as a feasible tool for the evaluation of red wines. Considering that wines are complex samples and their phenolic profiles are affected mainly by the grape variety, six varieties from the same region (*Campanha Gaúcha*) were tested to check the method selectivity. Therefore, the red wine samples were submitted to the method and their SaF markers were measured. Sample analyte peaks were comparable with those in standard profiles, including purity index (>0.99), t_R ($SD < 1$) and UV/VIS spectra (Table 4.3.2, Fig. 4.3.1 and Fig. 4.3.2).

The concentrations of five SaF and *trans*-cinnamic acid in red wines determined by this HPLC-DAD method are given in Table 4.3.5. The %RSD was higher for the lower SaF concentrations, but they could be reduced by employing an automated injector. The data presented were collected using a manual injector, taking into account analyst operation errors. Furthermore, *trans*-cinnamic acid and kaempferol showed the higher %RSD, but this is explicable by their low level and low solubility, respectively.

This is the first SaF characterization known for wines from the *Campanha Gaúcha* region. An exploration of the presented results, or the application of the same method for new samples, may contribute for Certificate of Origin and strategies for the design of new products in this region (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Here, the majority of the results were within the linear range of the method for each analyte.

Regarding each specific compound, viniferin, quercetin and myricetin were more frequently found than *trans*-resveratrol and kaempferol. Cinnamic acid was detected in a few samples and only quantified in one Merlot sample ($0.07 \mu\text{g mL}^{-1}$). The biosynthesis of SaF requires consumption of cinnamic acid, which is the first compound derived from phenylalanine (Pereira et al., 2010; Silva et al., 2011; Tenore et al., 2011). Generally, when this pathway to SaF is active, *trans*-cinnamic acid is present at low levels, whereas the SaF concentrations are high (Ribéreau-Gayon et al., 2006, Silva et al., 2011).

Table 4.3.5. Concentration of SaF markers and *trans*-cinnamic acid in commercial red wines samples from *Campanha Gaúcha*, according to the method described under *HPLC-DAD Conditions* section.

Wine Variety	Concentration ^a (µg mL ⁻¹)							Stilbenes ^b	Flavonols ^c	Markers of SaF ^d
	<i>trans</i> -Cinnamic acid	<i>trans</i> -Resveratrol	<i>trans</i> - ϵ -Viniferin	Kaempferol	Quercetin	Myricetin				
Cabernet Franc	ND	ND	1.85 (3.06)	ND	4.01 (4.21)	2.37 (3.81)	1.85	6.38	8.23	
Cabernet Sauvignon	<0.05	3.65 (5.44)	3.32 (3.42)	2.01 (8.03)	5.19 (2.05)	7.86 (0.73)	6.97	15.06	22.08	
Malbec	<0.05	2.37 (0.83)	1.95 (1.39)	1.78 (1.18)	4.64 (1.23)	8.07 (1.07)	4.32	14.49	18.86	
Merlot	0.07 (8.13)	8.61 (4.36)	2.92 (0.41)	ND	<0.90	3.80 (4.56)	11.53	4.70	16.3	
Tannat	<0.05	1.78 (2.76)	2.79 (4.34)	1.74 (4.70)	4.06 (0.94)	3.61 (4.23)	4.57	9.41	14.03	
Tempranillo	<0.05	5.27 (3.62)	5.31 (2.42)	1.87 (4.45)	4.58 (5.46)	8.94 (3.96)	10.58	15.39	26.02	

ND: not detected

^a Mean value and %RSD (in brackets), $n = 3$.

^b Sum of *trans*-resveratrol and *trans*- ϵ -viniferin.

^c Sum of kaempferol, quercetin, and myricetin.

^d Sum of all evaluated markers of SaF, where: ND=0.00; <0.05=0.05; <0.90=0.90.

In general, the results presented in this study agreed with other studies previously reported for red wines (Adrian et al., 2000; Castellari et al., 2002; Fontana & Bottini, 2014; Lima et al., 1999; López et al., 2001; Malovaná et al., 2001; Vitrac et al., 2005), which were similar in terms of the range of each SaF ($\mu\text{g mL}^{-1}$) present. More detailed comparisons among varieties or regions with those publications are meaningless, because the samples were analysed using different methods and conditions. Furthermore, other investigations proved that levels of SaF in wines are influenced by several factors like vineyard management, climatic conditions, vinification technology and grapevine variety (Carbonell-Bejerano et al., 2014). Despite this, clearly the developed method is usable and suitable for distinguishing samples through the analytes. This current HPLC-DAD method has several advantages over the previous published methods (Adrian et al., 2000; Aznar et al., 2011; Baptista et al.,

2001; Careri et al., 2004; Castellari et al., 2002; Cotea et al., 2012; Fontana & Bottini, 2014; Gómez-Alonso et al., 2007; Kerem et al., 2004; Lima et al., 1999; López et al., 2001; Malovaná et al., 2001; Pereira et al., 2010; Pérez-Magarino et al., 2008; Rastija et al., 2009; Revilla & Ryan, 2000; Villiers et al., 2004; Vitrac et al., 2005). These include very simple sample preparation, high selectivity, fast analysis, full reported validation, with widely available instrumentation and it has been tested through analysis of different varieties of real wine samples. In summary, we have showed the compliance of this HPLC method to determine markers of SaF biosynthetic pathway in red wines.

4.3.2.4. Conclusions

QTOF provided the confirmation of analyte selectivity in a feasible HPLC-DAD method for the chemical characterization of the products of SaF biosynthetic pathways, through a simultaneous determination of *trans*-resveratrol, *trans*- ϵ -viniferin, quercetin, kaempferol, myricetin and *trans*-cinnamic acid in red wines. The developed method combines several methodological advantages to determine markers of bioactive SaF in red wines (Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Malbec, Merlot, Tannat and Tempranillo). Validation results demonstrated that the proposed method is linear, sensitive, precise, accurate for each analyte, and robust. During validation, QTOF and DAD supported the establishment of the secure range of t_R to evaluate the analytes, avoiding overestimation of the results by coelution of the main interferents (anthocyanic pigments and flavanols). This method may be performed in any simple HPLC-DAD system, following the methodology recommendations in observing the analyte profiles on DAD detectors. The sample preparation and handling are very simple and minimize analytical errors.

The method appears to be useful in routine analysis, being selective and feasible. The analysis of wines from the *Campanha Gaúcha* region, Brazil, proved that the method may be used for successful wine designs. Using those SaF as markers of the nutraceutical grade of a wine it is possible to study the quality of the product. It may also be employed to establish the optimal conditions of field management, vinification technologies and potential regions for each grape variety. Finally, the proposed technique can potentially contribute to agriculture and wine making, not only in the new Brazilian grape regions, because it may be extrapolated to other regions and samples.

This HPLC-DAD method could be further adapted for the aglycone SaF and *trans*-cinnamic acid analysis of other wine varieties, grapes, grape by-products (e.g. juices), fruits, processed foods or beverages, following the specific sample preparation when necessary.

Acknowledgements. Commercial samples of wines were kindly collected by Dr. Jorge Tonietto from Embrapa Uva e Vinho (Brazilian Agricultural Research Corporation - Grape and Wine). The authors gratefully acknowledge the FINEP (Brazilian Innovation Agency) and PPGCF - UFRGS (Pharmaceutical Sciences Graduate Program - Federal University of Rio Grande do Sul) for the financial support. The authors also thank Stephani Amanda Lukasewicz Ferreira for reviewing the manuscript, Alessandra Russi for the illustrations and Dr. Fabio Rossi Cavalcanti for the statistical confirmations by OriginPro 8 software.

Symbols

t_R	retention time	min
v/v	volume/volume	%
R_s	resolution	
TF	asymmetry	
k	capacity factor	
N	theoretical plates	
r^2	coefficient of determination	
F_{calc}	calculated Fisher value	
F_{tab}	Fisher table value	
n	number of repetitions	
p	probability	
m/z	mass/charge	Da

Greek letters

λ_{max}	maximum ultraviolet absorption wavelength	nm
-----------------	---	----

4.3.2.5. References

Adrian M., Jeandet P., Breuil A. C., Levite D., Debord S., & Bessis R. (2000). Assay of resveratrol and derivative stilbenes in wines by direct injection high performance liquid chromatography. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(1), 37–41.

ANVISA (2003). Resolução n.899 de 29 de maio de 2003. *Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, 02 de junho. Brasília, DF, Brazil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Aznar O., Checa A., Oliver R., Hernández-Cassou S., & Saurina J. (2011). Determination of polyphenols in wines by liquid chromatography with UV spectrophotometric detection. *Journal of Separation Science*, 34, 527–535. DOI: 10.1002/jssc.201000816.

Baptista J. A. B., Tavares J. F., & Carvalho R. C. B. (2001). Comparison of polyphenols and aroma in red wines from Portuguese mainland versus Azores Islands. *Food Research International*, 34, 345–355. DOI: 10.1016/S0963-9969(00)00174-5.

Baur J. A., Pearson K. J., Price N. L., Jamieson H. A., Lerin C., Kalra A., Prabhu V. V., Allard J. S., Lopez-Lluch G., Lewis K., Pistell P. J., Poosala S., Becker K. G., Boss O., Gwinn D., Wang M., Ramaswamy S., Fishbein K. W., Spencer R. G., Lakatta E. G., Le Couteur D., Shaw R. J., Navas P., Puigserver P., Ingram D. K., Cabo R., & Sinclair D. A. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444(7117), 337–342. DOI: 10.1038/nature05354.

Bidlack W. R., & Wang W. (2006). Phytochemicals. In M. E. Shils, M. Shike, A. C. Ross, B. Caballero, & R. J. Cousins (Eds.), *Modern nutrition in health and disease* (10th ed.). Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Williams.

Bliesner D. M. (2006). *Validating chromatographic methods: a practical guide*. New Jersey, USA: John Wiley & Sons.

Burns J., Mullen W., Landrault N., Teissedre P., Lean M. E. J., & Crozier A. (2002). Variations in the profile and content of anthocyanins in wines made from cabernet sauvignon and hybrid grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4096–4102. DOI: 10.1021/jf011233s.

Carbonell-Bejerano P., Diego M., Martínez-Abaigar J., Martínez-Zapater J. M., Tardáguila J., & Núñez-Olivera E. (2014). Solar ultraviolet radiation is necessary to enhance grapevine fruit ripening transcriptional and phenolic responses. *BMC Plant Biology*, 14, 1–16. DOI: 10.1186/1471-2229-14-183.

Careri M., Corradini C., Elviri L., Nicoletti I., & Zagnoni I. (2004). Direct HPLC analysis of quercetin and *trans*-resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5226–5231. DOI: 10.1021/jf049219d.

Castellari M., Sartini E., Fabiani A., Arfelli G., & Amati A. (2002). Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. *Journal of Chromatography A*, 973, 221–227. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)01195-0.

Cielecka-Piontek J., Zalewski P., Jelinska A., & Garbacki P. (2013). UHPLC: The greening face of liquid chromatography. *Chromatographia*, *76*, 1429–1437. DOI: 10.1007/s10337-013-2434-6.

Cotea V. V., Luchian C. E., Bilba N., & Niculaua M. (2012). Mesoporous silica SBA-15, a new adsorbent for bioactive polyphenols from red wine. *Analytica Chimica Acta*, *732*, 180–185. DOI: 10.1016/j.aca.2011.10.019.

Crespy V., Morand C., Manach C., Besson C., Demigne C., & Remesy C. (1999). Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *American Journal of Physiology*, *277*, 120–126. DOI: 0193-1857/99.

Crespy V., Morand C., Manach C., Besson C., Demigne C., & Remesy C. (2002). Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 618–621. DOI: 10.1021/jf010919h.

Crozier A., Clifford M. N., & Ashihara H. (2006). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. UK: Blackwell.

De Rosso M., Tonidandel L., Larcher R., Nicolini G., Ruggeri V., Vedova A. D., De Marchi F., Gardiman M., & Flamini R. (2012). Study of anthocyanic profiles of twenty-one hybrid grape varieties by liquid chromatography and precursor-ion mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *732*, 120–129. DOI: 10.1016/j.aca.2011.10.045.

FDA, US Food and Drug Administration (1994). *Reviewer guidance, validation of chromatographic methods*. Retrieved March 20, 2016, from <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf>.

FDA, US Food and Drug Administration (2001). *Guidance for industry: bioanalytical method validation*. Retrieved March 20, 2016, from <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>.

Flamini R. (2003). Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: polyphenols. *Mass Spectrometry Review*, *22*, 218–250. DOI: 10.1002/mas.10052.

Flamini R., Mattivi F., Rosso M. D., Arapitsas P., & Bavaresco L. (2013). Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*, 19651–19669. DOI: 10.3390/ijms141019651.

Fontana A. R., & Bottini R. (2014). High-throughput method based on quick, easy, cheap, effective, rugged and safe followed by liquid chromatography-multi-wavelength detection for the quantification of multiclass polyphenols in wines. *Journal of Chromatography A*, *1342*, 44–53. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.03.044.

Gómez-Alonso S., Garcia-Romero E., & Hermosín-Gutiérrez I. (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, *20*, 618–626. DOI: 10.1016/j.jfca.2007.03.002.

González O., Blanco M. E., Iriarte G., Bartolomé L., Maguregui M. I., & Alonso R.M. (2014). Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. *Journal of Chromatography A*, 1353, 10–27. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.03.077.

Gordillo B., Rodríguez-Pulido F. J., Mateus N., Escudero-Gilete M. L., González-Miret M. L., Heredia F. J., & Freitas V. (2012). Application of LC–MS and tristimulus colorimetry to assess the ageing aptitude of Syrah wine in the Condado de Huelva D.O. (Spain), a typical warm climate region. *Analytica Chimica Acta*, 732, 162–171. DOI: 10.1016/j.aca.2012.03.051.

ISO, International Organisation for Standardisation (2005). ISO/IEC17025, *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. Geneva, Switzerland.

Kazakevich Y., & Lobrutto R. (2007). *HPLC for pharmaceutical scientists*. New Jersey, USA: Wiley – Interscience.

Kerem Z., Bravdo B., Shoseyov O., & Tugendhaft Y. (2004). Rapid liquid chromatography-ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must. *Journal of Chromatography A*, 1052, 211–215. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.08.105.

Khan R. S., Grigor J., Winger R., & Win A. (2013). Functional food product development - opportunities and challenges for food manufacturers. *Trends Food Science Technology*, 30, 27–37.

Lima M. T. R., Waffo-Téguo P., Teissedre P. L., Pujolas A., Vercauteren J., Cabanis J. C., & Mérillon J. M. (1999). Determination of stilbenes (*trans*-astringin, *cis*- and *trans*-piceid, and *cis*- and *trans*-resveratrol) in Portuguese wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(7), 2666–2670. DOI: 10.1021/jf9900884.

López M., Martínez F., Valle C. D., Orte C., & Miró M. (2001). Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 922, 359–363. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)00913-X.

Lorrain B., Ky I., Pechamat L., & Teissedre P. (2013). Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines, and extracts molecules. *Molecules*, 18, 1076–1100. DOI: 10.3390/molecules18011076.

Malovaná S., Montelongo F. J. G., Pérez J. P., & Rodríguez-Delgado M. A. (2001). Optimisation of sample preparation for the determination of *trans*-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 428, 245–253. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)01231-9.

Monagas M., Suárez R., Gómez-Cordovés C., & Bartolomé B. (2005). Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56, 139–174.

Murota K., & Terao J. (2003). Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 417, 12–17. DOI: 10.1016/S0003-9861(03)00284-4.

OIV, International Organization of Vine and Wine (2015). HPLC-determination of nine major anthocyanins in red and rosé wine. In: *OIV, Compendium of international methods of analysis*. Paris.

Paulo L., Domingues F., Queiroz J. A., & Gallardo E. (2011). Development and validation of an analytical method for the determination of *trans*- and *cis*-resveratrol in wine: analysis of its contents in 186 Portuguese Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2157–2168. DOI: 10.1021/jf105004y.

Pereira V., Câmara J. S., Cacho J., & Marques J. C. (2010). HPLC-DAD methodology for the quantification of organic acids, furans and polyphenols by direct injection of wine samples. *Journal of Separation Sciences*, 33, 1204–1215. DOI: 10.1002/jssc.200900784.

Pérez-Magarino S., Ortega-Heras M., & Cano-Mozo E. (2008). Optimization of a solid-phase extraction method using copolymer sorbents for isolation of phenolic compounds in red wines and quantification by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11560–11570. DOI: 10.1021/jf802100j.

Prior R. L. (2006). Phytochemicals. In M. E. Shils, M. Shike, A. C. Ross, B. Caballero, & R. J. Cousins (Eds.), *Modern nutrition in health and disease* (10th ed.). Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Williams.

Rastija V., Srečnik G., & Marica-Medić-Šarić (2009). Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins. *Food Chemistry*, 115(1), 54–60. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.11.071.

Renaud S., & De Lorgeril M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339, 1523–1526. DOI: 10.1016/0140-6736(92)91277-F.

Revilla E., & Ryan J. M. (2000). Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. *Journal of Chromatography A*, 881(1-2), 461–469. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00269-7.

Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., & Dubourdieu D. (2006). *Handbook of enology: the chemistry of wine stabilization and treatments* (2nd ed.). France: John Wiley & Sons.

Rodríguez-Delgado M., González-Hernández G., Conde-González J., & Pérez-Trujillo J. (2002). Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines. *Food Chemistry*, 78, 523–532. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00206-6.

Shabir A. G. (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US

Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, 987, 57–66. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)01536-4.

Silva C. L., Pereira J., Woutera V. G., Giróa C., & Câmara, J. S. (2011). A fast method using a new hydrophilic-lipophilic balanced sorbent in combination with ultra-high performance liquid chromatography for quantification of significant bioactive metabolites in wines. *Talanta*, 86, 82–90. DOI: 10.1016/j.talanta.2011.08.007.

Tenore G. C., Troisi J., Di Fiore R., Manfra M., & Novellino E. (2011). Nutraceutical value and toxicological profile of selected red wines from Morocco. *Food Chemistry*, 129, 792–798. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.05.022.

Tringali C. (2012). *Bioactive compounds from natural sources*. New York, USA: CRC Press.

Wu Q., Wang M., & Simon J. E. (2005). Determination of proanthocyanidins in fresh grapes and grape products using liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19, 2062–2068. DOI: 10.1002/rcm.2029.

Villiers A., Lynen F., Crouch A., & Sandra P. (2004). Development of a solid-phase extraction procedure for the simultaneous determination of polyphenols, organic acids and sugars in wine. *Chromatographia*, 59, 403–409. DOI: 10.1365/s10337-004-0204-1.

Vitrac X., Bornet A. L., Vanderlinde R., Valls J., Richard T., Delaunay J. C., Rillon J. M. M., & Teisseädre P. L. (2005). Determination of stilbenes (δ -viniferin, *trans*-astringin, *trans*-piceid, *cis*- and *trans*-resveratrol, ϵ -viniferin) in Brazilian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5664–5669. DOI: 10.1021/jf050122g.

Vrhovsek U., Masuero D., Gasperotti M., Franceschi P., Caputi L., Viola R., & Mattivi F. (2012). A versatile targeted metabolomics method for the rapid quantification of multiple classes of phenolics in fruits and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8831–8840. DOI: 10.1021/jf2051569.

Zhou J., Cui H., Wan G., Xu H., Pang Y., & Duan C. (2004). Direct analysis of *trans*-resveratrol in red wine by high performance liquid chromatography with chemiluminescent detection. *Food Chemistry*, 88, 613–620. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.05.003.

4.4. CAPÍTULO 4

Análise e Classificação Multivariada de
Vinhos Tintos Finos da Campanha Gaúcha através de Fenóis Bioativos

4.4.1. Introdução

Muitos esforços vêm sendo dedicados ao crescimento e à qualificação da vitivinicultura brasileira e, assim, ela vem ganhando espaço nos mercados (LIMA, 2013). A maior parte da produção brasileira de uvas e vinificações (90%) ocorre no Rio Grande do Sul, mais especificamente na Serra Gaúcha (MAPA, 2015; MELLO, 2013). Os vinhos do sul do Brasil são conhecidos por apresentarem altos teores de fenóis bioativos. Mediante análise de 520 amostras de vinhos tintos sul-americanos foi constatado um teor de *trans*-resveratrol superior em vinhos do sul do Brasil (VANDERLINDE et al., 2015).

Tentando explorar a diversidade de condições edafoclimáticas do Brasil, novas regiões vitivinícolas estão em desenvolvimento. Tais regiões podem abrigar variedades tradicionais com qualidade diferenciada ou mesmo serem utilizadas para explorar novas variedades de uvas para vinificação (GUERRA, 2014). A Campanha Gaúcha é uma das mais novas e potenciais regiões vitivinícolas brasileiras (TONIETTO et al., 2012). Especificamente para essa região, alguns estudos preliminares indicaram uma diferenciação dos vinhos com elevado teor de compostos fenólicos com atividade biológica, como o *trans*-resveratrol e a quercetina (GUERRA; ZUCOLOTTO; TONIETTO, 2008b; PAZZINI et al., 2015). Apesar disso, considerando que a Campanha Gaúcha é uma região vitivinícola recente, as características químicas e, principalmente de fenóis bioativos, dos seus produtos ainda são pouco conhecidas. Assim, procedeu-se a triagem e a classificação de amostras de vinhos tintos finos da Campanha Gaúcha através do teor de seis fenóis bioativos.

4.4.2. Revisão Bibliográfica

4.4.2.1. Campanha Gaúcha como Região Vitivinícola

A região da Campanha Gaúcha é constituída por três microrregiões: C_O, C_C e C_M (Figura 4.4.1). Considerando as áreas vitivinícolas, a microrregião C_O abrange as cidades: Uruguaiana, Alegrete, Itaqui, Maçambará e Quaraí. C_C é representada por Santana do Livramento e Rosário do Sul. Já a microrregião C_M engloba Bagé, Dom Pedrito, Candiota e Hulha Negra (IBGE, 2000; OLIVEIRA; MARTINEZ; SANTOS, 2015).



Figura 4.4.1. Microrregiões vitivinícolas da Campanha Gaúcha, com indicações das cidades avaliadas no presente estudo.

Há pesquisas em andamento com propostas de indicação geográfica, com objetivo de obtenção de Indicação de Procedência (IP) para vinhos provenientes da Campanha Gaúcha (GUERRA, 2014; SILVEIRA, 2013). A IP é um registro concedido pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) ao local que se torna conhecido por produzir, extrair ou fabricar determinado produto (BRASIL, 1996; INPI, 2015). Buscando agregar ainda mais valor aos vinhos e obter benefícios para a economia local, as etapas seguintes de indicação geográfica podem abranger a Denominação de Origem (DO). A DO também é concedida pelo INPI aos produtos cujas qualidades ou características se devam exclusiva ou essencialmente ao meio geográfico, incluídos fatores naturais e humanos (BRASIL, 1996; INPI, 2015).

4.4.2.2. Classificação Química em Enologia

Para a diferenciação de produtos e análise de dados numerosos, a aplicação de ferramentas quimiométricas, como os métodos de classificação multivariada, tem sido muito útil. O reconhecimento de padrões, tal como o referente ao perfil químico, pode ser realizado por análises exploratórias como agrupamento hierárquico (HCA) e análise de componentes principais (PCA) (CORREIA e FERREIRA, 2007; FERREIRA, 2015; GARCÍA-MARINO et al., 2011).

As técnicas de Quimiometria têm sido aplicadas como embasamento para indicações geográficas e controle de qualidade de uma diversidade de produtos, como água, óleos vegetais, especiarias, mel, uvas, sucos e vinhos (CHUDZINSKA e BARALKIEWICZ, 2010; CORREIA e FERREIRA, 2007; HOSSAIN et al., 2011; LI et al., 2011; LIMA et al., 2015; PREINER et al., 2013; WELKE et al., 2012). Especificamente para vinhos, diferentes avaliações podem ser conduzidas com o uso dessas ferramentas. Gordillo et al. (2012) classificaram, quanto aos teores de antocianinas, vinhos espanhóis da variedade Syrah em diferentes tempos de envelhecimento em barrica. Estudos de diferenciação de variedades de vinhos e tecnologia de vinificação também foram realizados por PCA (GARCÍA-MARINO et al., 2011). O teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante foi utilizado para classificar amostras de vinhos brancos, rosés e tintos provenientes de diferentes regiões da Índia (PATIL et al., 2011).

4.4.3. Material e Métodos

4.4.3.1. Amostras

O teor de fenóis bioativos foi determinado em 87 amostras de vinhos tintos finos da Campanha Gaúcha, abrangendo as microrregiões Co, Cc e Cm. Os vinhos foram elaborados com uvas de 19 variedades, produzidas entre 2004 e 2015. O processo de vinificação foi experimental, no qual foi mantida uma padronização (item 4.1.3.2) ou comercial, de acordo com o procedimento de cada vinícola.

4.4.3.2. Metodologia Analítica

Os reagentes, padrões analíticos e método validado por HPLC-DAD (II) foram utilizados conforme descrito no item 4.3.2. Os teores de seis fenóis bioativos foram determinados: ácido *trans*-cinâmico, *trans*-resveratrol, *trans*- ϵ -viniferina, quempferol, quercetina e miricetina.

4.4.3.3. Análises de Dados

Os dados de fenóis bioativos obtidos para 71 amostras de vinhos foram submetidos à análise multivariada, sendo essas escolhidas por apresentarem pelo menos três amostras de cada variedade e safra (2011 a 2015). A análise exploratória foi realizada por métodos multivariados não supervisionados (HCA e PCA), utilizando

o programa computacional ChemoStat® (HELPER et al., 2015). Para possibilitar os cálculos nesse programa e para determinar as médias e desvios padrão de cada analito, os dados não detectados (ND) foram substituídos pelo limite de detecção (LOD), enquanto os teores menores que o limite de quantificação (LOQ) foram substituídos por seu valor exato.

Os dados foram pré-processados através de autoescalamento, com a finalidade de atribuir igual importância a todos os fenóis bioativos quantificados, mesmo que estes apresentem grandes variações em suas respostas. Na análise por HCA, o dendograma foi obtido utilizando o método da distância Euclidiana (CORREIA e FERREIRA, 2007; CORREIA, 2015).

4.4.4. Resultados e Discussão

4.4.4.1. Avaliação Geral de Teores de Fenóis Bioativos

Os valores de LOD e LOQ obtidos para ácido *trans*-cinâmico, *trans*-resveratrol, *trans*- ϵ -viniferina, quempferol, quercetina e miricetina foram, respectivamente: 0,02 e 0,05; 0,33 e 1,01; 0,23 e 0,70; 0,27 e 0,81; 0,30 e 0,90; 0,23 e 0,69 mg L⁻¹. Os teores de compostos fenólicos, bem como o somatório das classes de estilbenos, flavonóis e fenóis bioativos apresentaram variabilidade entre as 87 amostras analisadas. No mapa de calor (Figura 4.4.2) são disponibilizados os dados referentes aos vinhos (71) com pelo menos três amostras por variedade (10) e safra (2011 a 2015), enquanto a Figura 4.4.3 ilustra os dados dos 16 vinhos restantes. Mesmo não fazendo parte da análise multivariada, a análise dessas 16 amostras comprova a possibilidade de aplicação do método HPLC-DAD II em uma maior diversidade de variedades, bem como apresenta uma triagem dos compostos fenólicos nos vinhos tintos finos da região da Campanha Gaúcha. Tais dados poderão ser utilizados como banco de dados para futuras pesquisas com variedades potenciais da região da Campanha. De forma geral, o teor de flavonóis das amostras é superior ao dos estilbenos.

Variedade	Am.	AC	R	V	K	Q	M	Σ Est	Σ Flav	Σ Fenóis
Arintano	AC13e	ND	2,70	2,16	3,48	13,58	5,88	4,86	22,94	27,81
	AC14e	ND	3,35	3,26	ND	5,60	6,09	6,11	11,96	18,59
	AM14e	ND	1,90	2,82	1,76	4,05	3,09	4,72	8,90	13,64
	AM15e	ND	2,01	2,45	ND	1,01	3,49	4,46	4,77	9,25
Barbera	BM13e	ND	<1,01	1,61	1,84	7,19	2,70	2,62	11,73	14,37
	BM14e	ND	1,59	5,63	ND	3,04	2,04	7,22	5,35	12,59
	BM15e	ND	<1,01	4,91	ND	ND	ND	5,92	0,80	6,74
Cabernet Sauvignon	CC13e2	ND	1,47	5,73	ND	1,80	2,19	7,20	4,26	11,48
	CC13c	ND	1,64	4,03	ND	2,05	3,51	5,67	5,83	11,52
	CC13e1	ND	1,06	3,14	ND	1,92	3,04	4,20	5,22	9,44
	CC11c	ND	<1,01	5,83	ND	4,67	4,29	5,83	9,22	16,09
	CM13e3	ND	1,10	3,34	ND	1,68	2,85	4,44	4,80	9,26
	CM11c1	<0,05	ND	3,90	1,73	3,66	5,62	4,23	11,01	15,28
	CM11c2	ND	4,97	2,87	1,95	6,05	5,62	7,84	13,62	21,48
	CM13e1	ND	<1,01	2,62	3,15	13,24	7,63	3,63	24,02	27,67
	CM13e2	ND	<1,01	2,93	ND	1,89	3,21	3,94	5,37	9,33
	CM11c3	ND	ND	9,44	2,27	6,05	4,24	9,77	12,56	22,34
	CM13e4	ND	<1,01	4,95	2,01	5,17	4,07	5,96	11,25	17,23
	CO11c	<0,05	ND	3,20	ND	6,30	9,55	3,53	16,11	19,69
	CO12c	<0,05	3,65	3,32	2,01	5,19	7,86	6,97	15,06	22,08
CO13c	<0,05	ND	6,01	1,61	6,08	6,07	6,34	13,75	20,14	
Malbec	XC13e1	ND	1,82	ND	2,28	6,97	6,48	2,05	15,73	17,81
	XC13e2	ND	2,15	ND	2,33	7,54	6,63	2,38	16,49	18,89
	XC14e1	ND	1,97	2,78	ND	5,53	5,45	4,75	11,25	16,02
	XC14e2	ND	1,31	2,58	ND	5,42	6,07	3,89	11,76	15,67
	XM13e	ND	<1,01	ND	ND	3,46	3,89	1,24	7,62	8,88
	XM14e	ND	1,67	ND	ND	2,83	3,90	1,90	7,00	8,92
	XO12c	<0,05	2,37	1,95	1,78	4,64	8,07	4,32	14,49	18,86
	XO13e	ND	3,53	ND	2,29	6,79	14,92	3,76	24,00	27,78
	XO14e	ND	1,17	3,05	ND	4,17	5,67	4,22	10,11	14,35
Merlot	MC12c1	<0,05	4,01	2,96	1,71	4,20	5,69	6,97	11,60	18,62
	MC13c	<0,05	2,80	3,06	ND	ND	2,87	5,86	3,44	9,34
	MC12c2	<0,07	8,61	2,92	ND	<0,90	3,80	11,53	4,07	16,57
	MM12c	ND	2,34	2,01	ND	2,74	2,28	4,35	5,29	9,67
	MM13c	ND	4,66	2,33	ND	3,27	3,00	6,98	6,54	13,55
	MM11c	ND	6,12	2,19	1,70	4,87	4,70	8,31	11,26	19,60
	MO11c	ND	2,15	1,84	1,72	4,22	7,18	3,99	13,12	17,13
Rebo	RC13e	ND	1,59	3,07	1,96	7,59	7,33	4,66	16,88	21,56
	RC14e	ND	3,42	3,18	1,74	4,07	6,61	6,60	12,42	19,04
	RC15e	ND	ND	3,55	1,03	3,66	5,35	3,88	10,04	13,94
	RM13e	ND	<1,01	2,21	ND	4,68	5,29	3,22	10,25	13,49
	RM14e	ND	ND	2,85	ND	2,45	3,78	3,18	6,50	9,70
Syrah	SC13e1	ND	2,17	1,87	3,61	14,03	3,14	4,04	20,77	24,83
	SC13e2	ND	3,22	1,53	3,43	13,62	2,93	4,74	19,98	24,74
	SC14e1	ND	1,76	ND	3,62	9,86	3,75	1,99	17,23	19,24
	SC14e2	ND	2,30	2,72	3,64	9,76	3,74	5,02	17,14	22,18
	SM13e1	ND	<1,01	ND	2,10	6,22	2,65	1,24	10,97	12,23
	SM13e2	ND	1,15	ND	2,23	6,72	3,12	1,38	12,07	13,47
	SM14e1	ND	ND	2,05	1,68	ND	ND	2,38	2,21	4,61
	SM14e2	ND	2,35	3,06	3,16	ND	ND	5,41	3,69	9,12
	SO13e	ND	3,14	1,85	4,37	12,13	6,01	4,98	22,51	27,51
	SO14e	ND	1,54	3,08	3,43	6,84	3,8	4,62	14,07	18,71
Tannat	TC12c1	ND	1,66	3,31	0,81	3,17	6,44	4,96	9,61	15,40
	TC13c	ND	1,61	7,14	1,99	5,05	10,43	8,75	17,47	26,24
	TC12c2	<0,05	2,23	4,21	1,70	4,53	5,84	6,43	12,07	18,55
	TM12c1	<0,05	1,78	2,79	1,74	4,06	3,61	4,56	9,40	14,02
	TM12c2	<0,05	ND	3,27	ND	ND	ND	3,60	0,80	4,45
	TM13c1	ND	5,36	5,21	ND	4,25	7,96	10,57	12,48	23,07
	TM13c2	ND	5,19	5,54	ND	4,14	8,54	10,73	12,95	23,71
	TM14c	ND	1,39	4,33	ND	3,94	4,64	5,72	8,85	14,59
Tempranillo	LC13e	ND	1,40	2,32	2,86	12,66	8,48	3,71	24,00	27,73
	LC14e	ND	<1,01	2,29	ND	8,24	4,93	3,30	13,44	16,76
	LM12c	<0,05	5,27	5,31	1,87	4,58	8,94	10,58	15,40	26,03
	LM13c	ND	1,02	5,10	ND	4,63	7,51	6,12	12,41	18,55
	LO13e	ND	1,36	2,72	2,29	8,57	12,30	4,08	23,16	27,26
	LO14e	ND	ND	2,9	ND	4,15	5,22	3,23	9,64	12,89
Teroldego	GC13e	ND	<1,01	ND	2,09	12,12	10,16	1,24	24,37	25,63
	GC14e	ND	ND	2,52	0,97	4,27	5,98	2,85	11,22	14,09
	GM13e	ND	<1,01	ND	2,09	4,49	8,93	1,24	15,51	16,77
	GM14e	ND	ND	ND	ND	6,32	7,70	0,56	14,29	14,87
	GM15e	ND	ND	2,65	2,51	4,37	7,89	2,98	14,77	17,77


ND  30 mg L⁻¹

Figura 4.4.2. Mapa de calor dos teores médios (mg L⁻¹) obtidos para vinhos tintos finos da Campanha Gaúcha ($n = 71$), com pelo menos três amostras por variedade e safra. Fenóis bioativos: ácido cinâmico (AC), *trans*-resveratrol (R), *trans*- ϵ -viniferina (V), quempferol (K), quercetina (Q) e miricetina (M). Soma de fenóis bioativos: estilbenos “ Σ Est” (R + V), flavonóis “ Σ Flav” (K + Q + M), fenóis “ Σ Fenóis” (AC + R + V + K + Q + M). ND: não detectado. Descrições das amostras (Am.) conforme Tabela III (Anexo).

Variedade	Am.	AC	R	V	K	Q	M	Σ Est	Σ Flav	Σ Fenóis
C. Franc	DM12c	ND	ND	1,85	ND	4,01	2,37	2,18	6,65	8,85
	DM13c	ND	2,27	2,69	1,91	4,51	2,93	4,95	9,35	14,32
C. Sauvignon	CC04c	<0,05	ND	3,07	1,87	4,42	3,00	3,40	9,29	12,68
Francoria	FM13e	ND	2,52	2,22	ND	4,34	2,09	4,73	6,43	11,17
L. Grasp.	WC13e	1	4,14	2,93	2,38	11,27	6,19	7,07	19,84	27,91
L. Salamino	YC13e1	ND	2,94	3,03	1,98	6,71	8,37	5,97	17,06	23,03
	YC13e2	ND	2,56	2,64	1,89	5,78	6,56	5,20	14,22	19,43
Marselan	ZM15e	ND	ND	3,11	1,71	ND	ND	3,11	1,71	4,82
	ZM14e	ND	1,45	4,84	1,64	3,58	2,97	6,29	8,19	14,48
Merlot	MC08c	ND	ND	3,64	1,80	3,82	3,55	3,97	9,17	13,16
	MM09c	<0,05	ND	2,86	2,57	9,95	6,46	3,19	18,98	22,17
M. Hamburgo	HC13e	ND	2,31	3,01	2,32	6,90	2,12	5,32	11,34	16,67
Pinot Noir	PM13c	ND	5,59	4,53	1,81	7,67	4,85	10,12	14,32	24,47
Ruby Cabernet	YO13e	ND	3,08	2,65	1,67	4,45	6,35	5,73	12,48	18,24
Sangiovese	IM13e	ND	1,67	1,62	ND	5,95	2,18	3,29	8,40	11,71
Tannat	TC05c	ND	ND	7,14	ND	3,59	4,12	7,47	7,99	15,48

ND  30 mg L⁻¹

Figura 4.4.3. Mapa de calor dos teores médios (mg L⁻¹) obtidos para vinhos tintos finos da Campanha Gaúcha ($n = 16$), com menos de três amostras por variedade e safra. Variedades: C. Franc (Cabernet Franc), Sauvignon (Cabernet Sauvignon), L. Grasp. (Lambrusco Grasperossa), L. Salamino (Lambrusco Salamino), M. Hamburgo (Moscatto de Hamburgo). Fenóis bioativos: ácido cinâmico (AC), *trans*-resveratrol (R), *trans*- ϵ -viniferina (V), quempferol (K), quercetina (Q) e miricetina (M). Soma de fenóis bioativos: estilbenos " Σ Est" (R + V), flavonóis " Σ Flav" (K + Q + M), fenóis " Σ Fenóis" (AC + R + V + K + Q + M). ND: não detectado. Descrições das amostras (Am.) conforme Tabela III (Anexo).

A Tabela 4.4.1 resume as médias e desvios padrão (DP) de cada composto fenólico por variedade de vinho analisada no presente estudo. A partir da análise desses dados, em conjunto com a interpretação do gráfico apresentado na Figura 4.4.4, é possível extrair informações gerais sobre os vinhos tintos da Campanha Gaúcha. As variedades em destaque quanto ao alto teor de fenóis bioativos (soma) são: Arinarnoa, Marselan, Rebo, Syrah, Tempranillo, Teroldego, Lambrusco Grasperossa, Lambrusco Salamino, Pinot Noir e Ruby Cabernet. As quatro últimas variedades requerem análise de um maior número de amostras para avaliar suas características quando produzidas na região.

As Figuras 4.4.2 e 4.4.3 e a Tabela 4.4.1 permitem uma avaliação específica de cada amostra. A média do somatório dos compostos fenólicos para as amostras foi de 16,77 mg L⁻¹ (DP = 6,01). Em avaliação geral, 16 amostras apresentaram teores mais elevados (média de fenóis + DP = 22,78 mg L⁻¹) de fenóis bioativos: Arinarnoa (C_c), Cabernet Sauvignon (C_M), Lambrusco Grasperossa (C_c), Lambrusco Salamino (C_c), Malbec (C_o), Pinot Noir (C_M), Syrah (uma amostra de C_o e duas amostras de C_c), Tannat (uma amostra de C_c e duas amostras de C_M), Tempranillo (C_M, C_o e C_c) e Teroldego (C_c).

A metade das amostras com alto teor de fenóis bioativos foi proveniente da C_c e todas foram da safra de 2013, exceto a Teroldego (2012). Mediante observação geral, o processo de vinificação pode contribuir para o teor elevado de compostos fenólicos, pois 24,4% dos vinhos experimentais e 19,2% dos vinhos comerciais se destacaram. As amostras com teores mais baixos (média de fenóis – DP = 10,76 mg L⁻¹) de compostos fenólicos foram 15: Arinarnoa (C_M), Barbera (C_M), Cabernet Franc (C_M), Cabernet Sauvignon (uma amostra de C_c e duas amostras de C_M), Malbec (duas amostras de C_M), Marselan (C_M), Merlot (C_M e C_c), Rebo (C_M), Syrah (duas amostras de C_M) e Tannat (C_M). Dessas amostras com baixo teor de compostos fenólicos, 12 foram provenientes da C_M e as safras variaram entre 2012 e 2015. Tais constatações confirmam que uma microrregião e ano de safra podem influenciar positivamente para a biossíntese de compostos de interesse enológico.

Tabela 4.4.1. Teores médios, em mg L⁻¹, (± DP) para os fenóis bioativos e somatórios de estilbenos, flavonóis e fenóis por vinho tinto varietal (n = 87) da Campanha Gaúcha.

Variedade	AC	R	V	K	Q	M	Σ Est	Σ Flav	Σ Fenóis
Arinarnoa	0,02 ± 0,00	2,49 ± 0,58	2,67 ± 0,41	1,45 ± 1,32	6,06 ± 4,64	4,64 ± 1,36	5,16	12,14	17,32
Barbera	0,02 ± 0,00	1,20 ± 0,33	4,05 ± 2,14	0,79 ± 0,90	3,51 ± 3,47	1,66 ± 1,28	5,25	5,96	11,23
Cabernet Franc	0,02 ± 0,00	1,30 ± 1,37	2,27 ± 0,59	1,09 ± 1,16	4,26 ± 0,35	2,65 ± 0,39	3,57	8,00	11,59
Cabernet Sauvignon	0,03 ± 0,01	1,30 ± 1,32	4,29 ± 1,83	1,23 ± 0,99	4,68 ± 2,96	4,85 ± 2,16	5,53	10,76	16,38
Francoria ^a	0,02	2,52	2,22	0,27	4,34	2,09	4,73	6,43	11,17
Lambrusco Grasparossa ^a	1,00	4,14	2,93	2,38	11,27	6,19	7,07	19,84	27,91
Lambrusco Salamino	0,02 ± 0,00	2,75 ± 0,27	2,84 ± 0,27	1,93 ± 0,06	6,24 ± 0,66	7,47 ± 1,28	5,59	15,64	21,23
Malbec	0,02 ± 0,01	1,89 ± 0,77	1,28 ± 1,28	1,11 ± 1,01	5,26 ± 1,63	6,79 ± 3,32	3,17	13,16	16,35
Marselan	0,02	0,89 ± 0,40	3,98 ± 0,61	1,68 ± 0,02	1,94 ± 1,16	1,60 ± 0,97	4,70	4,95	9,65
Merlot	0,04 ± 0,02	3,48 ± 2,70	2,65 ± 0,59	1,18 ± 0,90	3,81 ± 2,77	4,39 ± 1,72	6,13	9,28	15,53
Moscato de Hamburgo ^a	0,02	2,31	3,01	2,32	6,90	2,12	5,32	11,34	16,67
Pinot Noir ^a	0,02	5,59	4,53	1,81	7,67	4,85	10,12	14,32	24,47
Rebo	0,02	1,34 ± 1,28	2,97 ± 0,50	1,05 ± 0,79	4,49 ± 1,92	5,67 ± 1,37	4,31	11,22	15,55
Ruby Cabernet ^a	0,02	3,08	2,65	1,67	4,45	6,35	5,73	12,48	18,24
Sangiovese ^a	0,02	1,67	1,62	0,27	5,95	2,18	3,29	8,40	11,71
Syrah	0,02 ± 0,00	1,90 ± 0,92	1,68 ± 1,13	3,13 ± 0,84	7,98 ± 4,90	2,96 ± 1,71	3,58	14,06	17,67
Tannat	0,03 ± 0,02	2,21 ± 1,85	4,77 ± 1,62	0,84 ± 0,75	3,67 ± 1,37	5,76 ± 3,04	6,98	10,18	17,28
Tempranillo	0,03 ± 0,01	1,73 ± 1,78	3,44 ± 1,39	1,31 ± 1,18	7,14 ± 3,33	7,90 ± 2,72	5,17	16,34	21,54
Teroldego	0,02 ± 0,00	0,60 ± 0,37	1,17 ± 1,29	1,59 ± 0,93	6,31 ± 3,35	8,13 ± 1,55	1,77	16,03	17,83
								Média	16,77
								DP	6,01

Fenóis bioativos: ácido *trans*-cinâmico (AC), *trans*-resveratrol (R), *trans*-*ε*-viniferina (V), quemferol (K), quercetina (Q) e miricetina (M).

Σ: somatório de estilbenos (Est), flavonóis (Flav) e fenóis. ^a Apenas uma amostra

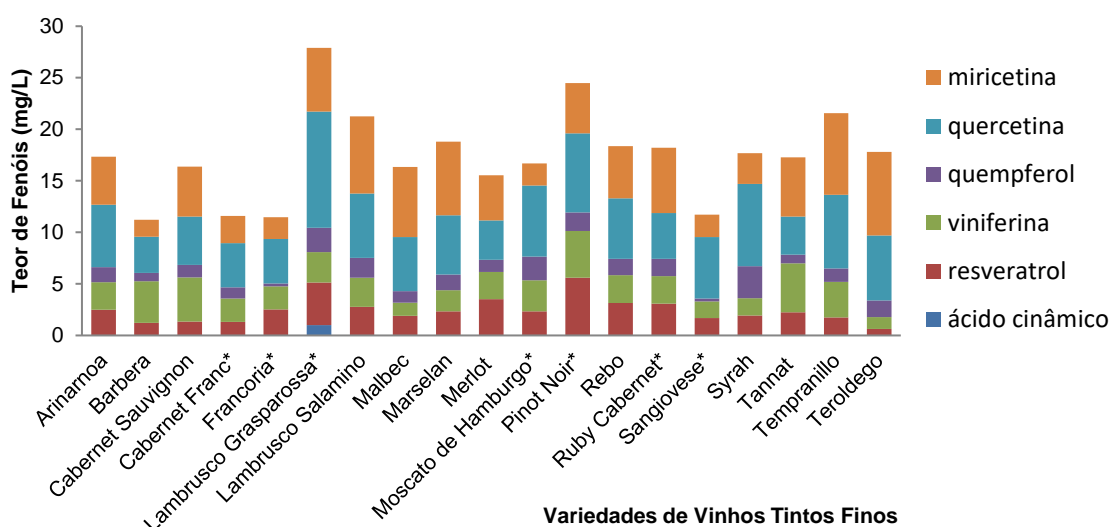


Figura 4.4.4. Gráfico de teores de fenóis bioativos em variedades de vinhos tintos finos da Campanha Gaúcha ($n = 87$). * Apenas uma amostra.

Os teores de *trans*-resveratrol obtidos para as 87 amostras avaliadas variaram de ND até $8,61 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto a quercetina foi de ND até $14,03 \text{ mg L}^{-1}$. Tais resultados são compatíveis com estudos anteriores de vinhos tintos da Campanha Gaúcha (GUERRA; ZUCOLOTTO; TONIETTO, 2008b; PAZZINI et al., 2015). Essas concentrações de fenóis bioativos são superiores às encontradas na maioria dos vinhos tintos finos (AZNAR et al., 2011; FONTANA e BOTTINI, 2014; MONAGAS et al., 2005; VRHOVSEK et al., 2012). Uma concentração superior de quercetina ($38,55 \text{ mg L}^{-1}$) foi encontrada em amostras de vinhos das Ilhas Canárias (MALOVANÁ et al., 2001).

4.4.4.2. Análise Multivariada

Conforme o exemplo das diferenças observadas em Arinarnoa provenientes de microrregiões distintas, algumas variedades de uvas para vinificação podem ser mais atraentes para produção em determinadas microrregiões. Para evidenciar tais diferenças, bem como atribuir quais compostos fenólicos contribuem para a classificação das amostras de vinhos tintos finos da Campanha Gaúcha, foram realizadas as análises por HCA e PCA. Tentativas de classificação de acordo com o tipo de elaboração (experimental ou comercial), variedade, ano de safra e microrregião de produção foram realizadas. O fenol ácido *trans*-cinâmico foi excluído das avaliações, pois não foi detectado na maioria das amostras.

Os resultados de HCA são apresentados através de um dendograma (Figura 4.4.5), no qual foi possível identificar dois grupos, considerando a distância euclidiana de 15,25 como valor de referência. O primeiro grupo, formado majoritariamente por amostras de vinhos experimentais, apresentou teores de compostos fenólicos mais elevados, enquanto o segundo grupo foi constituído por amostras com teores baixos a intermediários (Figura 4.4.2). As possíveis justificativas para a ocorrência de diferenças químicas dessas amostras são os fatores edafoclimáticos e agrônômicos, os quais influenciam a ativação da biossíntese de compostos fenólicos, as variedades de uvas, os processos de microvinificação (experimental ou comercial) e as safras. Os agrupamentos das amostras de mesma variedade e microrregião foram menos dispersos quando comparados às demais amostras. Algumas altas similaridades foram verificadas nas amostras: Malbec da C_M (XM13e e XM14e), Malbec da C_C (XC13e1 e XC13e2, XC14e1 e XC14e2), Syrah da C_M (SM13e1 e SM13e2, SM14e1 e SM14e2) e Tannat da C_M (TM13c1 e TM13c2).

Os gráficos de PCA para as 71 amostras descreveram 94,83% da variância nas quatro primeiras componentes principais (Tabela 4.4.2). No gráfico de componentes principais (PC), PC1 *versus* PC2, foi verificada uma tendência de separação das amostras conforme o tipo de elaboração dos vinhos (Figura 4.4.6). A mesma separação de grupos conforme teor de compostos fenólicos evidenciada no HCA (Figura 4.4.5) foi descrita pela primeira componente principal, a qual explicou 40,09% da variância total. As indicações dos pesos de cada parâmetro analisado mostram que quempferol, quercetina e miricetina são responsáveis pela formação do grupo com o teor mais elevado de fenóis bioativos, composto majoritariamente por vinhos experimentais. A segunda componente principal (21,47% da variância) separou as amostras comerciais de acordo com os teores de *trans*-resveratrol e *trans*- ϵ -viniferina, sendo que aquelas com escores negativos apresentaram teores mais elevados desses compostos fenólicos. Entretanto, muitas amostras apresentaram escores próximos ao ponto de intersecção entre os eixos de PC1 e PC2, dificultando a sua classificação. A formação de grupos de amostras experimentais e comerciais indica que a tecnologia de vinificação pode influenciar no teor de compostos fenólicos, podendo ser explorada em pesquisas posteriores.

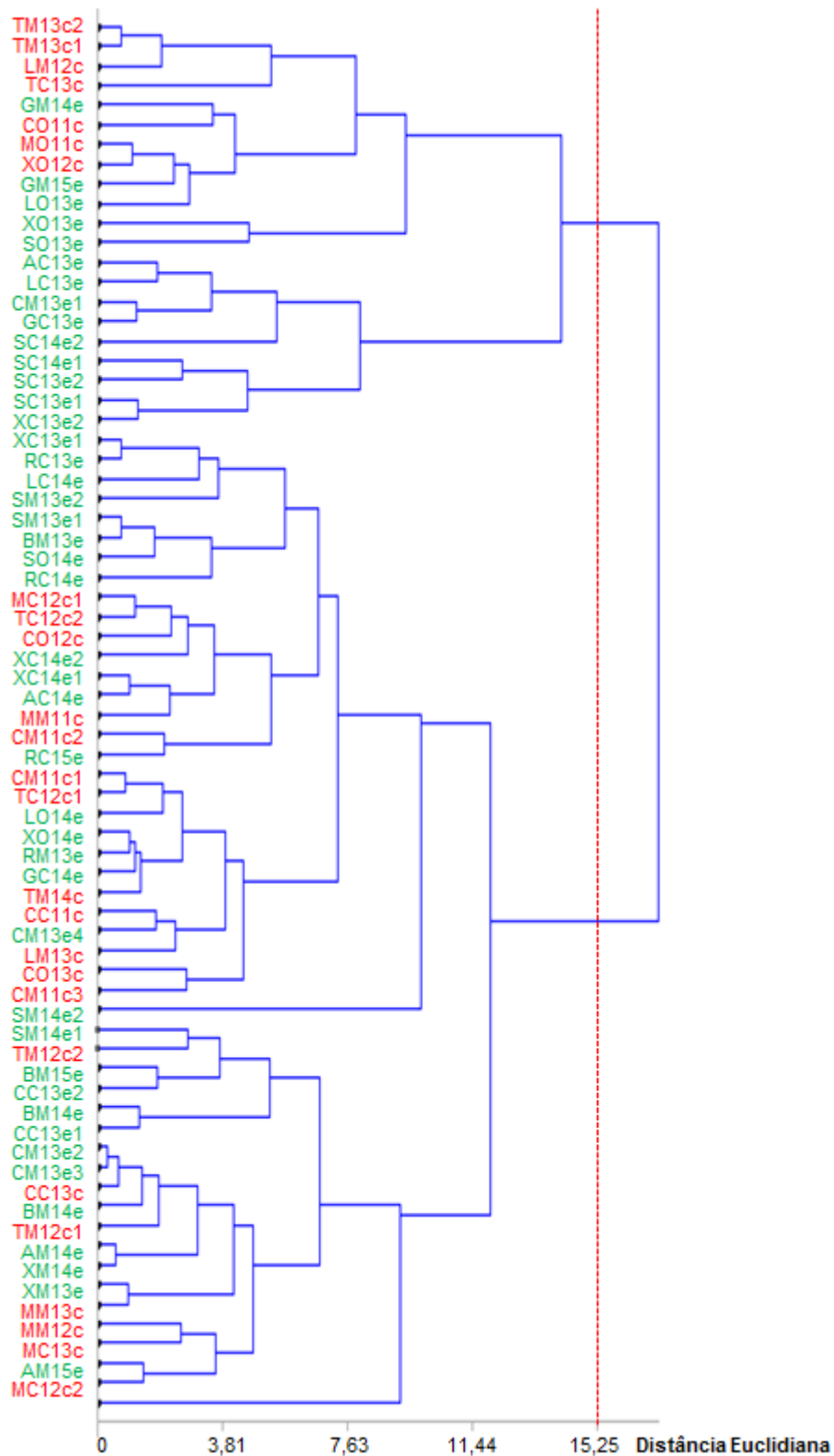


Figura 4.4.5. Dendrograma obtido através dos teores de cinco fenóis bioativos (*trans*-resveratrol, *trans*- ϵ -viniferina, quempferol, quercetina e miricetina) em 71 amostras de vinhos tintos finos experimentais (verde) e comerciais (vermelho) da Campanha Gaúcha. Referência para divisão dos grupos (....). Descrições das amostras conforme Tabela III (Anexo).

Tabela 4.4.2. Variâncias dos dados explicadas pela análise por PCA.

Componente Principal	Variância (%)	Variância Acumulada (%)
PC1	40,09	40,09
PC2	21,47	61,56
PC3	17,77	79,33
PC4	15,50	94,83
PC5	5,17	100,00

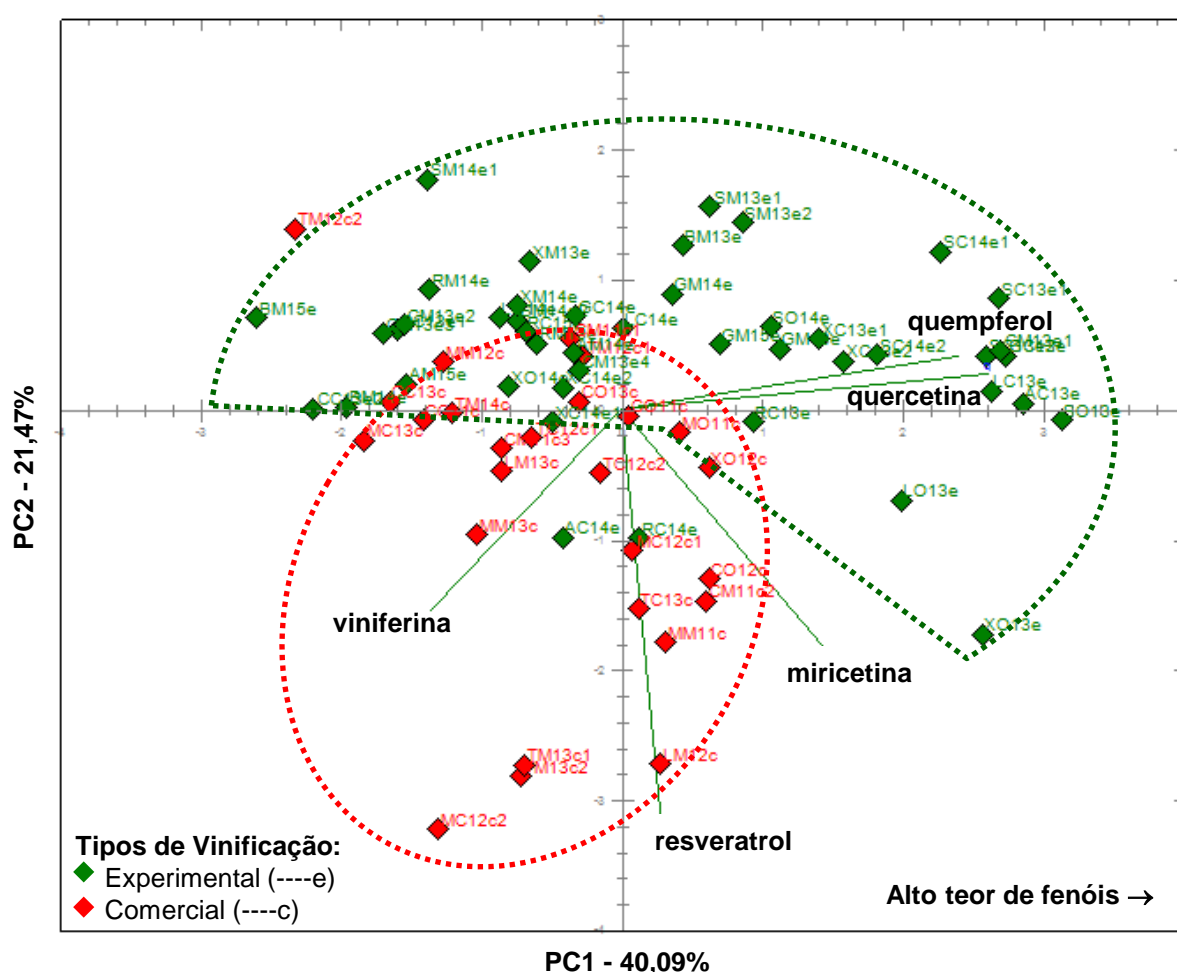


Figura 4.4.6. Gráfico de escores e pesos por PCA (1 e 2, variância explicada = 61,56%) obtido para os teores de fenóis bioativos de 71 amostras de vinhos tintos finos experimentais e comerciais da Campanha Gaúcha. Pesos dos compostos fenólicos (–): *trans*-resveratrol, *trans*- ϵ -viniferina, quempferol, quercetina e miricetina. Descrições das amostras conforme Tabela III (Anexo).

De forma geral, as amostras de vinhos experimentais de mesma variedade, tal como a Syrah, apresentaram menor dispersão do que os vinhos comerciais, tal como a Cabernet Sauvignon (Figura 4.4.7). Tal fato era esperado, pois o processo para a elaboração dos vinhos experimentais é padronizado, ao contrário dos vinhos comerciais para os quais as vinícolas têm autonomia para escolha da tecnologia a ser empregada. A extração de compostos fenólicos da uva para o vinho depende principalmente do tempo e condições da maceração envolvida no processo de vinificação (PATIL et al., 2011). Por isso, para identificar os agrupamentos nas avaliações de PCA a seguir (variedades, microrregiões e safras), foram considerados dois conjuntos de amostras: (1) 71 amostras de vinhos comerciais e experimentais; (2) 45 amostras de vinhos experimentais.

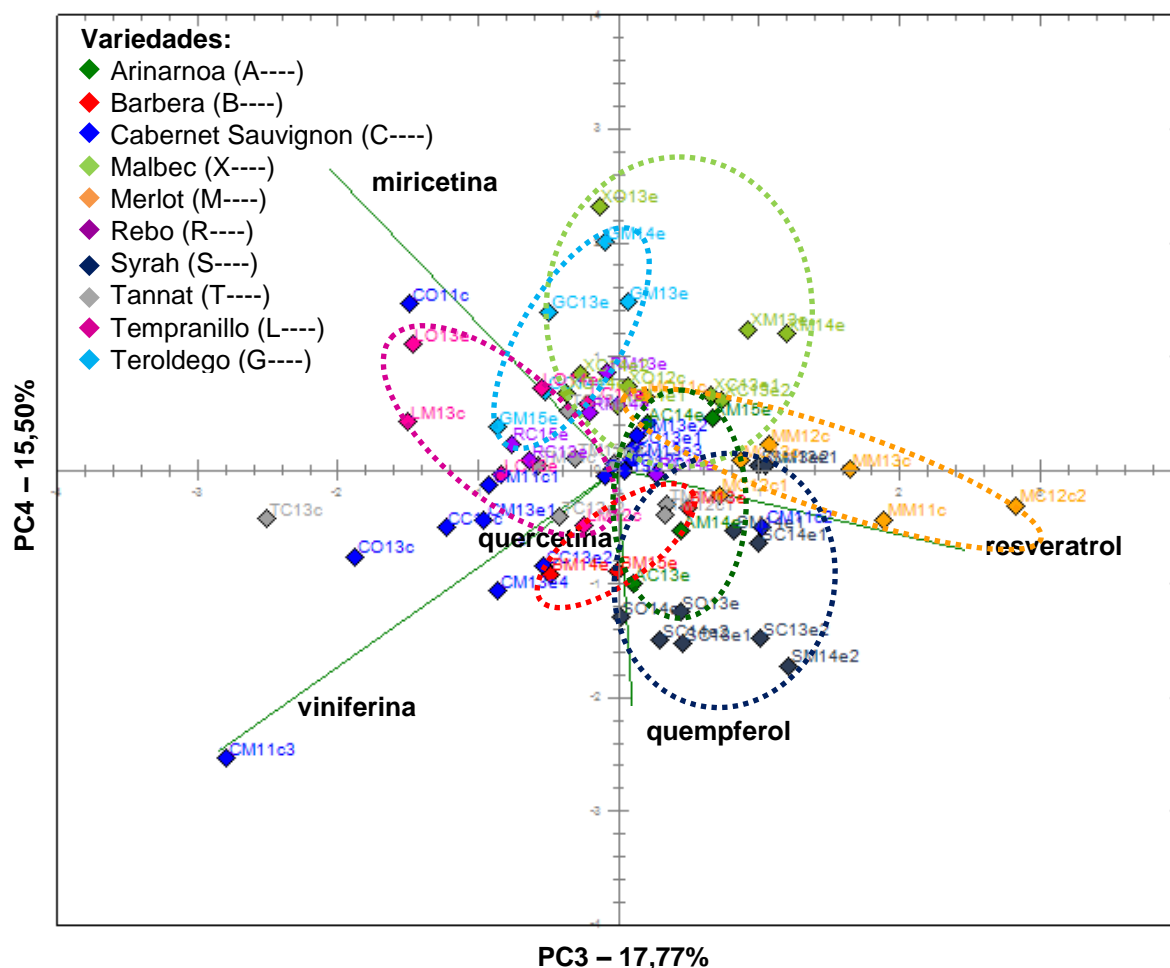


Figura 4.4.7. Gráfico de escores e pesos por PCA (3 e 4, variância explicada = 33,27%) obtido para os teores de fenóis bioativos de 71 amostras de variedades de vinhos tintos finos da Campanha Gaúcha. Pesos dos compostos fenólicos (–): *trans*-resveratrol, *trans-ε*-viniferina, quempferol, quercetina e miricetina. Descrições das amostras conforme Tabela III (Anexo).

Algumas variedades de vinhos (71 amostras) foram classificadas através do gráfico de PC1 *versus* PC3 (Figura I, em Anexo): Merlot, Syrah, Cabernet Sauvignon, Arinarnoa (exceto safra 2013) e Tannat (exceto safra 2013). Um maior número de variedades foi agrupado no gráfico de componentes principais de PC3 *versus* PC4 (Figura 4.4.7), representadas por elipses: Arinarnoa, Barbera, Malbec, Merlot, Syrah, Tempranillo e Teroldego. Também é possível verificar a alta similaridade de algumas variedades, por intersecção entre as elipses: Malbec e Teroldego; Arinarnoa, Barbera e Syrah.

As amostras da variedade Rebo (Figura 4.4.7), apesar de terem alto valor para a soma de compostos fenólicos, apresentaram teores intermediários de cada analito dosado e, portanto, ficaram posicionadas próximo à intersecção dos eixos das componentes principais. Já as amostras da variedade Tannat ficaram dispersas, provavelmente devido ao fato de todas serem comerciais, com processos de vinificação específicos de cada vinícola.

Para avaliar as amostras com tecnologia de vinificação mais homogênea, o PCA foi realizado com as 45 amostras experimentais. Na figura 4.4.8, o gráfico de PC2 *versus* PC3 demonstra uma separação mais adequada para as variedades do que com a totalidade de amostras, agrupando, inclusive, a variedade Cabernet Sauvignon.

Mediante análise do gráfico de PC1 *versus* PC2, elaborado com os dados do conjunto 1 (71 amostras), foi possível verificar uma tendência de separação de acordo com as microrregiões da Campanha Gaúcha (Figura II, em Anexo). O PCA obtido a partir dos dados do conjunto 2 (45 vinhos experimentais) é apresentado na Figura 4.4.9, para PC1 *versus* PC3. Nesse último gráfico, a separação conforme microrregiões foi melhor, principalmente para C_C e C_M, pois foram compostos exclusivamente por vinhos experimentais, cujo processo de vinificação foi padronizado.

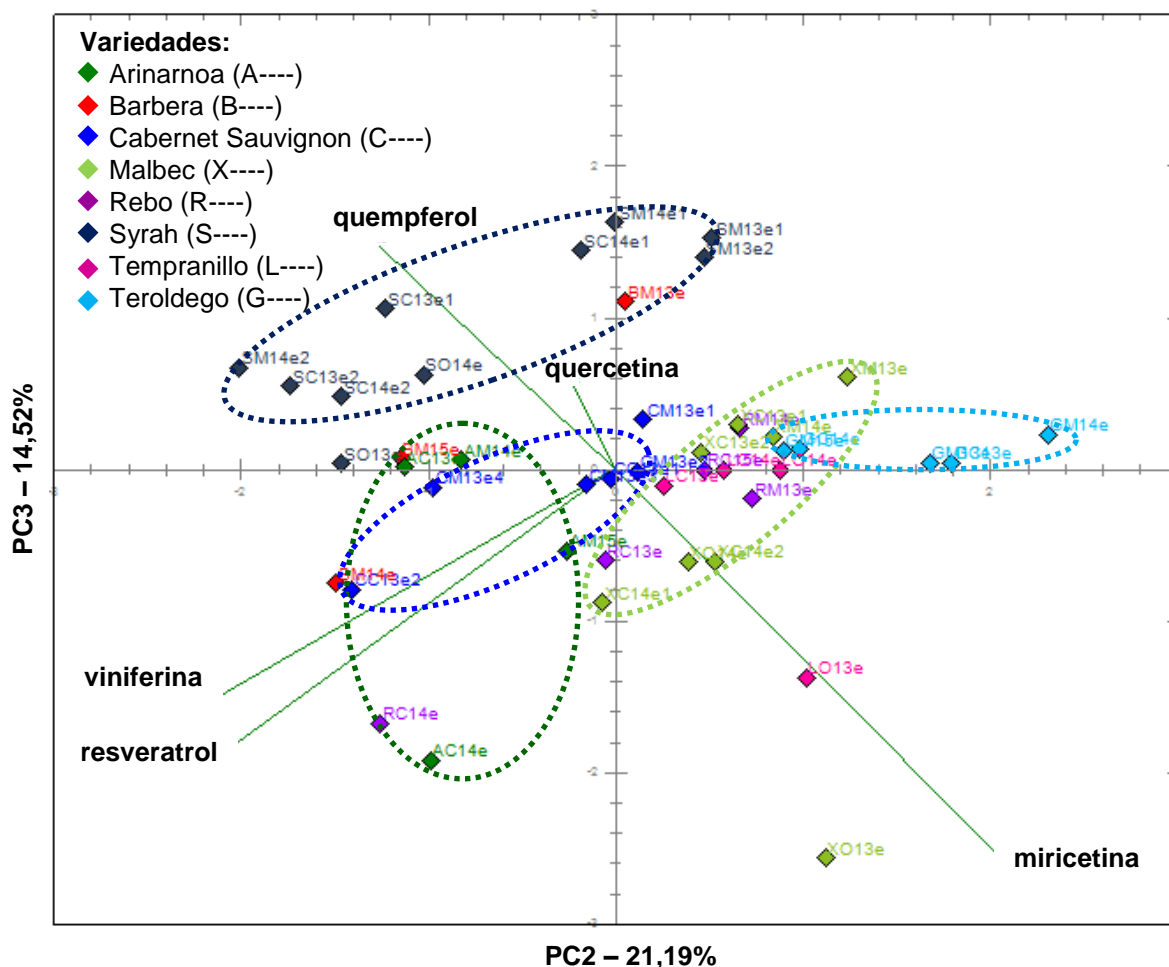


Figura 4.4.8. Gráfico de escores e pesos por PCA (2 e 3, variância explicada = 35,71%) obtido para os teores de fenóis bioativos de 45 amostras de vinhos tintos finos experimentais de diferentes variedades da Campanha Gaúcha. Pesos dos compostos fenólicos (–): *trans*-resveratrol, *trans*- ϵ -viniferina, quempferol, quercetina e miricetina. Descrições das amostras conforme Tabela III (Anexo).

Na tentativa de classificação das amostras de acordo com o ano da safra da uva, não foram observadas separações (Figura 4.4.10). Conforme constatado no item 4.4.3.1, a maioria dos vinhos de 2013 apresentaram elevado teor de compostos fenólicos.

De forma geral, os vinhos da Cc apresentam maior teor de fenóis bioativos, com maior peso para quempferol, quercetina e miricetina. A safra também foi um fator importante, sendo que as amostras de 2013 apresentaram teores mais elevados desses mesmos compostos fenólicos. Assim como previamente relatado na avaliação geral de teores de compostos fenólicos (item 4.4.3.1), a tecnologia de vinificação interferiu na obtenção de vinhos com concentração mais elevada de fenóis bioativos.

Entretanto, apenas mediante análise por PCA foi possível constatar uma maior similaridade entre variedade de vinhos experimentais do que de vinhos comerciais.

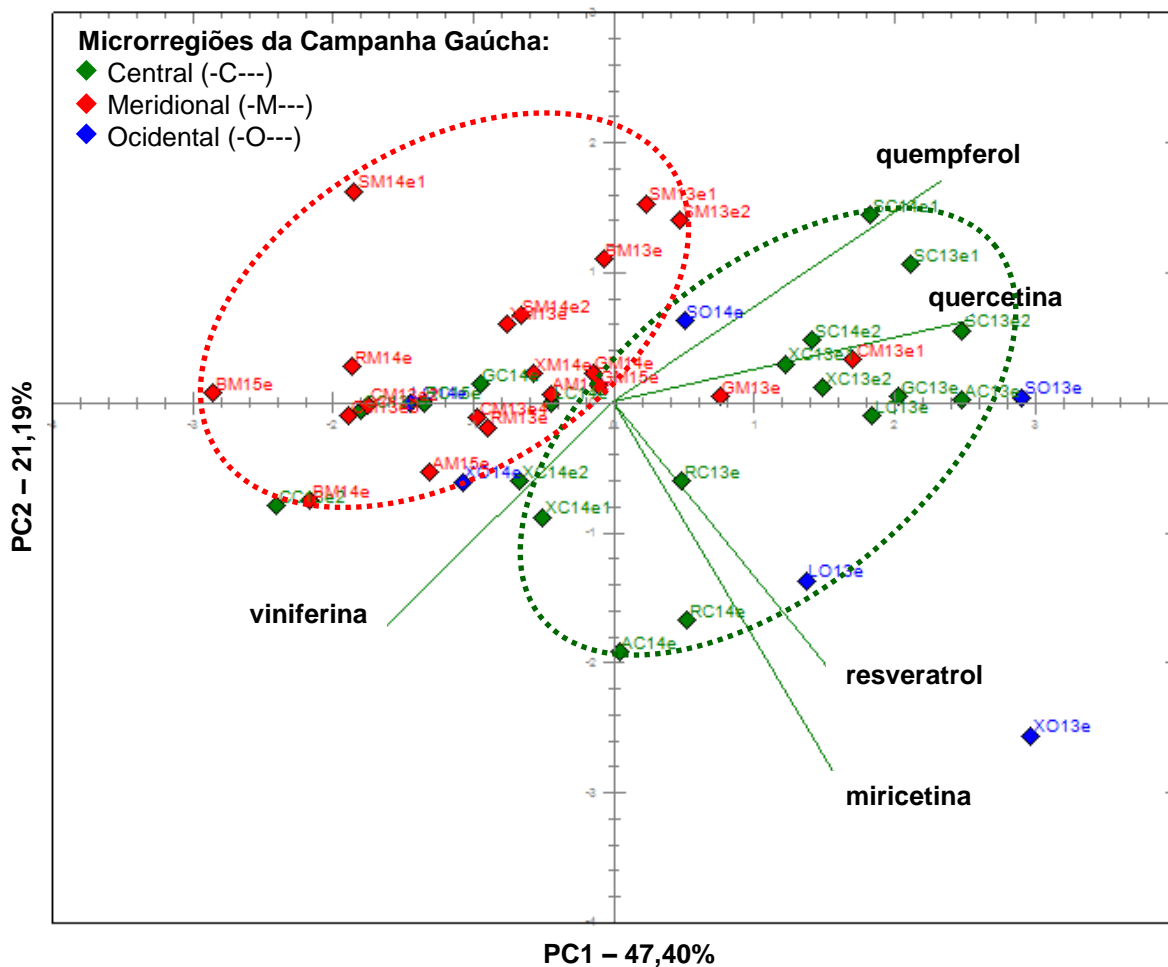


Figura 4.4.9. Gráfico de escores e pesos por PCA (1 e 3, variância explicada = 68,59%) obtido para os teores de fenóis bioativos de 45 amostras de vinhos tintos finos experimentais de diferentes microrregiões da Campanha Gaúcha. Pesos dos compostos fenólicos (–): *trans*-resveratrol, *trans-ε*-viniferina, quempferol, quercetina e miricetina. Descrições das amostras conforme Tabela III (Anexo), com cores definidas conforme microrregiões.

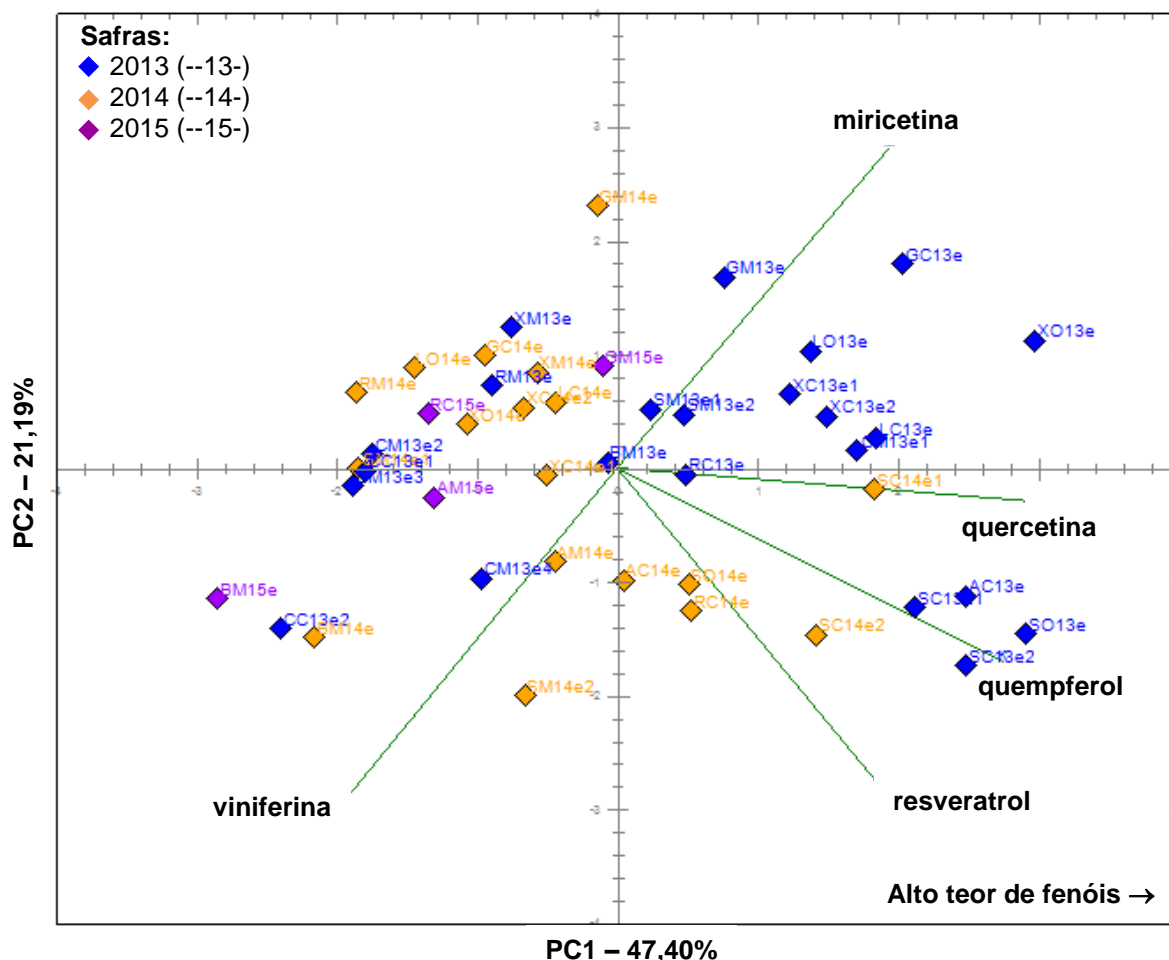


Figura 4.4.10. Gráfico de escores e pesos por PCA (1 e 2, variância explicada = 68,59%) obtido para os teores de fenóis bioativos de 45 amostras de vinhos tintos finos experimentais de diferentes safras da Campanha Gaúcha. Pesos dos compostos fenólicos (→): *trans*-resveratrol, *trans-ε*-viniferina, quempferol, quercetina e miricetina. Descrições das amostras conforme Tabela III (Anexo), com cores definidas conforme safras.

4.4.5. Conclusões

É apresentado um banco de dados com resultados de fenóis bioativos obtidos para 87 amostras de vinhos tintos finos da Campanha Gaúcha. Mediante avaliação geral dos parâmetros analíticos e Quimiometria foi possível verificar que as amostras de vinhos tintos finos da Campanha Gaúcha são distintas quanto à composição fenólica. Os teores de compostos fenólicos são influenciados, principalmente, pela tecnologia de vinificação e pela variedade de uva, com destaque para Arinarnoa, Marselan, Rebo, Syrah, Tempranillo e Teroldego. Lambrusco Grasparossa, Lambrusco Salamino, Pinot Noir e Ruby Cabernet apresentaram amostras contendo

alto teor de fenóis bioativos e seu potencial enológico pode ser investigado futuramente mediante análise de um maior número de amostras.

Outros fatores como microrregião de origem do vinhedo e ano da safra também contribuem para o perfil fenólico. Os vinhos elaborados com uvas produzidas na microrregião da Campanha Central e a maioria da safra de 2013 apresentaram maior teor de fenóis bioativos. A influência de safra foi pequena quando variedade, microrregião e, principalmente, mesmo vinhedo foram idênticos. Com isso, a análise por Quimiometria possibilitou a classificação da maioria das amostras de acordo com o teor de compostos fenólicos de cada variedade. A triagem de compostos fenólicos e a classificação apresentadas para vinhos tintos finos da Campanha Gaúcha podem ser utilizadas como ferramentas para o desenvolvimento do setor vitivinícola e, assim, contribuir para a obtenção de indicação geográfica da região.

4.5. CAPÍTULO 5

Limpeza de Amostras de Vinhos Tintos para Determinação de
Fenóis Bioativos por HPLC-DAD II e UPLC-MS

4.5.1. Introdução

O método por HPLC-DAD II, descrito no Capítulo 3, foi desenvolvido e validado para a determinação de seis fenóis bioativos em vinhos. Para algumas pesquisas, pode ser necessário o doseamento de mais compostos fenólicos para a avaliação do potencial de variedades de uvas, regiões vitivinícolas ou para a avaliação do grau nutracêutico (LORRAIN et al., 2013; SILVA et al., 2011; STRATIL; KUBÁŇ; FOJTOVÁ, 2008; YOU et al., 2012). Visando a atender a dois dos objetivos desta tese, de verificar o potencial de uvas para a elaboração de vinhos e de correlacionar compostos fenólicos com a atividade biológica, foi necessário ampliar o número de moléculas analisáveis. Por isso, o método por HPLC-DAD II (Capítulo 3), foi explorado para avaliar a possibilidade de incluir outros padrões de fenóis bioativos na análise (7), juntamente com os seis do método original. Foi possível detectar 13 padrões de compostos fenólicos na mesma análise cromatográfica, com coeluição apenas do ácido *trans*-ferúlico e do ácido *p*-cumárico. Entretanto, mediante análise direta de amostras de vinhos tintos em HPLC-DAD (método II), apenas filtradas, a seletividade é adequada só para seis fenóis bioativos (item 4.3.2).

Frente à constatação da grande interferência de antocianinas na determinação de fenóis bioativos em vinhos (item 4.3.2), foram procuradas alternativas para a eliminação das primeiras. Para tanto, foram testados métodos para realizar a limpeza das amostras através de SPE, utilizando as fases estacionárias C18 ou SCX, combinadas com diferentes sequências de eluição. A fase C18 foi escolhida por ser a mais usada para essa aplicação (LORRAIN et al., 2013; MATTIVI, 1993; ORTEGA-HERAS; CANO-MOZO, 2008; PÉREZ-MAGARINO), enquanto a SCX foi selecionada com base nas características químicas das moléculas envolvidas (item 4.5.2.3.2). SCX foi capaz de reter as antocianinas interferentes e eluir os demais fenóis bioativos de interesse, com recuperações adequadas. Através desse método de preparo de amostras de vinhos tintos, foi possível aumentar de seis para oito compostos fenólicos analisáveis por HPLC-DAD e um total de 19 por UPLC-MS.

O método desenvolvido por HPLC-DAD II foi utilizado como embasamento para o gradiente inicial no UPLC-MS. Foi utilizado o módulo “Column calculator” disponível no Empower3. Em seguida, foram realizados os testes com padrões de 19 fenóis

bioativos para a avaliação do seu comportamento no equipamento. As condições foram otimizadas para se obter um método de cinco minutos. Associando ao preparo de amostras com SCX, vários fenóis bioativos podem ser analisados por esse método. Com esses dados, foi redigido um artigo, o qual foi submetido ao periódico *Food Chemistry* (item 4.5.2).

4.5.2. Artigo Submetido ao Periódico *Food Chemistry*

Title Page

SOLID CATION EXCHANGE PHASE TO REMOVE INTERFERING ANTHOCYANINS IN BIOACTIVE PHENOL ANALYSIS OF RED WINE

Letícia Flores da Silva^{a,b,*}, Celito Crivellaro Guerra^a, Diandra Klein^{a,b}, Ana Maria Bergold^c

^a LACEM - Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas, Embrapa Uva e Vinho, F: +55-54-3455-8058, Rua Livramento, 515, CEP 95701-008 Bento Gonçalves, RS, Brazil

^b Faculdade de Farmácia, Universidade de Caxias do Sul, F: +55-54-3218-2100, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil

^c Laboratório de Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, F: +55-51-3308-5451, Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55-54-34558165. Fax: +55-54-34512792. E-mail address: leticiaflores@ig.com.br

ABSTRACT

Bioactive phenols (BPs) are often targets in red wine analysis. However, other compounds interfere in the liquid chromatography methods used for this analysis. Here, purification procedures were tested to eliminate anthocyanin interference during

the determination of 19 red-wine BPs. Liquid chromatography, coupled to a diode array detector (HPLC-DAD) and a mass spectrometer (UPLC-MS), was used to compare the direct injection of the samples with solid-phase extractions: reversed-phase (C18) and strong cation-exchange (SCX). The HPLC-DAD method revealed that, out of 13 BPs, only six are selectively analyzed with or without C18 treatment, whereas SCX enabled the detection of all BPs. The recovery with SCX was above 86.58% for eight BPs. Moreover, UPLC-MS demonstrated the potential of SCX sample preparation for the determination of 19 BPs. The developed procedure may be extended to the analysis of other red wine molecules or to other analytical methods where anthocyanins may interfere.

Keywords:

Bioactive phenols, red wine, liquid chromatography, mass spectrometry, diode array detector, sample purification

4.5.2.1. Introduction

Design of functional foods and beverages increasingly requires the examination of bioactive molecules (Bidlack & Wang, 2006; Khan, Grigor, Winger, & Win, 2013). Phenols, which are biosynthesized as part of the plant's defense system (Figure 4.5.1), are often targets in the analysis of fruit-derived products (Crozier, Clofford, & Ashihara, 2006). Grapes and wines are potential sources of such compounds in the human diet (Ribéreau-Gayon, Glories, Maujean, & Dubourdieu, 2006). Natural phenols may be classified as nonpigmented (or sometimes, soft) or strongly pigmented molecules. Nonpigmented molecules provide more health benefits such as: cardiovascular protection, and antitumor and antioxidant activity (Barjot, Tournaire, Castagnino, Vigor, Vercauteren, & Rossi, 2007; Fernández-Mar, Mateos, García-Parrilla, Puertas, & Cantos-Villar, 2012; Nigdikar, Williams, Griffin, & Howard, 1998; Renaud & Lorigeril, 1992; Roupe, Remsberg, Yáñez, & Davies, 2006; Whelan, Sutherland, McCormick, Yeoman, & Jong, 2004). Because of their high nutraceutical value, the nonpigmented compounds, called bioactive phenols (BPs), have received special attention in food research (Bidlack et al., 2006; Khan et al., 2013).

Technological advances in analytical instrumentation have enabled the analysis of several compounds that affect human health, including that of BPs in wines (Ribéreau-Gayon et al., 2006). High-performance liquid chromatography (HPLC) and

ultra-performance liquid chromatography (UPLC), coupled to an ultraviolet/visible detector (UV/Vis), a diode array detector (DAD), or a mass spectrometer (MS), are the main techniques for BP analysis, since BPs are nonvolatile organic molecules (Cotea, Luchian, Bilba, & Niculaua, 2012; Ignat, Volf, & Popa, 2011; Lorrain, Ky, Pechamat, & Teissedre, 2013; Pereira, Câmara, Cacho, & Marques, 2010; Rodríguez-Medina, Segura-Carretero, & Fernández-Gutiérrez, 2009; Silva, Pereira, Woutera, Giróa, & Câmara, 2011; Tenore, Troisi, Di Fiore, Manfra, & Novellino, 2011). However, pigmented phenols, for example, may interfere BP analysis in wines, as they have similar chemical properties (such as polarity), and as a result, they interact with the HPLC or UPLC columns fitted with most commonly used detectors (DAD and MS).

Another relevant aspect is the purification of the samples prior to the analysis in order to preserve the chromatographic columns, as they are usually expensive. Therefore, sample preparation is a crucial step for BP analysis in red wines through this instrumentation, and some attempts have been made to perform direct injection of the samples, a simple procedure, which, however, is not always selective and accurate (Pereira et al., 2010; Tenore et al., 2011). Other methods use solid-phase extraction (SPE) by different separation mechanisms or liquid-liquid extraction (Lorrain et al., 2013; Malovaná, Montelongo, Péreza, Rodríguez-Delgado, 2001), although the latter is more laborious and tends to give lower yields than SPE (Silva et al., 2011; Villiers, Lynen, Crouch, & Sandra, 2004). An SPE adsorbent commonly found in the literature for this purpose is octadecylsilane (C18), which is a reverse-phase-type adsorbent (Lorrain et al., 2013; Mattivi, 1993; Pérez-Magarino, Ortega-Heras, & Cano-Mozo, 2008). However, other types of adsorbents and techniques have also been proposed, such as anionic strong exchange (Figueiredo-González, Regueiro, Cancho-Grande, & Simal-Gándara, 2014; Guillén, Barroso, & Pérez-Bustamante, 1996; Guillén, Merello, Barroso, & Pérez-Bustamante, 1997), styrene-divinylbenzene (Silva et al., 2011; Villiers et al., 2004), molecularly imprinted polymers (Hashim, Schwarts, Boysen, Yang, Danylec, & Hearn, 2013), or mesoporous silica (Cotea et al., 2012).

In order to achieve suitable elimination of interferences from the wine matrix, it is important to identify these chemical differences with regard to BP analytes. Pigmented phenols are some of the major interferences; they are positively charged, whereas BPs are neutral in acidic media. Because of this observation, a strong ionic exchange mechanism was considered by Figueiredo-González et al. (2014), who used

a strong anion exchange cartridge in which the reaction of anthocyanin with sodium bisulfite was necessary for retention by the adsorbent. In another report, a strong cationic exchange cartridge was used, although the study focused on the analysis of anthocyanins in fruits and vegetables and they probably discarded the BPs which interfere in their analyses (He & Giusti, 2011). Such processes could be simplified through the retention of positively charged molecules on a strong cationic exchange cartridge, whereas BPs could be directly collected for the analysis. Considering that “strong cation exchange linked to benzyl ring cartridges” (SCX) combine both ionic and hydrophobic interactions (Moldoveanu & David, 2002), SCX could be a selective option to eliminate positively charged organic molecules that interfere BP analysis. Therefore, this study aimed to compare the BP recovery and selectivity obtained after SCX treatment of some traditional sample preparations of red wines, using the most commonly used instrumentation for analytical purpose (HPLC-DAD and UPLC-MS).

4.5.2.2. Materials and Methods

4.5.2.2.1. Chemicals and Standards

Methyl alcohol (MeOH) and formic acid were HPLC grade and were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Reagent grade ethyl alcohol (EtOH) and hydrochloric acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ultra-pure water (Milli-Q, Millipore, USA) was used to prepare all the solutions. Analytical standards of *trans*-resveratrol, *trans*-piceid, *trans*- ϵ -viniferin, quercetin, myricetin, kaempferol, rutin, *trans*-cinnamic acid, *p*-coumaric acid and *trans*-ferulic acid were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). (+)-Catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin gallate, procyanidin B1, quercetin-3-O-glucoside, kaempferol-3-O-glucoside, and taxifolin were acquired from Extrasynthese (Genay Cedex, France). All the phenol standards were of at least 94% purity.

A stock solution comprising 200 mg/L of each phenol was diluted in EtOH 70% (v/v in water). Fractions of the stock solution were stored at 4 °C for a week. The working standard solutions were freshly prepared daily.

4.5.2.2.2. Samples of Red Wines

A commercial Cabernet Sauvignon wine (CS1) from Rio Grande do Sul, Brazil, was used to evaluate the effect of the matrix and to determine a suitable methodology for sample preparation. The original wine sample was diluted 1.25 times with EtOH 70 % (v/v), followed by filtration through a 0.22 μm polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane. The sample was diluted to maintain the same proportion of the matrix in the fortified samples described below.

A fortified sample of CS1 was prepared by adding an appropriate volume of the stock solution so as to have a final concentration of 10 mg/L of each phenol. To obtain this, the matrix was diluted 1.25 times. The enriched sample was processed according to each optimization test (see Section 4.5.2.2.3).

The optimized sample purification method was applied to Merlot, Syrah, and Cabernet Sauvignon (CS1 and CS2) samples from Rio Grande do Sul. All the red wine samples were conserved at 18 ± 2 °C until analysis.

4.5.2.2.3. Sample Preparation Tests

Six different tests were conducted to evaluate the analytes according to each sample preparation: the traditional methods (direct injection and C18 SPE cartridge) and SCX SPE cartridges (SCXa, SCXb, SCXc, and SCXd tests). The SPE cartridges were coupled to a vacuum manifold (Supelco, USA).

Co-elution of the analytes with anthocyanins was considered in each test. A preliminary test of the direct injection of the CS1 sample was conducted through the HPLC-DAD instrument.

The purification of CS1 was tested by an RP tri-functional bonded (C18) cartridge, with 900 mg of sorbent and a particle size of 55–105 μm (tC18, Waters). First, the cartridges were conditioned with 10 mL of MeOH, 10 mL of water, and 3 mL of the sample. Any resulting waste was disposed of. Then, 2 mL of the sample were passed through the cartridge and the fraction was collected for subsequent HPLC-DAD injection.

Another test (SCXa) involved verifying the elimination of interferences using an SCX cartridge with 200 mg of sorbent and a particle size of 33 μm (Strata-XC, Phenomenex). After this, different experiments were conducted to determine the optimal conditions for sample purification (SCXb, SCXc, and SCXd tests). All cartridges were prepared beforehand by adding 1 mL of MeOH, followed by 1 mL of water. SCXa and SCXb tests involved passing 2 and 3 mL of the sample through the cartridges, respectively, and discarding the corresponding portions. The SCXa test required the use of 1 mL of MeOH with 0.1 M HCl for elution, whereas SCXb required 1 mL of MeOH/EtOH (90:10 v/v) with 0.1 M HCl. In the SCXc and SCXd tests, a portion of the sample (1 mL) was collected with the eluent, through elution with MeOH/EtOH (90:10 v/v) and 0.1 M HCl and with MeOH and 0.1 M HCl, respectively. The conditions and elution sequences for each test are summarized in Supplementary Table 4.5.1.

4.5.2.2.4. HPLC-DAD Method

The phenol determinations were carried out through an HPLC-DAD method previously validated by our group for six BPs, as described below (Silva, Guerra, Cavalcanti, & Bergold, 2014). A Shimadzu system (Kyoto, Japan) equipped with a diode array detector (DAD) was used, managed by CLASS VP software (Shimadzu). The C8 column used (Vertical, 150 x 4.6 mm, 5 μm) was protected with a C8 guard column (Phenomenex). The flow rate was 1 mL/min and the injection volume was 20 μL . The detection was performed according to the maximum UV/Vis absorption (λ_{max}) of each analyte (Table 4.5.1). The aqueous eluent consisted of formic acid and water (1:1000, v/v), and the organic eluent consisted of MeOH, formic acid, and water (900:1:100, v/v). The linear gradient was: from 30% to 45% of B in 7 min, 45% of B over 7 min, from 45% to 55% of B in 1 min, from 55% to 65% of B in 9 min, from 65% to 90% of B in 1 min, 90% of B over 2 min, from 90% to 30% of B in 0.5 min, and 30% of B over 2.5 min. The chromatograms were recorded for 30 min.

Sample and standard solutions were injected in triplicate. All peak integrations were performed according to previously established conditions for the standard solutions, such as the retention time (R_T) and λ_{max} . Quantification was carried out using the external standard method and by comparing each analyte with its corresponding calibration curve.

The selectivity was also evaluated. The peak purity obtained for each analyte in the standard solutions, wine samples, and fortified samples was analyzed by DAD. Spectra were collected from 200 to 600 nm. The peaks were considered pure when the peak purity index was over 0.95, as calculated by CLASS VP software.

Linearity was applied for the analysis of three calibration curves on different days, which involved injections in triplicate. The stock solution (Section 4.5.2.2.1) was used to prepare calibration curve solutions at six concentration levels (1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, and 40.0 mg/L), which were diluted in EtOH 70% (v/v). The concentrations of cinnamic acid were 0.1, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, and 10.0 mg/L. The linear equations were calculated using the least squares method and the linearity was evaluated by ANOVA.

The accuracy was assessed by a recovery study. The analytes were tested by adding 10 mg/L of each standard to a red wine sample (CS1). The calculation of the recovery was carried out using the following formula: $R\% = \frac{[\text{analyte in fortified sample}]}{[\text{analyte on original sample}] + [\text{analyte added}]} \times 100$.

4.5.2.2.5. UPLC-MS Method

The identifications of 19 BPs was performed on a Waters Acquity UPLC System (Milford, MA, USA), that comprised a quaternary pump, an autosampler, a column oven, a single mass quadrupole detector (MS), and Empower 3 software. A C18 BEH column was used (Waters, 50 × 2.1 mm, 5 μm), which was protected with a guard column of the same material (Waters). The flow rate was 0.5 mL/min and the injection volume was 1 μL. The detection was performed based on the molecular weight of each analyte (Table 4.5.1). The eluents were the same as those used for the HPLC-DAD method. The linear gradient was: from 30% to 65% of B in 2.5 min, from 65% to 90% of B over 0.5 min, 90% of B over 0.8 min, from 90% to 30% of B in 0.2 min, and 30% of B over 1.0 min. The chromatograms were recorded for 5 min.

MS detection was conducted on a Waters QDa instrument (Milford, MA, USA) with an electrospray (ESI) source. ESI mode was selected to obtain a high selectivity for each analyte. The probe temperature was 600 °C, the capillary voltage was -0.8 and +0.8 kV, the cone voltage was 15 V, and the sampling rate was 1 point across the peak. Acquisitions were obtained by scanning from m/z 140 to 615 Da.

4.5.2.3. Results and Discussion

4.5.2.3.1. Evaluation of Direct Injection by HPLC-DAD

Thirteen BP standards were suitably separated and detected through the HPLC-DAD method, whose chromatograms were illustrated at 278 and 320 nm to cover all the detection signals (Figure 4.5.2A). The linearity and selectivity (R_T and λ_{max}) obtained for each isolated analytical standard determined by the HPLC-DAD system are shown in Table 4.5.1. The method displayed good linearity for all BPs; their correlation factors (r) were up to 0.99, as corroborated by ANOVA statistics. The different R_T and λ_{max} values allowed the selective determination of each analyte. These results are in accordance with FDA (2001) requirements for analytical method validation.

However, when the method was tested using direct injection of a fortified red wine sample (CS1), only six BPs were detected: *trans*-resveratrol, myricetin, *trans*- ϵ -viniferin, quercetin, *trans*-cinnamic acid, and kaempferol. Figure 4.5.2B illustrates the chromatogram for pure CS1 wine, in which these BPs were found, except for *trans*-cinnamic acid and *trans*- ϵ -viniferin. Despite the potential of the HPLC-DAD method, the chemical complexity of red wines limits the analysis to a small number of BP, owing to several co-elutions with undesirable compounds. To have an acceptable chromatographic separation of more BP analytes, longer times of analysis and larger amounts of solvents would be required, which is against the green chemistry principles. Therefore, we conducted a study to remove the main interferences during the LC analysis of BP.

Substantial interferences occur owing to anthocyanin pigments, causing absorption both in the visible region and the UV region, which is the range where BP should be detected. The UV/Vis spectra shown in Figure 4.5.2C are consistent with those of red wine pigments such as malvidin 3-*O*-glucoside, an anthocyanin compound. The confirmation of such a wide region of co-elution is observed in the contour view graph of the CS1 sample directly injected in the HPLC-DAD instrument (Figure 4.5.3A). In these colored figures, the blue regions mean zero absorption at the corresponding retention time and wavelength. The change from green to red represents increasing peak concentrations. It was possible to confirm that, from the

beginning of the chromatogram up to 15 min of elution, the analytes and some interferences elute simultaneously. In this range of retention time, high absorption intensities were observed at visible region wavelengths (400–550 nm), which are consistent with the absorption signals of anthocyanins. Peak purity determination also confirmed this, since compounds that eluted before 15 min had poor peak purity values (<95%).

Therefore, it is possible to conclude that anthocyanins are undesirable components in HPLC-DAD analysis of several BPs in red wines. Several organic red wine constituents interfere in the BP analysis, because such compounds also elute and are detected by the HPLC-DAD method within the same time scale (He & Giusti, 2011).

4.5.2.3.2. Choice of SPE Adsorbent

Here, the main objective was to develop a method to analyze the maximum number of BPs in the same chromatographic run. An attempt was also made to determine whether the acceptable selectivity of each analyte can be obtained. The above results show that direct injection was not considered any further, and a series of SPE experiments aimed at reducing anthocyanin interferences while simultaneously quantifying various BP were carried out. Direct injection, as already proven in Section 4.5.2.3.1, and the C18 cartridge were not able to completely solve the selectivity problem regarding the desired analytes (Figures 3A and 3B, respectively). An overlap of the UV/Vis spectra of the analytes with those of anthocyanins is observed, which demonstrates that they have not been successfully separated. The inefficiency of C18 SPE has been reported (Silva et al., 2011; Villiers et al., 2004). Rebelo, Sousa, Valentão, Rego, & Andrade (2014) employed C18 for the determination anthocyanins and some acids in wines; their conclusions agree with our on this class of compounds and the C18 cartridge. Other proposed methods have led to low analyte yields, like the use of styrene-divinylbenzene adsorbents for compounds such as quercetin and myricetin (Villiers et al., 2004).

In the present method, a different mechanism was envisioned, *i.e.* the retention of cationic anthocyanins, while the other neutral phenols elute in an acidic medium. After treatment with the SCX cartridge, the wine was free from anthocyanins. Figure

4.5.3C illustrates the purified CS1 wine sample after passing through an SCX cartridge (SCXa test). Its contour graph presents a clean area in the visible range, showing that anthocyanins have not been detected. Remarkably, the compounds of interest, *i.e.*, BP, could still be detected after the SCX cartridge treatment, as shown for the fortified red wine sample (Figure 4.5.3D).

4.5.2.3.3. Refinement of the SPE Procedure

Once the anthocyanins have been removed from the samples, BP recovery could be further enhanced. Considering this, some variations of the SCXa test were conducted to optimize the corresponding recoveries. The organic solvents were varied and different volumes of the CS1-fortified sample were also used in these tests (Supplementary Table 4.5.1).

A comparison between the obtained recoveries for the six tested purification methods aimed at BP analysis in red wines is presented in Table 4.5.2. The analytes have been ordered according to their R_T values, which are inversely proportional to the polarity of the analytes along the chromatogram.

Although direct injection provided higher recoveries for resveratrol, myricetin, viniferin, quercetin, cinnamic acid, and kaempferol, its lack of selectivity did not allow the quantification of all the tested analytes.

Sample preparation with the C18 cartridge did not remove the anthocyanins and thus reduced the recovery values for the same six BPs analyzed by direct injection. The tests with the SCX cartridges provided higher recoveries in the ascending order: SCXa, SCXb, SCXc, and SCXd. In particular, SCXd showed recoveries from 86.58% to 101.21% (the lowest value corresponds to *trans-ε*-viniferin and the highest one to *trans*-cinnamic acid), accordance with validation requirements (FDA, 2001). All the test results show that SCXd was able to quantify more BPs, as observed on the radar graph (Supplementary Figure 4.5.1).

Some differences were found by changing the nature of the eluent and the sequence, since SCX has also enables the use of other mechanisms of retention such as π - π bonding and hydrophobic interactions (Moldoveanu & David, 2002), owing to different polarities of the analytes. Kaempferol, *trans-ε*-viniferin, and quercetin, for

example, are less polar than the studied compounds and present therefore a stronger interaction with the sorbent.

The SCXa and SCXb tests were used to concentrate the analytes in the elution sequence, since, sometimes, they may be present at low concentrations in red wine samples. However, the most polar analytes such as piceid, viniferin, resveratrol, and myricetin were partially lost through the preparation sequence. Even after this loss, it is possible that the alcohol content in wine (around 12% GL) was enough to elute some of them before eluent addition. Hence, further attempts (SCXc and SCXd) were made by joining the fractions of wine and eluent, thereby diluting the sample twice.

The SCXd test, with an eluent composed of acidic MeOH, proved to be the most appropriate to elute the analytes with no interference between the compounds. Such purification method allowed high recoveries of the quantifiable compounds. Furthermore, the SCXd method presented acceptable recoveries in comparison with those achieved by the strong anion exchange method, the former having the advantages of being simpler requiring lower solvent consumption (Figueiredo-González et al., 2014; Guillén et al., 1996; Guillén et al., 1997).

As the anthocyanin interferences are adsorbed on the cartridge, the SCXd treatment eliminates the need for a final washing step with an alkaline solution. After sample elution, the cartridge may be directly discarded, without the need for any further addition of an organic solvent, in agreement with the green chemistry principle of waste reduction (Tobiszewski & Namiesnik, 2012).

4.5.2.3.4. Additional Analytes by UPLC-MS

For a better exploration of the SCX potential to analyze a wide number of BPs in red wines, a UPLC-MS method was applied. Determining the co-eluted BP by modification of the HPLC-DAD method (described in Section 4.5.2.2.4) would probably imply longer analysis times and larger solvent quantities. UPLC-MS, in principle, presents no co-elution problems, since its detector is more selective toward each analyte. Despite this, sample purification is also desirable for this instrument, even if only for the purpose of column preservation.

After passing a fortified CS1 sample through SCX (test SCXd), 19 BPs were identified by UPLC-MS. Each R_t , the ESI mode with the highest sensibility and the corresponding m/z is presented in Table 4.5.1. The m/z detected for each BP was similar to those previously established (Vrhovsek et al., 2012). These results show that the SCX treatment can also be used to analyze other BPs in red wines.

Moreover, anthocyanins were not detected after the fortified sample passed through the SCX cartridge, as positively charged molecules are retained on the SCX column surface (Figure 4.5.4). On the contrary, SCX allows the elution of BPs, which are neutral and polar to moderately polar compounds. The pK_a of analytes is higher than that of anthocyanins and they elute through the cartridge in acidic media. This difference in their interaction with the column can be explained as follows: anthocyanin molecules (Figure 4.5.2C) are positively charged in the high acidic medium of the system, but not bioactive phenols (Figure 4.5.1). The sorbent is a polymer bounded to benzenesulfonic acid, which is a strong cation exchanger. It retains strong cationic compounds like anthocyanins, which are protonated at very low pH values (Asenstorfer, Iland, Tate, & Jones, 2003). In contrast, the desired analytes are not retained by SCX because they are weak organic bases (e.g. resveratrol, $pK_{a1} = 8.99$, $pK_{a2} = 9.63$, $pK_{a3} = 10.64$) or weak organic acids (e.g. coumaric acid, $pK_a = 4.0$) (Chemicalize, 2016).

4.5.2.3.5. Quantification of Real Samples of Red Wines

Typical varieties of red wines were employed to test the SCXd purification procedure. The results for the sample used in the previous tests (CS1), another Cabernet Sauvignon sample (CS2), Syrah, and Merlot samples are presented in Table 4.5.2. Peaks of the sample analytes were compared to the standard profiles by means of their purity (>95%), retention time (RSD < 5%) and UV/Vis spectra.

BPs profile distinguished the CS1 and CS2 samples, which were from the same region and variety (Cabernet Sauvignon), but from different wineries. *Trans*-resveratrol, *trans*- ϵ -viniferin, quercetin, and kaempferol were found in the CS1, CS2 and Merlot samples, with higher values obtained in the Cabernet Sauvignon samples than in the Merlot one. In contrast, the Merlot sample contains 4.63 mg/L of piceid, which was not detected in the CS1, CS2, and Syrah samples. The Cabernet Sauvignon

and Merlot samples contained higher BP values than the Syrah sample. Taxifolin and *trans*-cinnamic acid were not found in any of the analyzed samples. These results demonstrate that this methodology may be applied to differentiate wine varieties.

4.5.2.4. Conclusions

Our results prove that anthocyanins interact strongly with the SCX sorbent in acidic media, being removed from the red wine samples. When evaluated by the HPLC-DAD method, the SCX purification treatment increases the number of quantifiable analytes, compared to those with direct injection and the C18 cartridge. UPLC-MS confirmed that the SCX mechanism may be a potential tool to separate BP analytes from anthocyanins, a major source of interference in red wine analysis. The SCX purification procedure conferred selectivity to the analytical method as the interference of anthocyanins was eliminated. Surprisingly, there are no previous reports regarding this specific purpose.

By using BPs as markers of the nutraceutical grade of wines, it is possible to study and establish the best conditions for field management, and the potential regions for each grape variety and winemaking technologies. This SCX method can also be adapted for the treatment of other matrices such as grapes related products or several other fruits. Furthermore, this is a promising SPE mechanism for the analysis of other organic compounds with chemical characteristics similar to those of BP (*e.g.* amines or organic acids) or for other analytical methods (*e.g.* spectroscopy).

Acknowledgements

We thank MSc. Sylvain Tranchand for the information on the SPE cartridges and Vinícius Flores da Silva for reviewing the manuscript. We also gratefully acknowledge FINEP (Brazilian Innovation Agency) and PPGCF – UFRGS (Pharmaceutical Sciences Graduate Program - Federal University of Rio Grande do Sul) for their financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version.

4.5.2.5. References

Asenstorfer, R. E., Iland, P. G., Tate, M. E., & Jones, G. P. (2003). Charge equilibria and pKa of malvidin-3-glucoside by electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, *318*, 291–299.

Barjot, C. A., Tournaire, M. A., Castagnino, C. B., Vigor, C. C., Vercauteren J. C., & Rossi J. A. (2007). Evaluation of antitumor effects of two vine stalk oligomers of resveratrol on a panel of lymphoid and myeloid cell lines: Comparison with resveratrol. *Life Sciences*, *81*, 1565–1574.

Bidlack, W. R., & Wang, W. (2006). Designing functional foods. In: M.E. Shils, M. Shike, A.C. Ross, B. Caballero, & R.J. Cousins (Eds.), *Modern nutrition in health and disease* (10th ed) (pp.1789–1808). Philadelphia: Lippincott Williams & Williams.

Chemicalize (2016). URL <http://www.chemicalize.org/>. Accessed 01/03/2016.

Cotea, V. V., Luchian, C. E., Bilba, N., & Niculaua, M. (2012). Mesoporous silica SBA-15, a new adsorbent for bioactive polyphenols from red wine. *Analytica Chimica Acta*, *732*, 180–185.

Crozier, A., Clifford M. N., & Ashihara H. (2006). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Oxford: Blackwell.

FDA (US Food and Drug Administration). Guidance for industry: bioanalytical method validation, 2001. URL <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>. Accessed 01/03/16.

Fernández-Mar, M. I., Mateos, R., García-Parrilla, M. C., Puertas, B., & Cantos-Villar E. (2012). Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chemistry*, *30*, 797–813.

Figueiredo-González, M., Regueiro, J., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara J. (2014). Garnacha Tintorera-based sweet wines: Detailed phenolic composition by HPLC/DAD–ESI/MS analysis. *Food Chemistry*, *143*, 282–292.

Guillén, D. A., Barroso, C. G., & Pérez-Bustamante, J. A. (1996). 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*, *730*, 39–46.

Guillén, D. A., Merello, F., Barroso, C. G., & Pérez-Bustamante, J. A. (1997). Solid-Phase Extraction for Sample Preparation, in the HPLC Analysis of Polyphenolic Compounds in “Fino” Sherry Wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *45*, 403–406.

Hashim, S. N. N. S., Schwarts, L. J., Boysen, R. I., Yang, Y., Danylec, B., & Hearn, M. T. W. (2013). Rapid solid-phase extraction and analysis of resveratrol and other polyphenols in red wine. *Journal of Chromatography A*, *1313*, 284–290.

He, J., & Giusti, M. M. (2011). High-purity isolation of anthocyanins mixtures from fruits and vegetables – A novel solid-phase extraction method using mixed mode cation-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218, 7914–7922.

Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821–1835.

Khan, R. S., Grigor, J., Winger, R., & Win, A. (2013). Functional food product development - opportunities and challenges for food manufacturers. *Trends Food Science Technology*, 30, 27–37.

Lorrain, B., Ky, I., Pechamat, L., & Teissedre, P. (2013). Evolution of Analysis of Polyphenols from Grapes, Wines, and Extracts. *Molecules*, 18, 1076–1100.

Malovaná, S., Montelongo, F. J. G., Péreza, J. P., & Rodríguez-Delgado, M. A. (2001). Optimisation of sample preparation for the determination of trans-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 428, 245–253.

Mattivi, F. (1993). Solid phase extraction of trans-resveratrol from wines for HPLC analysis. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 196, 522–525.

Moldoveanu, S. C., & David, V. (2002). *Sample Preparation in Chromatography*. Journal of Chromatography Library. V.65. Amsterdam: Elsevier.

Nigdikar, S. V., Williams, N. R., Griffin, B. A., & Howard, A. N. (1998). Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation *in vivo*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 258–265.

Pereira, V., Câmara, J. S., Cacho, J., & Marques, J. C. (2010). HPLC-DAD methodology for the quantification of organic acids, furans and polyphenols by direct injection of wine samples. *Journal of Separation Science*, 33, 1204–1215.

Pérez-Magarino, S., Ortega-Heras, M., & Cano-Mozo, E. (2008). Optimization of a Solid-Phase Extraction Method Using Copolymer Sorbents for Isolation of Phenolic Compounds in Red Wines and Quantification by HPLC. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 11560–11570.

Rebelo, M. J., Sousa, C., Valentão, P., Rego, R., & Andrade, P. B. (2014). Phenolic profile of Douro wines and evaluation of their NO scavenging capacity in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food Chemistry*, 163, 16–22.

Renaud, S., & De Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339, 1523–1526.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of enology: The chemistry of wine stabilization and treatments – Volume 2*. (2nd ed.). France: John Wiley & Sons.

Rodríguez-Medina, I. C., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2009). Use of high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray-Qq-time-of-flight mass spectrometry for the direct characterization of the

phenolic fraction in organic commercial juices. *Journal of Chromatography A*, 1216, 4736–4744.

Roupe, K. A., Remsberg C. M., Yáñez, J. A., & Davies, N. M. (2006). Pharmacometrics of stilbenes: Seguing Towards the Clinic. *Current Clinical Pharmacology*, 1, 81–101.

Silva, C. L., Pereira, J., Wouter, V. G., Giróa, C., & Câmara, J. S. (2011). A fast method using a new hydrophilic–lipophilic balanced sorbent in combination with ultra-high performance liquid chromatography for quantification of significant bioactive metabolites in wines. *Talanta*, 86, 82–90.

Silva, L. F., Guerra, C. C., Cavalcanti, F. R., & Bergold, A. M. (2014). Nutraceutical Evaluation of Red Wines from ‘Campanha Gaúcha’ by a Feasible HPLC-DAD Method for Bioactive Polyphenols. In: COLACRO. Colombia, P-AB-22.

Tenore, G. C., Troisi, J., Di Fiore, R., Manfra, M., & Novellino, E. (2011). Nutraceutical value and toxicological profile of selected red wines from Morocco. *Food Chemistry*, 129, 792–798.

Tobiszewski, M., & Namiesnik, J. (2012). Direct chromatographic methods in the context of green analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, 35, 67–73.

Whelan, A. P., Sutherland, W. H. F., McCormick, M. P., Yeoman, D. J., & Jong S. A. (2004). Effects of white and red wine on endothelial function in subjects with coronary artery disease. *Internal Medicine Journal*, 34, 224–228.

Villiers, A., Lynen, F., Crouch, A., & Sandra, P. (2004). Development of a Solid-Phase Extraction Procedure for the Simultaneous Determination of Polyphenols, Organic Acids and Sugars in Wine. *Chromatographia*, 59, 403–409.

Vrhovsek, U., Masuero, D., Gasperotti, M., Franceschi, P., Caputi, L., Viola, R., & Mattivi, F. (2012). A versatile targeted metabolomics method for the rapid quantification of multiple classes of phenolics in fruits and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8831–8840.

Vitae

Letícia Flores da Silva studied Pharmacy (2004) at the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil. She obtained her Master’s Degree in 2008 in Pharmaceutical Sciences at UFRGS, focusing in analytical methods for the quality control of drugs and medicines. Currently, she is a doctoral student in Pharmaceutical Sciences at UFRGS and her thesis is related to the health benefits of grapes and wines. Additionally, she is an Analyst at Embrapa Uva e Vinho (Brazilian Agricultural Research Corporation - Grape & Wine) working on instrumental analysis.

Celito Crivellaro Guerra studied Agronomy (1986) at the Federal University of Santa Maria (UFSM), Brazil. He obtained his Master’s Degree in 1989 in Science and

Technology of Foods at UFSM, focusing on the quality control of grapes. He obtained his Doctoral Degree in Biological and Medical Sciences from the University Victor Segalen Bordeaux II in 1997, with the thesis on the chemistry of wines. Currently, he is a Researcher at Embrapa Uva e Vinho (Brazilian Agricultural Research Corporation - Grape & Wine), working on the enology field.

Diandra Klein is a Pharmacy student at Caxias do Sul University. Currently, she is a collaborator at Embrapa Uva e Vinho (Brazilian Agricultural Research Corporation - Grape & Wine) working on instrumental analysis.

Ana Maria Bergold studied Pharmacy (1967) at the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil. She obtained her Master's Degree in 1974 in Pharmaceutical Sciences at UFRGS, focusing on analytical methods for the quality control of drugs and medicines. She obtained her Doctoral Degree on Drugs and Medicines at the University of São Paulo in 1992, with the thesis on the quality control of drugs and medicines. Currently, she is a Professor at UFRGS working in analytical methods for the pharmaceutical field.

Table 4.5.1. HPLC-DAD and UPLC-MS parameters for the determination of bioactive phenols in red wines.

Analyte	HPLC-DAD ^a					UPLC-MS		
	a	b	r	R _T (min)	λ _{max} (nm)	R _T (min)	ESI	m/z ^b
Stilbenes								
<i>trans</i> -Resveratrol	-35370	167034	0.999	15.3	306	1.39	+	229
<i>trans</i> -Piceid	-16082	84951	0.998	10.0	306	1.23	-	389
<i>trans</i> -ε-Viniferin	-66727	66919	0.997	21.5	322	2.0	+	455
Flavanols								
(+)-Catechin	-214	11831	0.999	4.2	278	0.36	-	289
(-)-Epicatechin	-4836	20984	0.999	6.0	278	0.46	-	289
(-)-Epigallocatechin	*	*	*	*	*	0.31	-	305
(-)-Epicatechin gallate	*	*	*	*	*	0.65	-	441
(-)-Epigallocatechin gallate	*	*	*	*	*	0.35	-	457
Procyanidin B1	*	*	*	*	*	0.29	-	577
Flavonols								
Quercetin	-134573	87227	0.996	22.1	371	2.15	+	303
Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside	*	*	*	*	*	1.30	-	463
Myricetin	-119958	89030	0.998	16.6	374	1.57	-	317
Kaempferol	-182808	123799	0.998	26.2	365	2.65	+	287
Kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside	*	*	*	*	*	1.69	-	447
Rutin	-9248	28334	0.998	13.4	354	1.32	-	609
Cinnamic acid derived								
<i>trans</i> -Cinnamic acid	27071	254231	0.998	22.8	276	2.20	-	147
<i>p</i> -Coumaric acid	-24165	208546	0.998	10.8	309	0.80	+	165
<i>trans</i> -Ferulic acid	-14742	115639	0.997	11.0	322	1.02	+	195
Flavanonol								
Taxifolin	-23528	103730	0.998	10.5	288	0.74	+	305

^a Linear equation: intercept (a), slope (b) and correlation factor (*r*).

^b Equal to molecular weight in which eletrospray mode (ESI⁺ or ESI⁻).

* Linearity was not analyzed due to co-elution.

Table 4.5.2. Recoveries from sample preparation tests and the SCXd test in real samples of red wine. HPLC-DAD conditions according to Section 4.5.2.2.4.

Analyte	Recovery in sample preparation tests ^a						Results with SCXd			
	Direct injection	C18	SCXa	SCXb	SCXc	SCXd	CS1	CS2	Merlot	Syrah
<i>trans</i> -Piceid	NS	NS	66.81 ±4.31	38.42 ±3.91	75.50 ±0.19	95.32 ±1.98	ND	ND	4.63 ±3.73	ND
Taxifolin	NS	NS	69.53 ±6.90	NS	91.77 ±2.40	89.42 ±1.76	ND	ND	ND	ND
<i>trans</i> -Resveratrol	94.09 ±5.05	76.14 ±2.71	35.19 ±9.35	92.30 ±0.46	91.61 ±2.65	90.38 ±5.29	1.66 ±3.57	1.31 ±1.07	<LQ	ND
Myricetin	94.98 ±4.34	104.20 ±3.07	10.07 ±23.67	6.52 ±6.73	21.02 ±0.22	87.19 ±4.02	3.13 ±3.70	ND	<LQ	1.91 ±3.12
<i>trans</i> - ϵ -Viniferin	89.16 ±4.04	75.15 ±2.20	14.02 ±19.62	60.38 ±8.15	68.96 ±0.04	86.58 ±4.28	<LQ	4.56 ±0.91	1.0 6±4.91	1.38 ±0.27
Quercetin	98.59 ±4.71	80.23 ±1.92	18.90 ±12.41	22.99 ±0.12	34.99 ±1.11	90.06 ±4.06	3.61 ±4.31	3.51 ±4.89	<LQ	ND
<i>trans</i> -Cinnamic acid	94.71 ±4.45	72.46±	87.39 ±3.38	86.70 ±0.70	91.85 ±0.22	101.21 ±1.27	ND	ND	ND	ND
Kaempferol	93.04 ±4.74	88.35 ±3.51	24.57 ±5.63	60.38 ±0.63	56.11 ±2.57	99.55 ±5.31	2.51 ±3.18	3.62 ±2.28	<LQ	ND

NS: Not selective, with peak purity below 95%.

ND: Not detectable, over the limit of detection.

LQ: Limit of quantification.

CS: Cabernet Sauvignon sample.

^a Mean recovery of a fortified wine (10 mg/L of each analyte standard) and its corresponding RSD%.

Supplementary Table 4.5.1. SPE procedures for each optimization test with SCX cartridges.

Test	Preparation sequence ^a	Elution sequence	Final volume (mL) ^b	Dilution factor
SCXa	1 mL of MeOH			
	1 mL of water	1 mL of MeOH with HCl 0.1 M	1	0,5
	2 mL of sample			
SCXb	1 mL of MeOH			
	1 mL of water	1 mL of MeOH and EtOH (90:10 v/v) with HCl 0.1 M	1	0,33
	3 mL of sample			
SCXc	1 mL of MeOH	1 mL of sample	2	2
	1 mL of water	1 mL of MeOH and EtOH (90:10 v/v) with HCl 0.1 M		
SCXd	1 mL of MeOH	1 mL of sample	2	2
	1 mL of water	1 mL of MeOH with HCl 0.1 M ^b		

^a Disposal^b Collection into a volumetric flask, which had its volume filled with the same SPE eluent.

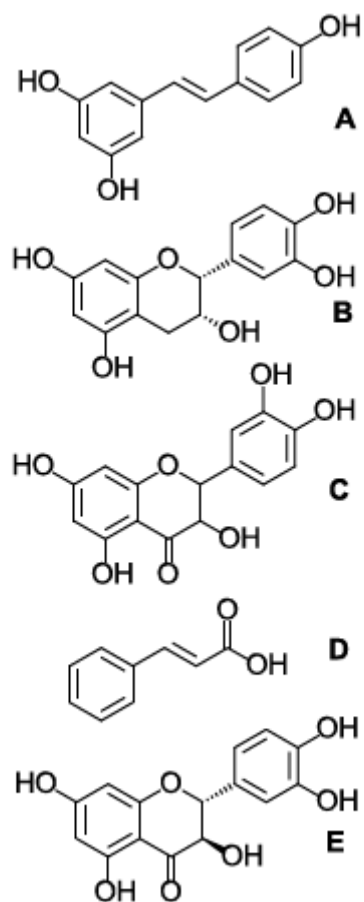


Fig. 4.5.1. Representative structures of the BP chemical classes: A) stilbenes: *trans*-resveratrol, B) flavanols: (-)-epicatechin, C) flavonols: quercetin, D) cinnamic acid derived: *trans*-cinnamic acid and E) flavanonol: taxifolin.

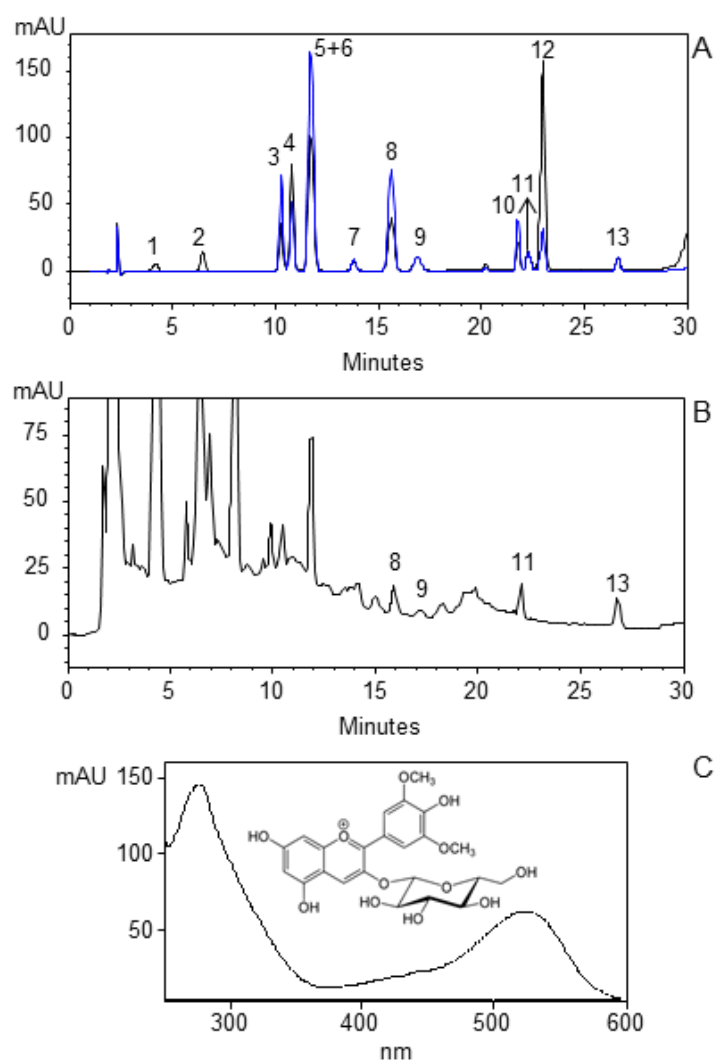


Fig. 4.5.2. HPLC-DAD method for BP analysis: A) chromatograms at 278 (—) and 320 nm (---), with 10 mg/L of each BP, except catechin and epicatechin (5 mg/L); B) chromatogram at 320 nm for Cabernet Sauvignon red wine; C) UV/Vis spectrum and chemical structure of malvidine-3-O-glucoside. Peak identification: (+)-catechin (1), (-)-epicatechin (2), *trans*-piceid (3), taxifolin (4), *trans*-ferulic acid (5), *p*-coumaric acid (6), rutin (7), *trans*-resveratrol (8), myricetin (9), *trans*- ϵ -viniferin (10), quercetin (11), *trans*-cinnamic acid (12) and kaempferol (13).

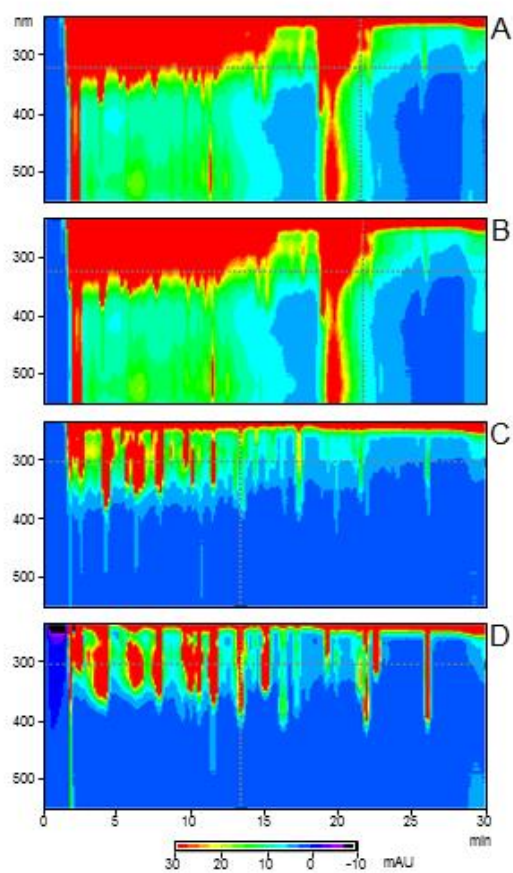
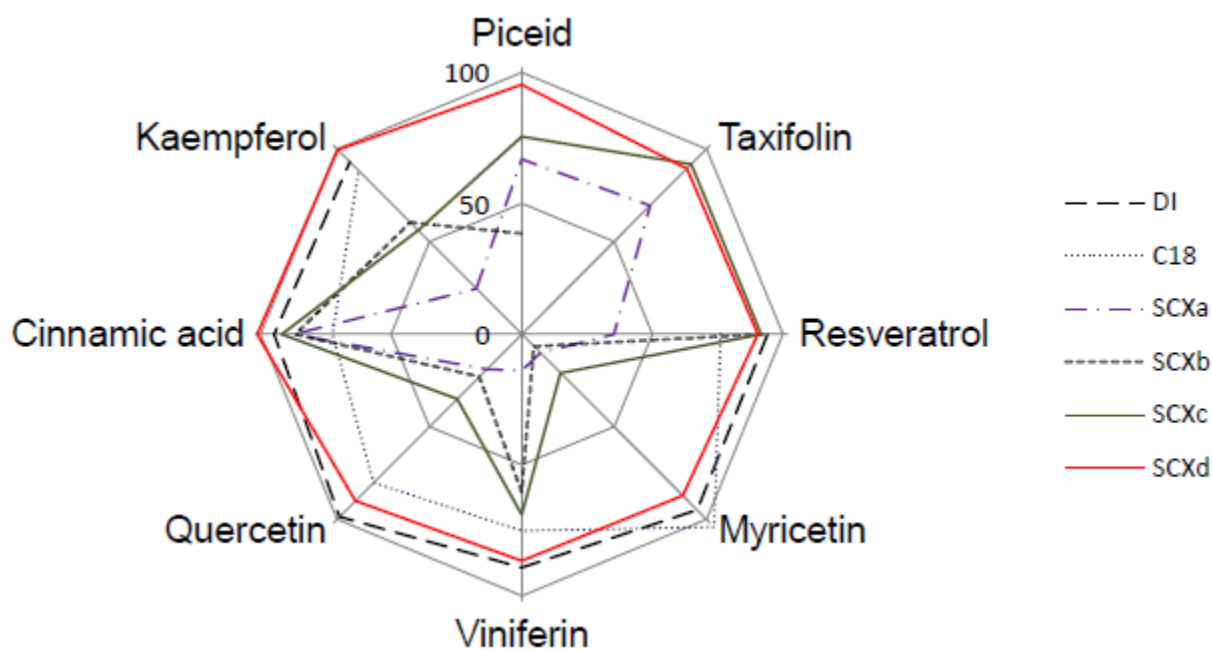


Fig. 4.5.3. Contour graph of the Cabernet Sauvignon wine sample (CS1): A) original sample before SPE; B) original sample after C18 cartridge; C) original sample after SCXa test; D) fortified sample, after SCXa test. Matrix was diluted 1.25 times.

Media Event	STEP 1: Sample addition / aqueous media (H ⁺)	STEP 2: Sample elution / MeOH media (H ⁺)
SCX Cartridge		
Liquid collection	<p>Partial BP</p> <p>↓</p>	<p>Remaining BP</p> <p>↓</p>
Aqueous and MeOH media are mixed for HPLC-DAD and UPLC-MS analyses		

Fig. 4.5.4. Elution sequence of the purification process of a red wine sample with the SCXd test.



Supplementary Fig. 4.5.1. Radar graph of recoveries for different sample preparation conditions (Cabernet Sauvignon CS1). DI: direct injection. C18: reverse-phase SPE. SCXa to SCXd tests described in Table 4.5.1.

4.6. CAPÍTULO 6

Avaliação de Compostos Fenólicos e Bioatividade em Uvas e Vinhos de
Novas Variedades da Campanha Gaúcha

4.6.1. Introdução

A Campanha Gaúcha é uma nova região vitivinícola brasileira, que vem elaborando, principalmente, vinhos tintos finos das variedades: Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Tannat, Tempranillo e Pinot Noir (TONIETTO et al., 2012). Algumas novas variedades de uvas *Vitis vinifera* L. que se destacaram em regiões com condições edafoclimáticas similares à Campanha Gaúcha foram implantadas nessa região. Essas novas variedades estão em avaliação quanto ao potencial enológico e poderão agregar valor através da diferenciação dos produtos da região (SILVEIRA, 2013). Muitos parâmetros analíticos podem ser utilizados para a avaliação da qualidade de uvas e vinhos, como teor de acidez, álcool e densidade (OIV, 2016a). Caracterizações químicas mais detalhadas envolvem o doseamento de compostos fenólicos, por exemplo, que além da relação com as características sensoriais dos vinhos, apresentam atividades biológicas (LORRAIN et al., 2013; RIBERÉAU-GAYON, et al., 2006a; RIBERÉAU-GAYON, et al., 2006b; SILVA et al., 2011; STRATIL; KUBÁŇ; FOJTOVÁ, 2008).

Os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante e, conseqüentemente, são extensamente estudados para a prevenção ou tratamento das doenças relacionadas ao processo oxidativo, como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, doença de Alzheimer, entre outras (FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012; FINLEY et al., 2013; MAHAN; ESCOTT-STUMP; RAYMOND, 2012; SHILS et al., 2006; SILVA e MURA, 2010; WANG et al., 2012). Os modelos biológicos para avaliação de compostos com potencial para o tratamento dessas patologias incluem, por exemplo, o uso de animais, culturas de células do tecido envolvido, ou organismos que apresentam homologia (semelhança) genética aos humanos, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ou o nematoide *Caenorhabditis elegans* (COSTA e MORADAS-FERREIRA, 2001; FINLEY et al., 2011; POTTER et al., 2002a; POTTER et al., 2002b; NGUYEN et al., 2009; TANG e HALLIWELL, 2010; YU e SCHELLHORN, 2013). Sobre o último, estudos revelaram que cerca de 60% de seu genoma é semelhante ao dos mamíferos (CULETTO e SATTELLE, 2000), o que, somado a várias outras vantagens experimentais (corpo transparente, pequeno tempo de vida, tamanho reduzido), o torna um bom modelo animal na avaliação de atividade biológica. Além disso, estudos epidemiológicos indicam que os processos oxidativos são mais lentos em indivíduos que consomem vinhos tintos regularmente, uma das

fontes mais ricas em fenóis bioativos na dieta humana (FLAMINI et al., 2013; NIGDIKAR et al., 1998; RENAUD e DE LORGERIL, 1992; WHELAN et al., 2004). Esses compostos são encontrados principalmente nas cascas de uvas *Vitis vinifera* L. tintas, as quais são mais ricas em fenóis bioativos do que as polpas (LOPES-LUTZ et al., 2010; RIBEREÁU-GAYON, et al., 2006a).

Apesar dos efeitos benéficos do vinho, a presença de álcool confere um efeito danoso a muitas células (GIEHL et al., 2007). Por isso, para a obtenção dos benefícios dos compostos fenólicos à saúde humana, são necessárias pesquisas propondo alternativas ao consumo de vinho, mas com efeitos antioxidantes iguais ou superiores. Entretanto, alimentos ou bebidas funcionais não são sempre acessíveis à população e, para as atividades biológicas dos compostos fenólicos, nem sempre as doses são suficientes (FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012). Por isso, fenóis bioativos promissores têm sido estudados para uso como modelos moleculares em química medicinal. Há um crescente interesse em isolamentos, mecanismos de sínteses e modificações moleculares inspiradas em compostos fenólicos de uvas e, principalmente, de vinhos, como o *trans*-resveratrol. O uso desses fenóis bioativos como modelos para sintetizar derivados moleculares tem como objetivo possibilitar sua dosagem, administração, maior potência e/ou maior dissolução em meio intestinal, trazendo vantagens para tratamentos de doenças (MCNULTY e DAS, 2009; MORO; CARDOSO; CORREIA, 2008; POTTER et al., 2002a). Para isso, é necessário conhecer quais são os compostos fenólicos mais potentes e eficazes como antioxidantes, de forma que possam, inclusive, ser utilizados como modelos para alterações moleculares objetivando o desenvolvimento de novos fármacos.

Assim, o objetivo desse estudo é estimar a atividade antioxidante relacionada aos fenóis bioativos de vinhos tintos finos obtidos a partir de novas variedades de uvas da Campanha Gaúcha, fornecendo subsídios para avanços na vitivinicultura regional/nacional. Além disso, relacionar o conhecimento de fenóis bioativos de uvas e vinhos da Campanha Gaúcha com os efeitos antioxidantes em *C. elegans*, contribuindo para a área da saúde e, mais especificamente, para a química medicinal.

4.6.2. Revisão Bibliográfica

4.6.2.1. Métodos para Fenóis Totais

Alguns métodos gerais podem ser utilizados para estimar o índice de fenóis totais (TPI) em vinhos, como o valor de Folin-Ciocalteu ou a densidade óptica a 280 nm. O último método apresenta maior reprodutibilidade, mas não inclui os derivados de ácido *trans*-cinâmico (RIBEREÁU-GAYON et al., 2006b).

4.6.6.2. Métodos para Atividade Antioxidante *in vitro*

Os princípios dos métodos 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) são a captação de radicais livres por compostos antioxidantes, os quais são usualmente utilizados para determinações de atividade antioxidante *in vitro* relacionada a moléculas fenólicas (ALVES et al., 2010; BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; RE et al., 1999). Considerando que são métodos estimativos, o ideal é utilizar mais de um método para a avaliação de um conjunto de amostras.

O método de DPPH é amplamente empregado para avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* de muitas frutas e bebidas, como uvas e vinhos (ABE et al., 2007; LIMA et al., 2015; PATIL et al., 2011; ROCKENBACH et al., 2011; RUFINO et al., 2010; STRATIL; KUBÁŇ; FOJTOVÁ, 2008; TENORE et al., 2011). O método de ABTS também possibilita uma boa aproximação da atividade antioxidante de alimentos e bebidas (LIMA et al., 2015; RE et al., 1999; RUFINO et al., 2007; RUFINO et al., 2010; STRATIL; KUBÁŇ; FOJTOVÁ, 2008). Embora sejam pouco comuns, outros métodos com outros princípios, envolvendo a redução de ferro ou a peroxidação lipídica, podem ser usados para a determinação da atividade antioxidante *in vitro* de uvas e vinhos (ALVES et al., 2010; RUFINO et al., 2010; STRATIL; KUBÁŇ; FOJTOVÁ, 2008).

4.6.2.3. *Caenorhabditis elegans* para Estudos de Atividade Antioxidante

A utilização de animais em estudos de atividade biológica deve seguir princípios éticos e legislações específicas de cada país. No Brasil, devem ser seguidas condutas da política dos 3R's que visam a redução, a substituição ou o refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa (BRASIL, 1998; BRASIL, 2008). Assim, sempre que possível, devem ser escolhidos modelos alternativos ao uso de animais (BRASIL,

2014). O *C. elegans* é um nematoide que possui cerca de 60 e 80% de homologia ao genoma humano (CULETTO e SATTELLE, 2000), podendo ser utilizado para a avaliação de efeitos biológicos, como atividade antioxidante e doenças relacionadas (BRENNER, 1994; HENRICSON et al., 2004; LIMA et al., 2014). Outras vantagens do *C. elegans* são: baixo custo de manutenção; ciclo de vida curto, possibilitando resultados rápidos; não parasitam humanos; possibilidade de transgenia com expressões de proteínas associadas a patologias humanas (BRENNER, 1994; HENRICSON et al., 2004; LIMA et al., 2014).

Vários protocolos envolvendo o uso de *C. elegans* foram usados para avaliações de atividades antioxidantes de fenóis bioativos. Extratos de produtos naturais, como da erva mate (*Ilex paraguariensis*), da romã (*Punica granatum* L.) e resíduos de vinificação aumentaram a sobrevivência de nematoides submetidos a agentes oxidantes (JARA-PALACIOS et al., 2013; KILIÇGÜN; ARDA; UÇAR, 2015; LIMA et al., 2014).

O modelo de *C. elegans* indicou a atividade antioxidante do *trans*-resveratrol frente a agentes estressores químicos, como a juglona e glicose (CHEN; REZAIZADEHNAJAFI; WINK, 2013b), e frente às radiações gama (YE et al., 2010). Esses animais também foram utilizados como modelo para comprovar o efeito protetor do *trans*-resveratrol na doença de Alzheimer (REGITZ et al., 2015) e no aumento da longevidade (BASS et al., 2007). Outros fenóis bioativos, como quercetina, (+)-catequina e rutina, também apresentaram ação antioxidante ou prolongamento do tempo de vida quando avaliadas em *C. elegans* (KAMPKÖTTER et al., 2007; KAMPKÖTTER et al., 2008; SAUL et al., 2008; SAUL et al., 2009; SURCO-LAOS et al., 2011; SURCO-LAOS et al., 2012).

4.6.2.4. Compostos Fenólicos da Uva e do Vinho e Análogos como Potenciais Fármacos

Frente aos inúmeros estudos relatando as ações dos fenóis bioativos para prevenção de doenças, é crescente o interesse em isolar, sintetizar ou fazer modificações em suas moléculas. O isolamento do *trans*-resveratrol, por exemplo, é bastante comum a partir de uma planta asiática, com nome popular de Knotweed japonês (*Polygonum cuspidatum*). Dela, é extraído o resveratrol-3-O-glicosídeo que,

por uma reação de hidrólise ácida, produz o *trans*-resveratrol (WANG; LIU; CHEN, 2013).

A síntese completa do *trans*-resveratrol também foi proposta por diferentes mecanismos. O mais usual é pela síntese de Wittig, que utiliza sais de tribenzil fosfônio para produzir estereoseletivamente a forma ativa *trans* (MCNULTY e DAS, 2009). Outro método é a arilação de Heck a partir de sais de arenodiazônio, também estereoseletiva (MORO; CARDOSO; CORREIA, 2008).

Devido ao potencial do *trans*-resveratrol para ligação a receptores específicos de células doentes, vários análogos foram sintetizados. Estratégias foram utilizadas para melhorar a dissolução em meio intestinal e estabilidade metabólica do *trans*-resveratrol, uma vez que a presença de três hidroxilas em sua molécula prejudicam essas funções no organismo (CHEN et al., 2013a). Assim, foi sintetizada a nova molécula, DMU-212 (*trans*-3,4,5,4'-tetrametoxi-estilbeno, Figura 4.6.1), a qual constou da adição de metoxilas na molécula de *trans*-resveratrol, de forma a aumentar a sua dissolução em fluidos intestinais e interação seletiva por receptores de células tumorais (POTTER et al., 2002b). Vários outros compostos derivados do *trans*-resveratrol foram propostos, com mecanismos de síntese total ou semissíntese a partir do isolamento de precursores naturais (BELLINA et al., 2015; CHEN et al., 2013a; PETTIT et al., 2009). Estudos clínicos estão em andamento para tornar fármacos algumas moléculas de fenóis bioativos e análogos, principalmente na terapia de cânceres (BISHAYEE, 2009; ORSINI et al. 2016).

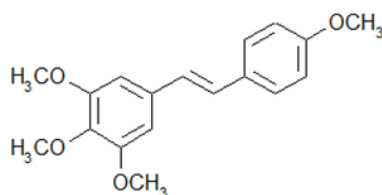


Figura 4.6.1. Estrutura química do DMU-212, um análogo sintético do *trans*-resveratrol.

Depois do *trans*-resveratrol, um dos flavonóis com maior número de estudos de atividade biológica e inclusão em terapias é a quercetina (ZAMIN et al., 2009). Isolamentos a partir de produtos naturais e síntese completa foram propostos. Além disso, modificações moleculares de quercetina, mediante inclusão de radicais alquila, por exemplo, apresentaram atividades antitumorais e antimicrobianas (HOSSION et

al., 2010; SHI et al., 2014; YUAN et al., 2012). Pesquisas dessa natureza também foram realizadas com outros fenóis bioativos, como quempferol, miricetina e (+)-catequina (IMAI et al., 2014; QU et al., 2009; XUE et al., 2015).

4.6.3. Material e Métodos

4.6.3.1. Reagentes

Nas determinações por HPLC-DAD e UPLC-MS foram utilizados padrões analíticos (Tabela I em Anexo) e solventes com pureza adequada para cada equipamento. Para os testes de atividade antioxidante, foram utilizados: DPPH, ABTS e persulfato de potássio da Sigma-Aldrich® (Saint Louis, EUA); Trolox (Acros Organics) e EtOH p.a. (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os reagentes para a manutenção do nematoide *C. elegans* foram da Sigma-Aldrich® e Kasvi®.

4.6.3.2. Amostras

As variedades foram escolhidas de acordo com os teores de compostos fenólicos obtidos para as 87 amostras de vinhos da Campanha Gaúcha (Figuras 4.4.2 e 4.4.3). Para possibilitar a correlação da composição fenólica com a atividade antioxidante, foram escolhidas variedades de vinhos com uma concentração variada de fenóis bioativos, ou seja, baixos e elevados. Simultaneamente, foram selecionadas novas variedades com potencial enológico, de forma a contribuir com a vitivinicultura da Campanha Gaúcha.

Foram utilizadas amostras de cascas de uvas *Vitis vinifera* L. da Campanha Gaúcha e dos vinhos experimentais correspondentes (item 4.1.2.2.2). Três amostras de uvas e vinhos (Arinarnoa, Barbera e Marselan) foram das safras de 2014 e 2015 e duas (Rebo e Teroldego) foram de 2015. Adicionalmente, foram avaliados os vinhos Rebo e Teroldego da safra de 2014. Todas as amostras foram de Dom Pedrito, exceto Rebo (2014 e 2015) e Teroldego (2014).

4.6.3.3. Extração de Compostos Fenólicos de Uvas

Para extrair o maior número e concentrações possíveis de compostos fenólicos de cascas de uvas *Vitis vinifera* L., os métodos propostos por Careri et al. (2004) e Carrera et al. (2012) foram adaptados. Para tanto, as bagas (100 de cada amostra de

uva) foram lavadas com água corrente, seguida de água ultrapura (Milli Q, Millipore) e enxugadas com papel absorvente. Em seguida, as cascas foram separadas das bagas, o resíduo de polpa foi eliminado mediante espremedura e as cascas foram secas com papel absorvente. As polpas foram descartadas e as cascas foram utilizadas para análise. As cascas frescas foram congeladas a -80 ± 5 °C e liofilizadas utilizando um equipamento Terroni (modelo Enterprise) até a secagem. Posteriormente, as cascas foram armazenadas em dessecador (20 ± 2 °C) e protegidas da luz até o momento da análise.

O procedimento de extração dos fenóis constou da adição do solvente extrator (EtOH 70% v/v) às cascas secas previamente pulverizadas em gral, na proporção de 1:7 (p/v). A suspensão obtida foi submetida à extração em ultrassom por 12 minutos, seguida de filtração a vácuo com uso de papel de filtro classe II B. A partir desse extrato foram preparadas as soluções para aplicação dos métodos de HPLC-DAD II, UPLC-MS, TPI ou atividades antioxidantes.

4.6.3.4. Índice de Fenóis Totais

O TPI foi realizado através da determinação da densidade óptica a 280 nm de amostras diluídas 100 vezes em água ultrapura (Milli Q, Millipore) (RIBERÉAU-GAYON et al., 2006). Todas as leituras foram realizadas em triplicata, em espectrofotômetro de absorção nas regiões UV/Vis (Cary 60, Agilent).

4.6.3.5. Método por HPLC-DAD II

As amostras de vinhos e os extratos obtidos no item 4.6.3.3 foram filtrados através do filtro PVDF 0,45 µm. Os vinhos foram diretamente analisados em HPLC-DAD e os extratos foram diluídos cinco vezes em água ultrapura. O método validado por HPLC-DAD (II) (item 4.3.2) foi utilizado para a análise de ácido *trans*-cinâmico, *trans*-resveratrol, *trans*- ϵ -viniferina, quempferol, quercetina e miricetina nas amostras de uvas e vinhos.

4.6.3.6. Método por UPLC-MS

As amostras de vinhos e os extratos obtidos no item 4.6.3.3 foram diluídos 2,5 vezes em água ultrapura. As soluções foram submetidas à SPE do tipo SCX, conforme definido no item 4.5.2.3.3, seguido de filtração através do filtro PVDF 0,22 µm e

diluição, sendo que na diluição final a concentração era cinco vezes menor que na amostra inicial.

As quantificações dos compostos fenólicos (*trans*-piceído, (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, galato de (-)-epicatequina, quercetina-3-O-glicosídeo, quempferol-3-O-glicosídeo, rutina, ácido *p*-cumárico, ácido *trans*-ferúlico e (+)-taxifolina) foram realizadas em equipamento UPLC-MS, conforme descrito no Capítulo 5. A astilbina também foi determinada na mesma análise, com aquisição em $m/z=451$, no modo ESI⁺. O volume de injeção foi de 1 μ L, em triplicada. Para aumentar a sensibilidade do método, foram alteradas as condições de aquisição do modo varredura (*Scan* de m/z 140 to 615) para o modo *Selected Ion Recorder* (SIR). A programação do método de aquisição foi conforme t_R e m/z previamente determinados para cada analito (Table 4.5.1).

4.6.3.7. Atividade Antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante *in vitro* foi realizada por dois métodos tradicionais, DPPH e ABTS. As amostras de vinhos e extratos de uvas foram diluídas 20 vezes com água ultrapura para a aplicação de ambos os métodos. Todas as leituras de padrões e amostras foram realizadas em triplicata, em espectrofotômetro de absorção nas regiões UV/Vis (Cary 60, Agilent).

O método de DPPH foi adaptado de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e Patil et al. (2011), com uso de soluções estoque de DPPH 600 μ M e Trolox 10 mM dissolvidos em EtOH p.a. A solução estoque de DPPH foi utilizada para o preparo de uma solução intermediária etanólica com 120 μ M. A partir da solução estoque de Trolox, foram preparadas soluções etanólicas para a curva de calibração nas concentrações de 200, 300, 400, 500 e 600 μ M. Cada ponto da curva foi submetido à cinética de reação em microtubos de 2 mL, mediante mistura de 950 μ L de DPPH 120 μ M com 1,05 mL de cada concentração de padrão. Os tubos foram agitados vigorosamente por 30 s. Para garantir a realização de leituras após o término da reação, foram avaliados diferentes esquemas de incubação: repouso por 30 minutos a 25 ± 5 °C, ultrassom a 25 ± 5 °C (15, 25 e 60 min). Considerando que pode haver aquecimento da água durante o banho de ultrassom, antes da incubação a

temperatura da água foi regulada para o limite inferior da faixa estabelecida, isto é, 20 °C. As leituras foram realizadas em 515 nm.

O método de ABTS foi realizado conforme protocolo estabelecido por Rufino et al. (2007). O radical ABTS^{•+} foi preparado através da mistura de 5 mL de ABTS 7mM e 88 µL de persulfato de potássio 140 mM, seguido de repouso no escuro por 16h. Essa mistura foi diluída com EtOH até a obtenção de uma absorvância de $0,70 \pm 0,02$ em 734 nm. A curva de calibração foi preparada com soluções de 100, 500, 1.000, 1.500 e 2.000 µM de Trolox. Cada frasco de reação foi preparado mediante adição de 30 µL de padrão ou amostra diluída e 3 mL do radical ABTS^{•+}.

4.6.3.8. Atividade Antioxidante *in vivo*

4.6.3.8.1. Preparo das Soluções de Tratamento

Alíquotas de 833 µL de todos os vinhos foram diluídas em água ultrapura e o volume foi completado para 10,0 mL em balão volumétrico. O gás nitrogênio foi aplicado à superfície dos extratos etanólicos, em volumes correspondentes a 167 mg de cada uva liofilizada (1,166 mL), para redução do teor alcoólico. Posteriormente, o resíduo obtido foi ressuspenso em água até completar o volume de 10,0 mL. As soluções obtidas foram utilizadas nos tratamentos de nematoides frente às diferentes condições oxidantes.

4.6.3.8.2. Tratamentos em *C. elegans*

Foram utilizados *C. elegans* tipo selvagem (N2 Bristol), fornecidos pelo “*Caenorhabditis* Genetics Center” (Minnessota, EUA). A propagação dos animais foi realizada em meio para crescimento de nematoide (NGM), em placas contendo o alimento *Escherichia coli* (cepa OP50) e mantidas em estufa a 22 °C. Os nematoides foram sincronizados através do rompimento de hermafroditas grávidos por uma solução de lise (NaOCl 1% v/v e NaOH 0,25 M) para que se obtivesse animais na fase larval L1, os quais foram submetidos às condições de estresse por agentes oxidantes (paraquat 5 mM, luz ultravioleta a 253 nm e calor a 35 °C, por uma hora). Os vermes (2.500) expostos a tais condições foram previamente tratados com as amostras de extratos de uvas e seus respectivos vinhos experimentais. O controle usado nos tratamentos foi o mesmo tampão usado para diluir as amostras de uvas e vinhos

(KH_2PO_4 20 mM, NaHPO_4 42 mM, NaCl 86 mM e MgSO_4 1 mM). A sobrevivência dos animais foi analisada e contabilizada 24 h após a exposição a cada estressor e foi expressa como porcentagem de sobrevivência em relação ao controle.

4.6.3.9. Análise Estatística

Os resultados obtidos para os compostos fenólicos de amostras de uvas e vinhos foram submetidos à análise por ANOVA e avaliados pelo teste de Tukey quanto às similaridades. Para tanto, foi utilizado o programa Assistat, versão 7.7 beta (SILVA, 2016).

A análise para os percentuais de sobrevivência dos nematoides foi realizada através do programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.), por ANOVA de uma ou duas vias e, quando cabível, um *post-hoc* de Tukey foi aplicado. A análise de PCA foi realizada em programa computacional ChemoStat[®], com autocalamento dos dados (HELPER et al., 2015).

4.6.4. Resultados e Discussão

4.6.4.1. Seleção de Método para Preparo de Amostras de Uvas

A eliminação da água das cascas foi realizada para manter a estabilidade das amostras de uvas por um longo período, preservando a integridade de compostos lábeis como os compostos fenólicos (ABE et al., 2007; CARERI et al., 2004; LANDRAULT et al., 2002; RODRÍGUEZ MONTEALEGRE et al., 2006; TOMAZ et al., 2015). Por questões de solubilidade dos analitos e menor toxicidade, foi selecionado o EtOH 70% v/v como solvente extrator. Também devido à elevada solubilidade dos fenóis no solvente extrator, foi possível utilizar uma baixa proporção de volume por massa de amostra (1:7 p/V), o que evita a diluição extrema dos compostos e a consequente dificuldade de quantificação devido aos LOQ dos métodos, além de consumir menor quantidade de solventes. Outros métodos envolvem uma maior proporção de solvente em relação à massa de amostra. Entretanto, a maioria requer uma posterior concentração dos analitos através de equipamento evaporador rotativo e reconstituição do resíduo em solvente (ABE et al., 2007; CARERI et al., 2004; LANDRAULT et al., 2002; RODRÍGUEZ MONTEALEGRE et al., 2006; TOMAZ et al., 2015). Considerando que alguns dos compostos fenólicos analisados no presente

trabalho são diferentes desses estudos, o procedimento de concentração de analitos não foi realizado, evitando, assim, perdas devido à maior manipulação da amostra e termodegradação.

Além disso, não foram adicionados ácidos à solução extratora, considerando a possibilidade de hidrólise de fenóis ligados a sacarídeos (ANDERSEN e MARKHAM, 2006; CROZIER; CLOFFORD; ASHIHARA, 2006). As degradações químicas em meio ácido também poderiam ser favorecidas pelo choque entre as moléculas, o qual foi promovido pelo ultrassom utilizado no presente trabalho. Landrault et al. (2002) e Careri et al. (2004) igualmente optaram pelo uso de solvente em pH neutro. Outros trabalhos utilizaram extratores ácidos, mas em condições diferentes (ABE et al., 2007; CARRERA et al., 2012; RODRÍGUEZ MONTEALEGRE et al., 2006; TOMAZ et al., 2015).

4.6.4.2. Teores de Compostos Fenólicos

Os dados referentes às curvas de calibração de cada padrão de fenol analisado por HPLC-DAD II são apresentados no Capítulo 3 (Table 4.3.3). Os perfis cromatográficos e os dados do DAD obtidos para os vinhos são comparáveis aos apresentados no Capítulo 3 (Figures 4.3.1 e 4.3.2). Os cromatogramas referentes às uvas apresentam as mesmas regiões com os desvios de linha de base observados para os vinhos (Figura 4.6.2). Nesses mesmos t_R , foram observadas absorções na região do visível, com espectros similares aos das antocianinas. Entretanto, as amostras de uvas parecem sofrer menor interferência de antocianinas. Possivelmente, isso ocorre porque os vinhos apresentam uma maior diversidade de moléculas derivadas de antocianinas, que vão reagindo entre si durante o processo de vinificação e após o envase. Nas uvas, esse processo é mais lento ou não ocorre, o que confere a elas uma menor diversidade de compostos derivados de antocianinas (FREITAS e MATEUS, 2011; GORDILLO et al., 2012; GUERRA, 1997; SALAS et al., 2004).

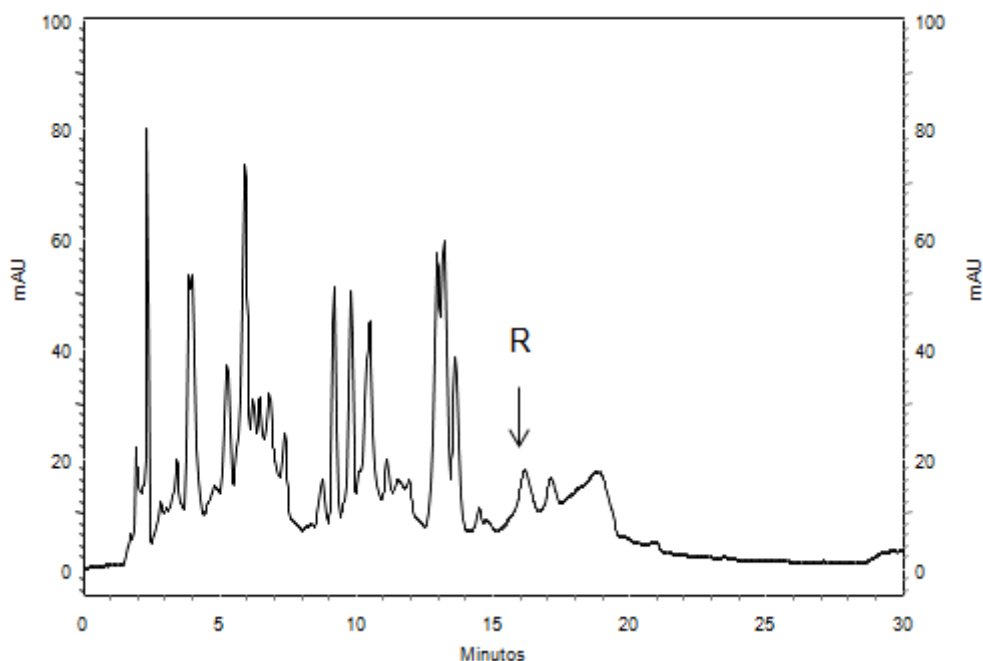


Figura 4.6.2. Cromatograma em 306 nm obtido para extrato etanólico de casca de uva Arinarnoa, por HPLC-DAD II. O pico assinalado corresponde ao *trans*-resveratrol (R).

Os resultados obtidos para as curvas de calibração de cada padrão de fenol analisado por UPLC-MS são apresentados na Tabela 4.6.1. Mediante comparação com o perfil cromatográfico de padrões de compostos fenólicos obtidos por UPLC-MS (Tabela 4.5.1 do Capítulo 5), tais compostos foram identificados e quantificados nas amostras de cascas de uvas e vinhos (Tabelas 4.6.2 e 4.6.3, respectivamente). Na mesma análise, foi possível incluir a determinação de astilbina ($t_R = 1,17$ min).

Os teores de *trans*-resveratrol para as amostras de uvas Arinarnoa (2014), Barbera (2014) e Marselan (2014) foram similares ou superiores aos encontrados por Careri et al. (2003). Um estudo constatou concentrações de (+)-catequina, (-)-epicatequina, quercetina e derivados cinâmicos em uvas Merlot e Syrah de Minas Gerais, Brasil (ABE et al., 2007), superiores aos encontrados para as amostras da Campanha Gaúcha. Entretanto, não foi apresentada a seletividade desse método e a solução de extração é acidificada, o que pode favorecer a hidrólise de flavonóides ligados a sacarídeos, formando os compostos livres encontrados.

Tabela 4.6.1. Resultados das curvas de calibração ($n = 3$) para os compostos fenólicos analisados por UPLC-MS.

Fenol	Faixa Linear ^a	Equação da Reta ^b		r^c	Limites ^d	
		a	b		LOD	LOQ
Estilbeno						
<i>trans</i> -Piceido	1,0-15,0	437	550	0,996	0,47	1,42
Flavanóis						
(+)-Catequina	0,2-10,0	3490	66021	0,998	0,11	0,32
(-)-Epicatequina	0,5-15,0	-42377	73558	0,999	0,32	0,97
(-)-Epigallocatequina	0,2-5,0	-5657	37022	0,999	0,08	0,23
Galato de (-)-Epicatequina	0,5-15,0	-36995	45699	0,999	0,24	0,74
Flavonóis						
Quercetina-3-O-Glicosídeo	0,2-3,0	-5377	40089	0,998	0,13	0,38
Quempferol-3-O-Glicosídeo	0,2-15,0	147	85400	0,996	0,18	0,53
Rutina	0,2-7,5	-8763	18622	0,998	0,05	0,15
Derivados Cinâmicos						
Ácido <i>p</i> -Cumárico	0,5-15,0	113801	73856	0,999	0,30	0,91
Ácido <i>trans</i> -Ferúlico	0,2-15,0	-49840	127129	0,996	0,12	0,36
Flavanonóis						
Astilbina	0,5-5	-212	5264	0,998	0,25	0,75
(+)-Taxifolina	0,5-15,0	33673	187756	0,999	0,44	1,34

^a Faixa linear entre as concentrações: 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 mg L⁻¹.

^b Intercepto (a) e inclinação (b).

^c Fator de correlação (r).

^d Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).

Comparações adicionais dos teores obtidos com outros trabalhos que dosaram compostos fenólicos são complexas, uma vez que os procedimentos para o preparo de amostras e as expressões dos resultados são bastante variados. Muitos estudos expressam os teores com relação à massa úmida de casca e/ou não citam o teor de água (ABE et al., 2007; PALOMINO et al., 2000; RODRÍGUEZ MONTEALEGRE et al., 2006).

Para vinhos, os resultados são expressos em volume, o que possibilita a realização de comparações entre teores de compostos fenólicos obtidos em diferentes estudos, com a ressalva das diferenças entre os métodos analíticos. O *trans*-resveratrol apresentou teores intermediários (1,45 a 3,44 mg L⁻¹) quando relacionados aos vinhos de várias regiões do mundo. Valores inferiores foram encontrados por Abe et al. (2007), Careri et al. (2003), Cotea et al. (2012), Fontana e Bottini (2014), López et al. (2001), Monagas et al. (2005), Pereira et al. (2010), Tenore et al. (2011) e Vrohvsek et al. (2012). Valores superiores foram obtidos por Adrian et al. (2000), Baptista et al. (2001), Castellari et al. (2002), Malovaná et al. (2001), Silva et al. (2011) e Vitrac et al. (2005). Entretanto, a maioria desses trabalhos com teores elevados de

trans-resveratrol não avaliou a seletividade do método, podendo estar superestimados.

O *trans*-piceído foi quantificado em apenas uma amostra (Rebo da safra de 2015), ao contrário de outros vinhos tintos. Já o outro estilbeno dosado (*trans-ε*-viniferina), apresentou teores considerados elevados quando comparados a outros estudos (ADRIAN et al., 2000; BAPTISTA; TAVARES; CARVALHO, 2001; LANDRAULT et al., 2002; VITRAC et al., 2005; VROHVSEK et al., 2012).

Os teores de flavanóis e flavonóis encontrados foram similares aos determinados por outros autores, através de métodos que possivelmente possuem alta seletividade, mediante uso de detector de MS ou elevado tempo de análise em HPLC-DAD (COTEA et al., 2012; LÓPEZ et al., 2001; SALVATORE et al., 2013; VRHOVSEK et al., 2012). Outros métodos, com uso de HPLC-DAD mais curtos e sem limpeza de amostras apresentaram valores muito superiores (AZNAR et al., 2011; CASTELLARI et al., 2002; MALOVANÁ et al., 2001; PEREIRA et al., 2010; RODRÍGUEZ-DELGADO et al., 2002; SERUGA; NOVAK; JAKOBEK, 2011). Tais contradições são justificadas por coeluições dos analitos com outros compostos fenólicos, incluindo a alta interferência de antocianinas, conforme evidenciado no Capítulo 5.

Dentre os flavanonóis, a (+)-taxifolina foi inferior ao LOQ (1,34 mg L⁻¹) para todas as amostras de vinhos, resultado similar a um vinho italiano da variedade Sangiovese (VRHOVSEK et al., 2012). A astilbina é raramente dosada em estudos, mas já foi detectada em uvas, vinhos brancos e tintos e champanhes (CHAMKHA et al., 2003; FIGUEIREDO-GONZÁLEZ; CANCHO-GRANDE; SIMAL-GÁNDARA, 2013; MONAGAS et al., 2005; TROUSDALE e SINGLETON, 1983) e foi dosada em engaçõ de variedades de uvas *Vitis vinifera* L. (SOUQUET et al., 2000). As amostras (Tabelas 4.6.2 e 4.6.3) apresentaram um teor inferior ao encontrado, por HPLC-DAD, para vinhos tintos franceses das variedades Cabernet Sauvignon, Merlot e Egidola, mas superiores aos da variedade Tempranillo (LANDRAULT et al., 2002). Altos teores de astilbina foram encontrados em vinhos argentinos Malbec (9,1 a 16,3 mg L⁻¹) e norte africanos (10,8 a 24,22 mg L⁻¹) (FANZONE et al., 2010; GUEBAILIA et al., 2006). Nos últimos estudos (FANZONE et al., 2010; LANDRAULT et al., 2002), foi utilizado HPLC-

DAD, enquanto os resultados apresentados na tese foram por UPLC-MS, um método mais seletivo e, portanto, menos susceptível a erros analíticos.

Tabela 4.6.2. Médias (\pm DP) de compostos fenólicos ($\mu\text{g g}^{-1}$ de casca seca) e parâmetros gerais obtidos para uvas *Vitis vinifera* L. tintas da Campanha Gaúcha, safras 2014 e 2015.

Parâmetro	Arinarnoa		Barbera		Marselan		Rebo		Teroldego	
	Au14	Au15	Bu14	Bu15	Mu14	Mu15	Ru14	Ru15	Tu14	Tu15
Estilbenos										
<i>trans</i> -Resveratrol	61,64a (4,81)	ND	15,43c (3,95)	ND	25,12b (3,24)	ND	-	ND	-	ND
<i>trans</i> -Piceido	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	ND
<i>trans</i> - ϵ -Viniferina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	ND
Σ Estilbenos ^b	62,34	ND	16,14	ND	25,82	ND	-	ND	-	ND
Flavanóis										
(+)-Catequina	61,83a (0,47)	24,82c (2,68)	55,98b (0,75)	18,32d (4,74)	16,12e (3,75)	23,27c (1,39)	-	1,48g (3,90)	-	13,45f (1,64)
(-)-Epicatequina	67,07a (0,58)	46,89b (1,69)	66,62a (0,30)	43,14c (2,62)	34,88d (1,38)	47,85b (1,94)	-	47,95b (2,74)	-	45,92bc (1,78)
(-)-Epigallocatequina	35,63a (2,88)	33,04b (2,94)	24,17d (2,58)	25,81d (2,81)	22,37e (4,07)	29,23c (2,97)	-	36,78a (4,34)	-	33,44b (0,83)
Galato de (-)-Epicatequina	29,71b (2,82)	29,41b (2,39)	29,98b (3,07)	28,44b (2,23)	29,66b (3,61)	28,82b (2,26)	-	29,01b (2,72)	-	31,83a (2,60)
Σ Flavanóis ^b	194,24	134,16	176,75	115,71	103,03	129,17	-	115,22	-	124,64
Flavonóis										
Quercetina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	ND
Quercetina-3-O-Glicosídeo	208,32d (0,50)	157,15e (2,98)	671,52a (0,91)	410,98c (0,53)	158,23e (1,92)	62,97g (1,59)	-	84,69f (1,99)	-	597,68b (0,35)
Miricetina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	ND
Quempferol	ND	ND	11,77b (3,08)	ND	ND	ND	-	11,73b (4,78)	-	15,44a (3,76)
Quempferol-3-O-Glicosídeo	38,94d (2,48)	25,75e (1,28)	82,12b (0,42)	41,89d (1,84)	6,72f (4,90)	86,63a (0,81)	-	6,08f (2,98)	-	75,99c (0,82)
Rutina	31,41d (2,76)	32,15d (2,32)	42,12c (0,31)	44,24c (0,73)	23,49e (4,46)	47,69b (0,80)	-	19,28f (4,30)	-	93,83a (0,90)
Σ Flavonóis ^b	279,47	215,85	808,06	497,91	189,24	198,09	-	122,31	-	783,47
Derivados Cinâmicos										
Ácido <i>trans</i> -Cinâmico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	ND
Ácido <i>p</i> -Cumárico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	ND
Ácido <i>trans</i> -Ferúlico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	ND
Σ derivados Cinâmicos ^b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	ND
Flavanonóis										
Astilbina	86,06b (0,81)	38,09f (1,40)	67,97c (0,50)	30,23g (1,59)	89,98a (0,93)	60,44d (1,33)	-	62,70d (1,91)	-	45,20e (0,87)
(+)-Taxifolina	<1,34	<1,34	<1,34	<1,34	<1,34	<1,34	-	<1,34	-	<1,34
Σ Flavanonóis ^a	87,40	39,43	69,31	31,57	91,32	61,78	-	64,04	-	46,54
Σ Fenóis ^b	623,89	390,91	1070,70	646,66	409,85	390,51	-	303,04	-	956,12
Parâmetros Gerais										
TPI ^c	113,73b (0,04)	101,40c (0,02)	86,85d (0,04)	41,33f (0,05)	103,76c (0,02)	79,26e (0,20)	-	102,58c (0,03)	-	201,37a (0,04)
DPPH ^d	64,61b (0,81)	59,46c (0,52)	54,15d (0,11)	26,55g (0,29)	51,74de (0,03)	49,40ef (0,05)	-	47,84f (0,11)	-	79,28a (0,04)
ABTS ^e	311,51b (0,05)	237,97c (0,03)	217,04d (0,18)	106,50f (0,08)	229,87c (0,05)	199,70e (0,14)	-	232,92c (0,04)	-	450,91a (0,19)

Valores seguidos pela mesma letra não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

^a Variedades de uvas codificadas na ordem: primeira letra da variedade; amostra de uva (u); dois últimos dígitos do ano da safra (2014 ou 2015).

^b Somatório da classe química de compostos fenólicos.

^c TPI: índice de fenóis totais.

^d DPPH: capacidade antioxidante por 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (mM Trolox g^{-1} casca de uva seca).

^e ABTS: capacidade antioxidante por ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (mM Trolox g^{-1} casca de uva seca).

Tabela 4.6.3. Médias (\pm DP) de compostos fenólicos (mg L⁻¹) e parâmetros gerais obtidos para os vinhos tintos da Campanha Gaúcha, safras 2014 e 2015.

Parâmetro	Arinarnoa		Barbera		Marselan		Rebo		Teroldego	
	Av14	Av15	Bv14	Bv15	Mv14	Mv15	Rv14	Rv15	Tv14	Tv15
Estilbenos										
<i>trans</i> -Resveratrol	1,90b (3,53)	2,01b (2,92)	1,59c (3,55)	<1,01	1,45d (4,73)	ND	3,44a (2,80)	ND	ND	ND
<i>trans</i> -Piceido	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	31,53 (0,70)	ND	ND
<i>trans-ε</i> -Viniferina	2,82f (4,39)	2,45g (1,94)	5,63a (4,25)	4,59c (4,66)	4,84b (4,30)	3,11e (2,79)	3,24e (3,92)	3,55d (3,42)	2,52g (2,05)	2,65fg (1,87)
Σ Estilbenos ^b	5,19	4,93	7,69	6,07	6,76	3,91	7,15	35,41	3,32	3,45
Flavanóis										
(+)-Catequina	7,14c (0,90)	5,45e (2,95)	6,54d (1,17)	2,78g (3,17)	7,46bc (0,81)	7,64b (0,79)	3,50f (2,09)	1,23h (3,89)	7,57b (1,50)	9,20a (0,95)
(-)-Epicatequina	10,09ef (1,41)	11,44d (2,46)	10,34e (1,55)	9,15g (2,08)	13,74b (1,08)	12,17c (1,80)	7,66h (2,54)	4,43i (3,59)	9,54fg (2,42)	16,11a (0,27)
(-)-Epigallocatequina	4,15a (1,59)	2,59e (2,96)	2,98d (2,28)	2,87d (2,97)	2,86d (3,59)	2,14f (2,05)	3,31c (2,13)	3,78b (3,59)	2,61e (2,85)	3,68b (2,52)
Galato de (-)-Epicatequina	4,29bc (2,59)	4,35b (2,84)	4,07c (3,74)	ND	4,24bc (2,42)	4,31bc (2,83)	4,29bc (2,86)	4,28bc (3,46)	ND	4,78a (0,61)
Σ Flavanóis ^b	25,67	23,83	23,93	15,04	28,30	26,26	18,76	13,72	19,96	33,77
Flavonóis										
Quercetina	4,05c (3,50)	1,01f (1,92)	3,04e (1,86)	ND	3,58d (4,33)	ND	4,07bc (2,92)	3,66d (3,40)	4,27ab (0,75)	4,37a (2,93)
Quercetina-3-O-Glicosídeo	ND	<0,38	ND	ND	ND	<0,38	ND	ND	<0,38	<0,38
Miricetina	3,09f (4,61)	3,49e (2,29)	2,04g (4,28)	ND	2,97f (3,22)	ND	7,31b (3,20)	5,35d (3,48)	5,98c (1,35)	7,89a (1,37)
Quempferol	1,76b (4,97)	ND	ND	ND	1,64c (3,04)	1,71bc (1,87)	ND	1,03d (3,78)	0,97d (1,57)	2,51a (2,08)
Quempferol-3-O-Glicosídeo	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Rutina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Σ Flavonóis ^b	9,16	5,28	5,61	1,06	8,45	2,75	11,91	10,30	11,73	15,28
Derivados Cinâmicos										
Ácido <i>trans</i> -Cinâmico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ácido <i>p</i> -Cumárico	3,49d (1,87)	4,73b (2,09)	3,05e (2,50)	ND	7,14a (1,37)	ND	ND	2,76f (3,51)	4,31c (2,09)	ND
Ácido <i>trans</i> -Ferúlico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Σ derivados Cinâmicos ^b	3,63	4,87	3,19	1,05	7,28	1,05	1,05	2,90	4,45	1,05
Flavanonóis										
Astilbina	3,94d (2,80)	6,80a (0,97)	ND	4,54c (2,36)	4,82b (2,96)	4,02d (2,90)	3,39e (3,06)	ND	1,56f (4,59)	6,83a (0,30)
(+)-Taxifolina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Σ Flavanonóis ^a	4,38	7,24	0,69	4,98	5,26	4,46	3,83	0,69	2,00	7,27
Σ Fenóis ^b	48,03	46,15	41,11	28,20	56,05	38,43	42,70	63,02	41,46	60,82
Parâmetros Gerais										
TPI ^c	36,14de (0,00)	55,64b (0,02)	24,86f (0,02)	25,50f (0,08)	33,80e (0,02)	36,30d e (0,06)	46,45c (0,05)	37,09d (0,03)	58,10b (0,02)	73,75a (0,05)
DPPH ^d	5,14d (0,08)	6,41b (0,16)	2,85h (0,02)	3,42g (0,12)	4,03f (0,03)	4,69e (0,27)	5,84c (0,22)	4,23f (0,03)	7,72a (0,36)	7,49a (0,04)
ABTS ^e	21,51d (0,01)	27,04b (0,03)	11,95f (0,06)	10,59g (0,04)	17,27e (0,04)	17,17e (0,05)	24,12c (0,05)	16,48e (0,17)	30,1a (0,08)	26,64b (0,31)

Valores seguidos pela mesma letra não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

^a Variedades de vinhos codificadas na ordem: primeira letra da variedade; amostra de vinho (v); dois últimos dígitos do ano da safra (2014 ou 2015).

^b Somatório da classe química de compostos fenólicos.

^c TPI: índice de fenóis totais.

^d DPPH: capacidade antioxidante por 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (mM Trolox g⁻¹ casca de uva seca).

^e ABTS: capacidade antioxidante por ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (mM Trolox g⁻¹ casca de uva seca).

4.6.4.3. Parâmetros Gerais de Avaliação dos Compostos Fenólicos

Durante a otimização do método para a determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH, foi verificada a necessidade de um tempo elevado para que reação atingisse o seu estado estacionário. Tal condição é essencial para a reprodutibilidade e a exatidão do método. Conforme evidenciado por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), a cinética de reação entre os compostos fenólicos e o reagente DPPH é lenta. Por isso, após realização de testes com os diferentes tempos de reação e uso ou não de ultrassom, a condição mais rápida que garantiu a reação completa foi por 30 min em ultrassom, na temperatura de 25 ± 5 °C.

Os valores mais elevados de atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e ABTS foram obtidos para as amostras de uvas e vinhos Arinarnoa, Rebo e Teroldego, de ambas as safras avaliadas. O método utilizado nesse experimento foi muito semelhante ao de Stratil, Kubáň e Fojtová (2008), o qual analisou 21 vinhos de várias regiões do mundo e obteve médias de 5,52 mM de Trolox para o DPPH e de 26,44 mM de Trolox para o ABTS. Mediante comparação com tais resultados e outros estudos (PATIL et al., 2011; TENORE et al., 2011), as três variedades de vinhos indicadas apresentam alta atividade antioxidante. Barbera e Marselan apresentaram baixas atividades antioxidantes. As cinco variedades de uvas apresentaram valores de DPPH superiores a amostras de Merlot e Syrah de outras regiões do Brasil (ABE et al., 2007).

O método com uso do ABTS forneceu valores maiores do que os de DPPH, devido à maior reatividade do primeiro reagente com os compostos fenólicos. Assim, uvas e vinhos Arinarnoa, Rebo e Teroldego também apresentaram atividades antioxidantes superiores às demais amostras avaliadas, sendo consideradas elevadas em relação a outro estudo (STRATIL; KUBÁŇ; FOJTOVÁ, 2008).

Os valores TPI obtidos para vinhos e extratos de cascas de uvas apresentaram alta correlação com os resultados dos dois métodos de atividade antioxidante *in vitro* ($r = 0,887$ e $r = 0,938$, para DPPH e ABTS, respectivamente). Entre DPPH e ABTS o r foi de 0,982. Tais resultados são coerentes com outros reportados na literatura (PATIL et al., 2011; STRATIL; KUBÁŇ; FOJTOVÁ, 2008; TENORE et al., 2011).

4.6.4.4. Correlações entre Teor de Compostos Fenólicos e Parâmetros Gerais

A Figura 4.6.3 apresenta um mapa de calor com os coeficientes de correlação (r) entre os parâmetros analíticos obtidos para uvas e vinhos, quando estes foram quantificáveis. As correlações mais elevadas foram obtidas entre os parâmetros gerais de uvas (TPI, DPPH e ABTS) e a maioria dos parâmetros determinados para vinhos, com exceção dos estilbenos, ácido *p*-cumárico e astilbina. González-Neves et al. (2004) obtiveram correlações significativas quando comparados resultados de uvas e vinhos tintos correspondentes através análises gerais, como fenóis totais, antocianinas totais e cor.

O galato de (-)-epicatequina determinado nas uvas também foi relevante para a composição fenólica geral dos vinhos correspondentes, apresentando altas correlações com vários compostos fenólicos. Além disso, as uvas apresentaram alta correlação desse fenol com o seu correspondente livre em vinhos ((-)-epicatequina). Apesar de terem sido observados teores de flavonóis glicosilados superiores em uvas do que em vinhos (Tabelas 4.6.2 e 4.6.3), não houve correlação com os seus correspondentes livres em vinhos. Para o caso específico dos estilbenos, foi encontrada apenas a forma livre (*trans*-resveratrol) em três amostras de uvas (Au14, Bu14 e Mu14). Enquanto isso, todos os vinhos apresentaram estilbenos, sendo esses majoritariamente aglicosídicos (*trans*-resveratrol ou *trans*- ϵ -viniferina). Considerando que esses compostos fenólicos são provenientes do metabolismo das uvas, esperava-se que, se estão presentes nos vinhos, também fossem encontrados nas uvas que os originaram. Portanto, outros estilbenos, que não tenham sido quantificados no presente estudo, poderão estar presentes nas amostras de uvas. Além disso, convém explorar ao máximo o processo de preparo de amostras de cascas de uvas quanto à recuperação da extração de estilbenos. Esses podem estar sendo degradados em alguma etapa, como na liofilização, por exemplo, ou com extração insuficiente.

<u>Vinhos</u>	<u>Uvas</u>	<i>trans</i> -Resveratrol	(+)-Catequina	(-)-Epicatequina	(-)-Epigallocatequina	Galato de (-)-Epicatequina	Σ Flavanóis	Quempferol	Quempferol-3-O-Glicosídeo	Quercetina-3-O-Glicosídeo	Rutina	Σ Flavonóis	Astilbina	Σ Fenóis	TPI	DPPH	ABTS
<i>trans</i> -Resveratrol		0,577	0,661	0,367	-0,188	-0,084	0,529	-0,464	-0,264	0,033	-0,434	-0,051	0,249	0,073	-0,229	0,053	-0,149
<i>trans</i> - ϵ -Viniferina		0,017	0,163	0,038	-0,816	-0,222	-0,026	0,080	0,012	0,399	-0,270	0,322	0,240	0,330	-0,488	-0,530	-0,529
Σ Estilbenos		-0,200	-0,439	-0,049	0,408	-0,270	-0,245	0,394	-0,517	-0,322	-0,460	-0,366	0,094	-0,392	-0,080	-0,227	-0,132
(+)-Catequina		0,298	0,358	0,112	-0,182	0,669	0,265	0,022	0,542	0,271	0,557	0,344	0,314	0,411	0,568	0,697	0,609
(-)-Epicatequina		0,017	0,056	-0,246	-0,311	0,652	-0,081	-0,018	0,427	0,323	0,661	0,382	0,011	0,365	0,543	0,553	0,522
(-)-Epigallocatequina		0,518	0,173	0,587	0,587	0,421	0,366	0,444	-0,257	0,175	0,064	0,136	0,295	0,236	0,500	0,420	0,566
Galato de(-)-Epicatequina		0,193	0,104	0,199	0,369	0,541	0,219	0,333	0,070	-0,171	0,068	-0,124	0,496	-0,044	0,655	0,805	0,669
Σ Flavanóis		0,224	0,214	0,001	-0,094	0,771	0,150	0,118	0,430	0,257	0,590	0,324	0,272	0,370	0,707	0,789	0,722
Quercetina		0,482	0,133	0,249	0,274	0,683	0,244	0,579	-0,189	0,249	0,113	0,214	0,580	0,316	0,702	0,642	0,718
Miricetina		-0,067	-0,311	-0,077	0,555	0,781	-0,112	0,703	-0,157	0,207	0,416	0,211	-0,005	0,187	0,900	0,744	0,851
Quempferol		0,253	-0,139	-0,140	0,283	0,585	-0,073	0,198	0,177	-0,088	0,485	-0,009	0,380	0,031	0,727	0,632	0,742
Σ Flavonóis		0,179	-0,158	0,018	0,478	0,818	0,010	0,653	-0,114	0,192	0,385	0,199	0,275	0,229	0,922	0,795	0,902
Ácido <i>p</i> -Cumárico		0,404	0,093	-0,180	-0,266	-0,030	-0,048	-0,327	-0,657	-0,323	-0,612	-0,414	0,580	-0,333	-0,032	0,090	-0,057
Astilbina		-0,086	-0,196	-0,463	0,060	0,326	-0,271	-0,343	0,015	-0,048	0,462	-0,009	-0,358	-0,073	0,376	0,343	0,353
Σ Fenóis		0,069	-0,361	-0,168	0,461	0,563	-0,199	0,536	-0,387	-0,143	0,048	-0,151	0,371	-0,136	0,748	0,629	0,693
TPI		-0,262	-0,323	-0,230	0,510	0,732	-0,182	0,377	0,119	0,123	0,657	0,183	-0,334	0,112	0,855	0,770	0,812
DPPH		-0,110	-0,218	-0,167	0,600	0,626	-0,079	0,174	0,083	-0,031	0,571	0,035	-0,282	-0,004	0,787	0,760	0,780
ABTS		0,051	-0,084	-0,078	0,595	0,582	0,038	0,077	-0,057	-0,145	0,350	-0,099	-0,096	-0,095	0,744	0,808	0,752



Figura 4.6.3. Mapa de calor contendo os fatores de correlação (r) entre os teores individuais e parâmetros gerais de compostos fenólicos de oito amostras de uvas e vinhos de novas variedades potenciais da Campanha Gaúcha. Amostras: Arinarnoa (2014 e 2015), Barbera (2014 e 2015), Marselan (2014 e 2015), Rebo (2015) e Teroldego (2015). Os somatórios (Σ) das classes com apenas um composto fenólico dosado não foram incluídas nessa avaliação.

Houve correlação negativa entre (-)-epigallocatequina de uvas e *trans-ε*-viniferina de vinhos. Aparentemente, isso não está relacionado à biossíntese dos compostos fenólicos, pois o primeiro é um flavanol e o segundo um estilbeno, com rotas biossintéticas envolvendo enzimas diferentes. A correlação entre esses dois compostos fenólicos poderá ser aleatória, devendo ser investigada em experimentos envolvendo um maior número de amostras.

Assim, as determinações de compostos fenólicos em uvas, principalmente do galato de (-)-epicatequina, de TPI e atividades antioxidantes *in vitro* (DPPH e ABTS) podem ser úteis para a predição do potencial antioxidante dos vinhos a serem elaborados. Essa ferramenta pode ser aplicada na vitivinicultura, a fim de auxiliar na escolha da tecnologia para a elaboração de vinhos ou para a definição do estágio mais adequado de colheita da uva (GONZÁLES-NEVES et al., 2004).

4.6.4.5. Atividade Antioxidante *in vivo*

O preparo de extratos para o tratamento de nematoides envolveu a remoção de EtOH até um nível, determinado experimentalmente, que não causasse toxicidade aos nematoides (1% v/v). A proporção de massa de uva foi definida com base no teor médio de água encontrado nas uvas (15% p/v) e a relação usual entre uva fresca e volume de vinho obtido em vinificação (1 kg de uva foi equivalente a 750 mL de vinho).

Os resultados de compostos fenólicos e parâmetros gerais obtidos para uvas e vinhos originais (Tabelas 4.6.2 e 4.6.3) foram trabalhados, considerando as respectivas diluições, a fim de determinar seus valores nas soluções utilizadas para tratamento dos nematoides (Tabelas 4.6.4 e 4.6.5). De forma geral, as soluções de uvas apresentaram teores superiores aos de vinhos (Figura 4.6.4). Isso indica que o método utilizado para o preparo de amostras de uvas em laboratório é mais eficiente que o processo de vinificação para a extração de fenóis bioativos. Os possíveis motivos para a eficiência da extração em laboratório é o elevado teor de EtOH na solução extratora (70% v/v), enquanto que durante o processo de vinificação, o teor de EtOH aumenta de 0 a 14% v/v. Além disso, a extração laboratorial dos compostos fenólicos de uvas utilizou o ultrassom, o qual facilita a liberação dos analitos das células das cascas e uma solubilização mais eficiente dos fenóis em solução etanólica

(CARERI et al., 2004; CARRERA et al., 2012). Em processos de vinificação, evita-se ter um elevado percentual de extração de compostos fenólicos, pois acarretaria em tanicidade excessiva, com amargor e adstringência.

Tabela 4.6.4. Valores calculados de compostos fenólicos ($\times 10^{-2}$ mg L⁻¹) e atividade antioxidante *in vivo* (média % sobrevivência \pm DP) das soluções de uvas *Vitis vinifera* L. tintas da Campanha Gaúcha (safras 2014 e 2015), utilizadas para tratamento.

Parâmetro	Arinarnoa		Barbera		Marselan		Rebo		Teroldego		
	Au14	Au15	Bu14	Bu15	Mu14	Mu15	Ru14	Ru15	Tu14	Tu15	
Estilbenos											
<i>trans</i> -Resveratrol	102,63	ND	25,70	ND	41,83	ND	-	ND	-	ND	
<i>trans</i> -Piceido	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	ND	
<i>trans</i> - ϵ -Viniferina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	ND	
Σ Estilbenos ^b	102,63	ND	25,70	ND	41,83	ND	-	ND	-	ND	
Flavanóis											
(+)-Catequina	102,95	41,33	93,21	30,50	26,84	38,74	-	2,46	-	22,39	
(-)-Epicatequina	111,67	78,07	110,92	71,83	58,08	79,67	-	79,84	-	76,46	
(-)-Epigallocatequina	59,32	55,01	40,24	42,97	37,25	48,57	-	61,24	-	55,68	
Galato de (-)-Epicatequina	49,47	48,97	49,92	47,35	49,38	47,99	-	48,30	-	53,00	
Σ Flavanóis ^b	323,41	223,38	294,29	192,65	171,55	214,97	-	191,84	-	207,53	
Flavonóis											
Quercetina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	ND	
Quercetina-3G	346,85	261,66	1118,08	684,28	263,45	104,85	-	141,01	-	995,14	
Miricetina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	ND	
Quempferol	ND	ND	19,60	ND	ND	ND	-	19,63	-	25,71	
Quempferol-3G	64,84	42,87	136,73	69,75	11,19	144,24	-	10,12	-	126,52	
Rutina	52,30	53,53	70,13	73,66	39,11	79,40	-	32,10	-	156,23	
Σ Flavonóis ^b	463,99	358,06	1344,54	827,69	313,75	328,49	-	202,86	-	1303,60	
Derivados Cinâmicos											
Ácido <i>trans</i> -Cinâmico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	ND	
Ácido <i>p</i> -Cumárico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	ND	
Ácido <i>trans</i> -Ferúlico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	ND	
Σ derivados Cinâmicos ^b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	-	ND	
Flavanonóis											
Astilbina	143,29	63,42	113,17	50,33	149,82	100,63	-	104,40	-	75,26	
(+)-Taxifolina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	<LOQ	-	<LOQ	
Σ Flavanonóis ^b	143,29	63,42	113,17	50,33	149,82	100,63	-	104,40	-	75,26	
Σ Fenóis ^b	1033,32	644,86	1777,70	1070,68	676,95	644,19	-	499,00	-	1586,38	
Atividade Antioxidante em nematoides											
Estressor ^c	Sem ^d										
Paraquat	56,70 (5,30)	71,33* (5,04)	64,65 (6,29)	68,88 (6,81)	60,72 (8,33)	73,42* (5,16)	69,34 (3,43)	-	72,48* (6,82)	-	62,68 (6,53)
UV	39,67 (5,13)	35,00 (8,89)	31,00 (11,53)	35,33 (4,51)	29,67 (3,06)	58,00* (4,36)	39,67 (5,13)	-	33,33 (6,51)	-	36,67 (7,57)
Temperatura	53,50 (4,20)	49,25 (6,13)	48,50 (4,51)	53,00 (8,60)	50,25 (6,85)	44,75 (15,15)	51,75 (8,81)	-	70,00* (4,32)	-	49,50 (6,03)

3G: 3-O-Glicosídeo. <LOQ: inferior ao limite de quantificação.

^a Variedades de uvas codificadas na ordem: primeira letra da variedade; amostra de uva (u); dois últimos dígitos do ano da safra (2014 ou 2015).

^b Somatório da classe química de compostos fenólicos.

^c Taxa de sobrevivência dos nematoides sem estressor e sem tratamento (Controle = 100%).

^d Taxas de sobrevivência dos nematoides expostos apenas aos agentes estressores.

* Diferença significativa em comparação ao controle ou estresse oxidativo sem tratamento ($p < 0,05$).

Tabela 4.6.5. Valores calculados de compostos fenólicos ($\times 10^{-2}$ mg L⁻¹) e atividade antioxidante *in vivo* (média % sobrevivência \pm DP) das soluções de vinhos tintos da Campanha Gaúcha (safra 2014 e 2015), utilizadas para tratamento.

Parâmetro	Arinarnoa		Barbera		Marselan		Rebo		Teroldego		
	Av14	Av15	Bv14	Bv15	Mv14	Mv15	Rv14	Rv15	Tv14	Tv15	
Estilbenos											
<i>trans</i> -Resveratrol	15,83	16,75	13,25	<LOQ	12,08	ND	28,67	ND	ND	ND	
<i>trans</i> -Piceido	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	262,75	ND	ND	
<i>trans</i> - ϵ -Viniferina	23,50	20,42	46,92	38,25	40,33	25,92	27,00	29,58	21,00	22,08	
Σ Estilbenos ^b	39,33	37,17	60,17	38,25	52,41	25,92	55,67	292,33	21,00	22,08	
Flavanóis											
(+)-Catequina	59,50	45,42	54,50	23,17	62,17	63,67	29,17	10,25	63,08	76,67	
(-)-Epicatequina	84,08	95,33	86,17	76,25	114,50	101,42	63,83	36,92	79,50	134,25	
(-)-Epigallocatequina	34,58	21,58	24,83	23,92	23,83	17,83	27,58	31,50	21,75	30,67	
Galato de (-)-Epicatequina	35,75	36,25	33,92	ND	35,33	35,92	35,75	35,67	ND	39,83	
Σ Flavanóis ^b	213,91	198,58	199,42	123,34	235,83	218,84	156,33	114,34	164,33	281,42	
Flavonóis											
Quercetina	33,75	8,42	25,33	ND	29,83	ND	33,92	30,50	35,58	36,42	
Quercetina-3G	ND	<LOQ	ND	ND	ND	<LOQ	ND	ND	<LOQ	<LOQ	
Miricetina	25,75	29,08	17,00	ND	24,75	ND	60,92	44,58	49,83	65,75	
Quempferol	14,67	ND	ND	ND	13,67	14,25	ND	8,58	8,08	20,92	
Quempferol-3G	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Rutina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Σ Flavonóis ^b	74,17	37,50	42,33	0,00	68,25	14,25	94,84	83,66	93,49	123,09	
Derivados Cinâmicos											
Ácido <i>trans</i> -Cinâmico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Ácido <i>p</i> -Cumárico	29,08	39,42	25,42	ND	59,50	ND	ND	23,00	35,92	ND	
Ácido <i>trans</i> -Ferúlico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Σ derivados Cinâmicos ^b	29,08	39,42	25,42	ND	59,50	ND	ND	23,00	35,92	ND	
Flavanonóis											
Astilbina	32,83	56,67	ND	37,83	40,17	33,50	28,25	ND	13,00	56,92	
(+)-Taxifolina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Σ Flavanonóis ^b	32,83	56,67	ND	37,83	40,17	33,50	28,25	ND	13,00	56,92	
Σ Fenóis ^b	389,33	369,33	327,33	199,42	456,17	292,50	335,08	513,33	327,75	483,50	
Atividade Antioxidante em nematoides											
Estressor ^c	Sem ^d										
Paraquat	56,70 (5,30)	59,55 (6,52)	57,97 (3,13)	60,17 (5,24)	55,42 (3,86)	75,47* (4,73)	62,11 (4,13)	61,40 (2,57)	57,06 (5,61)	57,61 (6,46)	62,41 (6,15)
UV	39,67 (5,13)	29,67 (4,16)	29,67 (9,61)	35,00 (4,00)	35,67 (8,39)	34,00 (4,58)	36,00 (6,24)	39,00 (3,61)	30,00 (2,65)	31,33 (3,21)	35,33 (5,51)
Temperatura	53,50 (4,20)	48,25 (10,72)	45,00 (4,69)	41,50 (9,47)	51,00 (5,94)	47,50 (5,80)	42,00 (3,74)	45,25 (8,34)	48,00 (5,10)	55,25 (13,40)	48,00 (6,98)

3G: 3-O-Glicosídeo. <LOQ: inferior ao limite de quantificação.

^a Variedades de uvas codificadas na ordem: primeira letra da variedade; amostra de uva (u); dois últimos dígitos do ano da safra (2014 ou 2015).

^b Somatório da classe química de compostos fenólicos.

^c Taxa de sobrevivência dos nematoides sem estressor e sem tratamento (Controle = 100%).

^d Taxas de sobrevivência dos nematoides expostos apenas aos agentes estressores.

* Diferença significativa em comparação ao controle ou estresse oxidativo sem tratamento ($p < 0,05$).

Compostos com atividade antioxidante atuam prolongando o tempo de vida de organismos (FINLEY et al., 2013). Assim, os resultados dos testes com *C. elegans* são expressos em percentual de sobrevivência para as condições de estresse oxidativo avaliadas: paraquat, UV e temperatura elevada (Tabelas 4.6.4 e 4.6.5). Os

grupos controle apresentaram 100% de sobrevivência. A exposição apenas aos agentes estressores, paraquat, UV e temperatura elevada, induziram morte nos nematoides, apresentando taxas de sobrevivência de 56,70% (DP = 5,30), 39,67% (DP = 5,13) e 53,50% (DP = 4,20), respectivamente. A mortalidade induzida pelos agentes pró-oxidantes em *C. elegans* foi parcialmente reduzida por algumas das amostras de uvas ou vinhos, em diferentes estressores.

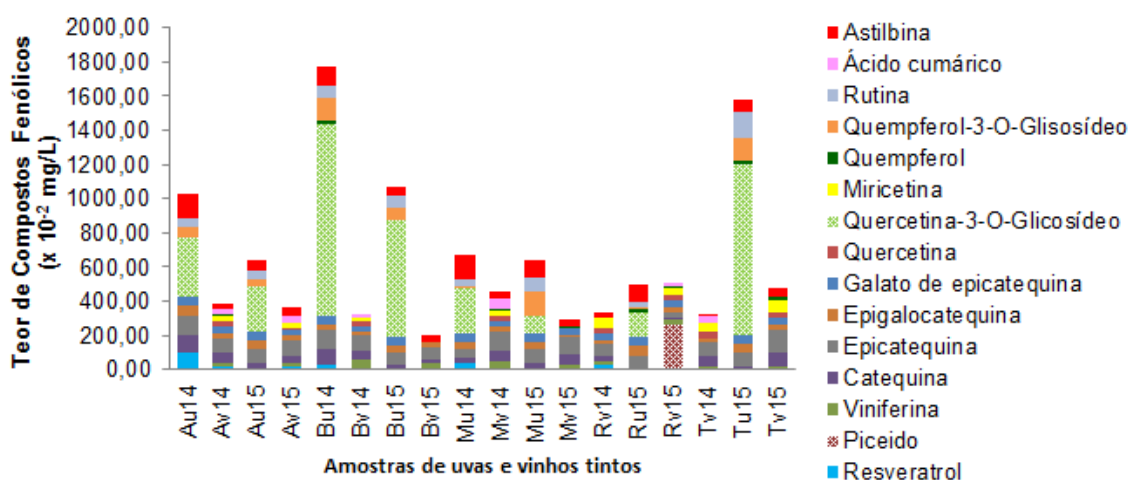


Figura 4.6.4. Gráfico de teores de fenóis bioativos nas soluções de tratamento de nematoides com uvas e vinhos tintos finos da Campanha Gaúcha (safra 2014 e 2015).

A utilização de diferentes agentes pró-oxidantes teve como objetivo testar a efetividade dos extratos frente a diversos tipos de estressores que afetam diferentes macromoléculas (proteínas, lipídios e DNA) por meio de mecanismos que envolvem a oxidação. Além disso, essas condições mimetizam as que podem ser enfrentadas naturalmente pelo consumidor das respectivas uvas e vinhos. Enquanto o paraquat é um pesticida ainda usado em alguns países (FORTENBERRY et al., 2016), este mesmo pró-oxidante é rotineiramente usado nos mais diversos protocolos experimentais como forma de induzir estresse oxidativo pela geração do ânion superóxido no citosol das células (HOSAMANI; KRISHNA; MURALIDHARA, 2014; MEDINA-LEENDERTZ et al., 2014; SALGUEIRO et al., 2014). Já a radiação UV é um mutagênico cuja ação é amplamente reconhecida nos casos de câncer de pele, por exemplo (SURDU et al., 2014). Sua ação se dá pela formação de ânions superóxido a partir da quebra de moléculas de água (SUGIURA et al., 1982), além de sua ação

dimerizante sobre as bases do DNA (SINHA e HÄDER, 2002). Finalmente, o calor é uma condição de estresse normalmente encontrada pelos organismos. Por exemplo, no processo inflamatório grave, onde a febre pode induzir dano às proteínas (HASDAY e SINGH, 2000), da mesma forma como espécies oxidantes também o podem fazer. Logo, tendo em vista as diferentes condições de estresse perante as quais os extratos desempenharam papel protetor, diversas hipóteses podem ser futuramente exploradas para se explicar o motivo de, por exemplo, variedades iguais mas de diferentes safras, terem resultados significativamente diferentes frente à luz UV, como no caso da variedade Marselan (Tabela 4.6.5), ou razão dos extratos etanólicos das uvas terem sido, geralmente, mais efetivos que seus vinhos.

Nos gráficos (Figura 4.6.5) são comparados os tratamentos com uvas e vinhos correspondentes e, portanto, as siglas das amostras foram escolhidas de acordo com a variedade e com a safra. As soluções que apresentaram resultados de sobrevivência (%) dos vermes diferentes do controle e com agentes estressores foram consideradas com maior atividade antioxidante ($p < 0,05$). Assim, os extratos de uvas Marselan (safra de 2014) e Rebo (safra de 2015) protegeram os vermes frente às oxidações causadas por paraquat, sendo que o primeiro também foi ativo em luz ultravioleta e o segundo ao calor. A amostra de Arinarnoa da safra 2014 também aumentou a sobrevivência dos nematoides quando estes foram expostos ao paraquat. A amostra de vinho Marselan (safra de 2014), que fez conjunto com o extrato de uva ativo, também demonstrou atividade antioxidante quando os nematoides foram expostos ao paraquat.

As amostras com maior atividade antioxidante *in vivo* não apresentaram, necessariamente, maiores valores para os parâmetros gerais e somatório de compostos fenólicos (Tabelas 4.6.4 e 4.6.5). Isso confirma a hipótese de que os fenóis bioativos de uvas e vinhos apresentam diferentes potências e eficácias para atividades biológicas e, ainda, podem atuar sinergicamente (FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012). Zamin et al. (2009) demonstraram um aumento da atividade antitumoral mediante associação de *trans*-resveratrol e quercetina. Para evidenciar os compostos fenólicos com maior atividade antioxidante *in vivo*, no item 4.6.4.6 foram utilizadas ferramentas para análise multivariada (HCA e PCA).

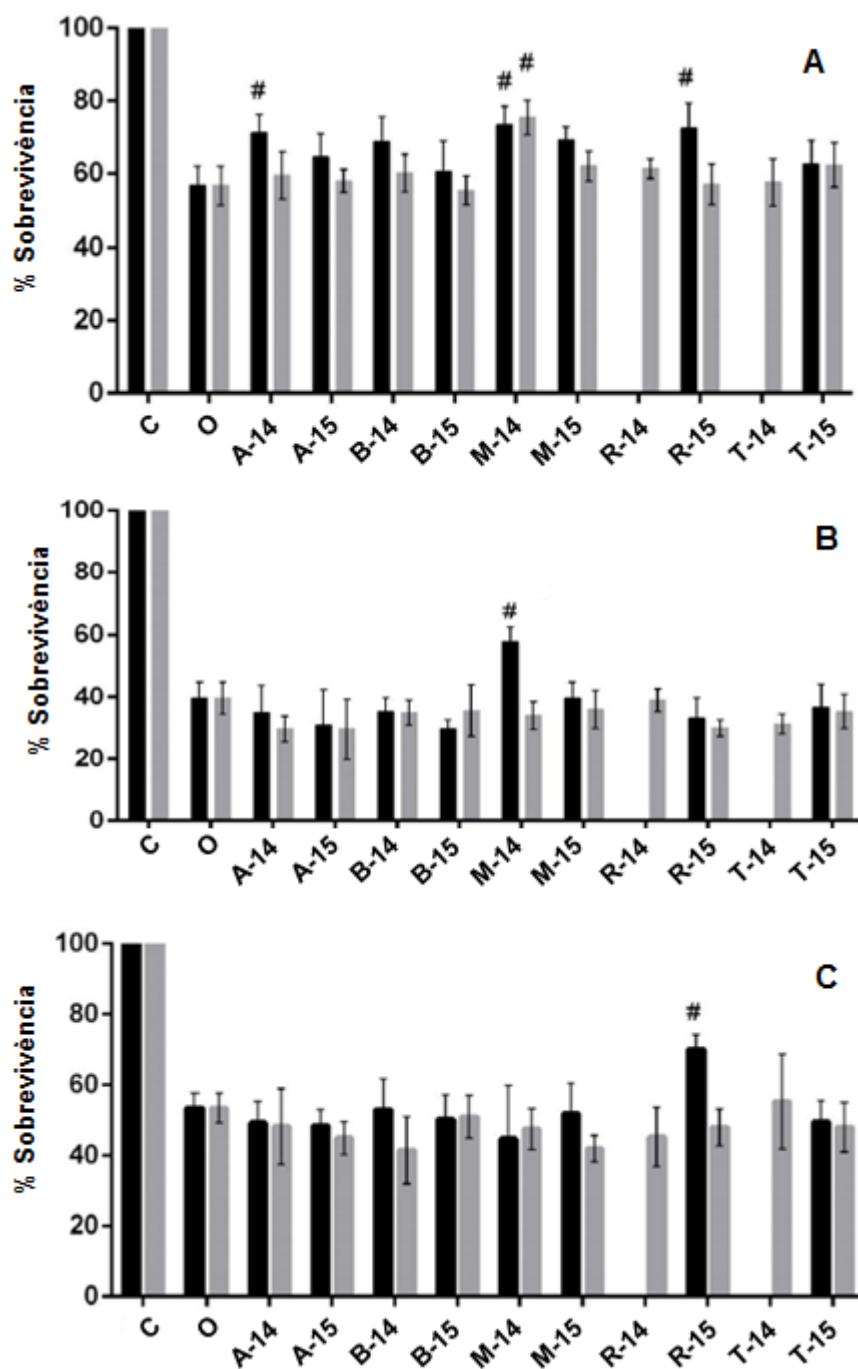


Figura 4.6.5. Sobrevivência (média \pm DP) de *C. elegans* frente ao estresse oxidativo causado por paraquat (A), UV (B) e temperatura (C), tratados com extratos de uvas (●) e respectivos vinhos (◐) da Campanha Gaúcha. Tratamentos com os conjuntos de amostras: Arinarnoa (A-14 e A-15), Barbera (B-14 e B-15), Marselan (M-14 e M-15), Rebo (R-14 e R15) e Teroldego (T-14 e T-15). Os dois últimos dígitos dos códigos de amostras correspondem ao ano da safra (2014 ou 2015). R-14 e T-14 apresentam apenas amostras de vinhos. # Diferença significativa quando comparados ao controle (C) ou estresse oxidativo sem tratamento (O) ($p < 0,05$).

4.6.4.6. Relação entre Atividade Antioxidante *in vivo* e Compostos Fenólicos

Conforme evidenciado nas Tabelas 4.6.2 e 4.6.3 e por Silva e Mura (2010), os teores de fenóis livres são superiores em vinhos do que nas uvas de variedades correspondentes. Alguns estudos indicam que os fenóis livres apresentam uma maior dissolução em meio intestinal e, conseqüentemente, uma atividade biológica superior em humanos (ANDERSEN e MARKHAM, 2006; CRESPIY et al., 1999; CRESPIY et al., 2002; CROZIER; CLOFFORD; ASHIHARA, 2006; MUROTA e TERAQ, 2003). Entretanto, através dos resultados obtidos para a atividade antioxidante em *C. elegans*, não foi possível constatar a maior atividade de compostos fenólicos de vinhos em relação ao das uvas. Em vermes, foram identificadas diferenças de atividade entre quercetina livre e glicosilada, mas os resultados são controversos quanto à forma mais ativa, sendo necessários estudos adicionais para avaliar a sua absorção e metabolismo (DUEÑAS et al., 2013; SURCO-LAOS et al., 2011). Portanto, não há subsídios para relacionar a atividade antioxidante nesse modelo aos teores de fenóis livres ou glicosilados.

Outra possível justificativa para a obtenção de maior atividade antioxidante em extratos de uvas do que nos vinhos correspondentes é uma alta extração de compostos fenólicos de uvas pelo método utilizado (item 4.6.4.5). No preparo de extratos de cascas de uvas, o solvente extrator contém maior concentração de EtOH e condições mais favoráveis do que durante o processo de vinificação. Por isso, para avaliação da atividade biológica no presente estudo, foi coerente avaliar os conjuntos de amostras separadamente, isto é, uvas e vinhos.

A fim de avaliar a atividade antioxidante *in vivo* frente às três condições de estresse oxidativo simultaneamente, foi realizada análise por HCA (Figura 4.6.6), através da qual foi possível identificar quatro grupos. O primeiro grupo (em vermelho) é o controle e, portanto, considerado o mais adequado para a sobrevivência dos nematoides. Entre os tratamentos, apresentaram maior semelhança com o controle, nessa ordem: segundo (Mu14 e Ru15, em verde) e terceiro (Mv14, Mu15, Au14 e Bu14, em azul) grupos. As demais amostras, pertencentes ao quarto grupo (em cinza), apresentaram baixa atividade antioxidante e estão no mesmo agrupamento da condição de estresse sem tratamento.

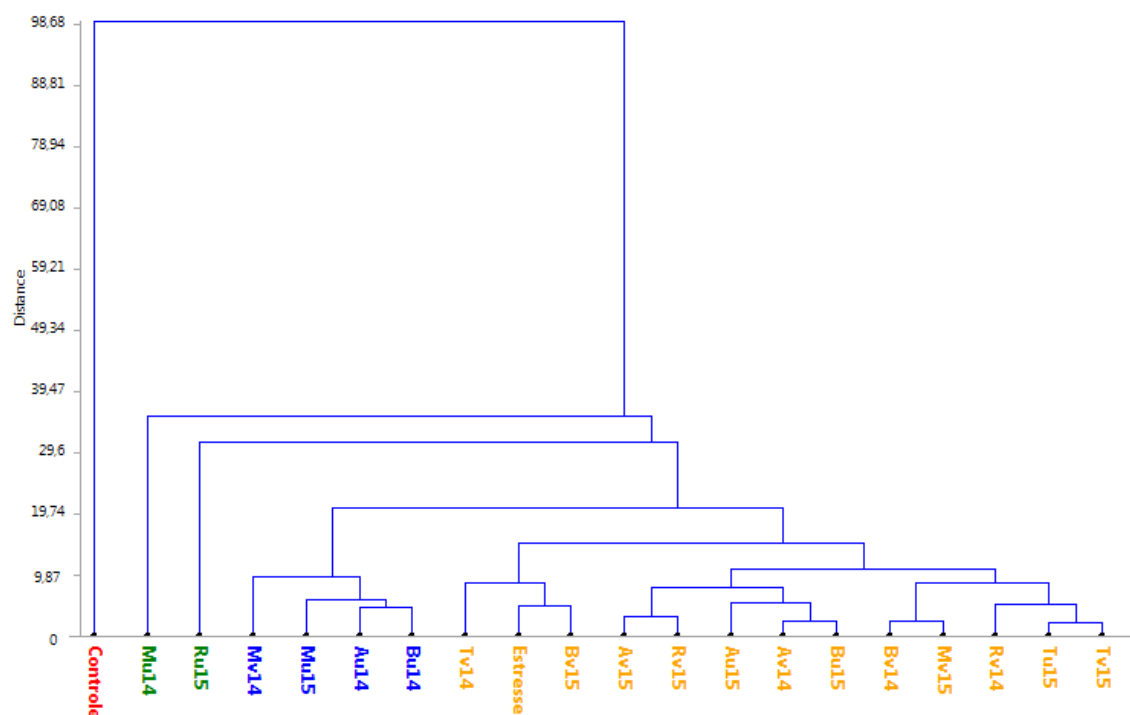


Figura 4.6.6. Dendrograma obtido através de avaliações de atividade antioxidante em nematoides frente a estresses oxidativos (paraquat, UV e temperatura elevada) em soluções de tratamentos de uvas ($n = 8$) e vinhos tintos finos experimentais ($n = 10$) da Campanha Gaúcha. Agrupamentos: Grupo 1 (—), Grupo 2 (—), Grupo 3 (—) e Grupo 4 (—). Descrições das amostras conforme Tabelas II e III (Anexo).

Considerando que apenas uma amostra de vinho apresentou atividade antioxidante *in vivo*, os vinhos foram excluídos da análise por PCA. Para a construção dos gráficos de PCA para as amostras de uvas, foram considerados os valores para atividade antioxidante *in vivo* e os parâmetros que mais variaram entre as amostras de uvas, isto é: *trans*-resveratrol, (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, galato de (-)-epicatequina, somatório de flavanóis, quempferol-3-O-glicosídeo, rutina, quempferol, astilbina, TPI, DPPH e ABTS.

Na avaliação por PCA, foi explicada 89,17% da variância até o quarto componente principal. O gráfico de PC1 *versus* PC3 (Figura 4.6.7) classificou as amostras com maior atividade antioxidante *in vivo*, de acordo com o observado no segundo grupo do HCA (em verde). A astilbina foi o fenol que mais influenciou na diferenciação das amostras de uvas com atividade antioxidante superior *in vivo*, principalmente nas condições de estresse promovidas por paraquat e UV.

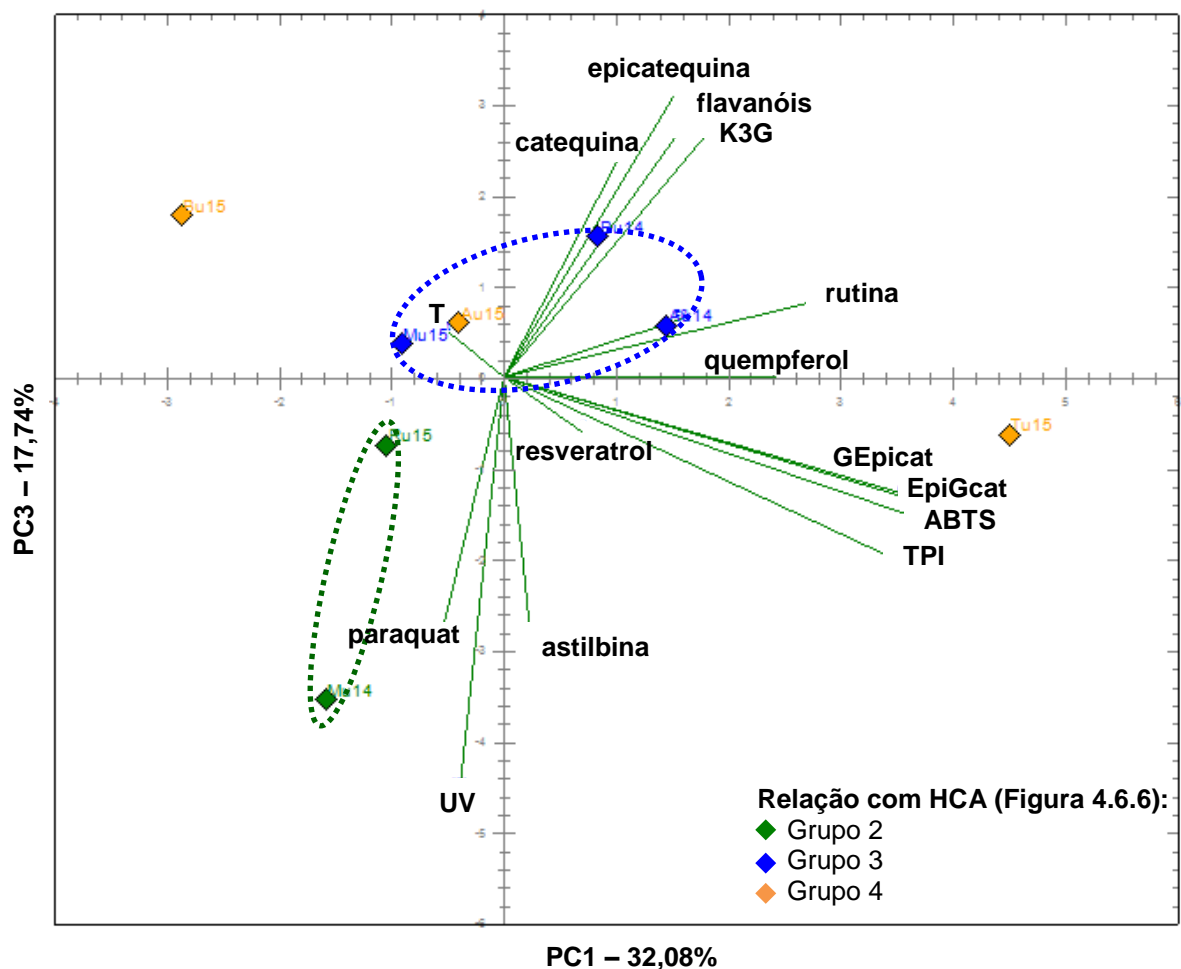


Figura 4.6.7. Gráfico de escores e pesos por PCA (1 e 3, variância explicada = 49,82%) obtido para os teores de fenóis bioativos de oito amostras de uvas *Vitis vinifera* L. tintas da Campanha Gaúcha. Pesos dos parâmetros analíticos (–): *trans*-resveratrol, quempferol, rutina, astilbina, (+)-catequina, (-)-epicatequina, galato de (-)-epicatequina (GEpicat), (-)-epigalocatequina (EpiGcat), quempferol-3-O-glicosídeo (K3G), quercetina-3-O-glicosídeo (Q3G), parâmetros gerais (TPI, DPPH e ABTS) e sobrevivência de nematoides frente aos estresses oxidativos (paraquat, UV e temperatura “T”). Descrições das amostras conforme Tabela I, em Anexo.

Um segundo agrupamento foi observado na Figura 4.6.7, composto pelas amostras do terceiro grupo do HCA, influenciadas por sua maior atividade antioxidante em nematoides frente ao estresse por alta temperatura. Os compostos fenólicos predominantes nessas amostras são os flavanóis, como a (+)-catequina e a (-)-epicatequina. Os valores de TPI e atividade antioxidante *in vitro* (DPPH e ABTS) não apresentaram relação com a atividade antioxidante *in vivo*. Além disso, apesar de inúmeros estudos comprovando a alta atividade antioxidante do *trans*-resveratrol (ANDROUTSOPOULOS et al., 2011; BELLINA et al., 2015; CUSHMAN et al., 1991;

KIM e HE, 2013; MIKSTACKA et al.; 2014; NGUYEN et al., 2009; PETTIT et al., 2009; POTTER et al., 2002a), não foi identificada alta correlação deste estilbeno com a atividade antioxidante *in vivo* realizada no presente estudo. Entre as amostras com maior atividade biológica, apenas a Au14 apresentou teor elevado de *trans*-resveratrol. Tal observação indica que uvas e vinhos podem conter outros compostos fenólicos com potência e eficácia igual ou superior àquelas relacionadas ao *trans*-resveratrol.

De forma geral, a astilbina, principalmente, e os flavanóis podem ser os mais potentes e eficazes como antioxidantes entre os fenóis bioativos dosados. Outra possibilidade é que esses fenóis, inclusive outros que não tenham sido dosados no presente estudo, atuem em sinergia. O *trans*-resveratrol e quercetina vêm sendo amplamente estudados e, inclusive, há modificações moleculares como propostas de novos fármacos anticâncer (MCNULTY e DAS, 2009; MORO; CARDOSO; CORREIA, 2008; POTTER et al., 2002a; SHI et al., 2014; ZAMIN et al., 2009). Entretanto, poucos estudos foram realizados com a astilbina nesse sentido. Em uvas, a concentração desse fenol é elevada com podridão causada pelo fungo *Botrytis cinerea*, indicando a sua atividade para a defesa da planta ao ataque de patógenos (LANDRAULT et al., 2002). Alguns doseamentos de astilbina foram realizados em uvas e vinhos, mas sem avaliação da atividade relacionada a humanos (FIGUEIREDO-GONZÁLEZ; CANCHO-GRANDE; SIMAL-GÁNDARA, 2013; LANDRAULT et al., 2002). Alguns estudos indicam que esse flavanonol apresenta atividades antioxidante, imunossupressora, antidepressiva e antibacteriana (HUANG et al., 2011; LV et al., 2014; MOULARI et al., 2006; YI et al., 2008; ZHANG; ZHANG; CHEUNG, 2009). Um mecanismo de síntese já foi proposto para a astilbina (OHMORI; OHRUI; SUZUKI, 2000), mas não foram encontrados estudos com derivados de sua molécula com a finalidade de aumentar sua potência ou eficácia. Portanto, tal fenol pode ser promissor para uso como modelo para modificações moleculares em química medicinal.

4.6.5. Conclusões

Vinhos de novas variedades potenciais da Campanha Gaúcha foram avaliados em conjunto com suas uvas de origem, mediante determinação do teor de fenóis bioativos, capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Os parâmetros gerais (TPI, DPPH e ABTS) apresentam alta correlação entre uvas e vinhos correspondentes. Elevados

teores de galato de (-)-epicatequina em uvas também podem predizer a obtenção de vinhos com alto potencial fenólico. A determinação desses parâmetros em uvas pode ser utilizada como suporte para a tomada de decisões em vitivinicultura, objetivando, principalmente, a obtenção de vinhos com elevado teor de fenóis bioativos.

Foram constatadas correlações altas de astilbina e moderada de flavanóis com a atividade antioxidante avaliada no modelo *C. elegans*. Os flavanóis com maior contribuição foram: (+)-catequina, (-)-epicatequina e (-)-epigallocatequina. Assim, tais fenóis bioativos, com ênfase para a astilbina, são promissores para investigações como modelos na química medicinal, em patologias relacionadas ao efeito oxidativo.

5. DISCUSSÃO GERAL

Na presente tese, foram desenvolvidos e aplicados métodos analíticos por LC para o doseamento de compostos fenólicos, bem como foi avaliada a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de uvas e vinhos da Campanha Gaúcha. As principais áreas de conhecimento utilizadas foram: Química Analítica, Química Orgânica, Quimiometria, Biologia, Enologia, Farmacologia e Estatística.

Os procedimentos necessários para a realização de cada método e os fenóis bioativos analisáveis por cada um deles são resumidos na Tabela 5.1. Nas primeiras tentativas de elaboração de métodos analíticos, foram priorizados procedimentos mais simples e com análise direta da amostra. Com esse propósito, foram desenvolvidos e validados dois métodos: HPLC-DAD e HPLC-DAD II.

O primeiro método proposto, por HPLC-DAD, possibilitou a determinação quantitativa de *trans*-resveratrol e quercetina de forma rápida e apresentou baixo consumo de solventes. Esse método também pode ser realizado em equipamento HPLC com detector UV/Vis com dois canais para a seleção de comprimentos de onda, pois apenas dois compostos com λ_{\max} diferentes são dosados.

O método HPLC-DAD II constou da determinação de seis marcadores da presença de fenóis bioativos, ou seja, flavonóis e estilbenos (*trans*-resveratrol, *trans*- ϵ -viniferina, quempferol, quercetina e miricetina), bem como o seu precursor ácido *trans*-cinâmico. Esse método também utilizou HPLC-DAD, mas com um tempo de análise maior (30 minutos), possibilitando a determinação seletiva dos analitos. Para esse caso, a seletividade de picos foi verificada com auxílio de QTOF, uma vez que as antocianinas demonstraram alta interferência nos compostos de interesse. HPLC-DAD II foi aplicado à análise de cascas de uvas, cujos compostos fenólicos foram extraídos por solução hidroalcoólica.

Outros métodos para a análise de tais compostos constam na literatura, mas apresentam enfoques diferentes dos reportados neste trabalho (Tabela 3.2). Esses dois métodos por HPLC-DAD, disponibilizados nesta tese, apresentam vantagens frente aos anteriores: mais curtos, validação completa, aplicados em amostras reais, com simples preparo de amostra (injeção direta) e uso de HPLC-DAD, um equipamento mais disponível do que o UPLC em laboratórios brasileiros.

Tabela 5.1. Resumo de métodos desenvolvidos por LC para análises de compostos fenólicos em amostras de vinhos.

Método	HPLC-DAD - 10 min	HPLC-DAD II - 30 min (seis fenóis)	HPLC-DAD II - 30 min (oito fenóis)	UPLC-MS
Condição				
Estoque de padrões	Solução diluída em meio		Solução diluída em EtOH 70% v/v	
Padrões de trabalho	sintético de vinho		Soluções diluídas em MeOH 30% v/v	
Preparo de amostra para injeção	Filtração PVDF 0,45 µm		- Limpeza com cartucho de SPE (SCX): condicionamento (1 mL de MeOH + 1 mL água ultrapura) e eluição (1 mL de amostra + 1 mL de MeOH com HCl 0,1% v/v); - Filtração PVDF 0,45 µm (HPLC) ou 0,22 µm (UPLC).	
Pré-coluna	Fase estacionária C8 (Phenomenex)			Fase estacionária C18 (Waters)
Coluna	C8 VertiSep UPS (Vertical), 4,6 x 150 mm Tamanho de partícula 5 µm e tamanho de poro de 100 Å			C18 BEH (Waters), 2,1 x 50 mm Tamanho de partícula 1,7 µm e tamanho de poro de 100 Å
Fase móvel A	Ácido fórmico 0,1% v/v, diluído em água ultrapura			
Fase móvel B	Ácido fórmico 0,1% v/v, diluído em MeOH	Ácido fórmico 0,1% v/v, diluído em MeOH 90% v/v		
Gradiente linear	0 a 5 min: 50% de B; 7 a 8 min: 70% de B; 9 a 10 min: 50% de B	0 a 7 min: 30 a 45% B; 7 a 14 min: 45% B; 14 a 15 min: 45 a 55% B; 15 a 20 min: 55 a 60% B; 20 a 24 min: 60 a 65% B; 24 a 25: 65 a 90% B; 25 a 27 min: 90% B; 27 a 27,5 min: 90 a 30% B; 27,5 a 30 min: 30% B		0 a 2,5 min: 30 a 65% B; 2,5 a 3,0 min: 65 a 90% B; 3,0 a 3,8 min: 90% B; 3,8 a 4,0 min: 90 a 30% B; 4,0 a 5,0 min: 30% B
Volume de injeção	20 µL			5 µL
Fluxo	1,0 mL min ⁻¹			0,3 mL min ⁻¹
Deteção	DAD (λ_{\max} de cada fenol): 306 nm (<i>trans</i> -resveratrol) 371 nm (quercetina) Obs.: Substituível por detector UV/Vis com dois canais	DAD (λ_{\max} de cada fenol): 276 nm (ácido cinâmico) 306 nm (<i>trans</i> -resveratrol) 322 nm (<i>trans</i> - ϵ -viniferina) 365 nm (quempferol) 371 nm (quercetina) 374 nm (miricetina)	DAD (λ_{\max} de cada fenol): 276 nm (ácido cinâmico) 288 nm (taxifolina) 306 nm (<i>trans</i> -resveratrol e <i>trans</i> -piceído) 322 (<i>trans</i> - ϵ -viniferina) 365 nm (quempferol) 371 nm (quercetina) 374 nm (miricetina)	MS nos modos ESI ⁺ e ESI ⁻ (conforme massa molecular de cada fenol): 18 fenóis (quantitativamente) e 19 (qualitativamente) fenóis, com possibilidade de inclusão de outros fenóis Obs.: Substituível por detector MS/MS
Tempo de análise em equipamento (min)	10	30	30	5
Número de análises por jornada (8h)	42	14	14	84

Além desses métodos, foi encontrada uma alternativa para o preparo de amostras com intenção de remover as antocianinas interferentes na análise de fenóis bioativos. Então, foi utilizado um cartucho do tipo SCX, o qual retém as antocianinas, que são carregadas positivamente em meio ácido, e permite a passagem dos analitos, que são neutros nesse pH. Assim, foi possível ampliar o número de fenóis bioativos detectáveis e quantificáveis por HPLC-DAD II de seis para oito e com grande potencial para determinações mais avançadas com o uso de UPLC-MS. Adicionalmente, esse preparo de amostras com SCX poderá ser adaptado para análises através de outros métodos de HPLC-DAD publicados anteriormente com injeção direta (CARERI et al., 2003; CASTELLARI et al., 2002; PEREIRA et al., 2010). Nesses casos, é esperado o aumento do número de compostos quantificáveis, devido à eliminação de antocianinas.

Além de vinhos, o método por UPLC-MS possibilitou a análise de compostos fenólicos de cascas de uvas, os quais foram extraídos em solução hidroalcoólica. Existem alternativas para essa limpeza de amostras de vinhos tintos, com uso de fase reversa, troca aniônica ou extração líquido-líquido. Entretanto, a maioria desses métodos é laboriosa, consome grande quantidade de solventes ou apresenta baixos rendimentos (FIGUEIREDO-GONZÁLEZ; CANCHO-GRANDE; SIMAL-GÁNDARA, 2014; GUILLÉN; BARROSO; PÉREZ-BUSTAMANTE, 1996; GUILLÉN et al., 1997; LORRAIN et al., 2013; MATTIVI, 1993; PÉREZ-MAGARINO; ORTEGA-HERAS; CANO-MOZO, 2008; SILVA et al., 2011; VILLIERS et al., 2004).

Assim, nesta tese são disponibilizadas diferentes possibilidades para o controle de qualidade de uvas e vinhos brasileiros através de determinações de compostos fenólicos bioativos. Um fluxograma para a seleção do método adequado para o doseamento de compostos fenólicos em vinhos tintos é apresentado na Figura 5.1. O método por HPLC-DAD de 10 min é o mais simples e de menor custo, enquanto o método por UPLC-MS é o mais seletivo e sensível, possibilitando a realização de análise simultânea de vários fenóis bioativos em amostras de uvas e vinhos. O equipamento de UPLC-MS é vantajoso frente aos de HPLC-DAD nos aspectos: redução do tempo das análises (84 análises por jornada de oito horas), redução do volume de solventes, maior sensibilidade e seletividade para possibilitar a validação dos métodos analíticos.

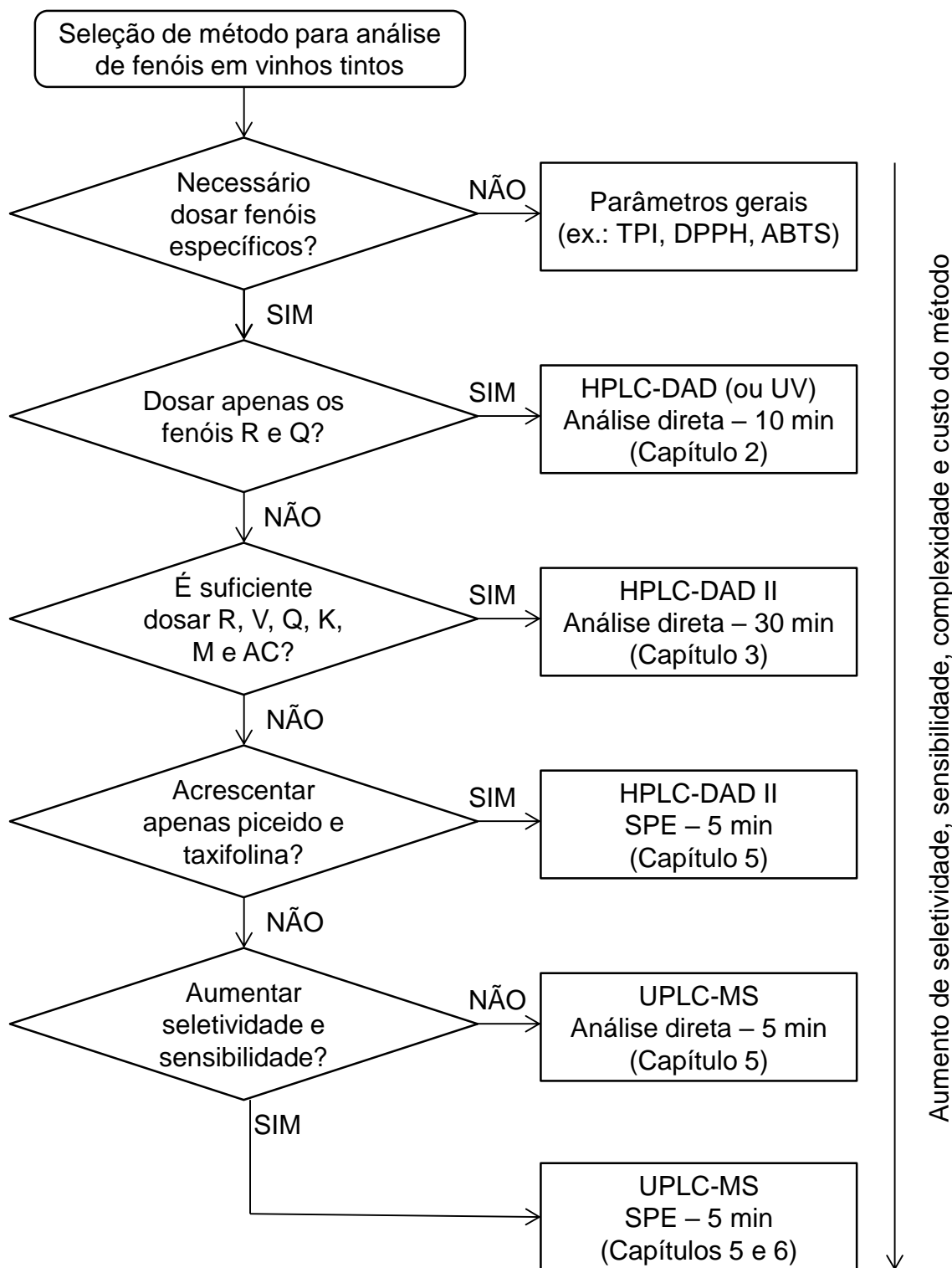


Figura 5.1. Fluxograma para seleção de método por LC para análise de fenóis bioativos em vinhos finos tintos. Fenóis: *trans*-resveratrol (R), quercetina (Q), *trans*- ϵ -viniferina (V), quempferol (K), miricetina (M) e ácido *trans*-cinâmico (AC).

Dessa forma, o método de HPLC-DAD II, desenvolvido para o doseamento de seis fenóis bioativos, foi utilizado para analisar 87 amostras de vinhos finos tintos comerciais e experimentais da Campanha Gaúcha. Mediante aplicação desse método, foram obtidas as primeiras informações sobre o perfil de compostos fenólicos de vinhos da região, contribuindo para a constituição de um banco de dados, o qual deverá ser ampliado com amostras das safras seguintes. Tais dados contribuem para a classificação das diferentes variedades da região e, conseqüentemente, poderão fortalecer o pedido de elevação da região ao *status* de região delimitada com Indicação de Procedência ao INPI.

Os vinhos da Campanha Gaúcha com teores de fenóis bioativos mais elevados foram: Arinarnoa, Marselan, Rebo, Syrah, Tempranillo, Teroldego, Lambrusco Grasparossa, Lambrusco Salamino, Pinot Noir e Ruby Cabernet. Poucas amostras das quatro últimas variedades foram avaliadas na tese, mas devido ao seu destaque merecem ser exploradas em estudos posteriores para avaliar os seus potenciais enológicos. Os vinhos com maior teor de compostos fenólicos foram predominantemente da Campanha Central, experimentais e da safra de 2013. Os valores obtidos para tais vinhos foram, de forma geral, iguais ou superiores a estudos para vinhos de outras regiões (CARERI et al., 2003; CASTELLARI et al., 2002; FANG et al., 2007; FONTANA e BOTTINI, 2014).

Os dados referentes ao doseamento de seis fenóis bioativos, por HPLC-DAD II, possibilitaram a classificação de 71 amostras de vinhos tintos finos da Campanha Gaúcha, principalmente quanto ao processo de elaboração (experimental ou comercial), mas também quanto às variedades e microrregiões de procedência das uvas. Os agrupamentos mais adequados foram obtidos para os vinhos experimentais, uma vez que o método de vinificação é padronizado.

Os métodos de HPLC-DAD II e UPLC-MS desenvolvidos também foram utilizados para o doseamento de compostos fenólicos em uvas e vinhos de novas variedades potenciais da região da Campanha Gaúcha. Esse experimento possibilitou a averiguação das correlações entre os fenóis de uvas e vinhos correspondentes. Tais resultados confirmaram estudos anteriores, nos quais as uvas apresentavam majoritariamente fenóis sacarídicos e os vinhos fenóis livres (ANDERSEN e MARKHAM, 2006; CRESPIY et al., 1999; CROZIER; CLOFFORD; ASHIHARA, 2006).

Os resultados elevados de galato de (-)-epicatequina, TPI, DPPH e ABTS em uvas foram determinantes para a obtenção de vinhos com maior teor de compostos fenólicos. Assim, as determinações de fenóis específicos e os parâmetros gerais para a avaliação dos mesmos podem ser úteis para a estimativa do potencial de uvas para a elaboração de vinhos. Tal ferramenta pode ser utilizada como subsídio para decisões, como período de colheita de uvas ou processos de vinificação adequados para cada matéria-prima.

Foi realizada, ainda, uma avaliação inédita da atividade antioxidante de uvas e vinhos em nematoides. As amostras das variedades Arinarnoa, Barbera, Marselan e Rebo, principalmente das uvas, aumentaram o percentual de sobrevivência dos nematoides submetidos às situações de estresse oxidativo. As amostras que se destacaram nesse sentido continham simultaneamente teores elevados de astilbina e flavanóis (+)-catequina, (-)-epicatequina e (-)-epigallocatequina.

Contribuindo para futuras pesquisas, os métodos disponibilizados nesta tese poderão ser utilizados para análises de amostras de uvas e vinhos de outras regiões brasileiras com potencial enológico. Assim, será possível realizar comparações entre safras e avaliar variedades com alto teor de fenóis bioativos para diferentes regiões vitivinícolas brasileiras.

6. CONCLUSÕES

Mediante avaliação dos resultados expostos nesta tese, é possível concluir:

- São disponibilizados métodos, com diferentes enfoques, para análises de fenóis bioativos em amostras de uvas e vinhos por HPLC-DAD e UPLC-MS.
- O método por HPLC-DAD, com análise direta de amostra, para análise de *trans*-resveratrol e quercetina, marcadores da presença de fenóis, pode ser utilizado como uma maneira rápida para a avaliação de amostras de vinhos.
- O método para o doseamento (HPLC-DAD II) de seis estilbenos e flavonóis (ácido *trans*-cinâmico, *trans*-resveratrol, *trans*- ϵ -viniferina, quercetina, quempferol e miricetina), com análise direta de amostra, pode ser utilizado quando for necessária uma estimativa das rotas metabólicas ativas das videiras em estudo e, assim, avaliar amostras de uvas e vinhos.
- O método de preparo de amostras com extração em fase sólida, do tipo troca catiônica forte, possibilita a remoção das antocianinas de vinhos, que são as principais interferentes na determinação dos fenóis bioativos objeto deste trabalho.
- É possível analisar um maior número de fenóis bioativos por HPLC-DAD (método II) ou UPLC-MS em amostras de uvas e vinhos previamente processadas por troca catiônica forte.
- A técnica por UPLC-MS, associada ao preparo de amostras por troca catiônica forte possibilita a ampliação do número de compostos fenólicos dosáveis, aumenta a seletividade e sensibilidade do método e confere agilidade para a realização das análises.
- Com o uso da metodologia desenvolvida e validada (HPLC-DAD II) foi possível dosar seis fenóis bioativos em 87 amostras de vinhos tintos da região da Campanha Gaúcha e classificar 71 delas.
- Os teores mais elevados de fenóis bioativos foram encontrados nos vinhos das variedades Arinarnoa, Marselan, Rebo, Syrah, Tempranillo e Teroldego da Campanha Gaúcha.
- A maioria dos vinhos provenientes da microrregião da Campanha Central e da safra de 2013 apresentou alto teor de fenóis bioativos.

- Uvas e respectivos vinhos experimentais da Campanha Gaúcha apresentaram correlações através do teor de galato de (-)-epicatequina, TPI, DPPH e ABTS.
- Mediante avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de uvas e vinhos de novas variedades da Campanha Gaúcha, foi possível verificar os compostos fenólicos com maior contribuição para esse efeito, como a astilbina e flavanóis.
- A caracterização de fenóis bioativos em uvas e vinhos da Campanha Gaúcha fornece subsídios para estratégias de ações de desenvolvimento da região. Os resultados poderão ser incorporados em projetos mais amplos da EMBRAPA Uva e Vinho para a solicitação de Indicação de Procedência.

7. REFERÊNCIAS

ABE, L.T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 394-400, 2007.

ABE. Associação Brasileira de Enologia. **Fases da Vitivinicultura**. Bento Gonçalves, 2011. Disponível em: <<http://www.enologia.org.br/component/kd2/item/43>>. Acesso em: 28 jun. 2016.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 17025**: requerimentos gerais para laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005.

ADRIAN M. et al. Assay of resveratrol and derivative stilbenes in wines by direct injection high performance liquid chromatography. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 51, n. 1, p. 37-41, 2000.

ALVES, C.Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 1-14, 2010.

ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R. **Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications**. Londres: Taylor & Francis, 2006. 1197 p.

ANDROUTSOPOULOS, V.P. et al. Anticancer effects of the metabolic products of the resveratrol analogue, DMU-212: structural requirements for potency. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 2586-2595, 2011.

AZNAR, O. et al. Determination of polyphenols in wines by liquid chromatography with UV spectrophotometric detection. **Journal of Separation Science**, v. 34, p. 527-535, 2011.

BAPTISTA, J.A.B.; TAVARES, J.F.P.; CARVALHO, R.C.B. Comparison of polyphenols and aroma in red wines from Portuguese mainland *versus* Azores Islands. **Food Research International**, v. 34, n. 4, p. 345-355, 2001.

BARJOT, C.A. et al. Evaluation of antitumor effects of two vine stalk oligomers of resveratrol on a panel of lymphoid and myeloid cell lines: comparison with resveratrol. **Life Sciences**, v. 81, p. 1565-1574, 2007.

BASS, T.M. et al. Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128, p. 546-552, 2007.

BBSRC Institute of Food Research. **NOTISPLUS**: A Database of Bioactive Compounds Found in Food Plants, 2016. Disponível em: <<http://www.ifr.ac.uk/search/?csrfmiddlewaretoken=qmwe9A18GA0wXXJwueLejtSyYTt753eX&q=Bioactive+Compounds+Found+in+Food+Plants>>. Acesso em: 6 jun. 2016.

BEHLING, E.B. et al. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BELLINA, F. et al. Imidazole analogues of resveratrol: synthesis and cancer cell growth evaluation. **Tetrahedron**, v. 71, p. 2298-2305, 2015.

BISHAYEE, A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. **Cancer Prevention Research**, v. 2, n. 5, p. 409-418, 2009.

BOULTON, R.B. et al. **Principles and practices of winemaking**. Nova Iorque: The Chapman & Hall Enology Library, 1996. 604 p.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, n. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária – MAPA. **Portaria nº 270, de 17 de novembro de 1988**. Altera os grupos de variedades constantes do Artigo 4º das Normas e Padrões de Qualidade da Uva para fins industriais, aprovadas pela Portaria MA nº 1012, de 17 de Novembro de 1978. Diário Oficial da União: Brasília, 24 nov. 1988.

BRASIL. Casa Civil - Subchefia para Assuntos Jurídicos. **Lei nº 9.279, de 14 de maio de 1996**. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. Diário Oficial da União: Brasília, 14 maio 1996.

BRASIL. Casa Civil - Subchefia para Assuntos Jurídicos. **Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998**. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Diário Oficial da União: Brasília, 7 fev. 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003**. Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União: Brasília, 2 jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária – MAPA. **Lei nº 10.970, de 12 de novembro de 2004**. Altera dispositivos da Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. Diário Oficial da União: Brasília, 16 nov. 2004.

BRASIL. Casa Civil - Subchefia para Assuntos Jurídicos. **Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008**. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da União: Brasília, 9 out. 2008.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. **Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014**. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências. Diário Oficial da União: Brasília, 4 jul. 2014.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, p. 71-94, 1994.

BURNS, J. et al. Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 220-230, 2000.

CAMARGO, U.A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN A. Progressos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. E., p.144-149, 2011.

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

CARERI, M. et al. Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of *cis*-resveratrol and *trans*-resveratrol: development, validation, and application of the method to red wine, grape, and winemaking byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6868-6874, 2004.

CARRERA, C. et al. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. **Analytica Chimica Acta**, v. 732, p. 100-104, 2012.

CASTELLARI, M. et al. Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. **Journal of Chromatography A**, v. 973, p. 221-227, 2002.

CHAMKHA, M. et al. Phenolic composition of champagnes from chardonnay and pinot noir vintages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3179-3184, 2003.

CHEN, L. et al. *Trans*-3,4,5,4'-tetramethoxystilbene, a resveratrol analog, potently inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, p. 1174-1182, 2013a.

CHEN, W.; REZAIZADEHNAJAFI, L.; WINK, M. Influence of resveratrol on oxidative stress resistance and life span in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, p. 682-688, 2013b.

CHUDZINSKA, M.; BARALKIEWICZ, D. Estimation of honey authenticity by multielements characteristics using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) combined with chemometrics. **Food Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 284-90, 2010.

CIELECKA-PIONTEK, J. et al. UHPLC: the greening face of liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 76, p. 1429-1437, 2013.

CORREIA, P.R.M.; FERREIRA, M.M.C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.

CORREIA, M.M.C. **Quimiometria**: conceitos, métodos e aplicações. 1. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2015. 496 p.

- COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, n. 4-5, p. 217-246, 2001.
- COTEA, V.V. et al. Mesoporous silica SBA-15, a new adsorbent for bioactive polyphenols from red wine. **Analytica Chimica Acta**, v. 732, p. 180-185, 2012.
- CREASY, G.L.; CREASY, L.L. **Grapes**: Crop production science in horticulture series, 16. Reino Unido: MPG Books Group, 2009. 295 p.
- CRESPY, V. et al. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. **American Journal of Physiology**, v. 277, p. 120-126, 1999.
- CRESPY, V.; MORAND, C.; MANACH, C.; BESSON, C.; DEMIGNE, C.; REMESY, C. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 618-621, 2002.
- CROZIER, A.; CLOFFORD M.N.; ASHIHARA H. **Plant secondary metabolites**: occurrence, structure and role in the human diet. Oxford: Blackwell, 2006. 713. p.
- CULETTO, E.; SATTELLE, D.B. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 6, p. 869-877, 2000.
- CUSHMAN, M. et al. Synthesis and evaluation of stilbene and dihydrostilbene derivatives as potential anticancer agents that inhibit tubulin polymerization. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 34, p. 9-25, 1991.
- DELTEIL, D. Esempi di itinerari completi di vinificazione e affinamento in barrique di due vini rossi. **Vinidea Net**, n. 5, p. 1-9, 2004.
- DI STEFANO, R. et al. Nouvelles techniques de vinification dans les vins rouges. **Vinidea Net**, n. 1, p. 1-10, 2003.
- DONNEZ, D. et al. Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 706-713, 2009.
- DUEÑAS, M. et al. Deglycosylation is a key step in biotransformation and lifespan effects of quercetin-3-O-glucoside in *Caenorhabditis elegans*. **Pharmacological Research**, v. 76, p. 41-48, 2013.
- FANG, F. et al. Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. **Food Chemistry**, v. 101, p. 428-433, 2007.
- FANZONE, M. et al. Phenolic characterization of malbec wines from Mendoza province (Argentina). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2388-2397, 2010.
- FDA. US Food and Drug Administration (2001). **Guidance for industry**: bioanalytical method validation. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance>

ComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>. Acesso em: 28 jun 2016.

FDA. US Food and Drug Administration (2001). **Guidance for industry: bioanalytical method validation**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>>. Acesso em: 28 jun. 2016.

FERNÁNDEZ-MAR, M.I. et al. Bioactive compounds in wine: resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: a review. **Food Chemistry**, v. 130, p. 797-813, 2012.

FERREIRA, M.M.C. Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações. Campinas: Editora da Unicamp, 2015. 496 p.

FERRER-GALLEGO, R. et al. Influence of climatic conditions on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv. Graciano. **Analytica Chimica Acta**, v. 732, p. 73-77, 2012.

FIGUEIREDO-GONZÁLEZ, M.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA, J. Effects on colour and phenolic composition of sugar concentration processes in dried-on- or dried-off-vine grapes and their aged or not natural sweet wines. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, p. 36-54, 2013.

FIM. The Foundation for Innovation in Medicine. **Nutraceutical research and education act**. Disponível em: <<http://www.fimdefelice.org/p2455.html>>. Acesso em: 26 jun. 2016.

FINLEY, J.W. et al. Antioxidants in foods: state of the science important to the food Industry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 59, p. 6837-6846, 2011.

FLAMINI, R. et al. Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. **International Journal of Molecular Science**, v. 14, p. 19651-19669, 2013.

FONTANA, A.R.; BOTTINI, R. High-throughput method based on quick, easy, cheap, effective, rugged and safe followed by liquid chromatography-multi-wavelength detection for the quantification of multiclass polyphenols in wines. **Journal of Chromatography A**, v. 1342, p. 44-53, 2014.

FORTENBERRY, G.Z. et al. Magnitude and characteristics of acute paraquat- and diquat-related illnesses in the US: 1998–2013. **Environmental Research**, v. 146, p.191-199, 2016.

FREITAS, V.; MATEUS, N. Formation of pyranoanthocyanins in red wines: a new and diverse class of anthocyanin derivatives. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 5, p. 1463-1473, 2011.

GARCÍA-MARINO, M. et al. Multivariate analysis of the polyphenol composition of Tempranillo and Graciano red wines. **Talanta**, v. 85, p. 2060-2066, 2011.

GASSNIER, V. **O livro do vinho**. 2. ed. São Paulo: Publifolha, 2013. 352 p.

GENOMENET. Disponível em: <<http://www.genome.jp/>>. Acesso em: 28 jun. 2016.

GIEHL, M.R. et al. Eficácia dos flavonoides da uva, vinho tinto e suco de uva tinto na prevenção e no tratamento secundário da aterosclerose. **Scientia Medica**, v. 17, n. 3, p. 145-155, 2007.

GMC. Grupo Mercado Comum (1996). **Resolução 45/96**: reglamento vitivinícola del Mercosur. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/downloads/1379426438.pdf>>. Acesso em: 13 jul. 2016.

GONZÁLEZ-NEVES, G. et al. Phenolic potential of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 191-196, 2004.

GORDILLO, B. et al. Application of LC–MS and tristimulus colorimetry to assess the ageing aptitude of Syrah wine in the Condado de Huelva D.O. (Spain), a typical warm climate region. **Analytica Chimica Acta**, v. 732, p. 162-171, 2012.

GUEBAILIA, H.A. et al. Hopeaphenol: the first resveratrol tetramer in wines from North Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9559-9564, 2006.

GUERRA, C.C. **Recherches sur les interactions anthocyanes-flavanols: application à l'interprétation chimique de la couleur des vins rouges**. Doctorat en Sciences Biologiques et Médicales, option oenologie et ampélogie. Université de Bordeaux II. 1997, 164 p.

GUERRA, C.C.; PEREIRA, G.E.; ZANUS, M.C. Influence de certaines techniques dans la vinification classique sur la qualité chimique et sensorielle du vin rouge. In: DEUTSCHER WEINBAUKONGRESS, 59.; INTERNATIONALES SYMPOSIUM INNOVATIONEN DER KELLERWIRTSCHAFT, 8., 2007, Stuttgart. Bonn: Deutscher Weinbauverband. **Resumo**. 2007. Não paginado.

GUERRA, C.C.; TONIETTO, J.; MION-GUGEL, G. Potentiel oenologique de raisins rouges: encépagement et origine géographique des vignobles. In: CONGRÉS INTERNATIONAL DES TERROIRS VITICOLES, 7., 2008, Nyon. **Comptes rendus**, Pully: Agroscope Changins Wädenswill, 2008b. p.300-306.

GUERRA, C.C.; ZUCOLOTTO, M.; TONIETTO, J. Profil chimique et sensoriel de vins rouges brésiliens selon le cépage et l'origine géographique des vignobles. In: CONGRÉS INTERNATIONAL DES TERROIRS VITICOLES, 7., 2008, Nyon. **Comptes rendus**, Pully: Agroscope Changins Wädenswill, 2008b. p.493-499.

GUERRA, C.C. et al. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. doc. 48. Junho, 2009.

GUERRA, C.C. Vinho tinto. In: VENTURINI FILHO, W.G. (Org.), **Bebidas alcoólicas: Ciência e tecnologia**. 1st ed. São Paulo: Blucher, Cap. 11. p. 209-233, 2010.

GUERRA, C.C. **Sustentabilidade da produção de vinhos brasileiros: tecnologias para novas regiões vitivinícolas de clima tropical e temperado.** Projeto MP2. Chamada 14/2013. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 2014.

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.

GUILLÉN, D.A. et al. Solid-Phase Extraction for Sample Preparation, in the HPLC Analysis of Polyphenolic Compounds in “Fino” Sherry Wine. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p. 403-406, 1997.

HASDAY, J.D.; SINGH, I.S. Fever and the heat shock response: distinct, partially overlapping processes. **Cell Stress & Chaperones**, v. 5, n. 5, p. 471-480, 2000.

HELPER, G.A. et al. ChemoStat, um software gratuito para análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 38, p. 1-24, 2015.

HENRICSON, A. et al. Functional characterization in *Caenorhabditis elegans* of transmembrane worm-human orthologs. **BMC Genomics**, v. 5, n. 85, p. 1-18, 2004.

HOSAMANI, R.; KRISHNA, G.; MURALIDHARA. Standardized *Bacopa monnieri* extract ameliorates acute paraquat-induced oxidative stress, and neurotoxicity in prepubertal mice brain. **Nutritional Neuroscience**, v. 0; p. 1-13, 2014.

HOSSAIN, M. et al. Application of principal component and hierarchical cluster analysis to classify different spices based on *in vitro* antioxidant activity and individual polyphenolic antioxidant compounds. **Journal of Functional Foods**, v. 3, p. 179-189, 2011.

HOSSION, A.M.L. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of a novel series of quercetin diacylglucosides as potent anti-MRSA and anti-VRE agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 5349-5352, 2010.

HUANG, J. et al. Effects of genistein, apigenin, quercetin, rutin and astilbin on serum uric acid levels and xanthine oxidase activities in normal and hyperuricemic mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1943-1947, 2011.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Atlas nacional do Brasil**. 3.ed. Rio de Janeiro: IBGE, 2000. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv47603_cap4_pt4.pdf>. Acesso em: 25 maio 16.

IMAI, K. et al. Synthesis and radical-scavenging activity of a dimethyl catechin analogue. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 1, p. 2582-2584, 2014.

INPI. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. **Indicação geográfica no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br/menu-servicos/indicacao-geografica/indicacao-geografica-no-brasil>>. Acesso em: 28 jun. 2016.

ISO. International Organisation for Standardisation. **ISO/IEC17025**: general requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva. 2005.

JACKSON, R.S. **Wine science**: principles and applications. 3. ed. California: Academ in Press, 2008. 751 p.

JARA-PALACIOS, M.J. et al. Study of Zalema grape pomace: phenolic composition and biological effects in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 5114-5121, 2013.

JNC7. **The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure**. Estados Unidos da América, United States Department of Health and Human Services, 2004.

KAMPKOTTER, A. et al. Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. **Toxicology**, v. 234, p. 113-123, 2007.

KAMPKÖTTER, A. et al. Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 149, p. 314-323, 2008.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for pharmaceutical scientists**. Nova Jersey: Wiley-Interscience, 2007. 1140 p.

KEREM, Z. et al. Rapid liquid chromatography-ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must. **Journal of Chromatography A**, v. 1052, p. 211-215, 2004.

KILIÇGÜN, H.; ARDA, N.; UÇAR, E.Ö. Identification of longevity, fertility and growth-promoting properties of pomegranate in *Caenorhabditis elegans*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 42, p. 356-359, 2015.

KIM, I.H.; HE, A. Targeting the AMP-activated protein kinase for cancer prevention and therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 3, p. 1-12, 2013.

KUHN, G.B. et al. **O cultivo da videira**: informações básicas. 2. ed. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPV, 1996. 60 p. (Circular Técnica 10).

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. **Robbins Patologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 912 p.

LANDRAULT, N. et al. Levels of stilbene oligomers and astilbin in french varietal wines and in grapes during noble rot development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 50, p. 2046-2052, 2002.

LI, C. et al. Comparison and analysis of fatty acids, sterols, and tocopherols in eight vegetable oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 23, p. 12493-12498, 2011.

LIMA, M.T.R. et al. Determination of stilbenes (*trans*-astringin, *cis*- and *trans*-piceid, and *cis*- and *trans*-resveratrol) in Portuguese wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 2666-2670, 1999.

LIMA, M.E. et al. *Ilex paraguariensis* extract increases lifespan and protects against the toxic effects caused by paraquat in *Caenorhabditis elegans*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, p. 10091-10104, 2014.

LIMA, M.S. et al. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced in industrial scale by different processes of maceration. **Food Chemistry**, n. 188, p. 384-392, 2015.

LONA, A.A. **Vinhos e espumantes: degustação, elaboração e serviço**. Porto Alegre: Age, 2009. 203 p.

LOPES-LUTZ, D. et al. Characterization and quantification of polyphenols in Amazon grape (*Pourouma cecropiifolia* Martius). **Molecules**, n. 15, p. 8543-8552, 2010.

LÓPEZ, M. et al. Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 922, p. 359-363, 2001.

LORRAIN, B.; KY, I.; PECHAMAT, L.; TEISSEDRE, P. Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines, and extracts. **Molecules**, v. 18, p. 1076-1100, 2013.

LV, Q.Q. et al. Antidepressant activity of astilbin: involvement of monoaminergic neurotransmitters and BDNF signal pathway. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 6, p. 987-995, 2014.

MA, Z. et al. Resveratrol analog *trans* 3,4,5,4-tetramethoxystilbene (DMU-212) mediates anti-tumor effects via mechanism different from that of resveratrol. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 63, p. 27-35, 2008.

MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S.; RAYMOND, J.L. **Krause's food & the nutrition care process**. 13 ed. Missouri: Elsevier, 2012, 1227 p.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MALOVANÁ, S. et al. 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.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Uva**. 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/uva>>. Acesso em: 28 jun. 16.

MATHERS, C.D. et al. Counting the dead and what they died from: an assessment of the global status of cause of death data. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 83, n. 3, p. 171-177, 2005.

- MATTIVI, F. Solid phase extraction of trans-resveratrol from wines for HPLC analysis. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, v. 196, p. 522-525, 1993.
- MCNULTY, J.; DAS, P. Highly Stereoselective and general synthesis of (E)-stilbenes and alkenes by means of an aqueous Wittig reaction. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 4031-4035, 2009.
- MEDINA-LEENDERTZ, S.; PAZ, M.; MORA, M.; BONILLA, E.; BRAVO, Y.; ARCAYA, J.L.; TERÁN, R.; VILLALOBOS, V. Longterm melatonin administration alleviates paraquat mediated oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. **Investigación Clínica**, v. 55, n. 4, p. 352-364, 2014.
- MELLO, L.M.R. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2012**. n. 137. Bento Gonçalves: EMBRAPA, 2013, 5 p. (Comunicado Técnico).
- MIKSTACKA, R. et al. 3,4,2'-Trimethoxy-*trans*-stilbene – a potente CYP1B1 inhibitor. **Medicinal Chemistry Communication**, v. 5, p. 496-501, 2014.
- MIYAGI, Y.; MIWA, K.; INOUE, H. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. **American Journal of Cardiology**, v. 15, n. 80(12), p. 1627-1631, 1997.
- MONAGAS, M. et al. Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 56, p. 139-174, 2005.
- MORO, A.V.; CARDOSO, F.S.P.; CORREIA, C.R.D. Heck arylation of styrenes with arenediazonium salts: short, efficient, and stereoselective synthesis of resveratrol, DMU-212, and analogues. **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 5668-5671, 2008.
- MOULARI, B. et al. Isolation and in vitro antibacterial activity of astilbin, the bioactive flavanone from the leaves of *Harungana madagascariensis* Lam. ex Poir. (Hypericaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 272-278, 2006.
- MUROTA, K.; TERAOKA, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 417, p. 12-17, 2003.
- NGUYEN, A.V. et al. Results of a phase I pilot clinical trial examining the effect of plant-derived resveratrol and grape powder on Wnt pathway target gene expression in colonic mucosa and colon cancer. **Cancer Management and Research**, v. 1, p. 25-37, 2009.
- NIGDIKAR, S.V. et al. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation *in vivo*. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 258-265, 1998.
- OHMORI, K.; OHRUI, H.; SUZUKI, K. First synthesis of astilbin, biologically active glycosyl flavonoid isolated from Chinese folk medicine. **Tetrahedron Letters**, v. 41, p. 5537-5541, 2000.

OIV. International Organization of Vine and Wine. **Resolution OIV/Concours 332A.** OIV standard for international wine and spirituous beverages of vitivinicultural origin competitions. Paris, 2009.

OIV. International Organization of Vine and Wine. **Statistical report on world vitiviniculture.** Paris, 2013.

OIV. International Organization of Vine and Wine. **Compendium of international methods of analysis.** v. 1. Paris, 2016a.

OIV. International Organization of Vine and Wine. **Compendium of international methods of analysis.** v. 2. Paris, 2016b.

OLIVEIRA, J.S.; MARTINEZ, J.F.; SANTOS, L.R.S. Enoturismo na região da Campanha Gaúcha. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, n. 7, p. 118-124, 2015.

O'NEIL, M.J. (Ed.) **The Merck index:** an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 15. ed. Londres: The Royal Society of Chemistry, 2013.

ORSINI, F. et al. Resveratrol derivatives and their role as potassium channels modulators. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 421-426, 2004.

ORSINI, F. et al. Synthesis of resveratrol derivatives and *in vitro* screening for potential cancer chemopreventive activities. **Archives der Pharmazie - Chemistry in Life Sciences**, v. 349, p.1-14, 2016.

PALOMINO, O. et al. Study of polyphenols in grape berries by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, n. 870, p. 449-451, 2000.

PATIL, S.H. et al. Phenolic composition and antioxidant activity of Indian wines. **Bulletin de l'OIV**, v. 84, p. 517-544, 2011.

PAZZINI, C.E.F. et al. Effects of red wine tannat on oxidative stress induced by glucose and fructose in erythrocytes *in vitro*. **International Journal of Medical Sciences**, v. 12, n. 6, p. 478-486, 2015.

PEREIRA, V. et al. HPLC-DAD methodology for the quantification of organic acids, furans and polyphenols by direct injection of wine samples. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 1204-1215, 2010.

PÉREZ-MAGARINO, S.; ORTEGA-HERAS, M.; CANO-MOZO, E. Optimization of a solid-phase extraction method using copolymer sorbents for isolation of phenolic compounds in red wines and quantification by HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11560-11570, 2008.

PETTIT, G.R. et al. Antineoplastic Agents. 579. Synthesis and cancer cell growth evaluation of E-stilstatin 3: a resveratrol structural modification. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1637-1642, 2009.

PIETTA, P.; MINOGGIO, M.; BRAMATI, L. Plant polyphenols: structure, occurrence and bioactivity. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 28, p. 257-312, 2003.

POTTER, G.A. et al. The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450enzyme CYP1B1. **British Journal of Cancer**, v. 86, p. 774-778, 2002a.

POTTER, G.A. et al. DMU-212: a novel CYP1B1 activated anticancer prodrug. **British Journal of Cancer**, v. 86, n. 1, p. S117, 2002b.

PREINER, D. et al. Organic acids profiles of the most important Dalmatian native grapevine (*V. vinifera* L.) cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 32, p. 162-168, 2013.

PROTAS, J.F.S.; CAMARGO, U.A. **Vitivinicultura brasileira: panorama setorial em 2010**. Brasília: SEBRAE; Bento Gonçalves: IBRAVIN e Embrapa Uva e Vinho, 2011. 110 p.

QU, W. et al. Kaempferol derivatives prevent oxidative stress–induced cell death in a DJ-1–dependent manner. **Journal of Pharmacology Science**, v. 110, p. 191-200, 2009.

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

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

REGITZ, C. et al. Resveratrol reduces amyloid-beta (A β 1–42)-induced paralysis through targeting proteostasis in an Alzheimer model of *Caenorhabditis elegans*. **European Journal of Nutrition**, v. 55, n. 2, p. 741-747, 2015.

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

REVILLA, E.; RYAN J.M. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1-2, p. 461-469, 2000.

RIBEREAU-GAYON, J. *Traite d'oenologie: transformations et traitements des vins*. 2. ed. Paris: Libraire Polytechnique Beranger, 1950. 546 p.

RIBÉREAU-GAYON, P. et al. **Handbook of enology: the microbiology of wine and vinifications**. 2. ed. v. 1. França: John Wiley e Sons, 2006a. 491 p.

RIBÉREAU-GAYON, P. et al. **Handbook of enology: the chemistry of wine stabilization and treatments**. 2. ed. v. 2. France: John Wiley e Sons, 2006b. 441 p.

- ROCKENBACH, I.I. et al. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. **Food Chemistry**, v. 127, p. 174-179, 2011.
- RODRÍGUEZ-DELGADO, M. et al. Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines. **Food Chemistry**, v. 78, p. 523-532, 2002.
- RODRÍGUEZ MONTEALEGRE, R. et al. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 687-693, 2006.
- ROUPE, K.A. et al. Pharmacometrics of stilbenes: segueing towards the clinic. **Current Clinical Pharmacology**, v. 1, p. 81-101, 2006.
- RUFINO, M.S.M. et al. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺**. n. 128. Fortaleza: EMBRAPA, 2007. 4 p. (Comunicado Técnico).
- RUFINO, M.S.M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.
- SALAS, E. et al. Demonstration of the occurrence of flavanols-anthocyanin adducts in wine and in model solutions. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 325-332, 2004.
- SALE, S. et al. Pharmacokinetics in mice and growth-inhibitory properties of the putative cancer chemopreventive agent resveratrol and the synthetic analogue *trans* 3,4,5,40-tetramethoxystilbene. **British Journal of Cancer**, v. 90, p. 736-744, 2004.
- SALGUEIRO, W.G. et al. Direct synthesis of 4-organylsulfenyl-7-chloro quinolines and their toxicological and pharmacological activities in *Caenorhabditis elegans*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, p. 448-459, 2014.
- SALVATORE, E. et al. Determination of phenolic compounds and authentication of PDO Lambrusco wines by HPLC-DAD and chemometric techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 761, p. 34-45, 2013.
- SAUL, N. et al. Quercetin-mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*: Is DAF-16 involved? **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 129, p. 611-613, 2008.
- SAUL, N. et al. Catechin induced longevity in *C. elegans*: from key regulator genes to disposable soma. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 130, p. 477-486, 2009.
- SBH. Sociedade Brasileira de Hipertensão. **Diretrizes brasileiras de hipertensão IV**. Revista Hipertensão. Ano 13, v. 13, n. 1, Janeiro, Fevereiro e Março de 2010.
- SERUGA, M.; NOVAK, I.; JAKOBEK, L. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1208-1216, 2011.

SHI, Z.H. et al. Synthesis, biological evaluation and SAR analysis of O-alkylated analogs of quercetin for anticancer. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 4424-4427, 2014.

SHILS, M. et al. **Modern nutrition in health and disease**. 10. ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Williams, 2006. 2069 p.

SILVA, S.M.C; MURA, J.D.O. **Tratado de alimentação & dietoterapia**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2010. 1256 p.

SILVA, C.L. et al. A fast method using a new hydrophilic–lipophilic balanced sorbent in combination with ultra-high performance liquid chromatography for quantification of significant bioactive metabolites in wines. **Talanta**, v. 86, p. 82-90, 2011.

SILVA, F.A.S. **ASSISTAT**: Versão 7.7 beta. DEAG-CTRN-UFCG – Atualizado em 13 de maio de 2016. Disponível em: <<http://www.assistat.com>>. Acesso em: 29 maio 2016.

SILVEIRA, S.V. **Desenvolvimento da Indicação de Procedência "Campanha" para vinhos finos e espumantes**. Projeto MP2. Chamada 00/2013. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 2013.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LCT, 2010. 508 p.

SINHA, R.P.; HÄDER, D.P. UV-induced DNA damage and repair: a review. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 4, p. 225-236, 2002.

SKOOG, D.A. et al. **Fundamentos de química analítica**. Tradução da 8ª Edição norte-americana. São Paulo: Editora Thomson, 2006. 999 p.

SOUQUET, J.M. et al. Phenolic composition of grape stems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p.1076-1108, 2000.

STRATIL, P.; KUBÁŇ, V.; FOJTOVÁ, J. Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 26, n. 4, p. 242-253, 2008.

SUGIURA, Y. et al. On the mechanism of hydrogen peroxide-, superoxide-, and ultraviolet light-induced dna cleavages of inactive bleomycin-iron(III) complex. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 105, n. 4, p. 1511-1518, 1982.

SURCO-LAOS, F. et al. Effects of O-methylated metabolites of quercetin on oxidative stress, thermotolerance, lifespan and bioavailability on *Caenorhabditis elegans*. **Food Function**, v. 2, p. 445-456, 2011.

SURCO-LAOS, F. et al. Influence of catechins and their methylated metabolites on lifespan and resistance to oxidative and thermal stress of *Caenorhabditis elegans* and epicatechin uptake. **Food Research International**, v. 46, p. 514-521, 2012.

SURDU, S. Non-melanoma skin cancer: occupational risk from UV light and arsenic exposure. **Reviews on Environmental Health**, v. 29, n. 3, p. 255-264, 2014.

TANG, S.Y.; HALLIWELL, B. Medicinal plants and antioxidants: what do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 394, p. 1-5, 2010.

TENORE, G.C. et al. Nutraceutical value and toxicological profile of selected red wines from Morocco. **Food Chemistry**, v. 129, p. 792-798, 2011.

TOMAZ, I. Multi-response optimisation of ultrasound-assisted extraction for recovery of flavonoids from red grape skins using response surface methodology. **Phytochemical Analysis**, v. 27, n. 1, p. 13-22, 2015.

TONIETTO, J. et al. O clima vitícola das regiões produtoras de uvas para vinhos finos do Brasil. In: TONIETTO, J.; RUIZ, V.S.; GÓMEZ-MIGUEL, V.D. (Org.), **Clima zonificación y tipicidad del vino en regiones vitivinícolas Iberoamericanas**, 1. ed., Madri: Imprenta Salazar, p.113-145, 2012.

TREUTTER, D. Managing phenol contents in crop plants by phytochemical farming and breeding-visions and constraints. **International Journal of Molecular Science**, v. 11, p. 807-857, 2010.

TROUSDALE, E.K.; SINGLETON, V.L. Astilbin and engeletin in grapes and wine. **Phytochemistry**, v. 22, n. 2, p. 619-620, 1983.

VANDERLINDE, R. et al. *Trans*-resveratrol em vinhos sul-americanos. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, n. 7, p. 118-124, 2015.

VILLIERS, A. et al. Development of a solid-phase extraction procedure for the simultaneous determination of polyphenols, organic acids and sugars in wine. **Chromatographia**, v. 59, p. 403-409, 2004.

VITRAC, X. et al. Determination of stilbenes (δ -viniferin, *trans*-astringin, *trans*-piceid, *cis*- and *trans*-resveratrol, ϵ -viniferin) in Brazilian wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5664-5669, 2005.

VRHOVSEK, U. et al. A versatile targeted metabolomics method for the rapid quantification of multiple classes of phenolics in fruits and beverages. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 60, p. 8831-8840, 2012.

WANG, Y. et al. An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 30; n. 50(3), p. 431-435. 2002.

WANG, H. et al. Resveratrol in cardiovascular disease: what is known from current research? **Heart Fail Review**, v. 17, p. 437-448, 2012.

WANG, D.; LIU, W.; CHEN, G. A simple method for the isolation and purification of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3(4), p. 241-247, 2013.

WELKE, J.E. et al. Characterization of the volatile profile of Brazilian Merlot wines through comprehensive two dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1226, p. 124-139, 2012.

WHELAN, A.P. et al. Effects of white and red wine on endothelial function in subjects with coronary artery disease. **Internal Medicine Journal**, v. 34, p. 224-228, 2004.

WHO. World Health Organization. **Food based dietary guidelines in the WHO European region**. EUR/03/5045414. 2003.

XUE, W.; SONG, B.A.; ZHAO, H.J.; BAO, X.; HUANG, Y.J.; LIU, X.H. Novel myricetin derivatives: design, synthesis and anticancer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 155-163, 2015.

YE, K. et al. Resveratrol attenuates radiation damage in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. **Journal of Radiation Research**, v. 51, p. 473-479, 2010.

YI, H.W. et al. Astilbin inhibits the adhesion of T lymphocytes via decreasing TNF- α and its associated MMP-9 activity and CD44 expression. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 1467-1474, 2008.

YOU, Q. et al. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry and evaporative light-scattering detector to compare phenolic profiles of muscadine grapes. **Journal of Chromatography A**, v. 1240, p. 96-103, 2012.

YU, R.; SCHELLHORN, H.E. Recent applications of engineered animal antioxidant deficiency models in human nutrition and chronic disease. **The Journal of Nutrition**, v. 143, n. 1, p. 1-11, 2012.

YUAN, J. et al. Synthesis of methylated quercetin derivatives and their reversal activities on P-gp- and BCRP-mediated multidrug resistance tumour cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 413-422, 2012.

ZAMIN, L.L. et al. Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. **Cancer Science**, v. 100, n. 9, p. 1655-1662, 2009.

ZANUS, M.C. et al. Total phenolic content in base wine for high quality sparkling - is there an optimal point? In: SYMPOSIUM IN VINO ANALYTICA SCIENTIA, VI., 2009, Angers. **Program and Abstracts**, Angers: UMT Vinitera, 2009. n. 34, p. 121-121.

ZHANG, Q.F.; ZHANG, Z.R.; CHEUNG, H.Y. Antioxidant activity of *Rhizoma Smilacis Glabrae* extracts and its key constituent-astilbin. **Food Chemistry**, v. 115, p. 297-303, 2009.

ANEXO

Tabela I. Descrições dos padrões analíticos de compostos fenólicos utilizados.

Fenóis	Características Químicas ^a				Dados do Fabricante	
	CAS	Sinônimo	Fórmula Molecular	Massa Molecular	Marca	Código Fabricante
Estilbenos						
<i>trans</i> -Resveratrol	501-36-0	3,4',5-triidroxiestilbeno	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	227,24	Sigma-Aldrich	R5010
<i>trans</i> -Piceido	65914-17-2	<i>trans</i> -resveratrol-3-β-D-glicopiranosídeo	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	390,38	Sigma-Aldrich	522691
<i>trans</i> -ε-Viniferina	129170-22-5	-	C ₂₈ H ₂₂ O ₆	454,47	Sigma-Aldrich	SMB00074
Flavanóis						
(+)-Catequina (2R, 3S)	154-23-4	(+)-3,3',4',5,7-penta-hidroxiflavano	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,28	Sigma-Aldrich	43412
(-)-Epicatequina (2R, 3S)	490-46-0	(-)-3,3',4',5,7-penta-hidroxiflavano	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,28	Extrasynthese	0977S
(-)-Epigalocatequina	970-74-1	(-)-3,3',4',5,5',7-hexa-hidroxiflavano	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	306,28	Extrasynthese	0979S
Galato (-)-de Epicatequina	1257-08-5	-	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	442,37	Extrasynthese	0978S
Galato de (-)-Epigalocatequina	989-51-5	-	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	458,37	Extrasynthese	0981S
Procianidina B1	20315-25-7	equicatequina(4β-8)catequina	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578,53	Extrasynthese	0983
Quercetina	117-39-5	3,3',4',5,7-penta-hidroxiflavona	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,24	Sigma-Aldrich	Q4951
Quercetina-3-O-Glicosídeo	21637-25-2	isoquercetrina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,38	Extrasynthese	0062
Miricetina	529-44-2	3,3',4',5,5',7-hexa-hidroxiflavona	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318,23	Sigma-Aldrich	70050
Quempferol	520-18-3	3,4',5,7-tetra-hidroxiflavona	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,23	Sigma-Aldrich	60010
Quempferol-3-O-Glicosídeo	480-10-4	astragalina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448,37	Extrasynthese	1243S
Rutina	153-18-4	quercetin-3-O-rutinosídeo	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,51	Sigma-Aldrich	78095
Derivados do ácido cinâmico						
Ácido <i>trans</i> -Cinâmico	140-10-3	-	C ₉ H ₈ O ₂	148,16	Sigma-Aldrich	C80857
Ácido <i>p</i> -Cumárico	501-98-4	-	C ₉ H ₈ O ₃	164,16	Sigma-Aldrich	C9008
Ácido <i>trans</i> -Ferúlico	537-98-4	-	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,18	Sigma-Aldrich	128708
Flanonol						
Astilbina	29838-67-3	taxifolina 3-ramnosídeo	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	450,39	Sigma-Aldrich	A2862
(+)-Taxifolina	17654-26-1	(+)-3,3',4',5,7-penta-hidroxiflavanona	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	304,25	Extrasynthese	1036

^a GENOMENET, 2015; O'NEIL, 2013

Tabela II. Descrições das amostras de variedades de uvas tintas utilizadas.

Variedade	Cidade	Microrregião^a	Safra	Código da Amostra^b
Arinarnoa	Dom Pedrito	C _M	2014	Au14
Arinarnoa	Dom Pedrito	C _M	2015	Au15
Barbera	Dom Pedrito	C _M	2014	Bu14
Barbera	Dom Pedrito	C _M	2015	Bu15
Marselan	Dom Pedrito	C _M	2014	Mu14
Marselan	Dom Pedrito	C _M	2015	Mu15
Rebo	Livramento	C _C	2015	Ru15
Teroldego	Dom Pedrito	C _M	2015	Tu15

^a Microrregiões: Campanha Gaúcha Meridional (C_M), Campanha Gaúcha Central (C_C) e Campanha Gaúcha Ocidental (C_O).

^b Código de amostras, obedecendo a ordem: letra definida por variedade; letra definida para amostras de uvas (u); dois últimos dígitos do ano da safra (2014 ou 2015).

Tabela III. Descrições das amostras ($n = 103$) de variedades de vinhos tintos finos.

Origem ^a	Clone ^b	Safra	Processo ^c	Capítulo 2	Capítulo 3	Capítulo 4 ^d Triagem	Capítulo 4 ^d Quimiometria	Capítulo 5	Capítulo 6 ^e
Arinarnoa ($n = 3$)									
Cc1	-	2013	e				AC13e		
Cc1	-	2014	e				AC14e		
Cm1	-	2014	e				AM14e		Av14
Cm1	-	2015	e				AM15e		Av15
Barbera ($n = 3$)									
Cm1	-	2013	e				BM13e		
Cm1	-	2014	e				BM14e		Bv14
Cm1	-	2015	e				BM15e		Bv15
Cabernet Franc ($n = 3$)									
Cm1	-	2012	c	*		DM12c			
Cm1	-	2013	c			DM13c			
Co1	-	2012	e	*					
Cabernet Sauvignon ($n = 18$)									
CCS	-	2012	e	*					
Cc1	-	2013	e				CC13e2		
Cc1	-	2014	c					*	
Cc2	-	2004	c			CC04c			
Cc3	-	2013	c				CC13c		
Cc3	-	2013	e				CC13e1		
Cc3	-	2014	c					*	
Cc4	-	2011	c				CC11c		
Cm1	-	2013	e				CM13e3		
Cm2	-	2011	c				CM11c1		
Cm3	-	2011	c				CM11c2		
Cm3	-	2013	e				CM13e1		
Cm4	-	2013	e				CM13e2		
Cm5	-	2011	c				CM11c3		
Cm6	-	2013	e				CM13e4		
Co2	-	2011	c				CO11c		
Co2	-	2012	c	*			CO12c		
Co2	-	2013	c				CO13c		
Francoria ($n = 1$)									
Cm1	-	2013	e			FM13e			
Lambrusco Grasparossa ($n = 1$)									
Cc1	-	2013	e			WC13e			
Lambrusco Salamino ($n = 2$)									
Cc1	VCR1	2013	e			QC13e1			
Cc1	R5	2013	e			QC13e2			
Malbec ($n = 10$)									
Cc1	594	2013	e				XC13e1		
Cc1	595	2013	e				XC13e2		
Cc1	594	2014	e				XC14e1		
Cc1	595	2014	e				XC14e2		
Cm1	-	2013	e				XM13e		
Cm1	-	2014	e				XM14e		
Co1	-	2012	e	*					
Co1	-	2012	c	*			XO12c		
Co1	-	2013	e				XO13e		
Co1	-	2014	e				XO14e		

(continua)

Tabela III. Descrições das amostras ($n = 103$) de variedades de vinhos tintos finos.

Origem ^a	Clone ^b	Safra	Processo ^c	Capítulo 2	Capítulo 3	Capítulo 4 ^d Triagem	Capítulo 4 ^d Quimiometria	Capítulo 5	Capítulo 6 ^e
Marselan ($n = 2$)									
C _{M1}	-	2014	e			ZM14e			Mv14
C _{M1}	-	2015	e			ZM15e			Mv15
Merlot ($n = 12$)									
CCS	-	2012	e	*					
C _{C1}	-	2012	c				MC12c1		
C _{C2}	-	2008	c			MC08c			
C _{C3}	-	2013	c				MC13c		
C _{C3}	-	2014	c					*	
C _{C5}	-	2012	c	*			MC12c2		
C _{M1}	-	2012	c				MM12c		
C _{M1}	-	2013	c				MM13c		
C _{M2}	-	2011	c				MM11c		
C _{M5}	-	2009	c			MM09c			
C _{O1}	-	2011	c				MO11c		
C _{O1}	-	2012	e	*					
Moscato de Hamburgo ($n = 1$)									
C _{C1}	302	2013	e			HC13e			
Petit Verdot ($n = 2$)									
CCS	-	2012	e	*					
CCS	-	2012	e	*					
Pinot Noir ($n = 2$)									
CCS	-	2012	e	*					
C _{M4}	-	2013	c			PM13c			
Rebo ($n = 5$)									
C _{C1}	-	2013	e				RC13e		
C _{C1}	-	2014	e				RC14e		Rv14
C _{C1}	-	2015	e				RC15e		Rv15
C _{M1}	-	2013	e				RM13e		
C _{M1}	-	2014	e				RM14e		
Ruby Cabernet ($n = 2$)									
C _{O1}	-	2012	e	*					
C _{O1}	-	2013	e			YO13e			
Sangiovese ($n = 1$)									
C _{M1}	-	2013	e			IM13e			
Syrah ($n = 12$)									
C _{C1}	174	2013	e				SC13e1		
C _{C1}	300	2013	e				SC13e2		
C _{C1}	174	2014	e				SC14e1		
C _{C1}	300	2014	e				SC14e2		
C _{M1}	174	2013	e				SM13e1		
C _{M1}	747	2013	e				SM13e2		
C _{M1}	174	2014	e				SM14e1		
C _{M1}	747	2014	e				SM14e2		
C _{O1}	-	2012	e	*					
C _{O1}	-	2013	e				SO13e		
C _{O1}	-	2014	e				SO14e		
SG	-	2013	c						*

(continua)

Tabela III. Descrições das amostras ($n = 103$) de variedades de vinhos tintos finos.

Origem ^a	Clone ^b	Safra	Processo ^c	Capítulo 2	Capítulo 3	Capítulo 4 ^d Triagem	Capítulo 4 ^d Quimiometria	Capítulo 5	Capítulo 6 ^e
Tannat ($n = 10$)									
C _{C1}	-	2012	c				TC12c1		
C _{C1}	-	2013	c				TC13c		
C _{C2}	-	2005	c			TC05c			
C _{C5}	-	2012	c				TC12c2		
C _{M1}	-	2012	c	*			TM12c1		
C _{M1}	-	2013	c				TM13c2		
C _{M4}	-	2013	c				TM13c1		
C _{M6}	-	2012	c				TM12c2		
C _{M6}	-	2014	c				TM14c		
C _{O1}	-	2012	e	*					
Tempranillo ($n = 7$)									
C _{C1}	-	2013	e				LC13e		
C _{C1}	-	2014	e				LC14e		
C _{M4}	-	2012	c	*			LM12c		
C _{M4}	-	2013	c				LM13c		
C _{O1}	-	2012	e	*					
C _{O1}	-	2013	e				LO13e		
C _{O1}	-	2014	e				LO14e		
Teroldego ($n = 5$)									
C _{C1}	-	2013	e				GC13e		
C _{C1}	-	2014	e				GC14e	Tv14	
C _{M1}	-	2013	e				GM13e		
C _{M1}	-	2014	e				GM14e		
C _{M1}	-	2015	e				GM15e		Tv15
Número de amostras =				12	6	16	71	4	10

* Amostras utilizadas no capítulo.

^a Amostras de microrregiões da Campanha Gaúcha (97): Campanha Gaúcha Meridional (C_M), Campanha Gaúcha Central (C_C) e Campanha Gaúcha Ocidental (C_O), seguidas do código numérico do estabelecimento vitivinícola (produtor e/ou vinícola). Amostras de outras regiões do RS (6): Bento Gonçalves, na Serra Gaúcha (SG) e Vacaria, nos Campos de Cima da Serra (CCS).

^b Clone informado para diferenciação de amostras, quando aplicável.

^c Processo de vinificação: vinho experimental (e) ou comercial (c).

^d Código de amostras para o Capítulo 4, obedecendo a ordem: letra definida por variedade; letra definida por microrregião da Campanha Gaúcha; dois últimos dígitos da safra; processo experimental (e) ou comercial (c); diferenciação numérica de amostras, quando necessário.

^e Código de amostras para o Capítulo 6, obedecendo a ordem: letra definida por variedade; letra definida para amostras de vinhos (v); dois últimos dígitos do ano da safra (2014 ou 2015).

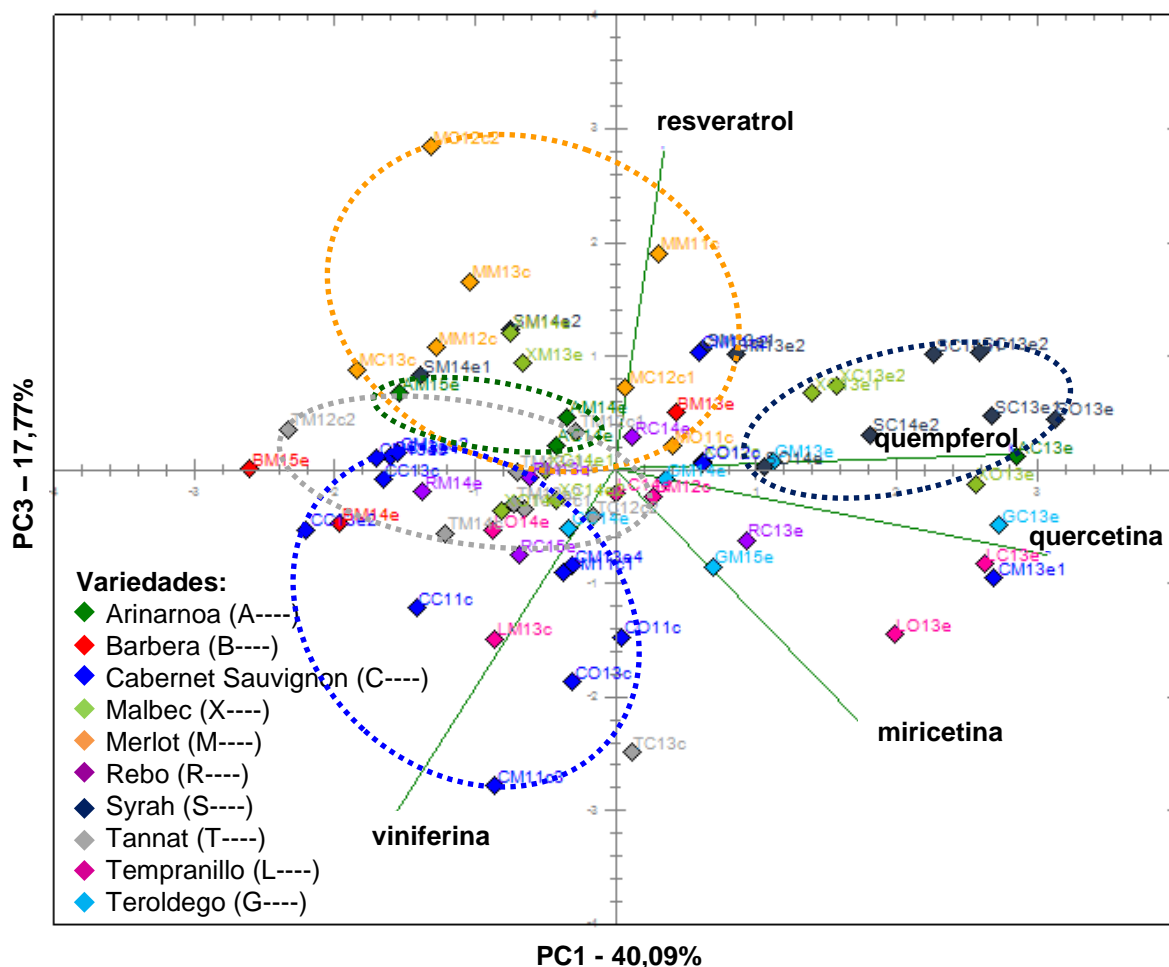


Figura I. Gráfico de escores e pesos por PCA (1 e 3, variância explicada = 57,86%) obtido para os teores de fenóis bioativos de 71 amostras de variedades de vinhos tintos finos da Campanha Gaúcha. Pesos dos compostos fenólicos (–): *trans*-resveratrol, *trans-ε*-viniferina, quempferol, quercetina e miricetina. Descrições das amostras conforme Tabela III (Anexo), com cores definidas conforme variedades.

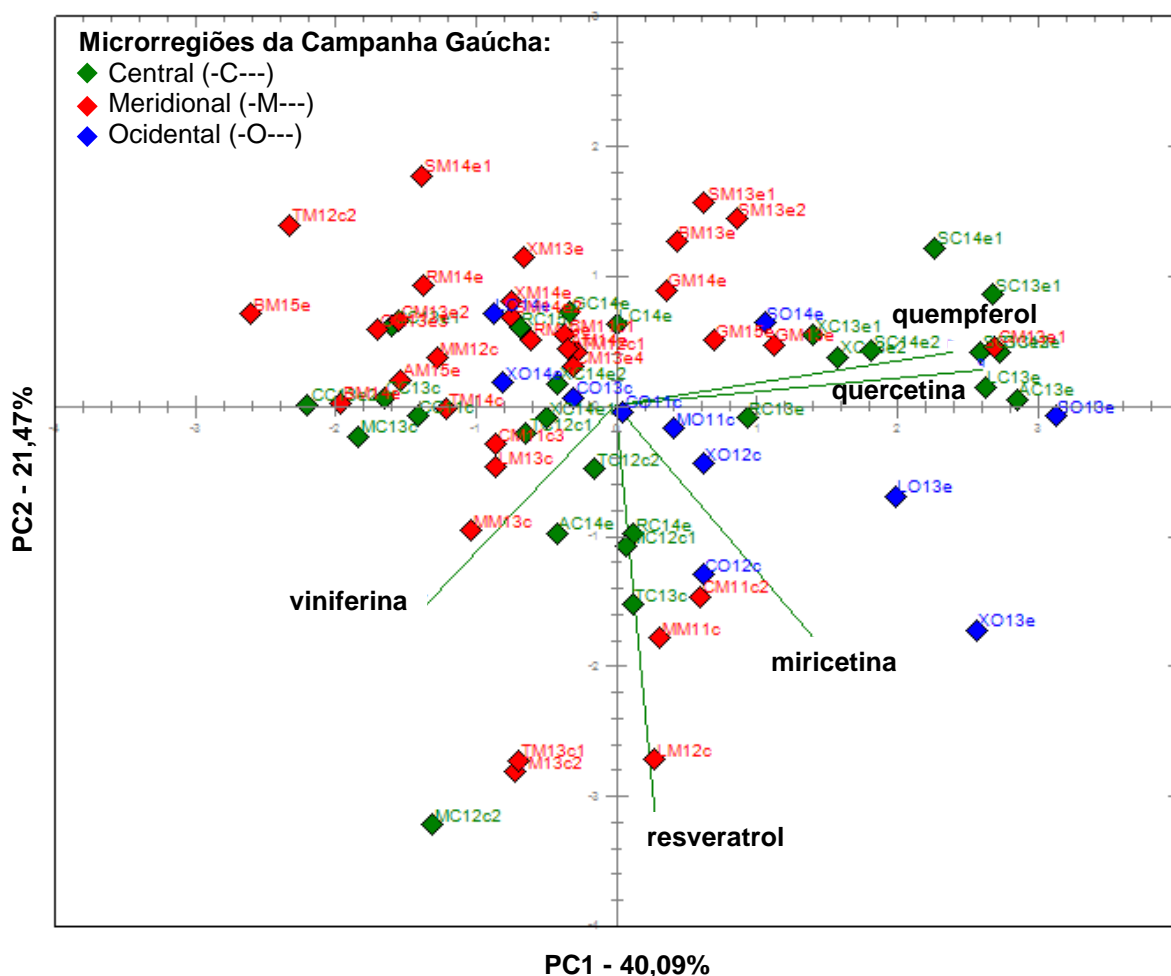


Figura II. Gráfico de escores e pesos por PCA (1 e 2, variância explicada = 61,56%) obtido para os teores de fenóis bioativos de 71 amostras de vinhos tintos finos de microrregiões da Campanha Gaúcha. Pesos dos compostos fenólicos (—): *trans*-resveratrol, *trans*- ϵ -viniferina, quempferol, quercetina e miricetina. Descrições das amostras conforme Tabela III (Anexo), com cores definidas conforme microrregiões.

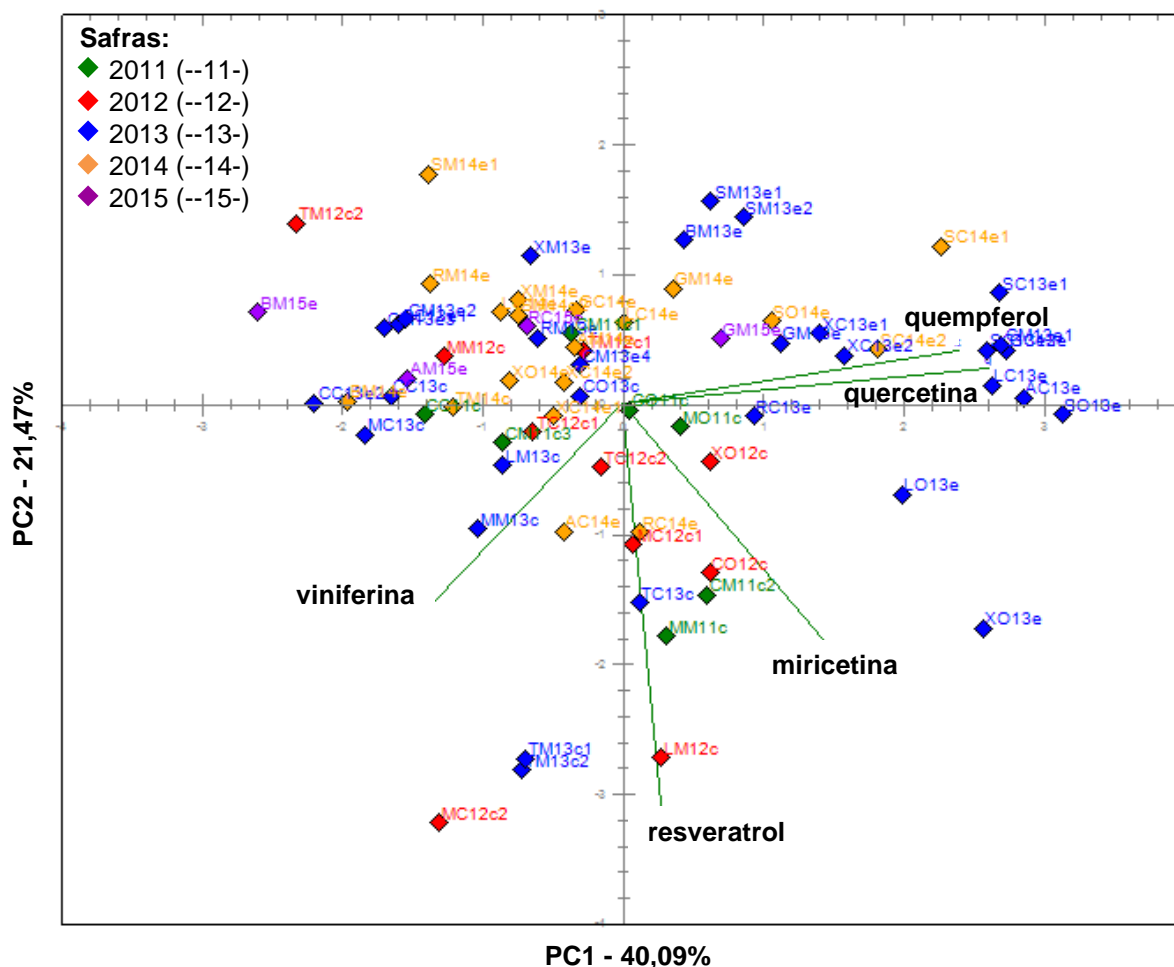


Figura III. Gráfico de escores e pesos por PCA (1 e 2, variância explicada = 61,56%) obtido para os teores de fenóis bioativos de 71 amostras de vinhos tintos finos de diferentes safras Campanha Gaúcha. Pesos dos compostos fenólicos (-): *trans*-resveratrol, *trans-ε*-viniferina, quempferol, quercetina e miricetina. Descrições das amostras conforme Tabela III (Anexo), com cores definidas conforme microrregiões.