

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

**CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS  
BIOATIVOS EM SUCO DE UVA**

**NATALIA ALEJANDRA PISONI CANEDO REIS**

Porto Alegre, 2020



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

CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS  
BIOATIVOS EM SUCO DE UVA

Tese apresentada por **Natalia Alejandra Pisoni Canedo Reis** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Bergold

Coorientação: Dr. Celito Crivellaro Guerra

Porto Alegre, 2020

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 25.05.2020, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Andréa Inês Horn Adams  
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Profa. Dra. Claudia Alcaraz Zini  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Profa. Dra. Gilsane Lino Von Poser  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Reis, Natalia Alejandra Pisoni Canedo  
CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS  
FENÓLICOS BIOATIVOS EM SUCO DE UVA / Natalia Alejandra  
Pisoni Canedo Reis. -- 2020.  
171 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, 2020.

1. suco de uva. 2. compostos fenólicos. 3.  
quantificação. 4. validação de metodologia analítica.  
5. atividade biológica. I. Bergold, Ana Maria, orient.  
II. Guerra, Celito Crivellaro, coorient. III. Título.



Este trabalho foi desenvolvido em conjunto entre o Laboratório de Química Farmacêutica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, o Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), o Laboratório de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans* da Universidade Federal do Pampa e o Laboratório de Quimiometria e Instrumentação Analítica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A autora da tese recebeu bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Ana Maria Bergold pela inspiração profissional desde os tempos da graduação e pelo lindo exemplo de ser humano.

Ao Dr. Celito Crivellaro Guerra por todo o conhecimento compartilhado, pela confiança e, principalmente, companheirismo.

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

À amiga e colega de profissão Letícia Flores por me apresentar o mundo das uvas e me ajudar a dar os primeiros passos nessa jornada.

Aos colegas de laboratório Magda Salvador e Celso Ruiz pela prestatividade, carinho e, principalmente, amizade.

À Profa. Dra. Daiana de Ávila e à mestranda Flávia Pereira do GBToxCe (UNIPAMPA) pela parceria e por terem desenvolvido um trabalho que fechou a tese com chave de ouro.

Ao Prof. Dr. Marco Ferrão e ao doutorando Carlos Henrique Junges do Instituto de Química da UFRGS pela parceria e contribuição essencial com a quimiometria.

À Profa. Dra. Aline Zimmer e ao Dr. Marcelo Zimmer pela ajuda na aquisição dos padrões vindos do EUA.

À aluna de Iniciação Científica Luísa Wetzstein pela dedicação.

À funcionária Inélia por estar sempre disposta a ajudar.

Ao especialista Alexandre Gomes da Waters pelas longas conversas e dicas com relação ao equipamento.

Às amigas e colegas de profissão Pâmela Lukasewicz e Layane Lenardon pela troca de ideias e ajuda constantes.

Às colegas de pousada na Embrapa, por tornarem meus dias em Bento Gonçalves mais felizes.

Aos colegas de trabalho em Guaíba por entenderem as dificuldades em conciliar trabalho e doutorado.

Aos familiares e amigos pelo carinho, orações e por compreenderem as minhas inúmeras ausências.

A minha irmã Gabriela por estar sempre torcendo pelas minhas conquistas.

A minha mãe por me impulsionar a alçar voos mais altos e ser minha maior inspiração de força e coragem.

Ao meu querido esposo Lucas por me apoiar com amor todos os dias.

A Deus por fazer deste sonho infinitamente mais do que eu pedi.

“Ora, Àquele que é poderoso para fazer infinitamente mais do que tudo o quanto pedimos ou pensamos, conforme o Seu poder que opera em nós, a Ele seja a glória...”

Efésios 3:20,21



## RESUMO

Compostos fenólicos são metabólitos secundários biossintetizados nas plantas como mecanismos de defesa em situações de estresse. Quando consumidas, estas substâncias possuem importante atividade antioxidante atuando no combate ao estresse oxidativo e diminuindo suas consequências deletérias ao organismo. As uvas e os produtos delas originados são ricos em fenólicos bioativos com ação antioxidante e por esse motivo possuem um elevado valor nutracêutico. Dentre os produtos originados das uvas está o suco que, no Brasil, é elaborado principalmente com uvas da espécie *Vitis labrusca* L. e seus híbridos. O consumo de suco de uva tem crescido grandemente nos últimos anos e o Brasil está entre os maiores produtores e consumidores da bebida. Apesar de seu crescente valor econômico e elevado valor nutracêutico, poucos estudos têm sido realizados utilizando os compostos fenólicos como marcadores de qualidade do suco de uva. Por esse motivo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico único que possibilite a quantificação de compostos fenólicos bioativos em suco de uva, além de avaliar quantitativamente o perfil fenólico de um grande número de amostras de suco de uva produzidas no Rio Grande do Sul e estudar a ação biológica destes frente a um modelo de doença de Alzheimer. O método desenvolvido utiliza um cromatógrafo a líquido de ultra eficiência acoplado a um detector de massas e é capaz de quantificar 16 compostos fenólicos, incluindo antocianinas, em apenas 4,5 minutos. A validação provou que o método desenvolvido é específico, linear, preciso, exato e muito sensível com limites de detecção e quantificação na ordem de partes por bilhão e até partes por trilhão. O método validado foi aplicado na análise de 56 amostras de suco de uva produzidas com variedades de uva tradicionais ou desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Uva e Vinho e mostrou-se apto a avaliar quantitativamente sucos de uva das mais diversas naturezas, condições, idades e estilos. A avaliação da atividade biológica de nove amostras de suco de uva, mostrou que este nutracêutico pode ser promissor na prevenção da doença de Alzheimer.

Palavras-chave: suco de uva, compostos fenólicos, quantificação, validação de metodologia analítica, espectrometria de massas, atividade biológica, doença de Alzheimer.





## ABSTRACT

### Characterization and quantification of bioactive phenolic compounds in grapes and grape juices

Phenolic compounds are secondary metabolites biosynthesized in plants as a defense mechanism in stress situations. When consumed, these substances present an important antioxidant activity fighting against oxidative stress and diminishing its consequences in the human body. Grapes and their derivatives are rich in bioactive phenolic compounds with antioxidant activity and, for that reason, have an important nutraceutical value. Among the products originated from grapes is grape juice, mainly elaborated from *Vitis labrusca* grapes and their hybrids. Grape juice consumption has grown over the past few years and Brazil is among the greatest producers and consumers countries. Despite its economic and nutraceutical value, there are only a few studies that use phenolic compounds as quality markers for grape juice. Hence, the objective of this work was to develop and validate a single analytical method for the quantification of phenolic compounds in grape juice, quantitatively study the phenolic profile of a great number of grape juice samples produced in Rio Grande do Sul and assess their biological activity regarding an Alzheimer's disease model. The developed methodology utilizes an ultra-performance liquid chromatographer coupled to a mass detector and is able to quantify 16 phenolic compounds, including anthocyanins, in only 4.5 minutes. The validation process proved that the developed method is specific, linear, precise, accurate and very sensitive with limits of detection and quantification in the order of parts per billion and even parts per trillion. The validated method was applied in the analysis of 56 grape juice samples produced with traditional grape varieties or varieties developed by Genetic Improvement Program of Embrapa Grape and Wine Research Center and was able to evaluate quantitatively grape juices of the most different natures, conditions, ages and styles. Biological activity of nine grape juice samples showed that this nutraceutical may have an important action on preventing Alzheimer's disease.

Keywords: grape juice, phenolic compounds, quantification, method validation, liquid chromatography, mass spectrometry, biological activity and Alzheimer's disease.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b> - Quantidade mínima de suco na sua concentração natural (%) em bebidas não alcoólicas.....	37
<b>Figura 3.2</b> – Esquema representativo sobre a situação global da vitivinicultura em 2014.....	38
<b>Figura 3.3</b> – Etapas do processo de elaboração do suco de uva.....	41
<b>Figura 3.4</b> – Sistema tubo em tubo para aquecimento das uvas.....	42
<b>Figura 3.5</b> – Conjunto de painéis extratoras por arraste de vapor.....	43
<b>Figura 3.6</b> – Desenho esquemático do suquificador integral.....	44
<b>Figura 3.7</b> – Estruturas químicas básicas dos compostos fenólicos.....	49
<b>Figura 3.8</b> – Esquema representativo das rotas e das enzimas envolvidas na biossíntese de ácidos fenólicos, estilbenos, flavonóis e flavanonóis.....	50
<b>Figura 3.9</b> – Esquema representativo da rota e das enzimas envolvidas na biossíntese de antocianinas.....	51
<b>Figura 3.10</b> – Esquema representativo da rota e das enzimas envolvidas na biossíntese de flavanóis.....	52
<b>Figure 4.1</b> – Chromatograms of the studied phenolic compounds and their corresponding retention time (RT) in minutes (non-anthocyanic compounds are shown in image A and anthocyanins in image B).....	68
<b>Figure 4.2</b> – Heat map of the concentration of phenolic compounds, in mg L <sup>-1</sup> , in grape juice (GJ) samples.....	78
<b>Figure 4.3</b> – Dendrogram of the grape juice samples studied.....	81
<b>Figure 4.4</b> – PC1 <i>versus</i> PC2 score biplot for the grape juice samples studied.....	82
<b>Figure 4.5</b> – PC1 (A) and PC2 (B) loadings for the phenolic compounds studied.....	83
<b>Figura 5.1</b> – Mapa de calor da concentração de compostos fenólicos, em mg L <sup>-1</sup> , nas amostras de suco de uva analisadas.....	109
<b>Figura 5.2</b> – Dendrograma das amostras de suco de uva estudadas.....	112
<b>Figura 5.3</b> – Gráfico de escores de PC1 versus PC2 para os dados autoescalados com destaque circular para os agrupamentos das amostras analisadas.....	113
<b>Figura 5.4</b> – Gráfico biplot de escores e de pesos de PC1 versus PC2 das amostras avaliadas.....	113

<b>Figure 6.1</b> – Survival of worms in different concentrations of grape juice compared to control .....	128
<b>Figure 6.2</b> – Length of worms in different concentrations of grape juice compared to control.....	129
<b>Figure 6.3</b> – Area of worms in different concentrations of grape juice compared to control.....	130
<b>Figure 6.4</b> – Brood size of worms in different concentrations of grape juice compared to control.....	131
<b>Figure 6.5</b> – Paralysis rate of worms in different concentrations of grape juice compared to control.....	132
<b>Figure 6.6</b> – Longevity of worms in different concentrations of grape juice compared to control.....	133
<b>Figura 7.1</b> – Resumo das etapas e das áreas de conhecimento desenvolvidas na tese.....	148

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> – Comercialização de suco de uva integral no Rio Grande do Sul, em litros, de 2016 a 2018.....	39
<b>Tabela 3.2</b> – Principais compostos fenólicos presentes em uvas e sucos de uva, de acordo com sua classificação química.....	52
<b>Tabela 3.3</b> – Métodos analíticos reportados na literatura para quantificação de compostos fenólicos em suco de uva.....	55
<b>Table 4.1</b> – MS detector conditions.....	67
<b>Table 4.2</b> – Specificity, linearity, LOD and LOQ values obtained during method validation.....	73
<b>Table 4.3</b> – Repeatability, intermediate precision and accuracy values obtained during method validation.....	74
<b>Tabela 5.1</b> – Sucos comerciais.....	98
<b>Tabela 5.2</b> – Concentração de compostos fenólicos, em mg L <sup>-1</sup> , nas amostras de sucos convencionais.....	100
<b>Tabela 5.3</b> – Concentração de compostos fenólicos, em mg L <sup>-1</sup> , nas amostras de sucos orgânicos.....	100
<b>Tabela 5.4</b> – Concentração de compostos fenólicos, em mg L <sup>-1</sup> , nas amostras de sucos de uvas cultivadas com adubação do solo.....	102
<b>Tabela 5.5</b> – Concentração de compostos fenólicos, em mg L <sup>-1</sup> , nas amostras de sucos de diferentes safras.....	102
<b>Tabela 5.6</b> – Concentração de compostos fenólicos, em mg L <sup>-1</sup> , nas amostras de sucos comerciais.....	103
<b>Tabela 5.7</b> – Média do somatório das concentrações de compostos fenólicos (antocianinas e compostos não antociânicos), em mg L <sup>-1</sup> , nas amostras de sucos orgânicos.....	105



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD: doença de Alzheimer, do inglês *Alzheimer's disease*

C8: octilsilano, em inglês *octylsilane*

C18: octadecilsilano, em inglês *octadecylsilane*

Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

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

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

FAO: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FD: detector de fluorescência, do inglês *fluorescence detector*

HCA: análise hierárquica de cluster, do inglês *hierarchical cluster analysis*

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

ICH: Conferência Internacional em Harmonização, do inglês *International Conference on Harmonization*

LC: cromatografia a líquido, do inglês *liquid chromatography*

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

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

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

m/z: razão massa/carga

ND: não detectado, do inglês *not detected*

NMG: meio de crescimento do nematoide, do inglês *nematode growth medium*

OIV: do inglês *International Organisation of Vine and Wine*

PA: para análise

PCA: análise da componente principal, do inglês *principal component analysis*

r: coeficiente de correlação

RNS: espécies reativas de nitrogênio, do inglês *reactive nitrogen species*

ROS: espécies reativas de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*

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

SIR: do inglês *single ion recording*

t<sub>R</sub>: tempo de retenção, do inglês *retention time*

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

VWD: detector de comprimento de onda variável, do inglês *variable wavelength detector*



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVOS .....	29
2.1. OBJETIVOS GERAIS .....	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	33
3.1 Aspectos gerais e breve histórico da viticultura .....	35
3.2 Suco de Uva.....	37
3.2.1 Classificação de bebidas no Brasil .....	37
3.2.2 O suco de uva no Brasil e no mundo.....	39
3.2.3 Aspectos econômicos da produção e consumo de suco de uva .....	41
3.2.4 Processo produtivo do suco de uva .....	42
3.2.5 Valor nutracêutico do suco de uva.....	47
3.3 Compostos fenólicos.....	50
3.3.1 Classificação e biossíntese.....	50
3.3.2 Métodos analíticos .....	55
4. CAPÍTULO 1: MÉTODO ANALÍTICO POR UPLC-MS PARA QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS BIOATIVOS EM SUCO DE UVA .....	59
4.1 Introdução .....	61
4.2 Artigo publicado no <i>Journal of Food Measurement and Characterization</i> 64	
4.2.1 Introduction .....	65
4.2.2 Materials and methods.....	67
4.2.2.1 Chemicals and standards .....	67
4.2.2.2 Grape juice samples .....	67
4.2.2.3 Instruments and conditions .....	68
4.2.2.4 Standards and sample preparation.....	69
4.2.2.5 Method validation .....	71
4.2.2.5.1 Specificity .....	71
4.2.2.5.2 Linearity.....	72
4.2.2.5.3 Precision .....	72
4.2.2.5.4 Accuracy .....	72
4.2.2.5.5 Limit of detection and limit of quantification .....	73
4.2.2.6 Exploratory analysis.....	73

4.2.3 Results and discussion .....	73
4.2.3.1 Method validation .....	73
4.2.3.1.1 Specificity and linearity .....	73
4.2.3.1.2 Precision and accuracy .....	74
4.2.3.1.3 Limit of detection and limit of quantification .....	77
4.2.3.2 Characterization of grape juice samples .....	77
4.2.3.2.1 Exploratory analysis .....	82
4.2.4 Conclusion .....	87
4.2.5 Conflict of interests .....	87
4.2.6 References .....	88
<b>5. CAPÍTULO 2: ESTUDO DO PERFIL FENÓLICO DE AMOSTRAS DE SUCO DE UVA</b>	
<b>PRODUZIDAS NO RIO GRANDE DO SUL .....</b>	<b>95</b>
5.1 Introdução .....	97
5.2 Material e métodos .....	97
5.2.1 Reagentes e padrões .....	97
5.2.2 Amostras de suco de uva .....	98
5.2.2.1 Sucos elaborados com uvas cultivadas em sistema convencional .....	98
5.2.2.2 Sucos elaborados com uvas cultivadas em sistema orgânico .....	99
5.2.2.3 Sucos elaborados com uvas cultivadas sob diferentes níveis de adubação de solo .....	99
5.2.2.4 Sucos elaborados com uvas de diferentes safras .....	100
5.2.2.5 Sucos comerciais .....	100
5.2.3 Instrumentos e condições analíticas .....	100
5.2.4 Preparação de padrões e amostras .....	101
5.3 Resultados e Discussão .....	101
5.3.1 Sucos elaborados com uvas cultivadas em sistema convencional .....	101
5.3.2 Sucos elaborados com uvas cultivadas em sistema orgânico .....	106
5.3.3 Sucos elaborados com uvas cultivadas sob diferentes níveis de adubação de solo .....	108
5.3.4 Sucos elaborados com uvas de diferentes safras .....	108
5.3.5 Sucos comerciais .....	109
5.3.6 Avaliação geral da composição fenólica dos sucos .....	110
5.3.7 Análise multivariada .....	113

5.4 Conclusões .....	117
6. CAPÍTULO 3: ESTUDO DAS PROPRIEDADES NUTRACÊUTICAS DO SUCO DE UVA FRENTE A UM MODELO DE DOENÇA DE ALZHEIMER .....	119
6.1 Introdução .....	121
6.2 Artigo a ser submetido ao periódico <i>Neurotoxicity Research</i> .....	123
6.2.1 Introduction .....	124
6.2.2 Material and Methods.....	125
6.2.2.1 Chemicals .....	125
6.2.2.2 Grape juice samples .....	126
6.2.2.3 Strains .....	126
6.2.2.4 <i>C. elegans</i> maintenance and synchronization .....	127
6.2.2.5 <i>C. elegans</i> treatment.....	127
6.2.2.6 Toxicity assays.....	127
6.2.2.7 Paralysis rate .....	128
6.2.2.8 Longevity.....	128
6.2.2.9 Statistical analysis.....	128
6.2.3 Results .....	129
6.2.3.1 Toxicity assays.....	129
6.2.3.2 Paralysis rate .....	129
6.2.3.3 Longevity.....	130
6.2.3.4 Discussion.....	135
6.2.4 Conclusion .....	138
6.2.5 Declaration of interests .....	138
6.2.7 References.....	139
7. DISCUSSÃO GERAL.....	143
8. CONCLUSÕES .....	151
9. REFERÊNCIAS .....	155
10. ANEXOS.....	169



## 1. INTRODUÇÃO

---



A partir da descoberta do paradoxo francês (RENAUD; DE LORGERIL, 1992), despertou-se na comunidade científica o interesse em se estudar com mais profundidade os componentes bioativos presentes nas uvas e nos vinhos. Descobriu-se que essas substâncias, os compostos fenólicos, possuem elevada ação antioxidante e, por esse motivo, trazem benefícios importantíssimos para o organismo. A partir disso, muitos estudos foram conduzidos com relação aos benefícios da ingestão de compostos fenólicos através do consumo do vinho (PAZZINI *et al.*, 2015; SILVA, 2016; SNOPEK *et al.*, 2018; VACCARI; SOCCOL; IDE, 2009; WHELAN *et al.*, 2004).

Nesse meio tempo, a produção e o consumo de suco de uva cresceram muito, especialmente no Brasil. A maior parte da produção de uvas e de suco de uva no Brasil está localizada no estado do Rio Grande do Sul e muitos dos elaboradores são pequenos produtores rurais. Os grandes produtores, além de produzirem suco para consumo interno também exportam muitos litros de suco concentrado. No ano de 2017 foram produzidos mais de 150 milhões de litros de suco concentrado cuja maior parte é destinada à exportação (MELLO, 2018). Nas uvas, os compostos fenólicos estão localizados especialmente nas cascas, um pouco nas sementes e quase nada é encontrado na polpa que é basicamente composta de água e açúcar (CREASY; CREASY, 2009). A quantidade de compostos fenólicos presentes no suco depende da variedade da uva utilizada em sua elaboração, do sistema de cultivo das uvas, do tipo de solo e adubação e também do processo produtivo utilizado para a sua elaboração.

Em termos quantitativos, ainda são poucos os estudos realizados utilizando os compostos fenólicos como marcadores de qualidade do suco de uva. E com a crescente valorização dessa bebida, especialmente em termos nutracêuticos, esse passa a ser um aspecto de interesse na pesquisa científica. Estudos mais aprofundados nesse sentido podem contribuir para a melhoria da qualidade dos sucos de uva e trazer benefícios não somente para a saúde, mas também para a competitividade e sustentabilidade da agricultura. Os benefícios da ingestão de compostos fenólicos através das uvas e de seus derivados estão relacionados especialmente à prevenção de doenças (CARDOZO *et al.*, 2013; SHANMUGANAYAGAM *et al.*, 2007; VINSON; TEUFEL; WU, 2001) e, por esse motivo, o conhecimento do perfil de compostos fenólicos, principalmente quando

correlacionados aos seus efeitos biológicos, pode contribuir para o desenvolvimento de novas terapias medicamentosas.

Objetivando aumentar o conhecimento sobre o perfil de compostos fenólicos em uvas e seus derivados e contribuir para a melhoria contínua da qualidade desses produtos e da saúde daqueles que os consomem, propõe-se o desenvolvimento de um método quantitativo para a análise de compostos fenólicos em suco de uva, visando também a correlação dos resultados quantitativos com a atividade biológica *in vivo* dessa bebida. O método de análise quantitativa desenvolvido utiliza a cromatografia a líquido de ultra eficiência acoplada a um detector de massas; é simples de ser executado, gera baixo consumo de solventes, possibilita avaliar um grande número de compostos fenólicos das mais diferentes classes no mais curto espaço de tempo possível e, além disso, é adequado para o propósito ao qual se destina, tendo sido validado em atendimento a normas nacionais e internacionais para o desenvolvimento e validação de metodologia analítica (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

Este trabalho está organizado na forma de capítulos. Inicialmente há uma breve revisão bibliográfica sobre o tema. Esta apresenta um histórico da viticultura no Brasil e no mundo, traz informações sobre a classificação de bebidas no país além de apresentar dados de consumo e produção do suco de uva. Ainda na revisão bibliográfica, são apresentadas, de forma mais detalhada, informações sobre o valor nutracêutico dos compostos fenólicos, bem como dados sobre sua biossíntese nas plantas e um resumo dos métodos analíticos disponíveis para sua análise química. O Capítulo 1 apresenta o primeiro artigo científico elaborado contendo informações sobre o desenvolvimento e a validação do método analítico para a quantificação de compostos fenólicos em suco de uva. O Capítulo 2 mostra a aplicação do método e apresenta os resultados da análise quantitativa de 56 amostras de suco de uva das mais diferentes origens. O Capítulo 3 traz o estudo da atividade biológica de amostras de suco de uva frente a um modelo de doença de Alzheimer. Ao final, na discussão geral, é feito um fechamento de todos os resultados apresentados previamente.

As atividades práticas deste trabalho foram realizadas inicialmente no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Rio Grande do Sul) e, principalmente, 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). A análise multivariada dos resultados foi realizada em conjunto com o Laboratório de Quimiometria e Instrumentação Analítica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A etapa de avaliação da atividade biológica foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans* da Universidade Federal do Pampa (Uruguaiana, Rio Grande do Sul).



## 2. OBJETIVOS

---



## **2.1. OBJETIVOS GERAIS**

Desenvolver metodologia analítica que possibilite a determinação da composição fenólica de sucos de uva e avaliar a atividade antioxidante *in vivo* dos mesmos.

## **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Desenvolver metodologia analítica para a análise de compostos fenólicos em sucos de uva utilizando como técnica analítica a cromatografia a líquido de ultra eficiência acoplada a um detector de massas;
- b) Executar a validação da metodologia analítica desenvolvida comprovando que esta é adequada para o uso pretendido;
- c) Identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes em amostras de sucos de uva elaborados a partir de diferentes processos e com uvas cultivadas em condições variadas;
- d) Avaliar a atividade antioxidante *in vivo* dos compostos fenólicos presentes nos sucos de uva utilizando *Caenorhabditis elegans* como modelo.



### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---





### 3.1 Aspectos gerais e breve histórico da viticultura

A videira (*Vitis* spp.) é uma planta trepadeira pertencente à família *Vitaceae*. As duas espécies mais amplamente distribuídas e de elevada importância comercial do gênero *Vitis* são *Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca*. As cultivares pertencentes à espécie *Vitis vinifera* foram domesticadas na região da Anatólia e de lá foram, inicialmente, distribuídas pelo continente europeu e parte da Ásia, por isso são chamadas de europeias (SOUSA, 1996). Já as cultivares pertencentes à espécie *Vitis labrusca* são nativas do continente norte-americano, mais especificamente da região nordeste dos Estados Unidos, e por isso são conhecidas como americanas (CREASY; CREASY, 2009; JACKSON, 2008). As cultivares ditas híbridas são resultado dos cruzamentos feitos entre cultivares europeias e americanas.

No Brasil, não existem espécies nativas de videira. As primeiras espécies, europeias, foram introduzidas no país a partir do estado de São Paulo, vindas da Ilha da Madeira e trazidas por agricultores portugueses. Nos Estados Unidos, após incansáveis tentativas de cultivar as variedades europeias, resolveu-se recorrer às variedades nativas para o cultivo de vinhedos (SOUSA, 1996). Estas se mostraram mais resistentes às doenças que tipicamente afetam as variedades *Vitis vinifera*, despertando também o interesse dos viticultores brasileiros e logo sendo introduzidas em diferentes regiões do país.

No Rio Grande do Sul, os vinhedos de variedades *Vitis vinifera* foram introduzidos primeiro pelos espanhóis, depois pelos portugueses, franceses, e, mais tarde, por italianos e alemães, e foram as únicas variedades cultivadas até a metade do século XIX, quando as variedades americanas (principalmente *Vitis labrusca*), chegaram ao território gaúcho e passaram a exercer completa predominância (SOUSA, 1996).

As variedades das uvas do grupo das americanas, especialmente da espécie *Vitis labrusca*, e seus híbridos são denominadas “uvas rústicas” ou “uvas comuns” e possuem um aroma dito “foxado” que não é muito bem aceito por muitos consumidores de vinho. No entanto, esse aroma característico e o equilíbrio açúcar/acidez presente nessas uvas tornam seu uso apropriado para o consumo *in natura* e para a produção de vinhos de mesa e suco de uva (HOFFMAN; CAMARGO; MAIA, 2005; RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

As principais variedades de uva cultivadas no Brasil para a elaboração de suco de uva e de vinhos de mesa são Bordô, Concord e Isabel. A cultivar tradicional Bordô é uma uva americana tinta de elevada produtividade, mas que apresenta dificuldade de desenvolvimento em climas tropicais. Esta uva possui alta concentração de matéria corante, motivo principal de sua significativa difusão. Origina suco intensamente colorido e pode ser usada inclusive para a melhoria da cor dos produtos à base de outras cultivares (HOFFMAN; CAMARGO; MAIA, 2005).

Concord é uma cultivar americana bastante tradicional na produção do suco de uva devido às suas características de sabor e aroma, sendo bastante usada para melhoria de sabor e da qualidade aromática de sucos feitos com outras variedades. Por ter elevada rusticidade, muitas vezes se pode dispensar o tratamento com fungicidas. Apresenta dificuldade de adaptação em climas tropicais e por esse motivo é cultivada principalmente nos três estados do sul do Brasil (HOFFMAN; CAMARGO; MAIA, 2005).

A cultivar Isabel está entre as variedades mais cultivadas no Brasil, especialmente no Rio Grande do Sul onde representa, juntamente com a Bordô, quase metade da área vitícola do Estado (MELLO *et al.*, 2017). Muito rústica, possui sabor característico das labruscas originando produtos com tipicidade e boa aceitação no mercado. A Isabel Precoce é um clone da Isabel, decorrente de mutação somática espontânea. Ela apresenta as características gerais da cultivar Isabel, porém sua maturação é antecipada em 33 dias (CAMARGO, 2004).

A Niágara Rosada é uma variedade *Vitis labrusca* proveniente de uma mutação somática ocorrida em plantas de Niágara Branca (CABRAL, 2009; CULTIVARES DE UVA E PORTA-ENXERTOS DE ALTA SANIDADE - NIAGARA ROSADA, [s.d.]; SILVA *et al.*, 2006). É muito cultivada no estado de São Paulo especialmente para consumo *in natura*.

Recentemente, outras variedades híbridas, obtidas pelo Programa de Melhoramento Genético da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Uva e Vinho, têm se destacado e sido cultivadas e utilizadas na elaboração de suco. A BRS-Rúbea é uma cultivar de *Vitis labrusca* originada do cruzamento das variedades Niágara Rosada e Bordô. Foi desenvolvida em 1965 visando ao aprimoramento do suco de uva brasileiro (CAMARGO, UMBERTO ALMEIDA; DIAS, 1999). A partir dela, foram desenvolvidas outras variedades como a BRS-Magna,

cultivar híbrida também desenvolvida especialmente para elaboração de suco. Possui ampla adaptação climática e foi lançada como uma alternativa para a melhoria da cor, da doçura e do sabor do suco de uva no Brasil. Essa cultivar foi desenvolvida em 1999, na Embrapa Uva e Vinho, em Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul (RITSCHER *et al.*, 2012).

Assim como a BRS-Magna, a BRS-Violeta foi desenvolvida a partir do Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Uva e Vinho, em 1999, e foi obtida a partir do cruzamento das cultivares BRS-Rúbea e IAC 1398-21. É uma cultivar precoce e que se adapta muito bem às condições de clima temperado e subtropical, bem como às regiões tropicais. O suco elaborado com essa cultivar apresenta intensa coloração violácea, sabor “aframboezado” característico e acidez relativamente baixa (CAMARGO; MAIA; NACHTIGAL, 2005).

Também desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Uva e Vinho, as cultivares BRS-Cora e BRS-Carmem são variedades híbridas obtidas a partir de cruzamentos envolvendo a BRS-Rúbea. A BRS-Carmem é uma cultivar tardia para suco enquanto que a BRS-Cora é adaptada a climas tropicais (CAMARGO; MAIA, 2004; CAMARGO; MAIA; RITSCHER, 2008).

## **3.2 Suco de Uva**

### **3.2.1 Classificação de bebidas no Brasil**

De acordo com o Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009 (BRASIL, 2009), bebida é um produto de origem vegetal industrializado sem finalidade medicamentosa ou terapêutica. De maneira geral, as bebidas podem ser classificadas como:

- a) Bebida não alcoólica: é a bebida com graduação alcoólica de até meio por cento (0,5%) em volume, a vinte graus Celsius (20 °C), de álcool etílico potável;
- b) Bebida alcoólica: é a bebida com graduação alcoólica acima de meio por cento (0,5%) em volume até cinquenta e quatro por cento (54%) em volume, a vinte graus Celsius (20 °C).

As bebidas não alcoólicas podem ser classificadas, resumidamente, como refrigerante, refresco, néctar e suco.

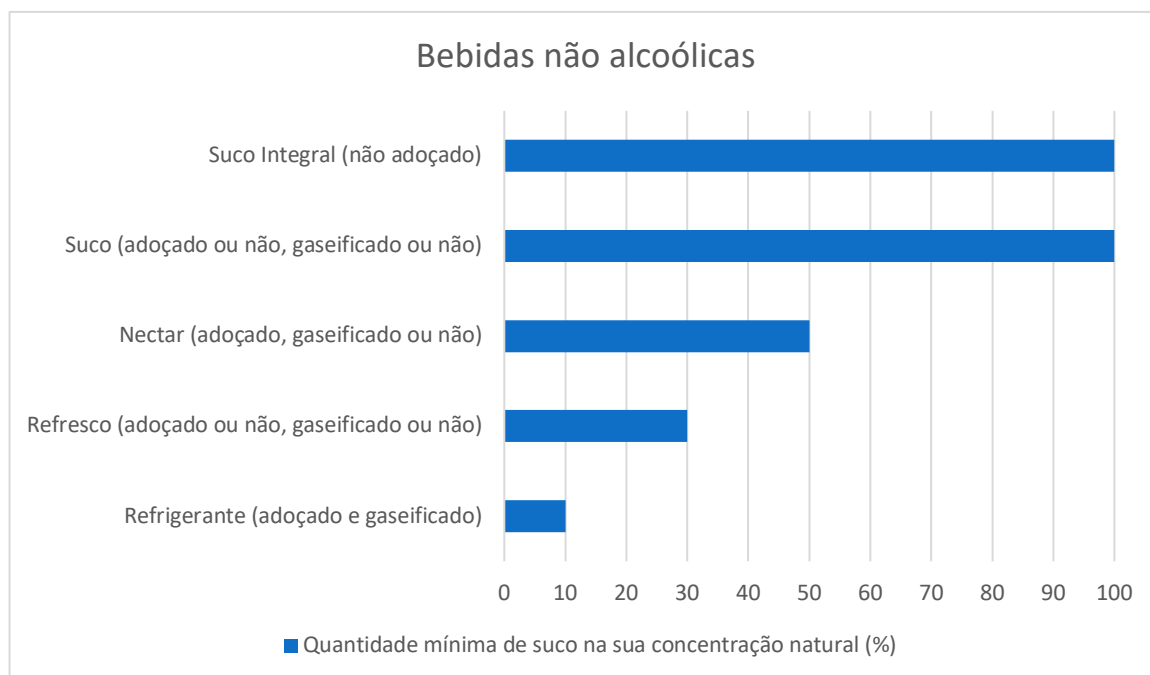
Refrigerante é a bebida gaseificada (obrigatoriamente saturada com dióxido de carbono), obtida pela diluição de suco em água potável e adicionada de açúcar. Os refrigerantes de uva devem conter no mínimo dez por cento (10%) em volume de suco na sua concentração natural.

Refresco é a bebida não fermentada, obtida pela diluição do suco em água potável, podendo ou não ter adição de açúcar. Os refrescos de uva devem conter no mínimo trinta por cento (30%) em volume de suco na sua concentração natural. Estes podem ou não ser gaseificados.

Néctar é a bebida não fermentada, obtida pela diluição em água potável do suco e com adição de açúcares. Este deve conter, especificamente no caso do néctar de uva, no mínimo cinquenta por cento (50%) em volume de suco na sua concentração natural (BRASIL, 2012), podendo ou não ser gaseificado.

Suco é a bebida não fermentada, não diluída, obtida da fruta madura e sã (BRASIL, 2009). Pode ser parcialmente desidratado, sendo, nesses casos, denominado de suco desidratado ou concentrado (quando a retirada de água for suficiente para elevar em, no mínimo, cinquenta por cento (50%) o teor de sólidos solúveis presentes no respectivo suco integral) (BRASIL, 2018). O suco desidratado/concentrado, quando reconstituído, deve apresentar as condições originais do suco integral. A designação integral é privativa do suco sem adição de açúcares, corantes ou aromas e na sua concentração natural, sendo vedado o uso de tal designação para o suco reconstituído (BRASIL, 2018).

O suco não pode conter substâncias estranhas à fruta como aromas e corantes artificiais. Poderá ser adicionado de açúcares na quantidade máxima de dez por cento (10%) em peso, tendo sua denominação acrescida pela designação adoçado. Quando adicionado de dióxido de carbono, deverá ser designado gaseificado (BRASIL, 2009). A Figura 3.1 apresenta um resumo das bebidas não alcoólicas.



**Figura 3.1** - Quantidade mínima de suco de uva na sua concentração natural (%) em bebidas não alcoólicas (BRASIL, 2009, 2012, 2018).

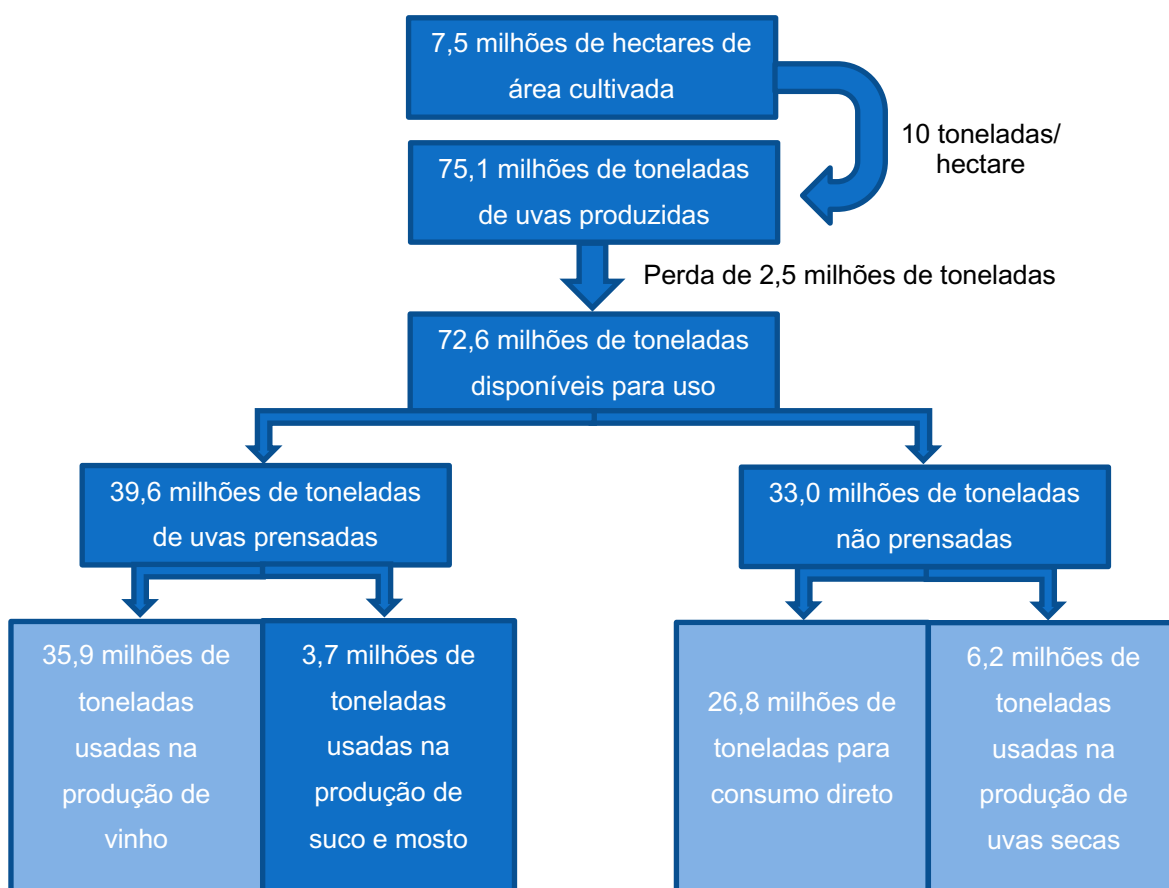
### 3.2.2 O suco de uva no Brasil e no mundo

A uva é uma das frutas mais produzidas no mundo, com aproximadamente 75 milhões de toneladas geradas a cada ano e tendo ocupado, em 2017, uma área de cultivo 7,5 milhões de hectares espalhados em 100 países. Dos 75 milhões de toneladas de uvas, algo em torno de 5% são destinadas à produção de suco e mosto (OIV, 2017, 2018). A Figura 3.2 apresenta um esquema representativo da situação global da vitivinicultura no ano de 2014 (FAO-OIV, 2016).

Em 2017, 37% das uvas cultivadas no ano corresponderam à produção europeia, 34% à asiática e 19% à produção americana (OIV, 2018). A produção europeia de uvas tem decaído pouco a pouco ao longo dos anos, a asiática está rapidamente crescendo, especialmente na China, inclusive ultrapassando os níveis de produção europeus, enquanto que a produção nas Américas tem se mantido estável.

As variedades de uvas destinadas à produção de suco devem destacar-se pelo bom rendimento, adequada relação açúcar/acidez e sabor e aroma agradáveis. As

uvas rústicas (americanas ou híbridas) mantêm essas características inclusive após a pasteurização, diferentemente das uvas da espécie *Vitis vinifera* que ficam com gosto de cozido ao longo do processamento. Isso explica a falta de sabor dos sucos de uva europeus, onde a significativa maioria das uvas cultivadas é *Vitis vinifera* (MARZAROTTO, 2010). Na Europa, praticamente todo o cultivo de uvas é destinado à produção de vinhos, sendo o suco de uva pouco produzido e pouco consumido nesse continente. Os Estados Unidos da América são o país que mais produz suco de uva no mundo e utilizam, para esse fim, principalmente a variedade Concord. O Brasil é o segundo maior produtor de suco de uva do mundo, exportando, juntamente com os Estados Unidos, milhões de litros de suco para países como Canadá e Japão (informação verbal<sup>1</sup>)(MELLO, 2017, 2018, 2019).



**Figura 3.2** – Esquema representativo sobre a situação global da vitivinicultura em 2014 (FAO-OIV, 2016).

No ano de 2018, a área plantada com videiras no Brasil foi de 75.951 ha, sendo que o estado do Rio Grande do Sul deteve 62,39% da área vitícola nacional com 822

mil toneladas de uva produzidas. Atualmente o estado de Pernambuco é o segundo maior produtor de uvas do país, tendo produzido, em 2018, 423 mil toneladas de uva (a maioria para consumo *in natura*). A região do vale do Rio São Francisco tem crescido muito no cultivo de uvas devido ao fato de o clima tropical possibilitar mais de uma colheita por ano, o que tem feito com que algumas empresas de pequeno e médio porte se instalem na região. O estado de São Paulo é o terceiro maior produtor de uvas no país tendo contabilizado, em 2018, um total de 128 mil toneladas de uvas produzidas (MELLO, 2019). Nessa região caracteriza-se a produção de uvas para consumo *in natura*, com grande produção da uva Niágara Rosada (MELLO, 2017).

No estado do Rio Grande do Sul são cultivadas mais de 130 variedades de uva sendo que 30 delas somam mais de 95% da área total. A cultivar Isabel ocupou, em 2015, 26,09% da área vitícola, seguida pela Bordô com 23,10% (MELLO *et al.*, 2017). Ambas são as principais cultivares utilizadas na produção do suco de uva. Em 2018 foram produzidos, no Rio Grande do Sul 189.867.546 litros de suco de uva (MELLO, 2019).

### 3.2.3 Aspectos econômicos da produção e consumo de suco de uva

A maior parte da produção de uvas cultivadas no Rio Grande do Sul é destinada à elaboração de suco de uva (35% das uvas processadas em 2018), derivado que apresenta o maior crescimento no consumo. A cada ano, a quantidade de suco de uva integral comercializado atinge valores mais elevados (MELLO, 2019). O aumento no consumo de suco de uva nos últimos anos pode estar relacionado ao fato de as pessoas estarem em busca de produtos e hábitos mais saudáveis. A Tabela 3.1 apresenta a quantidade de suco de uva integral comercializado no Rio Grande do Sul nos anos de 2016, 2017 e 2018.

**Tabela 3.1** – Comercialização de suco de uva integral no Rio Grande do Sul, em litros, de 2016 a 2018 (MELLO, 2019).

<b>PRODUTO</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>
<b>SUCO INTEGRAL</b>	85.199.190	107.243.326	140.472.108

Em 2018 o consumo *per capita* de suco foi de 1,33 litro por habitante (MELLO, 2019). Calcula-se um faturamento em torno de R\$ 800 milhões com a comercialização

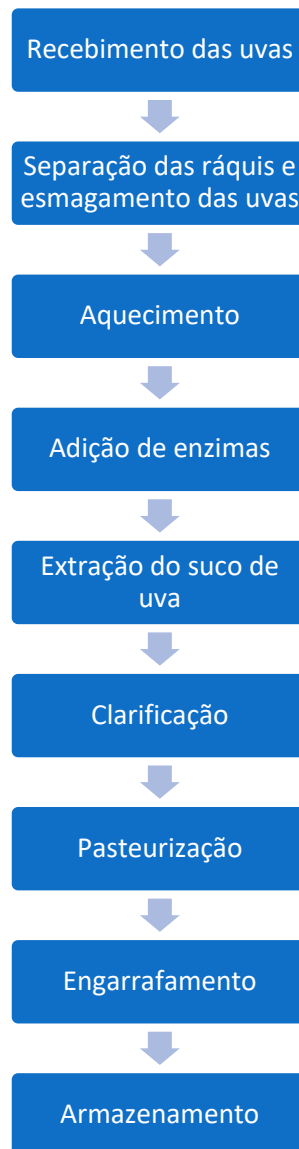
de suco de uva no ano de 2017 (VERGARA, 2017). O Brasil possui em torno de 400 estabelecimentos produtores de suco de uva registrados. Desses, aproximadamente 250 estão do Rio Grande do Sul (VENTURIN, 2014). Porém estima-se que exista um grande número de pequenos empreendimentos familiares que elaboram suco de uva dito “caseiro ou de panela” (ver item 3.2.4 b) e que estão, em sua grande maioria, na informalidade, comercializando o produto em feiras de agricultura familiar e para consumidores do entorno de suas propriedades. Essa atividade contribui de forma importante para a renda das micro e pequenas propriedades rurais (GUERRA *et al.*, 2016).

### **3.2.4 Processo produtivo do suco de uva**

Suco de uva é o produto não fermentado mais simples de ser obtido das uvas (FAO-OIV, 2016). Estas são submetidas a um processo rápido, quando comparado ao tratamento a que são submetidas as uvas para obtenção de vinho, e que deve gerar um produto que assegure qualidade e conservação das características organolépticas até o momento do consumo. No Brasil, o processo mais utilizado para a produção de suco de uva é o método Welch que envolve o aquecimento das uvas (MARZAROTTO, 2010). De maneira geral, podemos resumir a produção de suco de uva conforme o esquema apresentado na Figura 3.3.

Após o recebimento das uvas na propriedade vitícola, o processo produtivo do suco de uva inicia com a separação das ráquis e esmagamento das bagas. Essa etapa pode ser feita manualmente ou com o auxílio de um equipamento chamado desengaçadeira/esmagadeira. O esmagamento das bagas é aconselhado para aumentar a superfície de contato das uvas que serão a seguir aquecidas para extração do suco (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). Neste caso, o termo extração se refere ao ato de separar o suco da parte sólida das uvas.



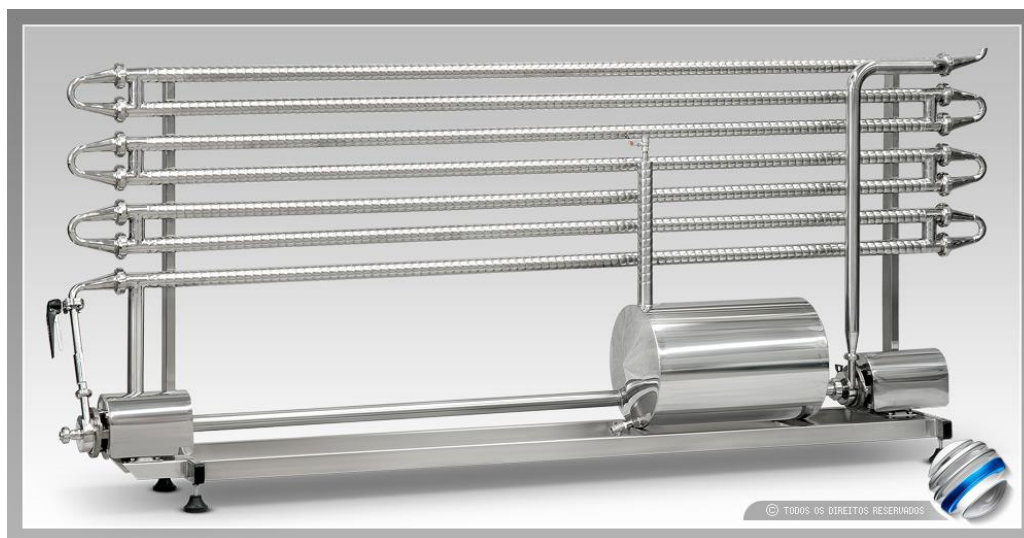


**Figura 3.3** – Etapas do processo de elaboração do suco de uva. Adição de enzimas e clarificação são procedimentos utilizados apenas nos processos por trocador de calor (GUERRA *et al.*, 2016; RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

O aquecimento é a etapa mais importante da produção do suco de uva. É neste momento que grande parte dos compostos benéficos presentes nas uvas são extraídos. O aquecimento deve alcançar uma temperatura de no mínimo 65 °C para adequada extração dos compostos fenólicos e no máximo 80 °C para não atribuir gosto de cozido ao suco (GUERRA *et al.*, 2016; RIZZON; MENEGUZZO, 2007). De maneira geral, podemos diferenciar os equipamentos utilizados na etapa de aquecimento conforme o volume de produção:

a) Termo-macerador tubular (sistema tubo em tubo): é um método de extração por trocador de calor muito utilizado para a elaboração de suco de uva integral em médios

e grandes volumes. O aquecimento é feito de forma indireta através de dois tubos concêntricos, sendo que na parte externa circula água quente e na parte interna, em contracorrente, circula a uva esmagada. O processo deve ser conduzido conservando-se um fluxo contínuo de uva esmagada, o que é possível através de uma bomba helicoidal. Conectado ao sistema tubo em tubo existe um tanque de reação enzimática. A etapa de adição de enzimas (pectinases) é realizada com objetivo de quebrar as pectinas que, quando presentes em grande quantidade, aumentam a viscosidade do suco dificultando sua extração e clarificação. A etapa de clarificação é realizada após a extração do suco e tem como objetivo diminuir os depósitos (borra) causados pelas pectinas, mucilagens, gomas, compostos fenólicos, bitartarato de potássio e tartarato de cálcio que acabam se depositando no fundo do frasco. Acoplado ainda ao sistema tubo em tubo pode haver um tanque de resfriamento, um pasteurizador e um aparato automático de envase. A Figura 3.4 apresenta um sistema tubo em tubo para aquecimento das uvas (GUERRA *et al.*, 2016; RIZZON; MENEGUZZO, 2007).



**Figura 3.4** – Sistema tubo em tubo para aquecimento das uvas (GUERRA *et al.*, 2016). Fonte: Japa Componentes Ltda.

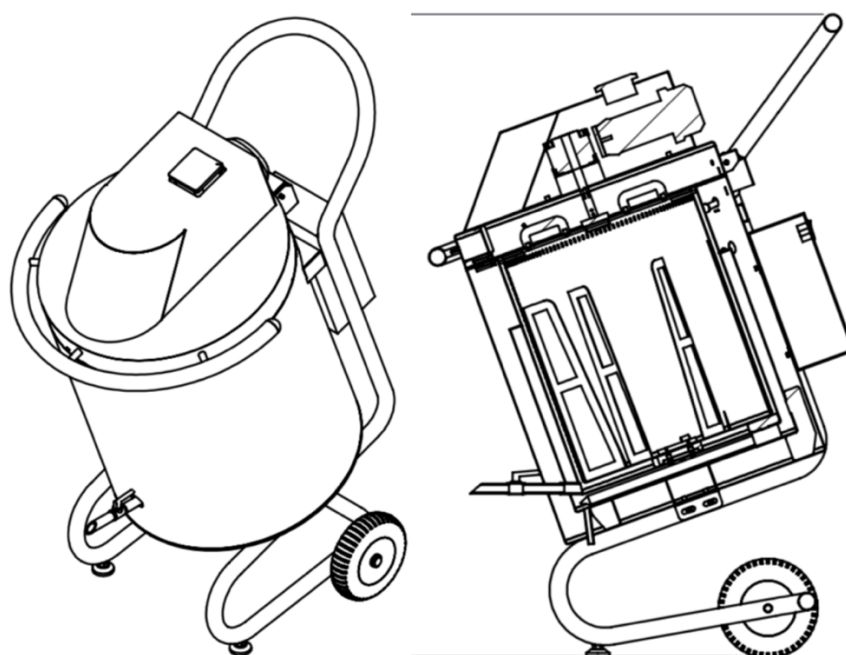
b) Painela extratora por arraste de vapor: a painela extratora é uma derivação do método Welch. Utilizada na fabricação de pequenos volumes de suco de uva, é um aparato simples e possui um custo de aquisição e manutenção muito mais baixo quando comparada ao termo-macerador tubular. Por esse motivo, tem sido o equipamento de escolha da grande maioria dos pequenos produtores de suco. A capacidade da painela pode variar de 5 a 80 kg de uva. Ela é formada por um depósito

de água, que é aquecido por uma fonte de calor (fornalha, caldeira, vaso de aquecimento, queimador a gás ou a óleo diesel) para geração de vapor. Sobre esse depósito de água é colocado um recipiente com abertura cônica no centro para passagem do vapor e com uma abertura lateral para o escoamento do suco. Acima é sobreposto um recipiente perfurado onde as uvas são colocadas. O catálogo explicativo com o funcionamento da panela extratora encontra-se anexo a esta tese (CATÁLOGO - PANELA EXTRATORA DE SUCO A VAPOR (SUQUEIRA) - HAUBER MACANUDA, [s.d.]). Se pode utilizar apenas uma panela ou é possível dispor várias delas em série, otimizando o processamento, conforme mostrado na Figura 3.5 (GUERRA *et al.*, 2016; RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998). O fato de o aquecimento do suco não ser de forma indireta como no sistema tubular, faz com que esse contato do vapor com as uvas acabe incorporando certa quantidade de água ao suco. A quantidade de água incorporada varia conforme o tempo de aquecimento, alguns estudos relatam cerca de 20% (BRESOLIN; GULARTE; MANFROI, 2013; GUERRA *et al.*, 2016; MARCON, 2013). Por causa dessa incorporação de água exógena, o suco produzido na panela extratora não está conforme os padrões legais para suco integral vigentes no país e, portanto, não pode, a rigor, sequer receber tal denominação (ver item 3.2.1) (GUERRA *et al.*, 2016).



**Figura 3.5** – Conjunto de panelas extradoras por arraste de vapor. À esquerda está a fonte de aquecimento, quatro panelas ao centro e uma envasadora manual à direita (GUERRA *et al.*, 2016). Fonte: AGM Máquinas Ltda.

c) Suquificador integral: este sistema foi desenvolvido pela Embrapa Uva e Vinho com o objetivo de solucionar a questão tecnológica da elaboração de suco integral em pequenos volumes. O aquecimento das uvas no suquificador é feito por condução e por isso não há incorporação de água exógena. Esse equipamento é constituído basicamente por um tanque inclinado com camisa dupla contendo um líquido aquecedor; a fonte de energia para aquecimento desse líquido é a energia elétrica. A inclinação foi planejada de modo que haja uma melhor distribuição do calor. A temperatura e o tempo de aquecimento podem ser controlados pelo operador. A parte interna do tanque possui um tambor giratório e perfurado onde são colocadas as uvas, com capacidade para até 70 kg. Esse tambor gira ao redor de um eixo central facilitando a homogeneização. Através do tambor perfurado, ocorre o escoamento do líquido para o recipiente inferior onde está uma válvula por onde é feita a retirada do suco que pode ser engarrafado diretamente, caso tenha sido atingida a temperatura de 80 °C (pasteurização). No entanto, pode ser interessante a realização de um processo de decantação a frio para separar a borra. Se feita a decantação, o suco precisa retornar para o suquificador para ser pasteurizado e então engarrafado (GUERRA *et al.*, 2016). A Figura 3.6 apresenta um desenho esquemático do suquificador integral.



**Figura 3.6** – Desenho esquemático do suquificador integral (GUERRA *et al.*, 2016).

Após a etapa de aquecimento, é realizada a extração do suco de uva que, conforme mencionado anteriormente, nada mais é do que a separação do suco do bagaço restante. Esta etapa pode ser realizada com o auxílio de uma prensa manual ou automática. A extração pode ser precedida de uma etapa de adição de enzimas e depois sucedida por uma etapa de clarificação do suco, conforme já mencionado no sistema tubo em tubo. Antes de ser engarrafado é preciso garantir que seja atingida a temperatura de 80 °C necessária para pasteurizar o produto. A etapa de engarrafamento pode ser automática ou manual. No caso de fazê-la manualmente, é interessante engarrafar o suco quente e tampá-lo imediatamente, dessa forma, além de minimizar os riscos de contaminação, forma-se um vácuo dentro da garrafa que serve de lacre para a tampa da mesma.

### **3.2.5 Valor nutracêutico do suco de uva**

Organismos aeróbicos produzem energia a partir da oxidação de substratos orgânicos através do oxigênio molecular. No entanto, o oxigênio utilizado nessa produção energética é um forte agente oxidante e, por esse motivo, é impossível evitar que ocorram oxidações secundárias não envolvidas no metabolismo fisiológico. Esses processos oxidativos secundários podem trazer consequências deletérias ao organismo caso não sejam neutralizados por um sistema antioxidante eficiente (SORG, 2004). Os agentes oxidantes podem ser classificados como radicais livres (aqueles que contêm um elétron desemparelhado) ou não radicais (não possuem elétron desemparelhado). São geralmente originados de átomos de oxigênio, denominados espécies reativas de oxigênio (em inglês *reactive oxygen species* – ROS) ou de átomos de nitrogênio, denominados espécies reativas de nitrogênio (em inglês *reactive nitrogen species* – RNS) (JÚNIOR *et al.*, 2013; RICE-EVANS, 1999). Sendo assim, o estresse oxidativo corresponde a um desequilíbrio entre a taxa de produção de agentes oxidantes e sua degradação e ocorre quando a produção de radicais livres está acelerada ou quando os mecanismos envolvidos na proteção se encontram deteriorados.

Os principais danos do estresse oxidativo no organismo envolvem a lipoperoxidação, a oxidação de proteínas e o dano ao DNA (RICE-EVANS, 1999). Por esse motivo, o estresse oxidativo está envolvido em diversas patologias como lesão

de isquemia-reperfusão, aterosclerose, excitotoxicidade, doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson, complicações do diabetes mellitus, envelhecimento precoce, dentre outras (EVORA *et al.*, 1996; HALLIWELL, 2011; SORG, 2004; VALKO *et al.*, 2007).

Os antioxidantes são substâncias que combatem o estresse oxidativo suprimindo a formação de radicais livres, inibindo a ocorrência de reações de oxidação em cadeia e reparando processos oxidativos (RICE-EVANS, 1999). Os compostos fenólicos presentes nas uvas e em seus derivados são um grupo heterogêneo, constituído de várias classes de substâncias com propriedades antioxidantes e que, por esse motivo, possuem um papel muito importante na prevenção das doenças associadas ao estresse oxidativo (MANACH *et al.*, 2004).

O papel dos polifenóis da uva como antioxidantes tornou-se mais evidente a partir de 1992 com o chamado “paradoxo francês”. Nesse período, foi realizado um estudo com o objetivo de entender a baixa mortalidade dos franceses apesar do elevado consumo de alimentos com alto teor de gorduras e bebidas alcoólicas, especialmente vinho. O estudo comprovou a ação benéfica do vinho em relação à doença cardíaca coronária (RENAUD; DE LORGERIL, 1992) e a partir disso, muitos outros estudos relacionados aos benefícios das uvas e de seus derivados têm sido realizados.

O consumo de álcool é tema de grande contradição entre pesquisadores e profissionais da saúde. Apesar do consumo moderado de vinho tinto, já largamente estudado, ser comprovadamente benéfico devido à alta concentração de compostos fenólicos presentes nessa bebida (PAZZINI *et al.*, 2015; SILVA, 2016; SNOPEK *et al.*, 2018; VACCARI; SOCCOL; IDE, 2009; WHELAN *et al.*, 2004), alguns estudos têm mostrado que o consumo de álcool, mesmo em quantidades pequenas e moderadas pode ser prejudicial ao organismo. PELUCCHI *et al.* (2011) afirmam que pequenas quantidades de álcool (até uma dose por dia) levam a um aumento de 20 a 30% no risco de câncer de boca e de faringe, por exemplo. Por sua vez, o risco de câncer de mama aumenta com tão somente três a seis doses de álcool por semana. Outro estudo conduzido com base no *Global Burden of Diseases Study 2016* (Carga Global de Doenças 2016) concluiu que a quantidade segura de consumo de álcool é zero, pois este contribui de muitas maneiras para uma redução dos níveis de saúde e de qualidade de vida da população mundial (GRISWOLD *et al.*, 2018).

Além dos fatores de risco apresentados pelo consumo de álcool, deve-se levar em consideração que nem todas as pessoas podem ou desejam consumir produtos alcoólicos. Seja por uma condição prévia de saúde, como cirrose, seja por convicção pessoal ou religiosa ou então por uma questão de restrição legal da idade permitida para o consumo de álcool, como é o caso das crianças e adolescentes. Por esses motivos, o suco de uva integral torna-se uma alternativa ao vinho tinto e uma ótima fonte de compostos fenólicos bioativos, podendo ser consumido livremente devido à ausência do álcool.

Um alimento com valor nutracêuticos é aquele que possui compostos bioativos que trazem benefícios à saúde. Os efeitos benéficos do suco de uva têm sido estudados com maior interesse nos últimos anos. O consumo de suco de uva reduz os níveis de colesterol, atenua a pressão arterial e reduz o risco de desenvolvimento de ateroma de carótida (SHANMUGANAYAGAM *et al.*, 2007). O suco de uva se mostrou duas vezes mais efetivo que o vinho tinto com relação à diminuição dos níveis de colesterol e à prevenção da aterosclerose (VINSON; TEUFEL; WU, 2001). Ratos tratados com dieta rica em gorduras tiveram uma diminuição no estresse oxidativo induzido no cérebro ao serem suplementados com sucos de uva convencionais e orgânicos (sendo o resultado do suco orgânico mais significativo que o do suco convencional) além de terem consumido menos calorias, portanto, ganhando menos peso que aqueles animais que não receberam os sucos. Esse último efeito pode ser atribuído ao fato de os flavonoides (uma classe de compostos fenólicos) aumentarem a termogênese e a oxidação de gorduras no organismo (CARDOZO *et al.*, 2013).

Um estudo publicado em 2013 demonstrou a ação anti-inflamatória do suco de uva sobre a colite induzida em ratos. O suco de uva concentrado colocado na água dos animais a uma concentração de 1% (v/v) foi capaz de reduzir a severidade e a extensão dos danos causados pela colite (MARCHI *et al.*, 2014; PAIOTTI *et al.*, 2013). O suco de uva também provou exercer um interessante potencial ergogênico (semelhante ao gerado pelos suplementos para atletas) quando testado em um grupo de corredores recreacionais. Houve um aumento significativo (15,3%) no tempo de corrida até a exaustão do grupo que recebeu a suplementação com suco de uva durante 28 dias (TOSCANO *et al.*, 2015).

A absorção dos compostos fenólicos presentes no suco é primordial para que estes possam atuar como antioxidantes no organismo. Poucos estudos avaliam a

absorção e o metabolismo dos compostos fenólicos em suco de uva. STALMACH *et al.* (2011) quantificaram compostos fenólicos (e seus metabólitos) em amostras de suco de uva, e também na urina e no plasma humano após o consumo do suco. Outro estudo comprovou a biodisponibilidade da catequina e do ácido gálico através da quantificação destes no plasma e na urina após a ingestão de suco de uva (LUTZ *et al.*, 2014). Estudos mais aprofundados sobre essa questão precisam ser conduzidos. No entanto, a evidente atividade biológica do suco de uva já relatada nos ensaios *in vivo* citados anteriormente indica, implicitamente, pelo menos alguma absorção dos compostos fenólicos bioativos presentes no suco.

### **3.3 Compostos fenólicos**

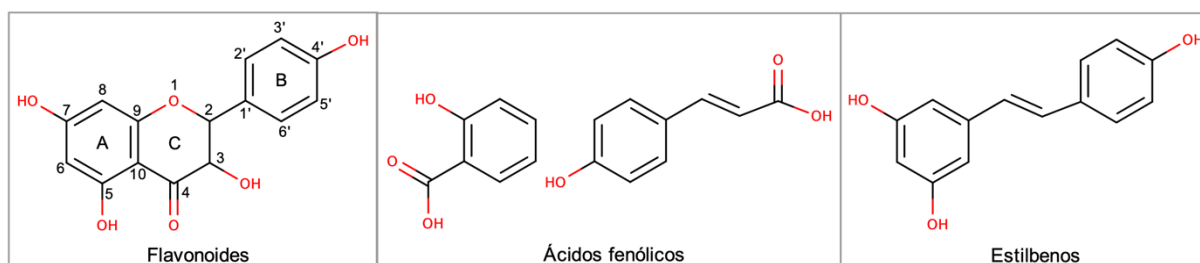
#### **3.3.1 Classificação e biossíntese**

Fitoquímicos são um grupo amplo de compostos orgânicos produzidos e acumulados nas plantas. As plantas sintetizam uma grande gama de fitoquímicos que podem ser classificados como metabólitos primários e metabólitos secundários. Os metabólitos primários (fitoesteróis, lipídios, nucleotídeos, aminoácidos e ácidos orgânicos) são compostos que exercem atividades essenciais para o desenvolvimento da planta como fotossíntese, respiração e crescimento; e por isso são parte intrínseca da sua composição. Já os metabólitos secundários são aqueles que não são essenciais para o desenvolvimento da planta, mas estão frequentemente envolvidos na adaptação desta frente a fatores de estresse biótico e abiótico tendo sua biossíntese induzida por esses fatores (CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006).

Os compostos fenólicos são encontrados em grande quantidade nas uvas, especialmente nas sementes e nas cascas, e são produzidos pela planta quando esta sofre algum tipo de estresse relacionado a ataques de patógenos, incidência de luz UV, baixas temperaturas, falta de nitrogênio, fosfato e ferro no solo, dentre outros. Quando o estresse sofrido pela planta for biótico (causado por patógenos), os compostos fenólicos sintetizados para combater esses patógenos podem ser denominados fitoalexinas. O exemplo mais comum de fitoalexinas são os estilbenos (CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006; DIXON; PAIVA, 1995; GUERRA, 2012).

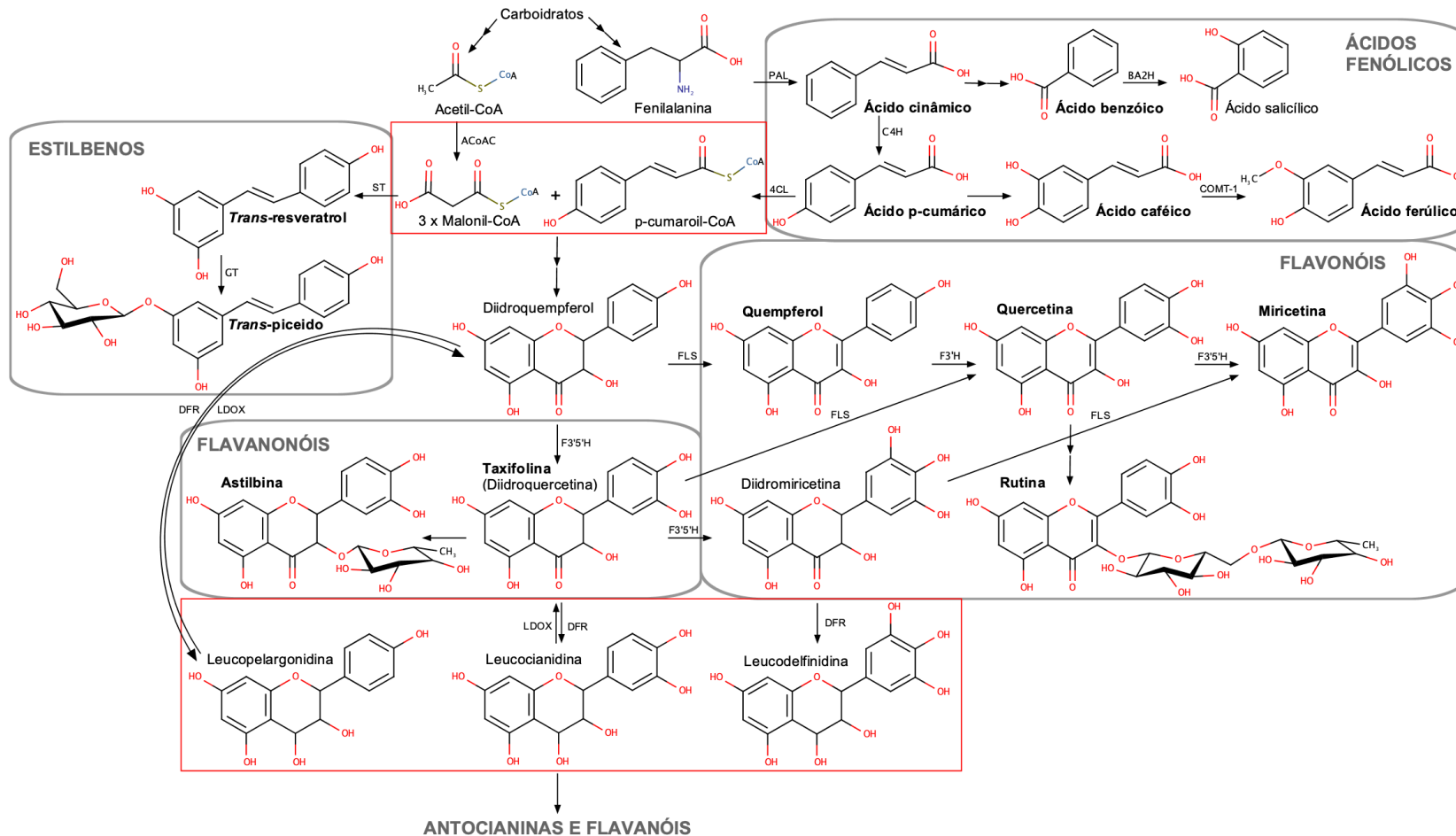


Os compostos fenólicos são caracterizados por possuírem pelo menos um anel aromático ligado a, no mínimo, um grupo hidroxila, podendo este ser substituído ou não. No caso de haver substituição por metila, formando uma metoxila, o composto também é classificado como fenólico. Estes podem ser divididos em dois grupos: os flavonoides e os não flavonoides. Flavonoides (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) são o maior grupo de interesse enológico e são compostos por dois anéis aromáticos (A e B) conectados por uma ponte de três carbonos que, fundida ao anel A, forma o anel C que contém um heteroátomo de oxigênio. Os flavonoides são classificados como antocianinas, flavanóis, flavanonas, flavanonóis e flavonóis. Os não flavonoides são o menor grupo e são compostos pelos ácidos fenólicos derivados do ácido benzoico e do ácido cinâmico (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> e C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, respectivamente) e pelos estilbenos (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) encontrados principalmente na forma ativa *trans* (Figura 3.7) (CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006; GUERRA, 2012; PIETTA; MINOGGIO; BRAMATI, 2003; SILVA, 2016). A Tabela 3.2 apresenta a classificação química dos principais compostos fenólicos presentes em uvas e sucos de uva. As Figuras 3.8, 3.9 e 3.10 apresentam a biossíntese dos principais compostos fenólicos de interesse para a viticultura.

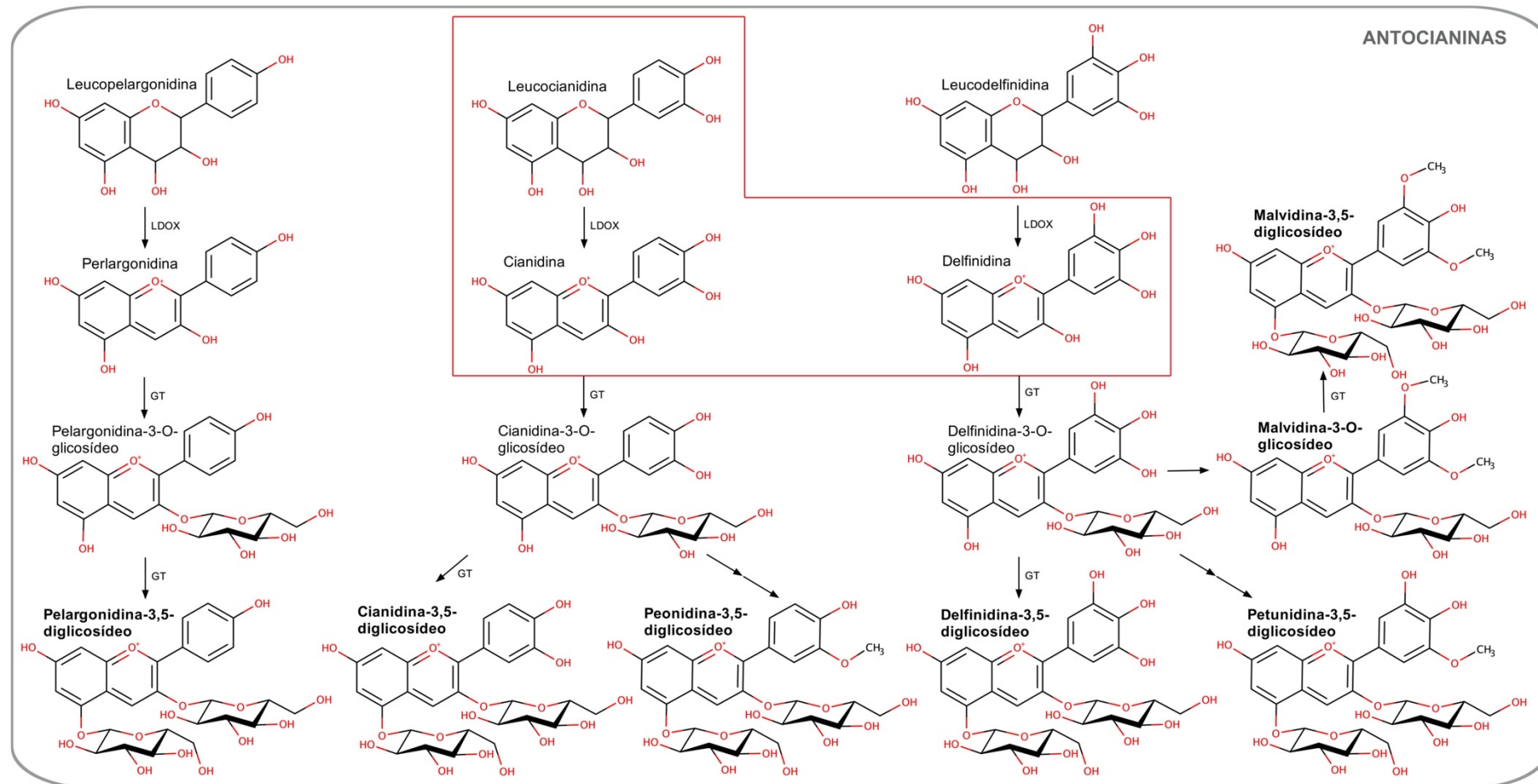


**Figura 3.7** – Estruturas químicas básicas dos compostos fenólicos.

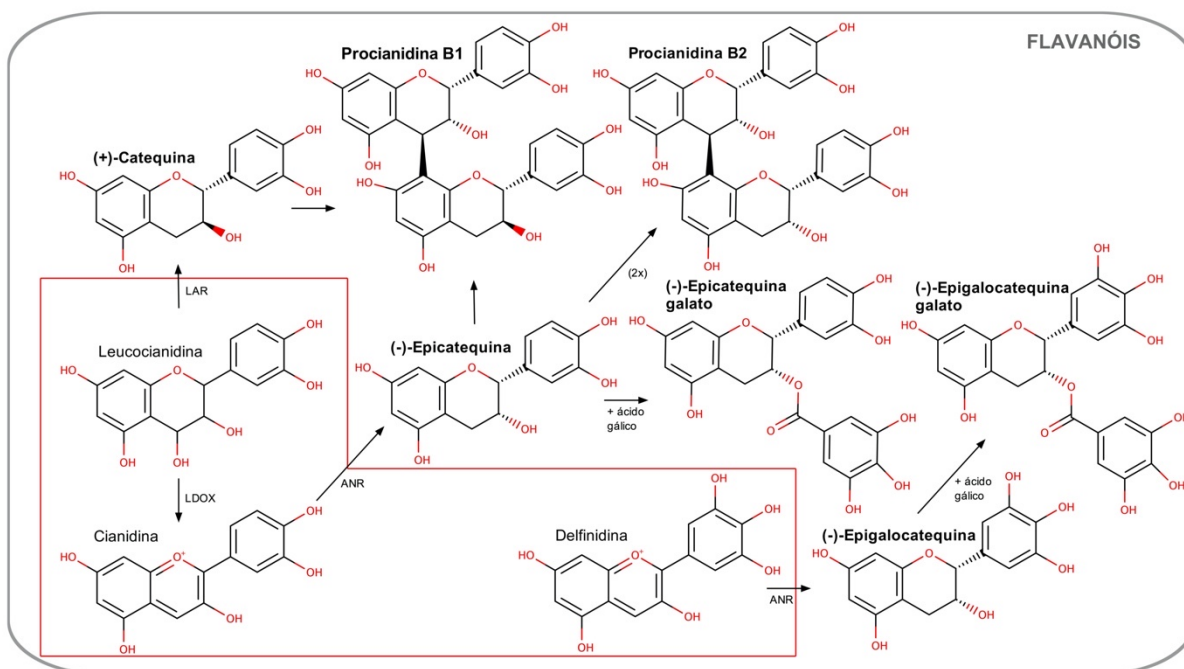
Estima-se que os metabólitos secundários sejam representados por algo em torno de 200 mil moléculas originadas através de diversas rotas de síntese (NASCIMENTO; FETT-NETO, 2010). Especificamente, a biossíntese dos compostos fenólicos envolve uma rede de três rotas complexas: a via do chiquimato que gera a fenilalanina, a via dos fenilpropanoides que, a partir da fenilalanina, vai formar *p*-cumaroil-CoA e a via do malonato que gera malonil-CoA. Malonil-CoA e *p*-cumaroil-CoA são precursores para a biossíntese dos estilbenos e flavonoides (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006; MAEDA; DUDAREVA, 2012).



**Figura 3.8** – Esquema representativo das rotas e das enzimas envolvidas na biossíntese de ácidos fenólicos, estilbenos, flavonóis e flavanonóis. Abreviaturas dos nomes das enzimas: 4CL – p-cumarato:CoA ligase; ACoAC – acetilCoA carboxilase; BA2H – ácido benzoico 2-hidroxilase; C4H – cinamato 4-hidroxilase; COMT-1 – ácido caféico/5-hidroxi-ferúlico O-metil transferase; DFR – diidroflavonol redutase; FLS – flavonol sintase; F3'H – flavonoide 3'-hidroxilase; F3'5'H – flavonoide 3',5'-hidroxilase; GT – glucosil transferase; LDOX – leucoantocianidina dioxigenase; PAL – fenilalanina amônia-liase; ST – estilbeno sintase; (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006; FLAMINI *et al.*, 2013; GENOMENET, [s.d.]; HOLTON; CORNISH, 1995; MAEDA; DUDAREVA, 2012; SILVA, 2016).



**Figura 3.9** – Esquema representativo da rota e das enzimas envolvidas na biossíntese de antocianinas. Abreviaturas dos nomes das enzimas: GT – glucosil transferase; LDOX – leucoantocianidina dioxigenase (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006; FLAMINI *et al.*, 2013; GENOMENET, [s.d.]; HOLTON; CORNISH, 1995; MAEDA; DUDAREVA, 2012; SILVA, 2016).



**Figura 3.10** – Esquema representativo da rota e das enzimas envolvidas na biossíntese de flavanóis. Abreviaturas dos nomes das enzimas: ANR – antocianidina redutase; LAR- leucoantocianidina redutase; LDOX – leucoantocianidina dioxigenase (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006; FLAMINI *et al.*, 2013; GENOMENET, [s.d.]; HOLTON; CORNISH, 1995; MAEDA; DUDAREVA, 2012; SILVA, 2016).

**Tabela 3.2** – Principais compostos fenólicos presentes em uvas e sucos de uva, de acordo com sua classificação química (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006; GUERRA, 2010, 2012; SILVA, 2016).

CLASSIFICAÇÃO	PRINCIPAIS COMPOSTOS FENÓLICOS	
FLAVONOIDES	Antocianinas	cianidina-3,5-diglicosídeo, delfinidina-3,5-diglicosídeo, malvidina-3-O-glicosídeo, malvidina-3,5-diglicosídeo pelargonidina-3,5-diglicosídeo peonidina-3,5-diglicosídeo, petunidina-3,5-diglicosídeo
	Flavanóis	(+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigalotacatequina, (-)-epicatequina galato, (-)-epigalocatequina galato, procianidinas
	Flavanonas	eriodictiol, naringerina
	Flavanonóis	taxifolina, astilbina
	Flavonóis	miricetina, quempferol, quercetina, rutina
	Estilbenos	<i>trans</i> -resveratrol, <i>trans</i> -piceido, pteroestilbeno, piceatanol
NÃO-FLAVONOIDES	Ácidos Fenólicos	- benzoicos: ácido benzoico, ácido gálico ácido salicílico - cinâmicos: ácido caféico, ácido cinâmico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico

### 3.3.2 Métodos analíticos

Atualmente, a qualidade do suco de uva é avaliada através de parâmetros físico-químicos clássicos como dosagem de sólidos solúveis (95% dos quais são açúcares fermentescíveis) e insolúveis, acidez, quantidade de álcool etílico e presença de determinados contaminantes conforme preconizado na legislação brasileira (BRASIL, 2018). A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (em inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations* - FAO) possui um padrão para avaliação da qualidade do suco de uva também baseado em parâmetros físico-químicos clássicos de análise (FAO, 1981). O Compêndio de Métodos Internacionais de Análise de Vinho e Mosto da Organização Internacional do Vinho e da Vinha (em inglês *International Organisation of Vine and Wine* - OIV) apresenta uma série de ensaios para avaliação da qualidade e da composição química do vinho, mas poucos desses métodos são aplicáveis especificamente ao suco de uva (OIV, 2019a, 2019b) e, por esse motivo, faz-se necessário que essas técnicas sejam adaptadas para a análise de suco.

O método químico tradicional mais utilizado para determinar compostos fenólicos em vinhos, mosto e suco de uva é denominado Folin-Ciocalteu. Este expressa o resultado em termos de compostos fenólicos totais, não os diferenciando entre si. Outros métodos quantificam classes específicas de compostos fenólicos, como as antocianinas, no entanto esses também, em sua maioria, expressam o resultado em termos totais (ABE *et al.*, 2007; BLAINSKI; LOPES; DE MELLO, 2013; MALACRIDA; MOTTA, 2005; OIV, 2019a; VARGAS; HOELZEL, 2008).

Métodos específicos para a análise de compostos fenólicos em vinhos têm sido desenvolvidos e são utilizados como rotina no mundo todo. SILVA (2016) avaliou os métodos por cromatografia a líquido de alta eficiência (do inglês *high performance liquid chromatography* – HPLC) e cromatografia a líquido de ultra eficiência (do inglês *ultra-performance liquid chromatography* - UPLC) reportados na literatura para esse fim e listou 26 métodos. Entretanto, no caso do suco de uva a quantidade de métodos disponíveis é bastante inferior. Uma pesquisa na plataforma *Web of Science* utilizando os termos *grape juice* no título e *phenolic compounds* e *quantification* em tópico (ou seja, em qualquer parte do texto) resultou em 14 publicações. Dessas, apenas seis estão relacionadas à quantificação de compostos fenólicos simultânea e

individualmente. A Tabela 3.3 apresenta um resumo dessas publicações. Três dos estudos apresentados relataram a validação completa do método. Em um deles a validação relatada é parcial e os últimos dois estudos não reportaram qualquer tipo de validação. De maneira geral, o tempo de análise é bastante longo na maioria dos métodos (chegando a 60 minutos) e no estudo cujo tempo de análise é menor (11 minutos) são quantificados apenas dois compostos.

Técnicas cromatográficas como HPLC e UPLC são bastante adequadas para a determinação de moléculas orgânicas em matrizes complexas, pois possibilitam a separação desses compostos. O UPLC trouxe grandes avanços em termos de sensibilidade e de diminuição do tempo de análise, possibilitando a quantificação de moléculas em concentrações muito baixas, com um baixo consumo de solventes e menor geração de resíduos químicos (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; SKOOG *et al.*, 2014; USP 40, 2017). Os métodos listados na Tabela 3.3 utilizam detectores de arranjo de diodos (em inglês – *diode array detector* - DAD), detector de fluorescência (do inglês *fluorescence detector* - FD), detector de comprimento de onda variável (do inglês *variable wavelength detector* - VWD) e a espectrometria de massas (do inglês *mass spectrometry* – MS). A espectrometria de massas é um tipo de análise que permite a determinação da massa molecular dos compostos sendo, por esse motivo, o mais seletivo entre os métodos de detecção citados anteriormente (GROSS, 2004; HOFFMANN; STROOBANT, 2007; MENET, 2011).

Sendo assim, fica evidente a necessidade de que a pesquisa em torno do desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação da composição fenólica do suco de uva precisa avançar, não apenas por sua importância, mas também porque os métodos quantitativos existentes são poucos e possuem algumas limitações analíticas, tais como método não validado por completo, poucos compostos analisados, complexo preparo de amostra e/ou tempo de análise longo. Somente um método seletivo, linear, preciso e exato pode expressar resultados confiáveis, especialmente quando se trata de amostras complexas como é o caso do suco de uva. Para esse tipo de amostra, o desenvolvimento de um método único que determine os compostos fenólicos mais significativos, das mais diferentes classes e no menor espaço de tempo possível é de grande interesse.

**Tabela 3.3** – Métodos analíticos reportados na literatura para quantificação de compostos fenólicos em suco de uva.

TEMPO (min) <sup>a</sup>	TIPOS DE AMOSTRA	APLICAÇÃO <sup>b</sup>	VALIDAÇÃO	COMPOSTOS FENÓLICOS <sup>c</sup>	REFERÊNCIA
<b>HPLC-DAD</b>					
25	Sucos elaborados com uvas Isabel Precoce, BRS-Cora, BRS-Magna e Violeta.	15	Completa	1, 2, 5, 7, 8, CY, OE, MA, 12, 13, CAT, EG, EGC, PB1, PB2	(PADILHA <i>et al.</i> , 2017)
65	Suco de uva rose da variedade Goethe.	1	NR	7, CAT, EPI, PB1, PB2, 20, 21	(DANI <i>et al.</i> , 2009)
<b>HPLC-DAD-FD</b>					
55	Sucos elaborados com uvas Isabel precoce, BRS-Cora, BRS-Magna, BRS-Violeta, Tempranillo, Syrah, Alicante Bouschet e Moscato Canneli.	7	Completa	1, 3, 4, 5, 7, 9, CY, OE, MA, 10, 11, 13, R, CAT, EPI, EG, EGG, 19, PB1, PB2, 22, M, 23, Q, RU	(NATIVIDADE <i>et al.</i> , 2013)
<b>HPLC-FD-VWD</b>					
37	Suco de uva integral, suco de uva diluído a partir de concentrado (convencional e orgânico) variedade NR, suco integral de uva Merlot e sucos de uva misturados com outras frutas.	11	Completa	15, 16, 17, R	(LÓPEZ-HERNÁNDEZ; QUIRÓS, 2016)
<b>UPLC-DAD</b>					
11	Sucos elaborados com uvas Sauvignon Blanc, Semillon e Chenin Blanc. Vinhos.	12	Parcial	1, CAT	(FRACASSETTI <i>et al.</i> , 2011)
<b>HPLC-DAD-ESI-MS</b>					
60	Suco integral elaborado com uva Concord.	1	NR	9, 11, OE, MA, 13, 14	(STALMACH <i>et al.</i> , 2011)
60		1	NR	1, 5, 6	
60		1	NR	CAT, EPI, EG, EGC, 18,	
60		1	NR	22, 23, 24, 25	
60		1	NR	7, R	

NR: Não reportado. <sup>a</sup>Tempo de análise. <sup>b</sup>Quantidade de amostras de suco analisadas. <sup>c</sup>Fenólicos quantificados individualmente: Ácidos fenólicos: Ácido caféico (1); ácido caftárico (2); ácido cinâmico (3); ácido clorogênico (4); ácido p-cumárico (5); ácido ferúlico (6); ácido gálico (7); ácido siríngico (8). Antocianinas: cianidina-3-O-glicosídeo (9); cianidina-3,5-diglicosídeo (CY); delphinidina-3-O-glicosídeo (10); malvidina-3-O-glicosídeo (OE); malvidina-3,5-diglicosídeo (MA); pelargonidina-3-O-glicosídeo (11); pelargonidina-3,5-diglicosídeo (12); peonidina-3-O-glicosídeo (13); petunidina-3-O-glicosídeo (14). Estilbenos: *trans*-piceatanol (15); *trans*-piceido (16); *trans*-pterostilbeno (17); *trans*-resveratrol (R). Flavanóis: (+)-catequina (CAT); (-)-epicatequina (EPI); (-)-epicatequina galato (EG); (-)-epigallocatequina (EGC); (-)-epigallocatequina galato (EGG); (-)-galocatequina (18); procianidina A2 (19); procianidina B1 (PB1); procianidina B2 (PB2); procianidina B3 (20); procianidina B4 (21). Flavonóis: isoramnetina-3-O-glicosídeo (22); miricetina (M); quempferol-3-O-glicosídeo (23); quercetina (Q); quercetina-3-O-galactosídeo (24); quercetina-3-O-glicosídeo (25); rutina (RU).





**4. CAPÍTULO 1: Método analítico por UPLC-MS para quantificação de compostos fenólicos bioativos em suco de uva**

---



## 4.1 Introdução

Apesar de sua crescente importância tanto em termos econômicos quanto como um alimento com qualidades nutracêuticas, o suco de uva não tem sido tão estudado quanto o vinho. Mesmo sendo elaborados a partir da mesma fruta, o suco de uva e o vinho possuem matrizes complexas e que podem ser consideradas bastante diferentes. A ausência/presença de álcool, a quantidade de açúcares, as variedades comumente utilizadas na elaboração de cada uma dessas bebidas e o próprio perfil dos compostos fenólicos que as compõem tornam essas bebidas diferentes. Por esse motivo, a metodologia analítica que serve para o vinho dificilmente será adequada para o suco de uva.

Essas diferenças ficam evidentes, por exemplo, com relação às antocianinas. Estas são consideradas uma classe de compostos fenólicos importantes para o suco de uva. Sabe-se que, devido especialmente ao tipo de uva utilizado na elaboração do suco (*Vitis labrusca* e seus híbridos), as antocianinas estão presentes, em sua maioria, na forma diglicosilada (HE *et al.*, 2010). Com relação aos métodos analíticos para a análise de antocianinas, estas costumam ser analisadas separadamente dos demais compostos. Por exemplo, o método da OIV para quantificação de antocianinas em vinho por HPLC utiliza 10% (v/v) de ácido fórmico na fase aquosa e na fase orgânica (OIV, 2019b). Isso se dá porque esses compostos são instáveis e geram picos cromatográficos com péssimo formato a menos que estejam em meio bastante ácido.

Visando-se obter um método por UPLC-MS que seja específico e abrangente para a análise de compostos fenólicos, incluindo antocianinas, em suco de uva, vários ensaios foram conduzidos. Como ponto de partida para o desenvolvimento do método analítico proposto, o método para quantificação de antocianinas da OIV (citado anteriormente) e outros métodos de quantificação de compostos fenólicos já desenvolvidos foram utilizados (DA SILVA *et al.*, 2017; LAGO-VANZELA *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2015). Com relação à acidez da fase móvel, foram testados dois ácidos orgânicos que são adequados para o uso no detector de massas: ácido acético e ácido fórmico. Os compostos não antocianínicos apresentaram bons resultados de formato de pico tanto com o ácido acético quanto com o ácido fórmico. No entanto, as antocianinas apresentaram picos com melhor formato com ácido fórmico, confirmando o método da OIV. Com relação à quantidade de ácido fórmico na fase móvel,

objetivou-se encontrar um equilíbrio entre o formato de pico adequado para as antocianinas e a menor quantidade possível de ácido, levando-se em consideração também o formato de pico dos demais compostos. Dessa forma, a concentração ideal de ácido fórmico encontrada foi de 2% (v/v). Essa concentração de ácido na fase móvel gera um pH por volta de 1,95 e, por esse motivo, tornou-se de extrema importância escolher uma coluna resistente a esse pH de forma que esta tivesse maior durabilidade. Foram testadas colunas com recheios C8 (octilsilano) e C18 (octadecilsilano); a coluna C18 apresentou melhores resultados em termos de separação dos analitos.

Com relação ao solvente orgânico da fase móvel, escolheu-se trabalhar com metanol porque este foi o solvente de escolha em vários outros trabalhos do mesmo tipo, citados anteriormente, e também por uma questão de disponibilidade e economia. A concentração de metanol na fase orgânica foi de 90% (v/v) objetivando, especialmente, reduzir a formação de bolhas no sistema cromatográfico.

No desenvolvimento do método, a escolha dos solventes para as soluções estoque e intermediária demandou estudos mais detalhados, pois o grau de solubilidade e a resposta cromatográfica dos analitos varia muito de um composto para o outro. Algumas opções foram testadas como meio sintético de vinho que é uma mistura de etanol, ácido tartárico e água (SILVA, 2016), foram testados também etanol 70% (v/v), metanol 30% (v/v), dentre outros. Após algumas tentativas, escolheu-se trabalhar com metanol 50% (v/v) para as soluções de padrões não antociânicos. Para as antocianinas foi escolhido metanol 50% (v/v) acidificado com 0,05% (v/v) de ácido fórmico, formando uma solução com pH em torno de 3,2 (valor de pH da grande maioria dos sucos de uva). As soluções de trabalho foram preparadas diluindo-se as soluções intermediárias em uma solução que mimetiza a condição inicial da fase móvel.

Por fim, era importante obter completa separação entre os dois pares de isômeros ((+)-catequina e (-)-epicatequina, procianidina B1 e procianidina B2) já que estes possuem mesma massa molecular. Uma co-eluição desses compostos inviabilizaria sua correta determinação no detector de massas. Para esse fim, o gradiente de fase móvel foi ajustado até que estes compostos estivessem completamente separados. Com relação ao preparo das amostras, o suco de uva, por conter bastante açúcar e ser muito viscoso, apresenta dificuldade em ser filtrado em filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro, mesmo quando diluído. Por isso, seguindo

uma sugestão do fabricante do sistema cromatográfico (Waters), foi decidido centrifugar as amostras ao invés de filtrá-las.

Ao final do desenvolvimento, foi possível obter um método capaz de determinar 16 compostos fenólicos em suco de uva, incluindo quatro antocianinas, em apenas 4,5 minutos (mais 3 minutos para reequilíbrio da coluna com a condição inicial da fase móvel). O método é rápido, econômico em termos de fase móvel e simples, já que não requer preparações ou purificações complexas da amostra. Sua adequação para o uso pretendido foi comprovada através da validação da metodologia analítica. O artigo gerado a partir desse estudo e publicado pelo *Journal of Food Measurement and Characterization* é apresentado a seguir.

## 4.2 Artigo publicado no *Journal of Food Measurement and Characterization*

### **Fast quantitative determination of phenolic compounds in grape juice by UPLC-MS: Method validation and characterization of juices produced with different grape varieties**

**Natalia Alejandra Pisoni Canedo-Reis<sup>a\*</sup>, Celito Crivellaro Guerra<sup>b</sup>, Leticia Flores da Silva<sup>b</sup>, Luísa Carolina Wetzstein<sup>b,c</sup>, Carlos Henrique Junges<sup>d</sup>, Marco Flôres Ferrão<sup>d</sup>, Ana Maria Bergold<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>LACEM – Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas, Embrapa Uva e Vinho, Rua Livramento, 515, CEP 95701-008, Bento Gonçalves, RS, Brazil

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

<sup>d</sup>Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

#### ABSTRACT

A fast method for the simultaneous quantitative determination of 16 phenolic compounds in grape juice by UPLC-MS was developed and validated. Run time was 4.5 minutes and the method proved to be specific, linear ( $r > 0.9961$ ), precise (RSD < 5%), accurate (recovery range was under  $\pm 5\%$ ) and sensitive with a limit of detection ranging from 0.45 to 35.34  $\mu\text{g L}^{-1}$  and limit of quantification ranging from 1.35 to 107.08  $\mu\text{g L}^{-1}$ . The validated method was used to characterize 49 grape juice samples which were produced with different grape varieties. Anthocyanins were the compounds present in the highest amounts on the analyzed samples and BRS-Violeta was the cultivar that presented the highest quantity of phenolic compounds in its juice. Exploratory analysis of the obtained results from the characterization of grape juice

samples was performed and a tendency to form groups according to the grape variety used in the elaboration of each juice was observed. Results confirmed that the UPLC-MS method is effective and suitable for the determination of phenolic compounds in grape juice.

Keywords: food composition, grape juice, *Vitis labrusca* L., phenolic compounds, quantification analysis, method validation.

#### 4.2.1 Introduction

Oxidative stress corresponds to an unbalance between production and degradation of oxidative agents such as reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) (RICE-EVANS, 1999; SORG, 2004). Oxidative stress can generate many deleterious consequences related especially to lipid oxidation, protein modification and DNA damage (RICE-EVANS, 1999). Therefore, oxidative stress is involved in many pathologies such as ischemia and reperfusion, atherosclerosis, excitotoxicity, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease, diabetes complications, premature aging, among others (EVORA *et al.*, 1996; SORG, 2004; VALKO *et al.*, 2007).

Phenolic compounds are secondary metabolites biosynthesized in plants as a defense mechanism against biotic and abiotic stress (CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006; DIXON; PAIVA, 1995; GUERRA, 2012). They are important antioxidant substances that fight against oxidative stress and reduce its consequences in the human body. These compounds act against oxidative stress by suppressing free radical formation, inhibiting the initiation of chain reactions, intercepting chain propagations and repairing oxidative processes (RICE-EVANS, 1999). They are largely present in grapes and grape-derived products, such as wine and grape juice (LÓPEZ-HERNÁNDEZ; QUIRÓS, 2016; NATIVIDADE *et al.*, 2013; PADILHA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017; SNOPEK *et al.*, 2018; STALMACH *et al.*, 2011; WHELAN *et al.*, 2004).

Grape juice is mainly produced from *Vitis labrusca* L. grapes and their hybrids (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). These grapes are commonly called rustic grapes and among the most important varieties used in the elaboration of grape juice are Bordo, Concord, Isabel, Isabel Precoce (*Vitis labrusca*) and BRS-Magna and BRS-Violeta

(hybrids of *Vitis vinifera* L. x *Vitis labrusca*) (CAMARGO, 2004; CAMARGO; MAIA; NACHTIGAL, 2005; HOFFMAN; CAMARGO; MAIA, 2005; RITSCHER *et al.*, 2012; RIZZON; MENEGUZZO, 2007). The absence of alcohol in grape juice makes its consumption adequate for the great majority of people, including children and those who have alcohol-related problems. The nutraceutical value of grape juice has been studied with greater interest in the past few years (MARCHI *et al.*, 2014; SHANMUGANAYAGAM *et al.*, 2007; TOSCANO *et al.*, 2015; VINSON; TEUFEL; WU, 2001). Grape juice consumption has grown over the years and Brazil is among the countries with the greatest amount of producers and consumers (FAO-OIV, 2016; MELLO, 2018; OIV, 2018). The extreme southern region of Brazil is responsible for over 60% of the country's grape and juice productions (MELLO, 2018). The growing availability of grape juice and an increased stimulus to its consumption especially due to the nutraceutical value of this drink arouses interest in studying more carefully the phenolic profile of grape juice.

Folin-Ciocalteu is a traditional method commonly used in enology for the determination of phenolic compounds. This method expresses the result of phenolic compounds in a sample in terms of total phenolic content and, therefore, it is not a specific method of quantification (OIV, 2019a). Specific methods for the quantification of phenolic compounds in wine have been developed (SILVA *et al.*, 2017). However, although wine and grape juice are both grape-derived products, they are significantly different. Wines are generally elaborated with *Vitis vinifera* grapes, while grape juices are, as mentioned before, elaborated with *Vitis labrusca* grapes and their hybrids, which generates a different phenolic profile. Moreover, the differences between the elaboration processes of these two drinks give them completely distinct characteristics. In literature, information is available only on few methods developed and validated for the quantification of phenolic compounds specifically in grape juice. In most cases, those methods have a long time of analysis, are not very sensitive and/or determine only a few compounds (DANI *et al.*, 2009; FRACASSETTI *et al.*, 2011; LÓPEZ-HERNÁNDEZ; QUIRÓS, 2016; NATIVIDADE *et al.*, 2013; PADILHA *et al.*, 2017; STALMACH *et al.*, 2011). Ultra-performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometer (UPLC-MS) is an accurate, sensitive and fast method of analysis (MENET, 2011; SKOOG *et al.*, 2014). Therefore UPLC-MS is an interesting tool to be used for phenolic compound determination in grape juice.



In this context, this study aimed to develop and validate a fast quantitative UPLC-MS method for the determination of phenolic compounds in grape juice and then to apply the validated methodology in the characterization of different grape juice samples.

## **4.2.2 Materials and methods**

### **4.2.2.1 Chemicals and standards**

Formic acid for analysis and methanol LC-MS grade were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was obtained from Fluka Analytical (Munich, Germany) and was used to prepare all solutions. Kaempferol, (+)-catechin, myricetin, quercetin, *trans*-resveratrol, rutin and taxifolin analytical standards were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Procyanidin B1, procyanidin B2, (-)-epicatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin gallate, cyanidin-3,5-diglucoside, malvidin-3-O-glucoside, malvidin-3,5-diglucoside and peonidin-3,5-diglucoside were obtained from Extrasynthese (Genay, France).

### **4.2.2.2 Grape juice samples**

Grape juice samples were obtained from Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation – Grape and Wine Research Center) in Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brazil. To validate the methodology, integral grape juice produced from the 2018 harvest using BRS-Magna variety was employed. The validated method was applied in the quantitative determination of phenolic compounds in 49 integral grape juice samples (characterization of grape juice samples). The samples studied belong to four different agronomical experiments conducted by researchers from Embrapa Grape and Wine Research Center: juices elaborated with grapes cultivated in the conventional farming system, juices elaborated with grapes cultivated in the organic farming system, juices elaborated with grapes cultivated under different levels of soil fertilization and juices elaborated with grapes from different harvests. This study focused on the phenolic profile of the evaluated samples; thus, specific agronomical aspects of the experiments were not assessed.

Grape varieties used in each juice elaboration (individually) were either traditional cultivars (Bordo, Concord, Isabel, Isabel Precoce and Niagara Rosada) or cultivars developed by Embrapa Grape and Wine's Genetic Improvement Program (BRS-Carmem, BRS-Cora, BRS-Magna, BRS-Rubea, BRS-Violeta and Seleção 13). All grape juices were prepared in an innovative system denominated Integral Juicer. The Integral Juicer was developed and patented by researchers from Embrapa Grape and Wine Research Center with the purpose of offering an appropriate production system for small-scale grape juice producers. It consists of an inclined rotating tank where grapes, already destemmed and crushed, are put in. The Integral Juicer applies thermal processing to extract the juice from the grapes and guarantee pasteurization (GUERRA *et al.*, 2016; MARZAROTTO, 2010; RIZZON; MENEGUZZO, 2007). On the outside wall of the tank, it has a liquid that serves as a heater for the inside part. The grapes inside the tank are heated to 80 °C, a process that takes about 2h to reach that temperature. When the estimated temperature is reached, the grape juice is collected on the bottom valve of the tank (GUERRA *et al.*, 2016).

#### **4.2.2.3 Instruments and conditions**

Analyses were performed on a Waters Acquity UPLC System (Milford, MA, USA) equipped with a quaternary solvent pump, an autosampler, a column oven and a single mass quadrupole detector (MS). The data analysis was carried out using Empower 3 software. A Waters Acquity UPLC BEH C18 column (50 x 2.1 mm, 5 µm) was used and it was protected with a guard column of the same material (5 x 2.1 mm, 5 µm). Mobile phase A (aqueous) consisted of formic acid and water (2:98 v/v) and mobile phase B (organic) consisted of methanol, formic acid and water (90:2:8 v/v). The linear gradient used was: 0 minutes (min), 15% of B; 1.35 min, 40% of B; 2.65 min, 65% of B; 3.55 min, 90% of B; 3.90 min, 90% of B; 4.25 min, 30% of B; 4.50 min, 15% of B. The chromatograms were recorded for 4.5 min. At the end of each injection, the column was equilibrated with the mobile phase in its initial condition (15% of B) for 3 min. The flow rate was 0.45 mL/min and the injection volume was 5 µL.

The MS detector (Waters QDa) was equipped with an electrospray ionization (ESI) source. The detection was performed based on the molecular weight (monoisotopic mass) of each compound on monitoring mode SIR (Single Ion

Recording). ESI mode (positive or negative) and cone voltage were selected to obtain a high selectivity for each compound. Mass-to-charge ( $m/z$ ) ratio, ESI mode and cone voltage for each compound are shown in Table 4.1. The probe temperature was adjusted to 600 °C, the capillary voltage was -0.8 kV in negative mode and +1.5 kV in positive mode. Smoothing was programmed in the processing method (Smoothing Type: Mean, Smoothing Level: 5) in order to obtain the best peak format.

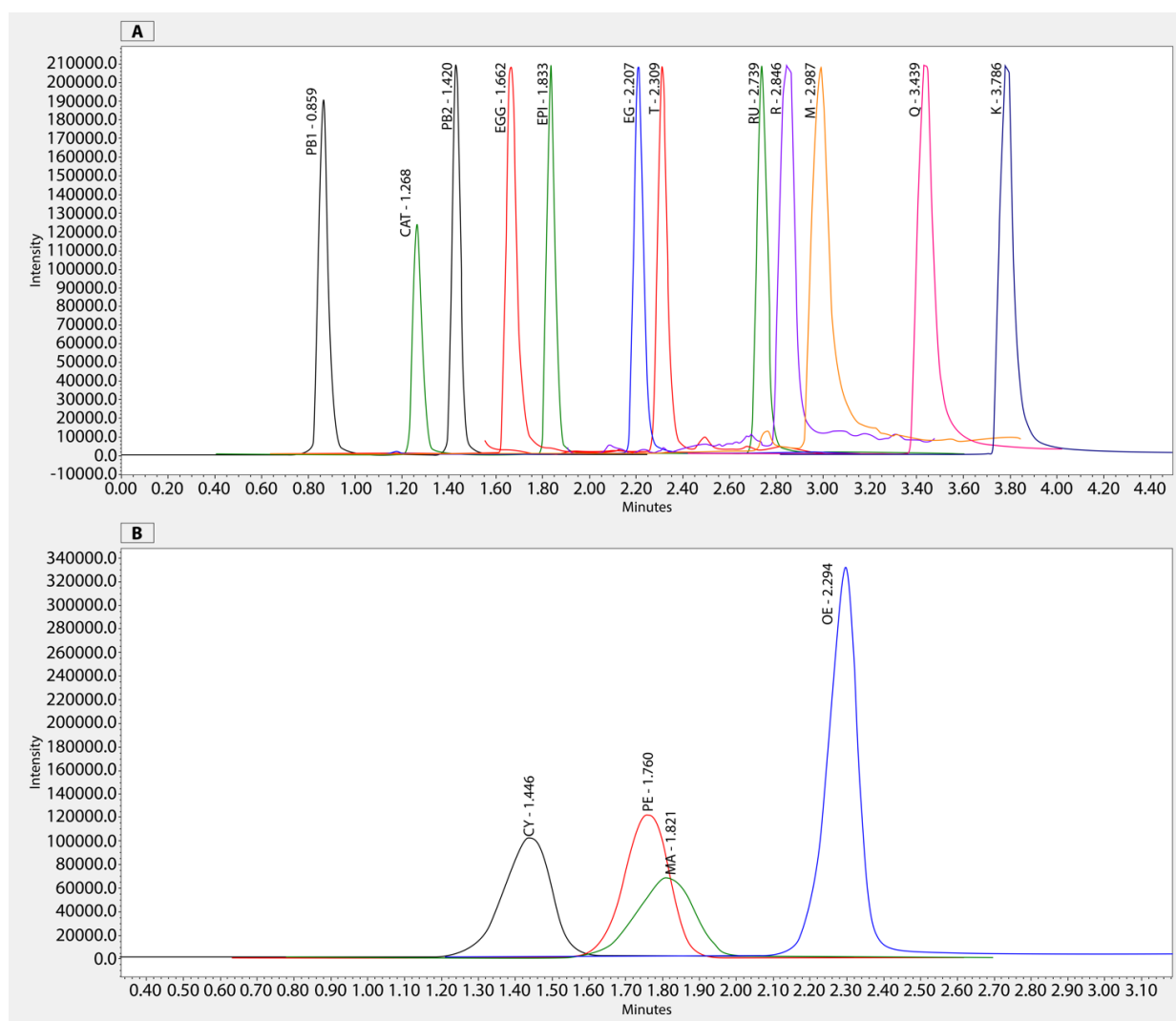
**Table 4.1** - MS detector conditions.

<b>Compound</b>	<b>Cone voltage (V)</b>	<b>ESI</b>	<b><math>m/z</math></b>
<b>Anthocyanins</b>			
cyanidin-3,5-diglucoside	2	+	611.16
malvidin-3-O-glucoside	2	+	493.13
malvidin-3,5-diglucoside	2	+	655.19
peonidin-3,5-diglucoside	2	+	625.18
<b>Flavanols</b>			
(+)-catechin	15	-	289.08
(-)-epicatechin	15	-	289.08
(-)-epicatechin gallate	15	-	441.09
(-)-epigallocatechin gallate	15	-	457.08
procyanidin B1	10	-	577.14
procyanidin B2	10	-	577.14
<b>Flavanonol</b>			
taxifolin	10	+	305.06
<b>Flavonols</b>			
kaempferol	10	-	285.05
myricetin	10	-	317.04
quercetin	10	-	301.04
rutin	10	-	609.15
<b>Stilbene</b>			
<i>trans</i> -resveratrol	15	+	229.08

#### 4.2.2.4 Standards and sample preparation

Stock and intermediate solutions of non-anthocyanic compounds (flavanols, flavanonol, flavonols and stilbene) were prepared individually diluting the standards in water and methanol (50:50 v/v). Anthocyanic standards were prepared individually diluting the standards in formic acid, water and methanol (0.05:49.95:50 v/v). The final concentration of stock solutions was 200 mg L<sup>-1</sup>. The final concentration of intermediate solutions was 10 mg L<sup>-1</sup>, except for procyanidin B1 e B2 that had an intermediate concentration of 40 mg L<sup>-1</sup>. All stock and intermediate solutions were stored in a freezer

(- 20 °C), except for kaempferol's and quercetin's solutions which were stored in a refrigerator because precipitation was observed in lower temperatures. Working standard solutions were prepared freshly at the moment of use in three separate groups: anthocyanins, procyanidins and non-anthocyanic compounds (except for procyanidins). They were diluted to the intended concentration with a solution that mimics the mobile phase's initial condition, which is formic acid, water and methanol (2:84.5:13.5 v/v).



**Figure 4.1** - Chromatograms of the studied phenolic compounds and their corresponding retention time (RT) in minutes (non-anthocyanic compounds are shown in image A and anthocyanins in image B). In order of elution: Procyanidin B1 (PB1): 0.86; (+)-catechin (CAT): 1.27; procyanidin B2 (PB2): 1.42; cyanidin-3,5-diglucoside (CY): 1.45; (-)-epigallocatechin gallate (EGG): 1.66; peonidin-3,5-diglucoside (PE): 1.76; malvidin-3,5-diglucoside (MA): 1.82; (-)-epicatechin (EPI): 1.83; (-)-epicatechin gallate (EG): 2.21; malvidin-3-O-glucoside (OE): 2.29; taxifolin (T): 2.31; rutin (RU): 2.74; *trans*-resveratrol (R): 2.85; myricetin (M): 2.99; quercetin (Q): 3.44; kaempferol (K): 3.79.

For the method validation, each working standard solution was prepared at a concentration according to the parameter evaluated. For the characterization of grape juice samples, working standard solutions were prepared with a concentration at the center of the calibration curve. Grape juices were centrifuged at 10,000 rotations per min for 10 min and the supernatant was then diluted at least five times (to reach a concentration within the calibration range of each compound) in formic acid, water and methanol (2:84.5:13.5 v/v). The diluted sample solutions were centrifuged again as mentioned before and the supernatant injected. Prior to use, working standard solutions were also centrifuged and the supernatant injected. The chromatograms obtained for the standard solutions of the 16 studied phenolic compounds and their respective retention times are shown in Figure 4.1. For better visualization, chromatograms are divided into two groups, non-anthocyanic compounds (A) and anthocyanins (B).

#### **4.2.2.5 Method validation**

The International Conference on Harmonization (ICH) guideline for Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) (ICH, 2005) and the Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA) resolution for validation of analytical methods (BRASIL, 2017) were used as guidance for method validation. The evaluated parameters were specificity, linearity, range, precision (repeatability and intermediate precision), accuracy, detection and quantification limits. Robustness was evaluated during the development of the analytical method.

##### **4.2.2.5.1 Specificity**

MS detector is capable of providing a high degree of specificity in the identification of compounds of interest. To assess the specificity of the method, peak purity was evaluated in terms of its base peak mass on scan mode. Base peak mass is the most abundant mass corresponding to the peak of interest and this evaluation can be performed at the beginning of the peak (leading), on the peak's apex and on the final part of the peak (trailing), ensuring that there are no coelutions. Phenolic compounds not present in the grape juice sample used for the method validation were

evaluated through spiking the grape juice with standards of those compounds. The base peak mass for each peak of interest was determined in the grape juice sample.

#### **4.2.2.5.2 Linearity**

Linearity was evaluated through the preparation of three calibration curves for each compound with five concentration levels and prepared on three different days. Concentrations *versus* response ratio were plotted for each analyte and linear regression analysis was performed using the least-squares method.

#### **4.2.2.5.3 Precision**

Precision was determined by intra-day (repeatability) and inter-day (intermediate precision) tests. Repeatability was conducted through the preparation, on the same day, of three curves of each compound with three concentration levels (low, medium and high from the linearity calibration curve). Intermediate precision was conducted through the preparation of three curves of each compound with three concentration levels (low, medium and high from the linearity calibration curve), prepared twice on two different days and by two different analysts. The precision results were expressed by the relative standard deviation (% RSD).

#### **4.2.2.5.4 Accuracy**

Accuracy was assessed by a recovery study. Three curves of grape juice spiked with low, medium and high concentration levels within the calibration range (9 replicates) of each standard compound were prepared. The native concentrations of each phenolic compound in the grape juice samples (if present) were considered for the definition of the spiking levels, avoiding final concentrations out of the linear range. Recovery was determined comparing the theoretical concentration of the added standard with the measured concentration on the spiked sample.

#### **4.2.2.5.5 Limit of detection and limit of quantification**

Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were obtained based on the standard deviation of the intercepts and slope from the calibration curve. LOD was calculated as 3.3 times the standard deviation of the intercepts divided by the slope of the calibration curve and LOQ as 10 times the standard deviation of the intercepts divided by the slope of the calibration curve.

#### **4.2.2.6 Exploratory analysis**

Exploratory analysis (hierarchical cluster analysis and principal component analysis) of the obtained results in the characterization of grape juice samples was conducted on Chemostat® free software, available at [www.chemostat.com.br](http://www.chemostat.com.br) (HELPER *et al.*, 2015). Forty-nine grape juice samples and 15 variables (phenolic compounds except for kaempferol that wasn't found in any sample) were evaluated. For multivariate analysis, the data were initially autoscaled. Singular Value Decomposition (SVD) was the algorithm used in principal component analysis. In hierarchical cluster analysis, Euclidean distance and complete linkage method were used.

### **4.2.3 Results and discussion**

#### **4.2.3.1 Method validation**

The obtained values for each parameter studied in the method validation are shown in Tables 2 and 3.

##### **4.2.3.1.1 Specificity and linearity**

Apex base peak mass found for each compound is presented in Table 4.2. The values found corresponded to those of the expected ions in question. To guarantee specificity in all determinations, compounds with the same  $m/z$  ratio must be separated. Isomers (+)-catechin and (-)-epicatechin ( $m/z$  289.08) and procyanidin B1 and B2 ( $m/z$  577.14) were completely separated as presented in Figure 4.1. Specificity results

found in this study were considered suitable for the intended purpose. The developed method is fast and able to specifically determine 16 phenolic compounds in only 4.5 min. Similar studies presented runtimes varying from 25 to 55 min (NATIVIDADE *et al.*, 2013; PADILHA *et al.*, 2017).

Calibration ranges and calibration curves equations for each analyte are presented in Table 4.2. The calibration range of each compound was selected taking into consideration the quantitative results found in previous studies (DANI *et al.*, 2009; FRACASSETTI *et al.*, 2011; LÓPEZ-HERNÁNDEZ; QUIRÓS, 2016; NATIVIDADE *et al.*, 2013; PADILHA *et al.*, 2017; STALMACH *et al.*, 2011). Regarding the correlation coefficient, the closest it is to unity ( $r = 1$ ), the more evident that the calibration curve is linear. However, the value of  $r$  also depends on the number of data points used to calculate it. For instance, if only two points are used,  $r$  will be 1, although it could not necessarily indicate a statistically significant correlation at an adequate confidence level. That is why at least three points should be used. In this case, each calibration curve was prepared with five concentration levels (points). Values obtained for the correlation coefficient ( $r$ ) of the 16 phenolic compounds evaluated ranged from 0.9961 to 0.9996, being all higher than 0.990 and, therefore, demonstrating adequate linearity.

#### 4.2.3.1.2 Precision and accuracy

The relative standard deviation (% RSD) values obtained for the precision (repeatability and intermediate precision) of the 16 phenolic compounds evaluated ranged from 0.14 to 4.88% demonstrating that the method is precise for all the analytes studied.

Accuracy study showed a recovery range from 95.33 to 104.55% of the spiked standards in the grape juice sample. These results show that the validated method is accurate for all 16 phenolic compounds evaluated and are similar to those obtained in other studies of the same type. For instance, Padilha *et al.* (2017) (PADILHA *et al.*, 2017) obtained recovery values ranging from 94.8 to 105.1%, similar to what was obtained in the present study, although a little higher than  $\pm 5\%$ .

Relative standard deviation (% RSD) and recovery (%) values obtained for each analyte are presented in Table 4.3.



**Table 4.2** - Specificity, linearity, LOD and LOQ values obtained during method validation.

Compound	Apex Base Peak Mass	Calibration range ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Calibration curve (equation)	Correlation coefficient ( <i>r</i> )	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
<b>Anthocyanins</b>						
cyanidin-3,5-diglucoside	611.16	100-450	$y = 2983.52x - 30666.88$	0.9993	12.29	37.24
malvidin-3- <i>O</i> -glucoside	493.14	40-450	$y = 8017.51x + 3913.45$	0.9994	0.45	1.35
malvidin-3,5-diglucoside	655.17	100-450	$y = 2932.62x - 36247.47$	0.9988	14.87	45.06
peonidin-3,5-diglucoside	625.16	100-500	$y = 3926.09x - 27356.79$	0.9995	15.58	47.22
<b>Flavanols</b>						
(+)-catechin	289.04	50-450	$y = 1082.85x - 10780.03$	0.9991	6.72	20.35
(-)-epicatechin	289.04	80-470	$y = 1626.70x - 43841.96$	0.9964	25.87	78.40
(-)-epicatechin gallate	441.07	50-450	$y = 1236.38x - 27721.99$	0.9977	10.61	32.15
(-)-epigallocatechin gallate	457.07	75-450	$y = 1224.40x - 44863.44$	0.9990	22.21	67.32
procyanidin B1	577.15	120-1600	$y = 287.93x - 14723.85$	0.9995	16.42	49.77
procyanidin B2	577.15	120-1600	$y = 238.38x - 18243.71$	0.9985	34.15	103.48
<b>Flavanonol</b>						
taxifolin	304.98	250-450	$y = 2082.00x + 50600.99$	0.9976	35.34	107.08
<b>Flavonols</b>						
kaempferol	284.98	25-200	$y = 5872.05x - 30032.02$	0.9983	4.01	12.16
myricetin	317.05	75-450	$y = 1885.70x - 74961.90$	0.9987	12.02	36.41
quercetin	301.04	50-400	$y = 3391.52x - 34913.14$	0.9996	7.52	22.80
rutin	609.22	50-450	$y = 1576.98x - 7306.98$	0.9994	4.77	14.47
<b>Stilbene</b>						
<i>trans</i> -resveratrol	229.09	250-450	$y = 1864.18x + 33167.27$	0.9961	10.72	32.49

**Table 4.3** - Repeatability, intermediate precision and accuracy values obtained during method validation.

Compound	Repeatability (% RSD)			Intermediate precision (% RSD)			Accuracy (% Recovery)		
	Low	Medium	High	Low	Medium	High	Low	Medium	High
<b>Anthocyanins</b>									
cyanidin-3,5-diglucoside	3.62	2.48	1.17	2.64	0.43	0.81	101.64	103.23	102.16
malvidin-3-O-glucoside	1.13	1.91	1.30	2.38	4.65	2.42	103.05	99.32	102.53
malvidin-3,5-diglucoside	4.09	3.27	1.19	3.86	1.86	0.14	100.22	98.74	99.60
peonidin-3,5-diglucoside	3.60	0.39	0.22	0.24	0.32	1.75	103.68	103.99	104.55
<b>Flavanols</b>									
(+)-catechin	1.48	0.90	1.22	1.18	3.85	2.02	100.87	99.04	103.63
(-)-epicatechin	0.62	4.87	4.34	3.43	4.53	4.36	103.14	98.42	97.32
(-)-epicatechin gallate	0.63	3.18	2.96	3.72	2.49	1.78	103.36	102.65	100.03
(-)-epigallocatechin gallate	2.32	3.66	0.82	3.39	3.12	2.60	99.15	103.40	103.65
procyanidin B1	2.52	0.84	0.28	1.09	3.55	4.26	98.82	96.61	99.53
procyanidin B2	2.43	1.65	1.77	4.88	1.47	4.36	96.59	100.12	101.50
<b>Flavanonol</b>									
taxifolin	0.35	0.52	1.49	3.69	2.97	2.37	97.73	95.33	96.47
<b>Flavonols</b>									
kaempferol	3.93	1.96	0.83	2.61	0.74	3.75	99.17	98.99	99.10
myricetin	0.18	2.39	1.20	2.56	0.16	0.76	103.05	101.31	103.78
quercetin	3.11	2.51	1.52	2.53	4.62	0.41	103.65	95.44	95.13
rutin	3.84	1.22	1.68	1.69	3.21	4.44	97.46	101.12	97.71
<b>Stilbene</b>									
<i>trans</i> -resveratrol	0.16	0.65	1.26	4.42	3.75	4.65	98.11	97.97	102.45

#### 4.2.3.1.3 Limit of detection and limit of quantification

Limit of detection (LOD) values varied from 0.45  $\mu\text{g L}^{-1}$  (malvidin-3-O-glucoside) to 35.34  $\mu\text{g L}^{-1}$  (taxifolin). Limit of quantification (LOQ) ranged from 1.35 to 107.08  $\mu\text{g L}^{-1}$  for the same compounds. The obtained results are presented in Table 4.2 and they show that the method validated presents a significant sensitivity for the determination of very low concentrations of the evaluated compounds. Furthermore, the method can be considered more sensitive than previously reported studies that quantify phenolic compounds in grape juice with LOD ranging from 40 to 850  $\mu\text{g L}^{-1}$  and LOQ ranging from 50 to 1410  $\mu\text{g L}^{-1}$  (PADILHA *et al.*, 2017).

#### 4.2.3.2 Characterization of grape juice samples

The quantitative results obtained in the characterization of grape juice samples are shown on the heatmap presented in Figure 4.2. The heatmap color scale varies, in this case, according to the concentration of phenolic compounds, from green, if not detected, to red with the highest concentrations found.

Nine conventional juices were elaborated with Bordo, BRS-Cora, BRS-Carmem, Concord, Isabel, Isabel Precoce, BRS-Magna, BRS-Rubea and BRS-Violeta grape varieties. Organic juices were produced using the same cultivars except for Isabel (only conventional juice) and Seleção 13 (only organic juice). Seleção 13 is a temporary name given to a new selection of grape cultivar that was developed by the Embrapa Grape and Wine's Genetic Improvement Program and is in the final stages of development. Grape varieties cultivated for the organic juices experiment were graft in two different rootstocks (Paulsen 1103 and VR 043-43), half of the area was conducted under a plastic cover and the other half without it. Some of the treatments in this experiment were not apt for grape juice elaboration and, in the end, 28 juices were produced.

Seleção 13 juice presented the highest quantities of phenolic compounds among organic juices, especially due to its elevated amounts of anthocyanins (malvidin-3,5-diglucoside and peonidin-3,5-diglucoside). Comparing conventional and organic juices elaborated with the same grape varieties, organic juices presented higher quantities of phenolic compounds in Bordo, BRS-Carmem, BRS-Cora, BRS-

Magna, BRS-Rubea, Concord and Isabel Precoce juices. The exception was the conventional BRS-Violeta juice that showed the highest concentration of phenolic compounds among all 49 samples analyzed. Phenolic compounds are biosynthesized in plants when those are under biotic and abiotic stress situations. Organic agriculture does not use pesticides during cultivation. Organic grapes are, consequently, more susceptible to the action of pathogens and, therefore, biosynthesize greater amounts of phenolic compounds (CARDOZO *et al.*, 2013; DANI *et al.*, 2007; DUTRA *et al.*, 2018).

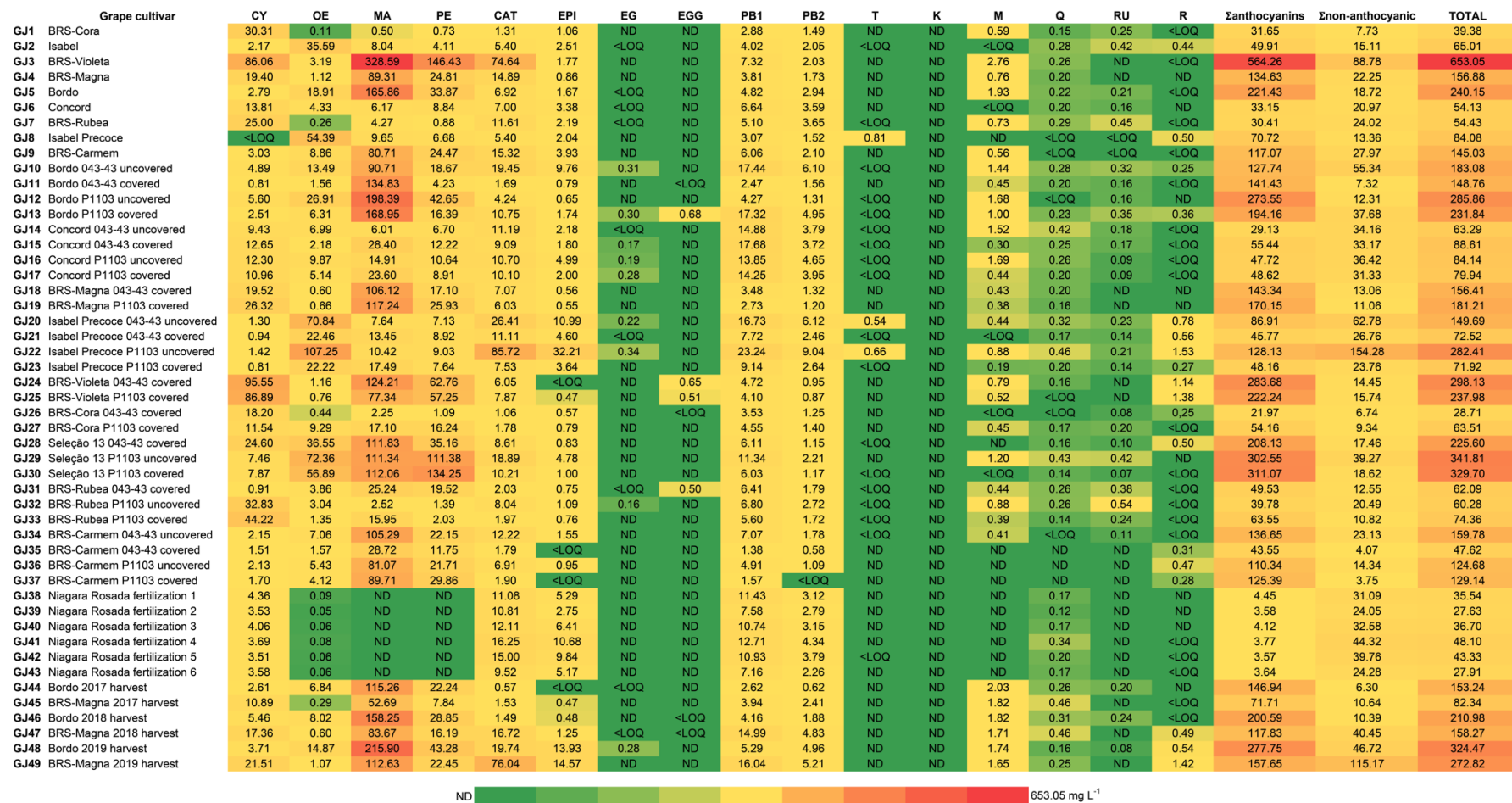
In both conventional and organic juices, those elaborated with BRS-Cora (GJ1 and GJ26) presented the smallest quantities of phenolic compounds. GJ27 (organic BRS-Cora) presented double the quantity of phenolics compared to the other two juices elaborated with the same variety, but that amount is still not very significant when compared to the other samples of organic juices. Niagara Rosada juices (elaborated with grapes cultivated under six different levels of soil fertilization) also showed small quantities of phenolic compounds, especially anthocyanins. Cyanidin-3,5-diglucoside is responsible for the pinkish coloration of this cultivar (ANANGA *et al.*, 2013) and is present in higher quantities when compared to other anthocyanins. Considering non-anthocyanic compounds, catechin, epicatechin and procyanidins B1 and B2 were found in higher quantities. GJ41 (intermediate level of soil fertilization) showed the greatest amounts of phenolics of the group.

Regarding juices elaborated with grapes from different harvests, the samples were prepared at the time of each harvest (2017, 2018 and 2019) with Bordo and BRS-Magna cultivars. Juices elaborated with Bordo grape showed higher quantities of anthocyanins in all three harvests, while BRS-Magna juices were richer in non-anthocyanic compounds. Of all anthocyanins analyzed, maldivin-3,5-diglucoside was found in greatest levels. Catechin, epicatechin and procyanidins B1 and B2 were the non-anthocyanic compounds found in highest amounts. All samples were analyzed at the same time (juices had different ages at the time of analysis), limiting the understanding about the influence of each harvest season on the phenolic profile of the grape juice samples studied. Nevertheless, it was possible to observe that the older the juice, the less phenolic compounds it has. That is the case found for all phenolics except for myricetin that presented higher amounts with older juices. A possible explanation for the increase in myricetin concentration over time is that the phenolic compounds involved in its biosynthetic pathway, as kaempferol, quercetin and taxifolin,

can go through degradative reactions generating more myricetin with time (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; GENOMENET, 2019; MAEDA; DUDAREVA, 2012). Concerning anthocyanins, even though they represent the final step in the flavonoid biosynthetic pathway, which yields flavonols and flavan-3-ols at intermediate steps, they are very reactive molecules and may, with time, generate different anthocyanins not analyzed in the present study (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; GENOMENET, 2019; HOLTON; CORNISH, 1995; MAEDA; DUDAREVA, 2012). A more specific stability study should be conducted to better understand the behavior over time of phenolic compounds in grape juice.

Anthocyanins were the phenolic compounds present in greatest amount in grape juice samples analyzed. Malvidin-3,5-diglucoside was the major compound encountered, with values varying from non-detectable range (Niagara Rosada juices) to 328.59 mg L<sup>-1</sup> (BRS-Violeta conventional juice – GJ3). Peonidin-3,5-diglucoside was the second most abundant anthocyanin with values varying from non-detectable range (Niagara Rosada juices) to 146.43 mg L<sup>-1</sup> (BRS-Violeta conventional juice - GJ3). Malvidin-3-O-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside were found in smaller quantities. The malvidin-3-O-glucoside concentration ranged from 0.05 (Niagara Rosada juice - GJ39) to 107.25 mg L<sup>-1</sup> (Isabel Precoce organic juice - GJ22) while cyanidin-3,5-diglucoside ranged from under LOQ (Isabel Precoce conventional juice - GJ8) to 95.55 mg L<sup>-1</sup> (BRS-Violeta organic juice - GJ24). These results are in accordance with the values found in other studies regarding grape juice samples from *Vitis labrusca* and its hybrids (NATIVIDADE *et al.*, 2013; PADILHA *et al.*, 2017).

Anthocyanic results also confirm what has been stated about anthocyanins glycosylation, that in *Vitis vinifera* the glucose molecules are linked to the anthocyanidin to form 3-O-monoglucosides. Conversely, in non *Vitis vinifera*, like *Vitis labrusca* and its hybrids analyzed in this study, the glycosylation produces mostly 3,5-diglucosides (HE *et al.*, 2010). This corroborates with the results encountered in this study where 3,5-diglucosides anthocyanins are mostly in higher concentrations than malvidin-3-O-glucoside. The thermal processing during grape juice elaboration, may also have some influence on anthocyanins content. Specific studies have shown that higher temperatures can be responsible for phenolic degradation (anthocyanins and total phenolic content), although a temperature of 80 °C for a short period of time (1 min) does not seem to have a significant effect on quantitative results (MARTINO *et al.*, 2013; SÓLYOM *et al.*, 2014).



ND  653.05 mg L<sup>-1</sup>

**Figure 4.2** - Heat map of the concentration of phenolic compounds, in mg L<sup>-1</sup>, in grape juice (GJ) samples. <LOQ: under limit of quantification. ND: not detected. Each value represents mean (n=3). Compounds: cyanidin-3,5-diglucoside (CY); malvidin-3-O-glucoside (OE); malvidin-3,5-diglucoside (MA); peonidin-3,5-diglucoside (PE); (+)-catechin (CAT); (-)-epicatechin (EPI); (-)-epicatechin gallate (EG); (-)-epigallocatechin gallate (EGG); Procyanidin B1 (PB1); procyanidin B2 (PB2); taxifolin (T); kaempferol (K); myricetin (M); quercetin (Q); rutin (RU); *trans*-resveratrol (R). Online Resource 1 presents complete information including standard deviation for each concentration result.

Flavanols or flavan-3-ols were the second most abundant class of phenolic compounds present in grape juice samples analyzed. The most abundant flavanol was (+)-catechin ranging from 0.57 (Bordo 2017 harvest juice – GJ44) to 85.72 mg L<sup>-1</sup> (Isabel Precoce organic juice - GJ22). (+)-catechin was also found in higher levels in BRS-Violeta juice (GJ3) and BRS-Magna juice (GJ49). The (-)-epicatechin concentration ranged from under LOQ (BRS-Violeta organic juice – GJ24, BRS-Carmem organic juice – GJ35 and GJ37, Bordo 2017 harvest juice – GJ44) to 32.21 mg L<sup>-1</sup> (Isabel Precoce organic juice - GJ22). On the other hand, (-)-epicatechin gallate and (-)-epigallocatechin gallate were not detected or were under LOQ in most of the samples analyzed. The highest concentration of (-)-epicatechin gallate found was 0.34 mg L<sup>-1</sup> (Isabel Precoce organic juice - GJ22). The highest concentration of (-)-epigallocatechin gallate found was 0.68 mg L<sup>-1</sup> (Bordo organic juice – GJ13). Procyanidin B1 ((+)-catechin and (-)-epicatechin conjugates) was found in higher concentrations than Procyanidin B2 ((-)-epicatechin conjugates), which makes sense since (+)-catechin was more abundant than (-)-epicatechin. Procyanidin B1 ranged from 1.38 (BRS-Carmem organic juice – GJ35) to 23.24 mg L<sup>-1</sup> (Isabel Precoce organic juice - GJ22) while procyanidin B2 ranged from under LOQ (BRS-Carmem organic juice – GJ37) to 9.04 mg L<sup>-1</sup> (Isabel Precoce organic juice - GJ22).

In general, (+)-catechin values found in this study were in accordance with those presented by other similar studies (DANI *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2014; PADILHA *et al.*, 2017; STALMACH *et al.*, 2011). Regarding the concentration of (-)-epicatechin gallate in grape juice samples, Natividade *et al.* (2013) (NATIVIDADE *et al.*, 2013) and Padilha *et al.* (2017) (PADILHA *et al.*, 2017) also found low or none. In terms of procyanidin B1 and B2, the results are in agreement with other studies that also encountered greater values for procyanidin B1 (DANI *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2014; NATIVIDADE *et al.*, 2013). In most cases, the results presented in this study agree with other studies previously reported for *Vitis labrusca* and its hybrids.

Myricetin was the flavonol found in greatest quantity in grape juice samples analyzed. The highest value of myricetin encountered was 2.76 mg L<sup>-1</sup> in BRS-Violeta conventional juice (GJ3). Quercetin was found in more samples than myricetin, but in smaller quantities. Quercetin's concentration was very similar in most of the samples studied, the highest quantity of quercetin encountered was 0.46 mg L<sup>-1</sup> in three samples elaborated with two grape varieties: Isabel Precoce organic juice (GJ22) and BRS-Magna 2017 and 2018 harvests (GJ45 and GJ47, respectively). Rutin was not

detected or was under limit of quantification in almost half of the analyzed samples. Conventional and organic BRS-Rubea juices (GJ7 and GJ32) presented the highest concentrations of rutin: 0.45 and 0.54 mg L<sup>-1</sup>, respectively. Kaempferol was not detected in any of the analyzed samples. All of the studied flavonols were either not detected or under LOQ in conventional Isabel Precoce juice (GJ8) and in three of four of the organic BRS-Carmem juices (GJ35, GJ36 and GJ37).

Myricetin, quercetin and rutin values found in this study were in agreement with those reported by Natividade *et al.* (2013) (NATIVIDADE *et al.*, 2013) and Dutra *et al.* (2018) (DUTRA *et al.*, 2018). No other studies were found regarding the quantification of kaempferol in *Vitis labrusca* grape juice for comparison.

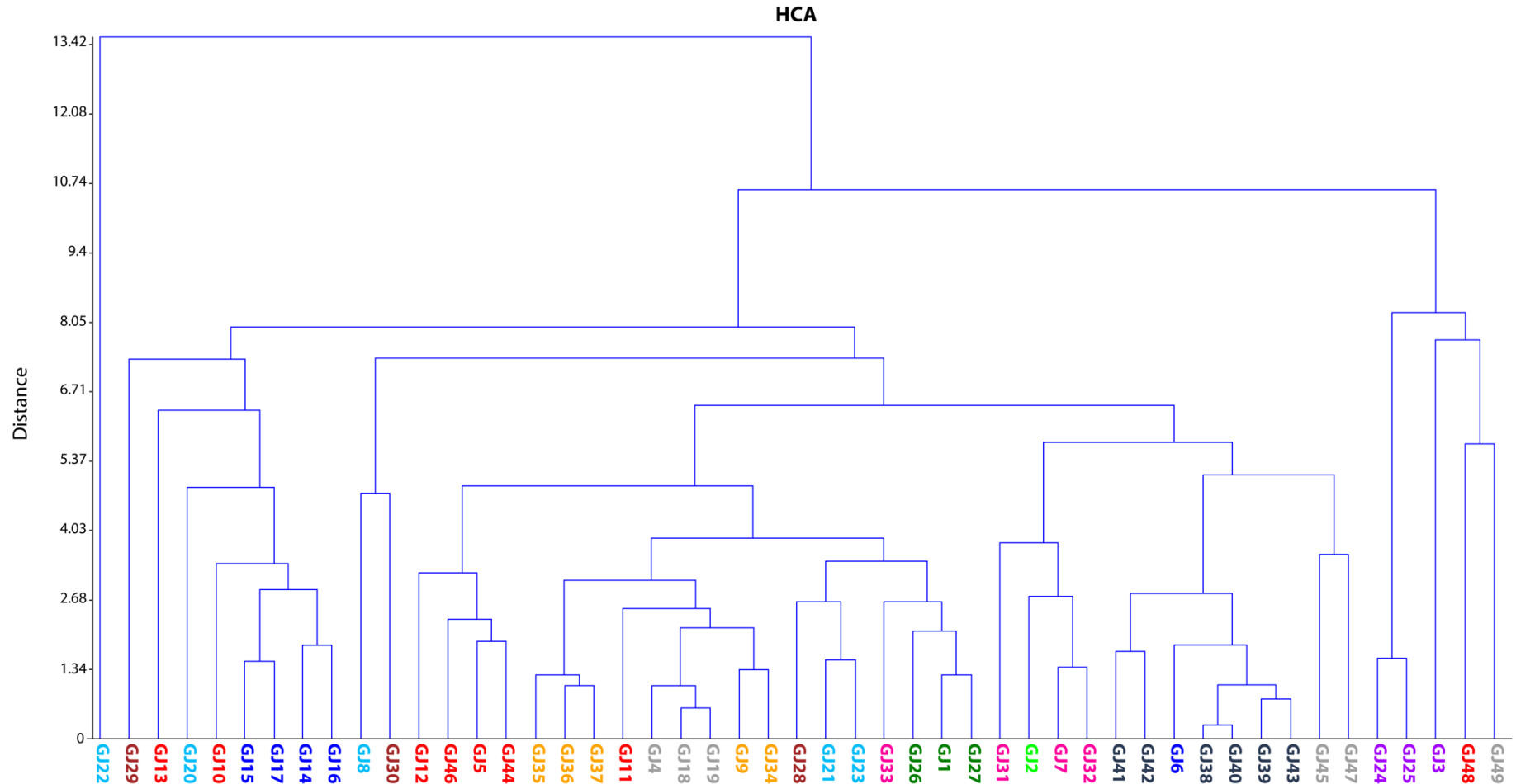
Taxifolin was only found in Isabel Precoce juices (GJ8, GJ20 and GJ22) with a maximum concentration of 0.81 mg L<sup>-1</sup> (GJ8). In all the other samples, taxifolin was either under LOQ or not detected. No other studies were found regarding the quantification of taxifolin in *Vitis labrusca* grape juice for comparison.

*Trans*-resveratrol was not detected or was under LOQ in BRS-Rubea, Concord and Niagara Rosada juices. It was found in greatest amount in organic Isabel Precoce juice (GJ22) with 1.53 mg L<sup>-1</sup>. These results are in accordance with other studies that also quantified *trans*-resveratrol in grape juices produced with *Vitis labrusca* grapes and its hybrids (DUTRA *et al.*, 2018; NATIVIDADE *et al.*, 2013; STALMACH *et al.*, 2011).

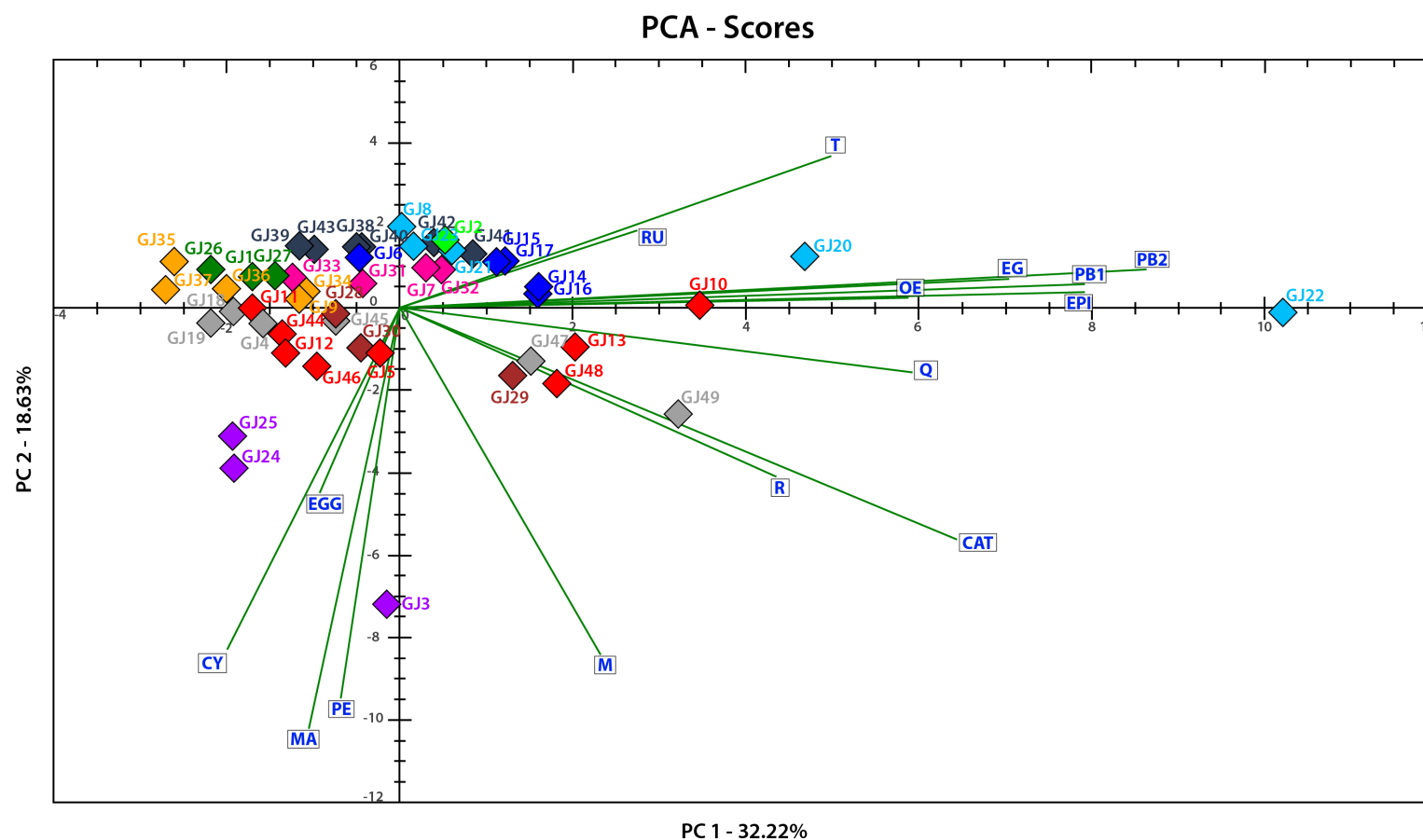
#### 4.2.3.2.1 Exploratory analysis

The quantitative results obtained in the characterization of grape juice samples were analyzed by hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA). HCA and PCA are unsupervised methods of pattern recognition. HCA objectives to concentrate on the same cluster samples that are more similar. PCA, on the other hand, shows how much each variable used contributes to the principal components which differentiate the samples from each other (BRERETON, 2003). The dendrogram obtained is shown in Figure 4.3. PC1 *versus* PC2 score biplot (Figure 4.4) accounted for 50.85% data variance (PC1 = 32.22% and PC2 = 18.63%). The PCA loadings are shown in Figure 4.5.

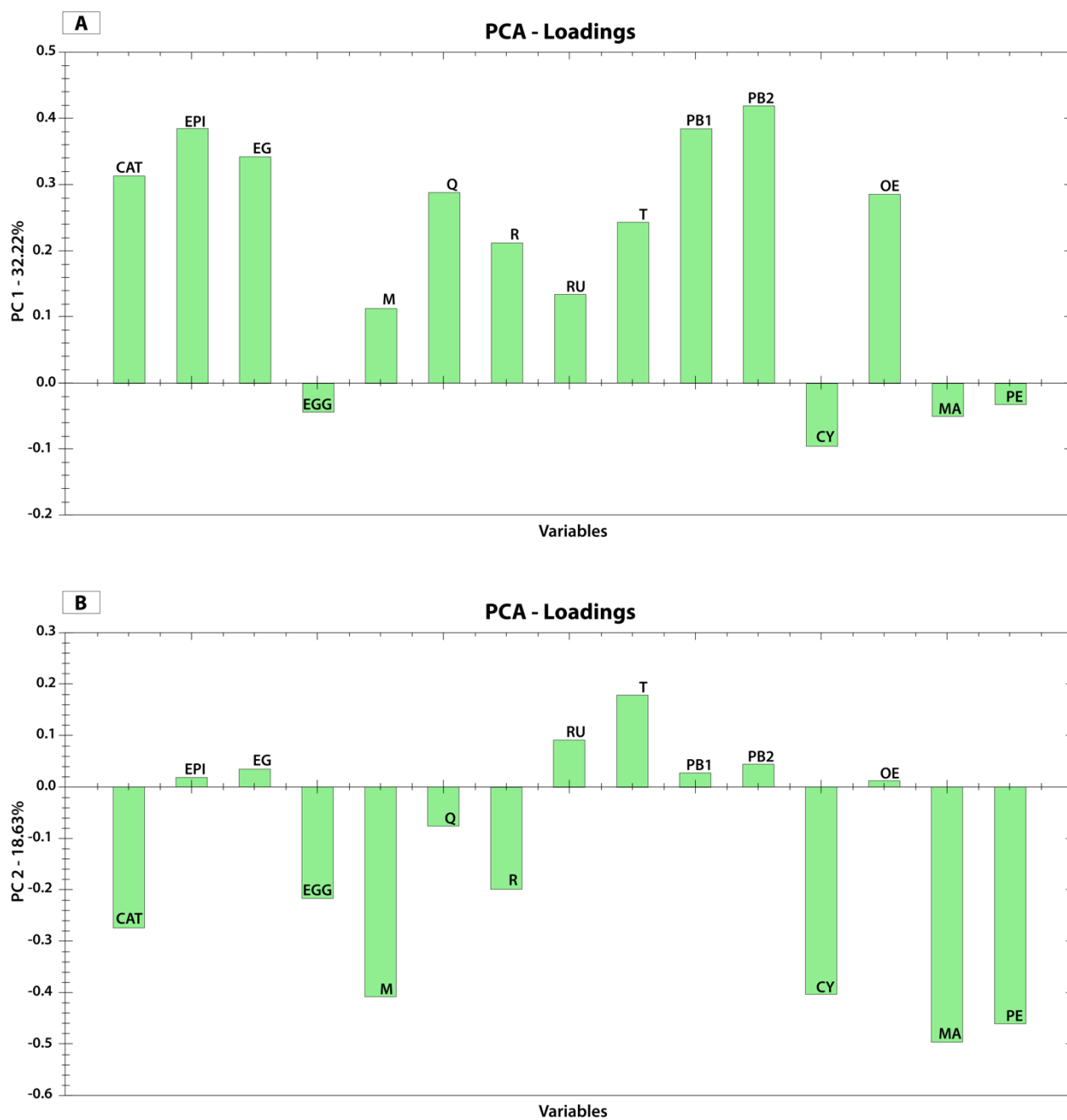




**Figure 4.3** - Dendrogram of the grape juice samples studied. Each grape juice label was colored according to the grape cultivar used in its elaboration: BRS-Cora (dark green): GJ1, GJ26, GJ27; Isabel (light green): GJ2; BRS-Violeta (purple): GJ3, GJ24, GJ25; BRS-Magna (light gray): GJ4, GJ18, GJ19, GJ45, GJ47, GJ49; Bordo (red): GJ5, GJ10, GJ11, GJ12, GJ13, GJ44, GJ46, GJ48; Concord (blue): GJ6, GJ14, GJ15, GJ16, GJ17; BRS-Rubea (pink): GJ7, GJ31, GJ32, GJ33; Isabel Precoce (light blue): GJ8, GJ20, GJ21, GJ22, GJ23; BRS-Carmem (orange): GJ9, GJ34, GJ35, GJ36, GJ37; Seleção 13 (brown): GJ28, GJ29, GJ30; Niagara Rosada (dark gray): GJ38, GJ39, GJ40, GJ41, GJ42, GJ43.



**Figure 4.4** - PC1 versus PC2 score biplot for the grape juice samples studied. Loading vectors (phenolic compounds): cyanidin-3,5-diglucoside (CY); malvidin-3-O-glucoside (OE); malvidin-3,5-diglucoside (MA); peonidin-3,5-diglucoside (PE); (+)-catechin (CAT); (-)-epicatechin (EPI); (-)-epicatechin gallate (EG); (-)-epigallocatechin gallate (EGG); Procyanidin B1 (PB1); procyanidin B2 (PB2); taxifolin (T); myricetin (M); quercetin (Q); rutin (RU); *trans*-resveratrol (R). Each grape juice label was colored according to the grape cultivar used in its elaboration as described in Figure 4.3. Online Resource 2 presents PC1 and PC2 scores for each sample.



**Figure 4.5** - PC1 (A) and PC2 (B) loadings for the phenolic compounds studied. Compounds' labels are described in Figure 4.4.

Dendrogram analysis shows a tendency to form groups according to the grape variety used in the elaboration of each juice. However, Isabel Precoce organic juice (GJ22) is distinct and, for that reason, it was completely separated from all the rest. That separation was also evident in PCA score biplot. Evaluating the influence of each phenolic compound (Figure 4.4 and 5), it is possible to observe that GJ22 was different

from other juices especially for its content of (-)-epicatechin and procyanidins B1 and B2. In fact, GJ22 presented the highest amounts of those compounds.

Another group of samples was also separated from the rest, but with a smaller Euclidean distance. BRS-Violeta juices (GJ3, GJ24 and GJ25), distinct by their elevated anthocyanic content, and also Bordo and BRS-Magna 2019 harvest juices (GJ48 and GJ49) showing in common a significant quantity of malvidin-3,5-diglucoside and/or (+)-catechin and myricetin.

The other samples were primarily separated into two clusters. All Concord organic juices (GJ14, GJ15, GJ16 and GJ17) appeared together in the smaller of the two clusters. Concord conventional juice (GJ6), poorer in phenolic compounds than the others of the same type, especially procyanidin B1, was grouped with Niagara Rosada juices. GJ38 and GJ40 (both Niagara Rosada) were found to be more similar to each other (smallest Euclidean distance) than all other juices studied.

Bordo juices (GJ5, GJ12, GJ44 and GJ46), influenced mostly by cyanidin-3,5-diglucoside, malvidin-3,5-diglucoside and peonidin-3,5-diglucoside, showed significant similarity. On the other hand, GJ11 (Bordo organic juice) was more similar to BRS-Magna (GJ4, GJ18 and GJ19) and BRS-Carmem juices, all of them presented intermediate concentration of most compounds. GJ35, GJ36, GJ37 are slightly different from the rest of this group especially due to the absence of myricetin and the presence of *trans*-resveratrol.

Finally, BRS-Cora juices (GJ1, GJ26 and GJ27), very poor in most compounds, particularly flavanols, were clustered with BRS-Rubea organic juice (GJ33). The other three BRS-Rubea juices (GJ7, GJ31 and GJ32) were more similar to Isabel juice (GJ2) and seem to be influenced mostly by rutin and taxifolin.

PCA loadings (Figure 4.5) indicate how much each variable contributes to differentiate the samples studied. For instance, positive PC1 scores are associated to samples containing higher amounts of flavanols, quercetin and/or malvidin-3-O-glucoside, such as Concord organic juices and Isabel Precoce juices. While positive PC2 scores are not very significant, negative PC2 scores, on the other hand, can be associated to grape varieties that are differentiated from the rest especially because of their lower content of diglucosylated anthocyanins, such as BRS-Cora juices, BRS-Carmem juices, BRS-Rubea juices and Niagara Rosada juices.

#### 4.2.4 Conclusion

The validation parameters used to evaluate the proposed method showed that the method is specific, linear, precise, accurate and very sensitive with LOD and LOQ in the order of  $\mu\text{g L}^{-1}$  and even  $\text{ng L}^{-1}$ . The validated method is fast and determinates, simultaneously, 16 phenolic compounds belonging to five different classes, including anthocyanins, in only 4.5 min and does not require complex sample preparation or previous purification.

The applicability of the validated method was verified through the characterization of 49 samples of grape juice produced with different grape varieties. Traditional cultivar Bordo and two varieties (BRS-Violeta and Seleção 13) developed by Embrapa Grape and Wine's Genetic Improvement Program generated the richest juices in terms of phenolic compounds, especially anthocyanins. The anthocyanin found in greatest amounts was malvidin-3,5-diglucoside while malvidin-3-O-glucoside was found in smallest concentrations.

Isabel Precoce juice presented the most significant quantity of non-anthocyanic compounds, especially (+)-catechin and procyanidin B1. Kaempferol, taxifolin, (-)-epicatechin gallate and (-)-epigallocatechin gallate were the phenolic compounds less found in the samples analyzed. BRS-Cora and Niagara Rosada juices presented the smallest concentration of the compounds studied.

The validated method proved to be able to evaluate quantitatively grape juices from the most different natures. It is a useful tool for studying the phenolic profile of grape juices, as well as helping to assure the quality of this drink with important nutraceutical value.

#### 4.2.5 Conflict of interests

The authors declare that they have no competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### 4.2.6 References

ANANGA, A.; GEORGIEV, V.; OCHIENG, J.; PHILLS, B.; TSOLOVA, V. Production of anthocyanins in grape cell cultures: a potential source of raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries. In: **The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive**. [s.l.] : IntechOpen, 2013.

ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM, K. R. (EDS.). **Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications**. Boca Raton, FL: CRC, Taylor & Francis, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde - MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. **Diário Oficial da União (DOU), Brasília, DF**. 25 jul. 2017.

BRERETON, R. G. **Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant**. 1. ed. UK: Wiley, 2003. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1198/tech.2004.s738>>. Acesso em: 10 nov. 2019.

CAMARGO, U. A. **Isabel Precoce - Alternativa para a Vitivinicultura Brasileira. Comunicado Técnico 54**. 1. ed. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2004.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; NACHTIGAL, J. C. **BRS-Violeta - Nova Cultivar de Uva para Suco e Vinho de Mesa. Comunicado Técnico 63**. 1. ed. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2005.

CARDOZO, M. G.; MEDEIROS, N.; DOS SANTOS LACERDA, D.; DE ALMEIDA, D. C.; HENRIQUES, J. A. P.; DANI, C.; FUNCHAL, C. Effect of chronic treatment with conventional and organic purple grape juices (*Vitis labrusca*) on rats fed with high-fat diet. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 33, n. 8, p. 1123–1133, 2013.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. **Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet**. UK: Blackwell Publishing, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.2237>>. Acesso em: 22 abr. 2019.

DANI, C.; OLIBONI, L. S.; VANDERLINDE, R.; BONATTO, D.; SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally-produced grapes. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 45, n. 12, p. 2574–2580, 2007.

DANI, C.; OLIBONI, L. S.; VANDERLINDE, R.; PRA, D.; DIAS, J. F.; YONEAMA, M. L.; BONATTO, D.; SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. Antioxidant activity and phenolic and mineral content of Rose grape juice. **Journal of Medicinal Food**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 188–192, 2009.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 7, p. 1085–1097, 1995.

DUTRA, M. da C. P.; RODRIGUES, L. L.; DE OLIVEIRA, D.; PEREIRA, G. E.; LIMA, M. dos S. Integrated analyses of phenolic compounds and minerals of Brazilian organic and conventional grape juices and wines: Validation of a method for determination of Cu, Fe and Mn. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 269, p. 157–165, 2018.

EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; SECCOMBE, J. F.; SCHAFF, H. V. Lesão de isquemia-reperfusão. aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s. l.], v. 66, p. 7, 1996.

FAO-OIV. **TABLE and dried grapes- Non-alcoholic products of the vitivinicultural sector intended for human consumption. FAO-OIV FOCUS 2016**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations and International Organisation of Vine and Wine, 2016.

FRACASSETTI, D.; LAWRENCE, N.; TREDoux, A. G. J.; TIRELLI, A.; NIEUWOUDT, H. H.; DU TOIT, W. J. Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 128, n. 4, p. 1136–1142, 2011.

**GENOMENET**. 2019. Disponível em: <[www.genome.jp](http://www.genome.jp)>. Acesso em: 7 abr. 2019.

GUERRA, C. C. Polifenóis da uva e do vinho. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 90–100, 2012.

GUERRA, C. C.; BITARELO, H.; BEN, R. L.; MARIN, A. **Sistema para elaboração de suco de uva integral em pequenos volumes: Suquificador Integral. Documentos, 96**. 1. ed. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2016.

HE, F.; MU, L.; YAN, G.-L.; LIANG, N.-N.; PAN, Q.-H.; WANG, J.; REEVES, M. J.; DUAN, C.-Q. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. **Molecules**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 9057–9091, 2010.

HELPER, G. A.; BOCK, F.; MARDER, L.; FURTADO, J. C.; COSTA, A. B. Da; FERRÃO, M. F. ChemoStat, um software gratuito para análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, [s. l.], 2015. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0100-4042.20150063>>. Acesso em: 18 nov. 2019.

HOFFMAN, A.; CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G. **Sistema de produção de uvas rústicas para processamento em regiões tropicais do Brasil**. 2005. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasRusticasParaProcessamento/index.htm>>. Acesso em: 7 fev. 2019.

HOLTON, T. A.; CORNISH, E. C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 7, p. 1071–1083, 1995.

ICH. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. [s.l.] : International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, 2005.

LIMA, M. dos S.; SILANI, I. de S. V.; TOALDO, I. M.; CORRÊA, L. C.; BIASOTO, A. C. T.; PEREIRA, G. E.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; NINOW, J. L. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 161, p. 94–103, 2014.

LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J.; QUIRÓS, A. R.-B. De. *Trans*-stilbenes in commercial grape juices: quantification using HPLC approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 1769, 2016.

MAEDA, H.; DUDAREVA, N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Biology**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 73–105, 2012.

MARCHI, P.; PAIOTTI, A. P. R.; NETO, R. A.; OSHIMA, C. T. F.; RIBEIRO, D. A. Concentrated grape juice (G8000™) reduces immunoexpression of iNOS, TNF-alpha, COX-2 and DNA damage on 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced-colitis. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 819–827, 2014.

MARTINO, K. G.; PAUL, M. S.; PEGG, R. B.; KERR, W. L. Effect of time–temperature conditions and clarification on the total phenolics and antioxidant constituents of muscadine grape juice. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 327–330, 2013.

MARZAROTTO, V. Suco de Uva. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Ed.). **Bebidas não-alcoólicas: ciência e tecnologia**. 1. ed. São Paulo: Edgar Blücher, 2010. v. 2p. 385.

MELLO, L. M. R. De. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2017. Comunicado Técnico 207**. 1. ed. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2018.

MENET, M.-C. Principes de la spectrométrie de masse. **Revue Francophone des Laboratoires**, [s. l.], v. 2011, n. 437, p. 41–53, 2011.

NATIVIDADE, M. M. P.; CORRÊA, L. C.; SOUZA, S. V. C. De; PEREIRA, G. E.; LIMA, L. C. de O. Simultaneous analysis of 25 phenolic compounds in grape juice for HPLC: method validation and characterization of São Francisco Valley samples. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 110, p. 665–674, 2013.

OIV. **2018 World Vitiviniculture Situation. OIV Statistical Report on World Vitiviniculture**. Paris: International Organisation of Vine and Wine, 2018.

OIV. **Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis**. Paris: International Organisation of Vine and Wine, 2019. v. 1.

PADILHA, C. V. da S.; MISKINIS, G. A.; DE SOUZA, M. E. A. O.; PEREIRA, G. E.; DE OLIVEIRA, D.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; LIMA, M. dos S. Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 228, p. 106–115, 2017.



RICE-EVANS, C. Screening of phenolics and flavonoids for antioxidant activity. In: **Antioxidant Food Supplements in Human Health**. 1. ed. San Diego, California: Academic Press, 1999. p. 496.

RITSCHER, P.; MAIA, J. D. G.; CAMARGO, U. A.; ZANUS, M. C.; DE SOUZA, R. T.; FAJARDO, T. V. M. **BRS-Magna - Nova cultivar de uva para suco com ampla adaptação climática. Comunicado Técnico 125**. 1. ed. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2012.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. **Suco de uva**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007.

SHANMUGANAYAGAM, D.; WARNER, T. F.; KRUEGER, C. G.; REED, J. D.; FOLTS, J. D. Concord grape juice attenuates platelet aggregation, serum cholesterol and development of atheroma in hypercholesterolemic rabbits. **Atherosclerosis**, [s. l.], v. 190, n. 1, p. 135–142, 2007.

SILVA, L. F. Da; GUERRA, C. C.; KLEIN, D.; BERGOLD, A. M. Solid cation exchange phase to remove interfering anthocyanins in the analysis of other bioactive phenols in red wine. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 227, p. 158–165, 2017.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentals of analytical chemistry**. 9. ed. Boston, MA: Cengage, 2014.

SNOPEK, L.; MLCEK, J.; SOCHOROVA, L.; BARON, M.; HLAVACOVA, I.; JURIKOVA, T.; KIZEK, R.; SEDLACKOVA, E.; SOCHOR, J. Contribution of red wine consumption to human health protection. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 1684, 2018.

SÓLYOM, K.; SOLÁ, R.; COCERO, M. J.; MATO, R. B. Thermal degradation of grape marc polyphenols. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 159, p. 361–366, 2014.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? **Comptes Rendus Biologies**, [s. l.], v. 327, p. 649–662, 2004.

STALMACH, A.; EDWARDS, C. A.; WIGHTMAN, J. D.; CROZIER, A. Identification of (poly)phenolic compounds in concord grape juice and their metabolites in human plasma and urine after juice consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 59, n. 17, p. 9512–9522, 2011.

TOSCANO, L. T.; TAVARES, R. L.; TOSCANO, L. T.; SILVA, C. S. O. Da; ALMEIDA, A. E. M. De; BIASOTO, A. C. T.; GONÇALVES, M. da C. R.; SILVA, A. S. Potential ergogenic activity of grape juice in runners. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, [s. l.], v. 40, n. 9, p. 899–906, 2015.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VINSON, J. A.; TEUFEL, K.; WU, N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. **Atherosclerosis**, [s. l.], v. 156, n. 1, p. 67–72, 2001.

WHELAN, A. P.; SUTHERLAND, W. H. F.; MCCORMICK, M. P.; YEOMAN, D. J.; DE JONG, S. A.; WILLIAMS, M. J. A. Effects of white and red wine on endothelial function in subjects with coronary artery disease: Wine and coronary artery disease. **Internal Medicine Journal**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 224–228, 2004.

Grape cultivar	CY	OE	MA	PE	CAT	EPI	EG	EGG	PB1	PB2	T	K	M	Q	RU	R	Xanthocyanins	Znon-anthocyanic	TOTAL
<b>Juices elaborated with grapes cultivated in conventional farming system</b>																			
GJ1 BRS-Cora	30.31±0.47	0.11±0.00	0.50±0.00	0.73±0.00	1.31±0.03	1.06±0.04	ND	ND	2.88±0.05	1.49±0.01	ND	ND	0.59±0.01	0.15±0.00	0.25±0.00	<LOQ	31.65	7.73	39.38
GJ2 Isabel	2.17±0.02	35.59±0.31	8.04±0.04	4.11±0.06	5.40±0.02	2.51±0.05	<LOQ	ND	4.02±0.02	2.05±0.01	<LOQ	ND	<LOQ	0.28±0.00	0.42±0.00	0.44±0.00	49.91	15.11	65.01
GJ3 BRS-Violeta	86.06±0.22	3.19±0.01	328.59±2.27	146.43±0.69	74.64±0.12	1.77±0.00	ND	ND	7.32±0.01	2.03±0.00	ND	ND	2.76±0.01	0.26±0.00	ND	<LOQ	564.26	88.78	653.05
GJ4 BRS-Magna	19.40±0.72	1.12±0.00	89.31±0.08	24.81±0.18	14.89±0.27	0.86±0.00	ND	ND	3.81±0.10	1.73±0.02	ND	ND	0.76±0.01	0.20±0.00	ND	ND	134.63	22.25	156.88
GJ5 Bordo	2.79±0.01	18.91±0.09	165.86±0.89	33.87±0.18	6.92±0.02	1.67±0.01	<LOQ	ND	4.82±0.04	2.94±0.01	ND	ND	1.93±0.02	0.22±0.00	0.21±0.00	<LOQ	221.43	18.72	240.15
GJ6 Concord	13.81±0.05	4.33±0.00	6.17±0.02	8.84±0.03	7.00±0.02	3.38±0.01	<LOQ	ND	6.64±0.10	3.59±0.05	ND	ND	<LOQ	0.20±0.00	0.16±0.00	ND	33.15	20.97	54.13
GJ7 BRS-Rubea	25.00±0.16	0.26±0.00	4.27±0.04	0.88±0.00	11.61±0.02	2.19±0.00	<LOQ	ND	5.10±0.01	3.65±0.03	<LOQ	ND	0.73±0.01	0.29±0.00	0.45±0.00	<LOQ	30.41	24.02	54.43
GJ8 Isabel Precoce	<LOQ	54.39±0.75	9.65±0.07	6.68±0.02	5.40±0.01	2.04±0.00	ND	ND	3.07±0.02	1.52±0.01	0.81±0.00	ND	ND	<LOQ	<LOQ	0.50±0.00	70.72	13.36	84.08
GJ9 BRS-Carmem	3.03±0.03	8.86±0.04	80.71±0.37	24.47±0.07	15.32±0.01	3.93±0.01	ND	ND	6.06±0.05	2.10±0.01	ND	ND	0.56±0.00	<LOQ	<LOQ	<LOQ	117.07	27.97	145.03
<b>Juices elaborated with grapes cultivated in organic farming system</b>																			
GJ10 Bordo 043-43 uncovered	4.89±0.04	13.49±0.08	90.71±0.10	18.67±0.04	19.45±0.05	9.76±0.03	0.31±0.00	ND	17.44±0.25	6.10±0.01	<LOQ	ND	1.44±0.00	0.28±0.00	0.32±0.00	0.25±0.00	127.74	55.34	183.08
GJ11 Bordo 043-43 covered	0.81±0.00	1.56±0.01	134.83±0.17	4.23±0.01	1.69±0.01	0.79±0.00	ND	<LOQ	2.47±0.02	1.56±0.03	ND	ND	0.45±0.00	0.20±0.00	0.16±0.01	<LOQ	141.43	7.32	148.76
GJ12 Bordo P1103 uncovered	5.60±0.00	26.91±0.03	198.39±0.46	42.65±0.04	4.24±0.02	0.65±0.01	ND	ND	4.27±0.00	1.31±0.03	<LOQ	ND	1.68±0.00	<LOQ	0.16±0.00	ND	273.55	12.31	285.86
GJ13 Bordo P1103 covered	2.51±0.00	6.31±0.01	168.95±0.28	16.39±0.22	10.75±0.03	1.74±0.00	0.30±0.00	0.68±0.00	17.32±0.05	4.95±0.00	<LOQ	ND	1.00±0.00	0.23±0.00	0.35±0.00	0.36±0.01	194.16	37.68	231.84
GJ14 Concord 043-43 uncovered	9.43±0.01	6.99±0.00	6.01±0.01	6.70±0.01	11.19±0.04	2.18±0.00	<LOQ	ND	14.88±0.06	3.79±0.03	<LOQ	ND	1.52±0.00	0.42±0.00	0.18±0.00	<LOQ	29.13	34.16	63.29
GJ15 Concord 043-43 covered	12.65±0.02	2.18±0.01	28.40±0.12	12.22±0.01	9.09±0.01	1.80±0.19	0.17±0.00	ND	17.68±0.11	3.72±0.25	<LOQ	ND	0.30±0.00	0.25±0.00	0.17±0.00	<LOQ	55.44	33.17	88.61
GJ16 Concord P1103 uncovered	12.30±0.01	9.87±0.01	14.91±0.03	10.61±0.00	10.70±0.03	4.99±0.06	0.19±0.00	ND	13.85±0.07	4.65±0.02	<LOQ	ND	1.69±0.00	0.26±0.00	0.09±0.00	<LOQ	47.72	36.42	84.14
GJ17 Concord P1103 covered	10.96±0.01	5.14±0.01	23.60±0.08	8.94±0.02	10.10±0.01	2.00±0.00	0.28±0.00	ND	14.25±0.03	3.95±0.03	<LOQ	ND	0.44±0.00	0.20±0.00	0.09±0.01	<LOQ	48.62	31.33	79.94
GJ18 BRS-Magna 043-43 covered	19.52±0.02	0.60±0.00	106.12±0.50	17.10±0.00	7.07±0.03	0.56±0.00	ND	ND	3.48±0.02	1.32±0.03	ND	ND	0.43±0.00	0.20±0.00	ND	ND	143.34	13.06	156.41
GJ19 BRS-Magna P1103 covered	26.32±0.09	0.66±0.00	117.24±1.17	25.93±0.06	6.03±0.02	0.55±0.00	ND	ND	2.73±0.01	1.20±0.03	ND	ND	0.38±0.00	0.16±0.00	ND	ND	170.15	11.06	181.21
GJ20 Isabel Precoce 043-43 uncovered	1.30±0.00	70.84±0.02	7.64±0.01	7.13±0.00	26.41±0.11	10.99±0.03	0.22±0.00	ND	16.73±0.03	6.12±0.01	0.54±0.00	ND	0.44±0.00	0.32±0.00	0.23±0.01	0.78±0.00	86.91	62.78	149.69
GJ21 Isabel Precoce 043-43 covered	0.94±0.00	22.46±0.00	13.45±0.01	8.92±0.01	11.11±0.04	4.60±0.03	<LOQ	ND	7.72±0.03	2.46±0.02	<LOQ	ND	<LOQ	0.17±0.00	0.14±0.00	0.56±0.00	45.77	26.76	72.52
GJ22 Isabel Precoce P1103 uncovered	1.42±0.00	107.25±0.12	10.42±0.01	9.03±0.02	85.72±0.15	32.21±0.44	0.34±0.00	ND	23.24±0.04	9.04±0.13	0.66±0.01	ND	0.88±0.00	0.46±0.00	0.21±0.00	1.53±0.00	128.13	154.28	282.41
GJ23 Isabel Precoce P1103 covered	0.81±0.00	22.22±0.09	17.49±0.04	7.64±0.01	7.53±0.00	3.64±0.02	ND	ND	9.14±0.10	2.64±0.04	<LOQ	ND	0.19±0.00	0.20±0.00	0.14±0.01	0.27±0.00	48.16	23.76	71.92
GJ24 BRS-Violeta 043-43 covered	95.55±0.53	1.16±0.00	124.21±1.38	62.76±0.05	6.05±0.01	<LOQ	ND	0.65±0.01	4.72±0.02	0.95±0.04	ND	ND	0.79±0.00	0.16±0.00	ND	1.14±0.00	283.68	14.45	298.13
GJ25 BRS-Violeta P1103 covered	86.89±0.16	0.76±0.00	77.34±0.45	57.25±0.02	7.87±0.01	0.47±0.00	ND	0.51±0.01	4.10±0.02	0.87±0.01	ND	ND	0.52±0.00	<LOQ	ND	1.38±0.00	222.24	15.74	237.98
GJ26 BRS-Cora 043-43 covered	18.20±0.02	0.44±0.00	2.25±0.01	1.09±0.00	1.06±0.00	0.57±0.00	ND	<LOQ	3.53±0.01	1.25±0.01	ND	ND	<LOQ	<LOQ	0.08±0.00	0.25±0.00	21.97	6.74	28.71
GJ27 BRS-Cora P1103 covered	11.54±0.01	9.29±0.02	17.10±0.02	16.24±0.01	1.78±0.00	0.79±0.00	ND	ND	4.55±0.01	1.40±0.02	ND	ND	0.45±0.00	0.17±0.00	0.20±0.00	<LOQ	54.16	9.34	63.51
GJ28 Seleção 13 043-43 covered	24.60±0.07	36.55±0.02	111.83±0.01	35.16±0.05	8.61±0.03	0.83±0.00	ND	ND	6.11±0.01	1.15±0.01	<LOQ	ND	ND	0.16±0.00	0.10±0.00	0.50±0.00	208.13	17.46	225.60
GJ29 Seleção 13 P1103 uncovered	7.46±0.02	72.36±0.13	111.34±0.27	111.38±0.37	18.89±0.02	4.78±0.06	ND	ND	11.34±0.11	2.21±0.02	ND	ND	1.20±0.00	0.43±0.00	0.42±0.01	ND	302.55	39.27	341.81
GJ30 Seleção 13 P1103 covered	7.87±0.01	56.89±0.21	112.06±0.33	134.25±0.37	10.21±0.05	1.00±0.00	ND	ND	6.03±0.02	1.17±0.01	<LOQ	ND	<LOQ	0.14±0.00	0.07±0.00	<LOQ	311.07	18.62	329.70
GJ31 BRS-Rubea 043-43 covered	0.91±0.00	3.86±0.01	25.24±0.08	19.52±0.02	2.03±0.01	0.75±0.01	<LOQ	0.50±0.00	6.41±0.03	1.79±0.01	<LOQ	ND	0.44±0.00	0.26±0.00	0.38±0.01	<LOQ	49.57	12.55	62.09
GJ32 BRS-Rubea P1103 uncovered	32.83±0.04	3.04±0.00	2.52±0.02	1.39±0.01	8.04±0.01	1.09±0.01	0.16±0.00	ND	6.80±0.01	2.72±0.03	<LOQ	ND	0.88±0.00	0.26±0.00	0.54±0.01	<LOQ	39.78	20.49	60.28
GJ33 BRS-Rubea P1103 covered	44.22±0.17	1.35±0.00	15.95±0.03	2.03±0.01	1.97±0.00	0.76±0.00	ND	ND	5.60±0.01	1.72±0.02	<LOQ	ND	0.39±0.00	0.14±0.00	0.24±0.01	<LOQ	63.55	10.82	74.36
GJ34 BRS-Carmem 043-43 uncovered	2.15±0.00	7.06±0.02	105.29±0.11	22.15±0.11	12.22±0.00	1.55±0.00	ND	ND	7.07±0.02	1.78±0.02	<LOQ	ND	0.41±0.00	<LOQ	0.11±0.00	<LOQ	136.65	23.13	159.78
GJ35 BRS-Carmem 043-43 covered	1.51±0.00	1.57±0.00	28.72±0.06	11.75±0.02	1.79±0.01	<LOQ	ND	ND	1.38±0.00	0.58±0.01	ND	ND	ND	ND	ND	0.31±0.00	43.55	4.07	47.62
GJ36 BRS-Carmem P1103 uncovered	2.13±0.01	5.43±0.01	81.07±0.40	21.71±0.08	6.91±0.05	0.95±0.01	ND	ND	4.91±0.02	1.09±0.04	ND	ND	ND	ND	ND	0.47±0.00	110.34	14.34	124.68
GJ37 BRS-Carmem P1103 covered	1.70±0.01	4.12±0.01	89.71±0.17	29.86±0.12	1.90±0.00	<LOQ	ND	ND	1.57±0.01	<LOQ	ND	ND	ND	ND	ND	0.28±0.00	125.39	3.75	129.14
<b>Juices elaborated with grapes cultivated under different levels of soil fertilization</b>																			
GJ38 Niagara Rosada fertilization 1	4.36±0.00	0.09±0.00	ND	ND	11.08±0.01	5.29±0.02	ND	ND	11.43±0.03	3.12±0.03	ND	ND	ND	0.17±0.00	ND	ND	4.45	31.09	35.54
GJ39 Niagara Rosada fertilization 2	3.53±0.01	0.05±0.00	ND	ND	10.81±0.02	2.75±0.03	ND	ND	7.58±0.01	2.79±0.04	ND	ND	ND	0.12±0.00	ND	ND	3.58	24.05	27.63
GJ40 Niagara Rosada fertilization 3	4.06±0.01	0.06±0.00	ND	ND	12.11±0.09	6.41±0.02	ND	ND	10.74±0.10	3.15±0.02	ND	ND	ND	0.17±0.00	ND	ND	4.12	32.58	36.70
GJ41 Niagara Rosada fertilization 4	3.69±0.01	0.08±0.00	ND	ND	16.25±0.02	10.68±0.03	ND	ND	12.71±0.09	4.34±0.00	ND	ND	ND	0.34±0.00	ND	<LOQ	3.77	44.32	48.10
GJ42 Niagara Rosada fertilization 5	3.51±0.01	0.06±0.00	ND	ND	15.00±0.06	9.84±0.02	ND	ND	10.93±0.04	3.79±0.03	<LOQ	ND	ND	0.20±0.00	ND	<LOQ	3.57	39.76	43.33
GJ43 Niagara Rosada fertilization 6	3.58±0.00	0.06±0.00	ND	ND	9.52±0.01	5.17±0.03	ND	ND	7.16±0.01	2.26±0.02	ND	ND	ND	0.17±0.00	ND	<LOQ	3.64	24.28	27.91
<b>Juices elaborated with grapes from different harvests</b>																			
GJ44 Bordo 2017 harvest	2.61±0.00	6.84±0.01	115.26±0.08	22.24±0.02	0.57±0.01	<LOQ	<LOQ	ND	2.62±0.01	0.62±0.01	ND	ND	2.03±0.00	0.26±0.00	0.20±0.00	ND	146.94	6.30	153.24
GJ45 BRS-Magna 2017 harvest	10.89±0.00	0.29±0.00	52.69±0.03	7.84±0.04	1.53±0.01	0.47±0.01	ND	ND	3.94±0.01	2.41±0.03	ND	ND	1.82±0.01	0.46±0.01	ND	<LOQ	71.71	10.64	82.34
GJ46 Bordo 2018 harvest	5.46±0.01	8.02±0.03	158.25±0.44	28.85±0.03	1.49±0.00	0.48±0.00	ND	<LOQ	4.16±0.01	1.88±0.02	ND	ND	1.82±0.00	0.31±0.00	0.24±0.00	<LOQ	200.59	10.39	210.98
GJ47 BRS-Magna 2018 harvest	17.36±0.09	0.60±0.00	83.67±0.23	16.19±0.10	16.72±0.02	1.25±0.01	<LOQ	<LOQ	14.99±0.03	4.83±0.01	ND	ND	1.71±0.01	0.46±0.00	ND	0.49±0.00	117.83	40.45	158.27
GJ48 Bordo 2019 harvest	3.71±0.02	14.87±0.04	215.90±0.51	43.28±0.18	19.74±0.02	13.93±0.02	0.28±0.00	ND	5.29±0.16	4.96±0.04	ND	ND	1.74±0.01	0.16±0.01	0.08±0.00	0.54±0.01	277.75	46.72	324.47
GJ49 BRS-Magna 2019 harvest	21.51±0.12	1.07±0.00	112.63±0.81	22.45±0.05	76.04±0.90	14.57±0.05	ND	ND	16.04±0.02	5.21±0.06	ND	ND	1.65±0.02	0.25±0.00	ND	1.42±0.02	157.65	115.17	272.82

93

**Online Resource 1** - Concentration of phenolic compounds, in mg L<sup>-1</sup>, in grape juice samples. <LOQ: under limit of quantification. ND: not detected. Each value represents mean (n=3) ± standard deviation. Compounds: cyanidin-3,5-diglucoside (CY); malvidin-3-O-glucoside (OE); malvidin-3,5-diglucoside (MA); peonidin-3,5-diglucoside (PE); (+)-catechin (CAT); (-)-epicatechin (EPI); (-)-epicatechin gallate (EG); (-)-epigallocatechin gallate (EGG); Procyanidin B1 (PB1); procyanidin B2 (PB2); taxifolin (T); kaempferol (K); myricetin (M); quercetin (Q); rutin (RU); *trans*-resveratrol (R).

	<b>PC1</b>	<b>PC2</b>
GJ1	-1,694	0,751
GJ2	0,527	1,653
GJ3	-0,141	-7,186
GJ4	-1,578	-0,379
GJ5	-0,229	-1,100
GJ6	-0,462	1,224
GJ7	0,309	0,974
GJ8	0,025	1,959
GJ9	-1,158	0,207
GJ10	3,477	0,063
GJ11	-1,699	-0,005
GJ12	-1,320	-1,101
GJ13	2,032	-0,956
GJ14	1,610	0,510
GJ15	1,123	1,123
GJ16	1,603	0,330
GJ17	1,214	1,140
GJ18	-1,920	-0,092
GJ19	-2,178	-0,360
GJ20	4,685	1,249
GJ21	0,603	1,399
GJ22	10,215	-0,114
GJ23	0,166	1,500
GJ24	-1,907	-3,895
GJ25	-1,930	-3,106
GJ26	-2,185	0,921
GJ27	-1,440	0,785
GJ28	-0,736	-0,143
GJ29	1,314	-1,662
GJ30	-0,450	-0,984
GJ31	-0,430	0,584
GJ32	0,484	0,933
GJ33	-1,233	0,731
GJ34	-1,078	0,397
GJ35	-2,560	1,116
GJ36	-1,999	0,470
GJ37	-2,701	0,438
GJ38	-0,493	1,476
GJ39	-1,160	1,492
GJ40	-0,440	1,467
GJ41	0,848	1,297
GJ42	0,394	1,575
GJ43	-0,984	1,411
GJ44	-1,361	-0,637
GJ45	-0,734	-0,314
GJ46	-0,952	-1,420
GJ47	1,521	-1,304
GJ48	1,815	-1,839
GJ49	3,229	-2,577

**Online Resource 2** - PC1 and PC2 scores for the grape juice samples studied.

**5. CAPÍTULO 2: Estudo do perfil fenólico de amostras de suco de uva  
produzidas no Rio Grande do Sul**

---



## **5.1 Introdução**

O volume de suco de uva gerado no Rio Grande do Sul é o mais significativo de todo o país e um dos mais relevantes do mundo, já que muitos litros de suco produzidos neste estado são exportados para diversos países (MELLO, 2018). No entanto, essa produção não é homogênea uma vez que as variedades de uva utilizadas, o tipo de cultivo e o modo de elaboração do suco são bastante variados. Além disso, as condições climáticas e fisiográficas de cada região e de cada safra influenciam muito nas uvas produzidas e, por conseguinte, nos sucos gerados.

Dentre os sucos comerciais, a variabilidade é especialmente grande. Isso se deve ao fato da maioria dos fabricantes utilizar uma mistura de diversas cultivares de uva com diferentes percentuais de cada uma na elaboração do suco (assemblage). As variedades mais comumente utilizadas com esse fim são Bordô e Isabel, mas podem ser usadas muitas outras. Além disso, o processo produtivo também pode ser bastante variável, especialmente com relação à etapa de clarificação e aquecimento (ver item 3.2.4). Já os sucos experimentais elaborados na Embrapa Uva e Vinho, com o suquificador integral, são padronizados quanto ao processo de elaboração. Entretanto, estão sujeitos aos demais fatores de variabilidade que exercem influência sobre o cultivo das plantas.

E é nesse contexto de amostras bastante heterogêneas que se objetivou caracterizar amostras de suco de uva produzidos no Rio Grande do Sul. Utilizando-se o método desenvolvido e validado previamente descrito, foram avaliadas 56 amostras. Os resultados de 49 dessas amostras foram apresentados no Capítulo 1 com o objetivo de se comprovar a aplicabilidade do método desenvolvido. No entanto, estes resultados serão estudados com mais detalhes neste capítulo, focando na avaliação do perfil fenólico dos sucos de uva produzidos no Rio Grande do Sul. Acrescidas a essas 49 amostras, serão estudadas ainda 7 amostras comerciais.

## **5.2 Material e métodos**

### **5.2.1 Reagentes e padrões**

Ácido fórmico P.A. e metanol LC-MS foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). Água ultra-pura foi obtida da Fluka (Munich, Germany) e utilizada para o preparo de todas as soluções. Os padrões analíticos quempferol, (+)-catequina, miricetina, quercetina, resveratrol, rutina e taxifolina foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Procianidina B1, procianidina B2, (-)-epicatequina, (-)-epicatequina galato, (-)-epigallocatequina galato, cianidina-3,5-diglicosídeo, malvidina-3-O-glicosídeo, malvidina-3,5-diglicosídeo e peonidina-3,5-diglicosídeo foram obtidos de Extrasynthese (Genay, France).

## **5.2.2 Amostras de suco de uva**

As amostras de suco de uva analisadas foram elaboradas de forma padronizada através do suquificador integral na Embrapa Uva e Vinho em Bento Gonçalves ou adquiridas em um supermercado local (no caso das amostras de sucos comerciais).

Os sucos elaborados no suquificador integral pertencem a quatro experimentos conduzidos por pesquisadores da Embrapa Uva e Vinho: sucos elaborados com uvas cultivadas em sistema convencional, sucos elaborados com uvas cultivadas em sistema orgânico, sucos elaborados com uvas cultivadas sob diferentes níveis de adubação do solo e sucos elaborados com uvas de diferentes safras. As uvas utilizadas nesses experimentos são de variedades tradicionais (Bordô, Concord, Isabel, Isabel Precoce e Niágara Rosada) e de variedades desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Uva e Vinho (BRS-Carmem, BRS-Cora, BRS-Magna, BRS-Rúbea, BRS-Violeta, Seleção 13).

Os sucos comerciais foram escolhidos levando-se em consideração dois pré-requisitos básicos: sucos integrais elaborados unicamente com uvas (sem conservantes) e produzidos na Região da Uva e do Vinho da Serra Gaúcha.

### **5.2.2.1 Sucos elaborados com uvas cultivadas em sistema convencional**

As uvas utilizadas neste experimento foram cultivadas na Embrapa Uva e Vinho através do sistema convencional, ou seja, com utilização de defensivos agrícolas. Foram elaborados nove sucos varietais (Suco 1 ao Suco 9) com as seguintes



cultivares: BRS-Cora, Isabel, BRS-Violeta, BRS-Magna, Bordô, Concord, BRS-Rúbea, Isabel Precoce e BRS-Carmem. Os sucos produzidos com essas uvas foram elaborados no suquificador integral através de processo anteriormente descrito (ver item 3.2.4 c) com uvas da safra de 2019.

#### **5.2.2.2 Sucos elaborados com uvas cultivadas em sistema orgânico**

Os sucos elaborados com uvas orgânicas (sem adição de defensivos agrícolas ou aditivos químicos) fazem parte de um experimento com fins agrônômicos cujo objetivo principal é avaliar o desempenho das cultivares e definir quais delas se adaptam melhor às técnicas de manejo adotadas para elaboração de sucos integrais orgânicos. As cultivares foram enxertadas sobre os porta-enxertos Paulsen 1103 e VR 043-43, sendo metade da área conduzida com cobertura plástica e metade sem. Com esse formato, foram obtidas 40 combinações diferentes, entre cultivares, porta-enxertos e sistemas de cobertura. No entanto, em alguns tratamentos, não houve produção apta à suquificação. Ao final, foram elaborados 28 sucos (Suco 10 ao Suco 37).

As uvas utilizadas na elaboração dos 28 sucos orgânicos pertencem a oito variedades de uva distintas (Bordô, Concord, BRS-Magna, Isabel Precoce, BRS-Violeta, BRS-Cora, BRS-Rúbea e BRS-Carmem), além de uma variedade nova desenvolvida pela Embrapa Uva e Vinho e em fase de testes (Seleção 13). Os sucos produzidos com essas uvas foram elaborados no suquificador integral através de processo anteriormente descrito (ver item 3.2.4 c) com uvas da safra de 2019.

#### **5.2.2.3 Sucos elaborados com uvas cultivadas sob diferentes níveis de adubação de solo**

Este também é um experimento com fins agrônômicos cujo foco principal do cultivo está nos níveis de adubação do solo. Foram elaborados seis sucos utilizando-se uma única variedade de uva, a Niágara Rosada, cultivada em solo com níveis crescentes de adubação, começando sem adubação (Suco 38) até o nível mais elevado (Suco 43). Os sucos produzidos com essas uvas foram elaborados no

suquificador integral através de processo anteriormente descrito (ver item 3.2.4 c) com uvas da safra de 2019.

#### 5.2.2.4 Sucos elaborados com uvas de diferentes safras

Neste experimento, as variedades Bordô e BRS-Magna foram utilizadas para produzir seis sucos varietais (Suco 44 ao Suco 49) durante as safras de 2017, 2018 e 2019. As duas variedades de uvas utilizadas neste experimento foram cultivadas na cidade de Muçum no Rio Grande do Sul. Os sucos foram elaborados no suquificador integral, na Embrapa Uva e Vinho, através de processo anteriormente descrito (ver item 3.2.4 c).

#### 5.2.2.5 Sucos comerciais

Os sucos integrais e sem adição de conservantes ou antioxidantes disponíveis no mercado são ainda pouco numerosos, especialmente em se tratando de sucos varietais e aqueles elaborados com uvas cultivadas em sistema orgânico. Foram adquiridos sete sucos comerciais de diferentes marcas. As informações de cada amostra de suco comercial são apresentadas na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1** – Sucos comerciais.

<b>CÓDIGO</b>	<b>VARIEDADE</b>	<b>MARCA</b>	<b>VALIDADE</b>	<b>LOTE</b>
Suco 50	Bordô	Uva Só	02/21	1313
Suco 51	Bordô	Casa de Bento	01/21	51355203019
Suco 52	Bordô Orgânico	Casa de Bento	02/20	51279603618
Suco 53	Assemblage	Garibaldi	02/20	035/28
Suco 54	Assemblage	Casa Madeira	09/20	G107/18
Suco 55	Assemblage	Salton	03/20	L17093
Suco 56	Assemblage Orgânico	Mena Kaho	01/22	02/19

#### 5.2.3 Instrumentos e condições analíticas

Os instrumentos e as condições analíticas utilizados na análise quantitativa de compostos fenólicos nas amostras de sucos de uva seguiram os procedimentos descritos no item 4.2.2.3, conforme o método analítico desenvolvido e validado.

#### **5.2.4 Preparação de padrões e amostras**

As soluções padrão e amostra foram preparadas conforme descrito no item 4.2.2.4, de acordo com o método analítico desenvolvido e validado. As soluções padrão utilizadas nas análises quantitativas foram preparadas na concentração central da curva de linearidade do método analítico desenvolvido.

### **5.3 Resultados e Discussão**

Os resultados encontrados na caracterização de compostos fenólicos das amostras estudadas são apresentados nas Tabelas 5.2 (Sucos elaborados com uvas cultivadas em sistema convencional), 5.3 (Sucos elaborados com uvas cultivadas em sistema orgânico), 5.4 (Sucos elaborados com uvas cultivadas sob diferentes níveis de adubação de solo), 5.5 (Sucos elaborados com uvas de diferentes safras) e 5.6 (Sucos comerciais).

#### **5.3.1 Sucos elaborados com uvas cultivadas em sistema convencional**

O suco elaborado com a variedade BRS-Violeta (Suco 3) apresentou a maior quantidade de procianidina B1 e miricetina dentre as amostras convencionais. No entanto, o que mais chama a atenção é o seu elevado conteúdo de catequina e antocianinas diglicosiladas, contrastando, por outro lado, com a baixa quantidade de malvidina-3-O-glicosídeo encontrada nessa amostra. Esta antocianina foi encontrada em quantidades mais elevadas nos sucos elaborados com as variedades Isabel (Suco 2) e Isabel Precoce (Suco 8), que também se destacam por terem sido as duas únicas amostras a apresentar níveis de resveratrol acima do LOQ. Ainda, o Suco 8 foi o único dentre as amostras convencionais que apresentou quantidade de taxifolina acima do LOQ.

**Tabela 5.2 – Concentração de compostos fenólicos, em mg L<sup>-1</sup>, nas amostras de sucos convencionais.**

Variedade		CY	OE	MA	PE	CAT	EPI	EG	EGG	PB1	PB2	T	K	M	Q	RU	R
Suco 1	BRS-Cora	30,31 ±0,47	0,11 ±0,00	0,50 ±0,00	0,73 ±0,00	1,31 ±0,03	1,06 ±0,04	ND	ND	2,88 ±0,05	1,49 ±0,01	ND	ND	0,59 ±0,01	0,15 ±0,00	0,25 ±0,00	<LOQ
Suco 2	Isabel	2,17 ±0,02	35,59 ±0,31	8,04 ±0,04	4,11 ±0,06	5,40 ±0,02	2,51 ±0,05	<LOQ	ND	4,02 ±0,02	2,05 ±0,01	<LOQ	ND	<LOQ	0,28 ±0,00	0,42 ±0,00	0,44 ±0,00
Suco 3	BRS-Violeta	86,06 ±0,22	3,19 ±0,01	328,59 ±2,27	146,43 ±0,69	74,64 ±0,12	1,77 ±0,00	ND	ND	7,32 ±0,01	2,03 ±0,00	ND	ND	2,76 ±0,01	0,26 ±0,00	ND	<LOQ
Suco 4	BRS-Magna	19,40 ±0,72	1,12 ±0,00	89,31 ±0,08	24,81 ±0,18	14,89 ±0,27	0,86 ±0,00	ND	ND	3,81 ±0,10	1,73 ±0,02	ND	ND	0,76 ±0,01	0,20 ±0,00	ND	ND
Suco 5	Bordô	2,79 ±0,01	18,91 ±0,09	165,86 ±0,89	33,87 ±0,18	6,92 ±0,02	1,67 ±0,01	<LOQ	ND	4,82 ±0,04	2,94 ±0,01	ND	ND	1,93 ±0,02	0,22 ±0,00	0,21 ±0,00	<LOQ
Suco 6	Concord	13,81 ±0,05	4,33 ±0,00	6,17 ±0,02	8,84 ±0,03	7,00 ±0,02	3,38 ±0,01	<LOQ	ND	6,64 ±0,10	3,59 ±0,05	ND	ND	<LOQ	0,20 ±0,00	0,16 ±0,00	ND
Suco 7	BRS-Rubea	25,00 ±0,16	0,26 ±0,00	4,27 ±0,04	0,88 ±0,00	11,61 ±0,02	2,19 ±0,00	<LOQ	ND	5,10 ±0,01	3,65 ±0,03	<LOQ	ND	0,73 ±0,01	0,29 ±0,00	0,45 ±0,00	<LOQ
Suco 8	Isabel Precoce	<LOQ	54,39 ±0,75	9,65 ±0,07	6,68 ±0,02	5,40 ±0,01	2,04 ±0,00	ND	ND	3,07 ±0,02	1,52 ±0,01	0,81 ±0,00	ND	ND	<LOQ	<LOQ	0,50 ±0,00
Suco 9	BRS-Carmem	3,03 ±0,03	8,86 ±0,04	80,71 ±0,37	24,47 ±0,07	15,32 ±0,01	3,93 ±0,01	ND	ND	6,06 ±0,05	2,10 ±0,01	ND	ND	0,56 ±0,00	<LOQ	<LOQ	<LOQ

<LOQ: abaixo do limite de quantificação. ND: não detectado. Cada valor representa a média (n=3) ± o desvio padrão. Compostos: cianidina-3,5-diglicosídeo (CY); malvidina-3-O-glicosídeo (OE); malvidina-3,5-diglicosídeo (MA); peonidina-3,5-diglicosídeo (PE); (+)-catequina (CAT); (-)-epicatequina (EPI); (-)-epicatequina galato (EG); (-)-epigallocatequina galato (EGG); procianidina B1 (PB1); procianidina B2 (PB2); taxifolina (T); quempferol (K); miricetina (M); quercetina (Q); rutina (RU); *trans*-resveratrol (R).

102

**Tabela 5.3 – Concentração de compostos fenólicos, em mg L<sup>-1</sup>, nas amostras de sucos orgânicos.**

Variedade		CY	OE	MA	PE	CAT	EPI	EG	EGG	PB1	PB2	T	K	M	Q	RU	R
Suco 10	Bordô 043-43 sem cobertura	4,89 ±0,04	13,49 ±0,08	90,71 ±0,10	18,67 ±0,04	19,45 ±0,05	9,76 ±0,03	0,31 ±0,00	ND	17,44 ±0,25	6,10 ±0,01	<LOQ	ND	1,44 ±0,00	0,28 ±0,00	0,32 ±0,00	0,25 ±0,00
Suco 11	Bordô 043-43 com cobertura	0,81 ±0,00	1,56 ±0,01	134,83 ±0,17	4,23 ±0,01	1,69 ±0,01	0,79 ±0,00	ND	<LOQ	2,47 ±0,02	1,56 ±0,03	ND	ND	0,45 ±0,00	0,20 ±0,00	0,16 ±0,01	<LOQ
Suco 12	Bordô P1103 sem cobertura	5,60 ±0,00	26,91 ±0,03	198,39 ±0,46	42,65 ±0,04	4,24 ±0,02	0,65 ±0,01	ND	ND	4,27 ±0,00	1,31 ±0,03	<LOQ	ND	1,68 ±0,00	<LOQ	0,16 ±0,00	ND
Suco 13	Bordô P1103 com cobertura	2,51 ±0,00	6,31 ±0,01	168,95 ±0,28	16,39 ±0,22	10,75 ±0,03	1,74 ±0,00	0,30 ±0,00	0,68 ±0,00	17,32 ±0,05	4,95 ±0,00	<LOQ	ND	1,00 ±0,00	0,23 ±0,00	0,35 ±0,00	0,36 ±0,01
Suco 14	Concord 043-43 sem cobertura	9,43 ±0,01	6,99 ±0,00	6,01 ±0,01	6,70 ±0,01	11,19 ±0,04	2,18 ±0,00	<LOQ	ND	14,88 ±0,06	3,79 ±0,03	<LOQ	ND	1,52 ±0,00	0,42 ±0,00	0,18 ±0,00	<LOQ
Suco 15	Concord 043-43 com cobertura	12,65 ±0,02	2,18 ±0,01	28,40 ±0,12	12,22 ±0,01	9,09 ±0,01	1,80 ±0,19	0,17 ±0,00	ND	17,68 ±0,11	3,72 ±0,25	<LOQ	ND	0,30 ±0,00	0,25 ±0,00	0,17 ±0,00	<LOQ
Suco 16	Concord P1103 sem cobertura	12,30 ±0,01	9,87 ±0,01	14,91 ±0,03	10,64 ±0,00	10,70 ±0,03	4,99 ±0,06	0,19 ±0,00	ND	13,85 ±0,07	4,65 ±0,02	<LOQ	ND	1,69 ±0,00	0,26 ±0,00	0,09 ±0,00	<LOQ

(continua)

**Tabela 5.3 – Concentração de compostos fenólicos, em mg L<sup>-1</sup>, nas amostras de sucos orgânicos.**

	Variedade	CY	OE	MA	PE	CAT	EPI	EG	EGG	PB1	PB2	T	K	M	Q	RU	R
<b>Suco 17</b>	Concord P1103 com cobertura	10,96 ±0,01	5,14 ±0,01	23,60 ±0,08	8,91 ±0,02	10,10 ±0,01	2,00 ±0,00	0,28 ±0,00	ND	14,25 ±0,03	3,95 ±0,03	<LOQ	ND	0,44 ±0,00	0,20 ±0,00	0,09 ±0,01	<LOQ
<b>Suco 18</b>	BRS-Magna 043-43 com cobertura	19,52 ±0,02	0,60 ±0,00	106,12 ±0,50	17,10 ±0,00	7,07 ±0,03	0,56 ±0,00	ND	ND	3,48 ±0,02	1,32 ±0,03	ND	ND	0,43 ±0,00	0,20 ±0,00	ND	ND
<b>Suco 19</b>	BRS-Magna P1103 com cobertura	26,32 ±0,09	0,66 ±0,00	117,24 ±1,17	25,93 ±0,06	6,03 ±0,02	0,55 ±0,00	ND	ND	2,73 ±0,01	1,20 ±0,03	ND	ND	0,38 ±0,00	0,16 ±0,00	ND	ND
<b>Suco 20</b>	Isabel Precoce 043-43 sem cobertura	1,30 ±0,00	70,84 ±0,02	7,64 ±0,01	7,13 ±0,00	26,41 ±0,11	10,99 ±0,03	0,22 ±0,00	ND	16,73 ±0,03	6,12 ±0,01	0,54 ±0,00	ND	0,44 ±0,00	0,32 ±0,00	0,23 ±0,01	0,78 ±0,00
<b>Suco 21</b>	Isabel Precoce 043-43 com cobertura	0,94 ±0,00	22,46 ±0,00	13,45 ±0,01	8,92 ±0,01	11,11 ±0,04	4,60 ±0,03	<LOQ	ND	7,72 ±0,03	2,46 ±0,02	<LOQ	ND	<LOQ	0,17 ±0,00	0,14 ±0,00	0,56 ±0,00
<b>Suco 22</b>	Isabel Precoce P1103 sem cobertura	1,42 ±0,00	107,25 ±0,12	10,42 ±0,01	9,03 ±0,02	85,72 ±0,15	32,21 ±0,44	0,34 ±0,00	ND	23,24 ±0,04	9,04 ±0,13	0,66 ±0,01	ND	0,88 ±0,00	0,46 ±0,00	0,21 ±0,00	1,53 ±0,00
<b>Suco 23</b>	Isabel Precoce P1103 com cobertura	0,81 ±0,00	22,22 ±0,09	17,49 ±0,04	7,64 ±0,01	7,53 ±0,00	3,64 ±0,02	ND	ND	9,14 ±0,10	2,64 ±0,04	<LOQ	ND	0,19 ±0,00	0,20 ±0,00	0,14 ±0,01	0,27 ±0,00
<b>Suco 24</b>	BRS-Violeta 043-43 com cobertura	95,55 ±0,53	1,16 ±0,00	124,21 ±1,38	62,76 ±0,05	6,05 ±0,01	<LOQ	ND	0,65 ±0,01	4,72 ±0,02	0,95 ±0,04	ND	ND	0,79 ±0,00	0,16 ±0,00	ND	1,14 ±0,00
<b>Suco 25</b>	BRS-Violeta P1103 com cobertura	86,89 ±0,16	0,76 ±0,00	77,34 ±0,45	57,25 ±0,02	7,87 ±0,01	0,47 ±0,00	ND	0,51 ±0,01	4,10 ±0,02	0,87 ±0,01	ND	ND	0,52 ±0,00	<LOQ	ND	1,38 ±0,00
<b>Suco 26</b>	BRS-Cora 043-43 com cobertura	18,20 ±0,02	0,44 ±0,00	2,25 ±0,01	1,09 ±0,00	1,06 ±0,00	0,57 ±0,00	ND	<LOQ	3,53 ±0,01	1,25 ±0,01	ND	ND	<LOQ	<LOQ	0,08 ±0,00	0,25 ±0,00
<b>Suco 27</b>	BRS-Cora P1103 com cobertura	11,54 ±0,01	9,29 ±0,02	17,10 ±0,02	16,24 ±0,01	1,78 ±0,00	0,79 ±0,00	ND	ND	4,55 ±0,01	1,40 ±0,02	ND	ND	0,45 ±0,00	0,17 ±0,00	0,20 ±0,00	<LOQ
<b>Suco 28</b>	Seleção 13 043-43 com cobertura	24,60 ±0,07	36,55 ±0,02	111,83 ±0,01	35,16 ±0,05	8,61 ±0,03	0,83 ±0,00	ND	ND	6,11 ±0,01	1,15 ±0,01	<LOQ	ND	ND	0,16 ±0,00	0,10 ±0,00	0,50 ±0,00
<b>Suco 29</b>	Seleção 13 P1103 sem cobertura	7,46 ±0,02	72,36 ±0,13	111,34 ±0,27	111,38 ±0,37	18,89 ±0,02	4,78 ±0,06	ND	ND	11,34 ±0,11	2,21 ±0,02	ND	ND	1,20 ±0,00	0,43 ±0,00	0,42 ±0,01	ND
<b>Suco 30</b>	Seleção 13 P1103 com cobertura	7,87 ±0,01	56,89 ±0,21	112,06 ±0,33	134,25 ±0,37	10,21 ±0,05	1,00 ±0,00	ND	ND	6,03 ±0,02	1,17 ±0,01	<LOQ	ND	<LOQ	0,14 ±0,00	0,07 ±0,00	<LOQ
<b>Suco 31</b>	BRS-Rúbea 043-43 com cobertura	0,91 ±0,00	3,86 ±0,01	25,24 ±0,08	19,52 ±0,02	2,03 ±0,01	0,75 ±0,01	<LOQ	0,50 ±0,00	6,41 ±0,03	1,79 ±0,01	<LOQ	ND	0,44 ±0,00	0,26 ±0,00	0,38 ±0,01	<LOQ
<b>Suco 32</b>	BRS-Rúbea P1103 sem cobertura	32,83 ±0,04	3,04 ±0,00	2,52 ±0,02	1,39 ±0,01	8,04 ±0,01	1,09 ±0,01	0,16 ±0,00	ND	6,80 ±0,01	2,72 ±0,03	<LOQ	ND	0,88 ±0,00	0,26 ±0,00	0,54 ±0,01	<LOQ
<b>Suco 33</b>	BRS-Rúbea P1103 com cobertura	44,22 ±0,17	1,35 ±0,00	15,95 ±0,03	2,03 ±0,01	1,97 ±0,00	0,76 ±0,00	ND	ND	5,60 ±0,01	1,72 ±0,02	<LOQ	ND	0,39 ±0,00	0,14 ±0,00	0,24 ±0,01	<LOQ
<b>Suco 34</b>	BRS-Carmem 043-43 sem cobertura	2,15 ±0,00	7,06 ±0,02	105,29 ±0,11	22,15 ±0,11	12,22 ±0,00	1,55 ±0,00	ND	ND	7,07 ±0,02	1,78 ±0,02	<LOQ	ND	0,41 ±0,00	<LOQ	0,11 ±0,00	<LOQ
<b>Suco 35</b>	BRS-Carmem 043-43 com cobertura	1,51 ±0,00	1,57 ±0,00	28,72 ±0,06	11,75 ±0,02	1,79 ±0,01	<LOQ	ND	ND	1,38 ±0,00	0,58 ±0,01	ND	ND	ND	ND	ND	0,31 ±0,00
<b>Suco 36</b>	BRS-Carmem P1103 sem cobertura	2,13 ±0,01	5,43 ±0,01	81,07 ±0,40	21,71 ±0,08	6,91 ±0,05	0,95 ±0,01	ND	ND	4,91 ±0,02	1,09 ±0,04	ND	ND	ND	ND	ND	0,47 ±0,00
<b>Suco 37</b>	BRS-Carmem P1103 com cobertura	1,70 ±0,01	4,12 ±0,01	89,71 ±0,17	29,86 ±0,12	1,90 ±0,00	<LOQ	ND	ND	1,57 ±0,01	<LOQ	ND	ND	ND	ND	ND	0,28 ±0,00

<LOQ: abaixo do limite de quantificação. ND: não detectado. Cada valor representa a média (n=3) ± o desvio padrão. Compostos: cianidina-

3,5-diglicosídeo (CY); malvidina-3-O-glicosídeo (OE); malvidina-3,5-diglicosídeo (MA); peonidina-3,5-diglicosídeo (PE); (+)-catequina (CAT); (-)-epicatequina (EPI); (-)-epicatequina galato (EG); (-)-epigallocatequina galato (EGG); procianidina B1 (PB1); procianidina B2 (PB2); taxifolina (T); quempferol (K); miricetina (M); quercetina (Q); rutina (RU); *trans*-resveratrol (R).

**Tabela 5.4 – Concentração de compostos fenólicos, em mg L<sup>-1</sup>, nas amostras de sucos de uvas cultivadas com adubação do solo.**

	Variedade	CY	OE	MA	PE	CAT	EPI	EG	EGG	PB1	PB2	T	K	M	Q	RU	R
<b>Suco 38</b>	Niágara Rosada adubação 1	4,36 ±0,00	0,09 ±0,00	ND	ND	11,08 ±0,01	5,29 ±0,02	ND	ND	11,43 ±0,03	3,12 ±0,03	ND	ND	ND	0,17 ±0,00	ND	ND
<b>Suco 39</b>	Niágara Rosada adubação 2	3,53 ±0,01	0,05 ±0,00	ND	ND	10,81 ±0,02	2,75 ±0,03	ND	ND	7,58 ±0,01	2,79 ±0,04	ND	ND	ND	0,12 ±0,00	ND	ND
<b>Suco 40</b>	Niágara Rosada adubação 3	4,06 ±0,01	0,06 ±0,00	ND	ND	12,11 ±0,09	6,41 ±0,02	ND	ND	10,74 ±0,10	3,15 ±0,02	ND	ND	ND	0,17 ±0,00	ND	ND
<b>Suco 41</b>	Niágara Rosada adubação 4	3,69 ±0,01	0,08 ±0,00	ND	ND	16,25 ±0,02	10,68 ±0,03	ND	ND	12,71 ±0,09	4,34 ±0,00	ND	ND	ND	0,34 ±0,00	ND	<LOQ
<b>Suco 42</b>	Niágara Rosada adubação 5	3,51 ±0,01	0,06 ±0,00	ND	ND	15,00 ±0,06	9,84 ±0,02	ND	ND	10,93 ±0,04	3,79 ±0,03	<LOQ	ND	ND	0,20 ±0,00	ND	<LOQ
<b>Suco 43</b>	Niágara Rosada adubação 6	3,58 ±0,00	0,06 ±0,00	ND	ND	9,52 ±0,01	5,17 ±0,03	ND	ND	7,16 ±0,01	2,26 ±0,02	ND	ND	ND	0,17 ±0,00	ND	<LOQ

<LOQ: abaixo do limite de quantificação. ND: não detectado. Cada valor representa a média (n=3) ± o desvio padrão. Compostos: cianidina-3,5-diglicosídeo (CY); malvidina-3-O-glicosídeo (OE); malvidina-3,5-diglicosídeo (MA); peonidina-3,5-diglicosídeo (PE); (+)-catequina (CAT); (-)-epicatequina (EPI); (-)-epicatequina galato (EG); (-)-epigallocatequina galato (EGG); procianidina B1 (PB1); procianidina B2 (PB2); taxifolina (T); quempferol (K); miricetina (M); quercetina (Q); rutina (RU); *trans*-resveratrol (R).

104

**Tabela 5.5 – Concentração de compostos fenólicos, em mg L<sup>-1</sup>, nas amostras de sucos de diferentes safras.**

	Variedade	CY	OE	MA	PE	CAT	EPI	EG	EGG	PB1	PB2	T	K	M	Q	RU	R
<b>Suco 44</b>	Bordô safra 2017	2,61 ±0,00	6,84 ±0,01	115,26 ±0,08	22,24 ±0,02	0,57 ±0,01	<LOQ	<LOQ	ND	2,62 ±0,01	0,62 ±0,01	ND	ND	2,03 ±0,00	0,26 ±0,00	0,20 ±0,00	ND
<b>Suco 45</b>	BRS-Magna safra 2017	10,89 ±0,00	0,29 ±0,00	52,69 ±0,03	7,84 ±0,04	1,53 ±0,01	0,47 ±0,01	ND	ND	3,94 ±0,01	2,41 ±0,03	ND	ND	1,82 ±0,01	0,46 ±0,01	ND	<LOQ
<b>Suco 46</b>	Bordô safra 2018	5,46 ±0,01	8,02 ±0,03	158,25 ±0,44	28,85 ±0,03	1,49 ±0,00	0,48 ±0,00	ND	<LOQ	4,16 ±0,01	1,88 ±0,02	ND	ND	1,82 ±0,00	0,31 ±0,00	0,24 ±0,00	<LOQ
<b>Suco 47</b>	BRS-Magna safra 2018	17,36 ±0,09	0,60 ±0,00	83,67 ±0,23	16,19 ±0,10	16,72 ±0,02	1,25 ±0,01	<LOQ	<LOQ	14,99 ±0,03	4,83 ±0,01	ND	ND	1,71 ±0,01	0,46 ±0,00	ND	0,49 ±0,00
<b>Suco 48</b>	Bordô safra 2019	3,71 ±0,02	14,87 ±0,04	215,90 ±0,51	43,28 ±0,18	19,74 ±0,02	13,93 ±0,02	0,28 ±0,00	ND	5,29 ±0,16	4,96 ±0,04	ND	ND	1,74 ±0,01	0,16 ±0,01	0,08 ±0,00	0,54 ±0,01
<b>Suco 49</b>	BRS-Magna safra 2019	21,51 ±0,12	1,07 ±0,00	112,63 ±0,81	22,45 ±0,05	76,04 ±0,90	14,57 ±0,05	ND	ND	16,04 ±0,02	5,21 ±0,06	ND	ND	1,65 ±0,02	0,25 ±0,00	ND	1,42 ±0,02

<LOQ: abaixo do limite de quantificação. ND: não detectado. Cada valor representa a média (n=3) ± o desvio padrão. Compostos: cianidina-3,5-diglicosídeo (CY); malvidina-3-O-glicosídeo (OE); malvidina-3,5-diglicosídeo (MA); peonidina-3,5-diglicosídeo (PE); (+)-catequina (CAT);

(-)-epicatequina (EPI); (-)-epicatequina galato (EG); (-)-epigallocatequina galato (EGG); procianidina B1 (PB1); procianidina B2 (PB2); taxifolina (T); quempferol (K); miricetina (M); quercetina (Q); rutina (RU); *trans*-resveratrol (R).

**Tabela 5.6** – Concentração de compostos fenólicos, em mg L<sup>-1</sup>, nas amostras de sucos comerciais.

Variedade		CY	OE	MA	PE	CAT	EPI	EG	EGG	PB1	PB2	T	K	M	Q	RU	R
<b>Suco 50</b>	Bordô UvaSó	0,70 ±0,00	0,46 ±0,00	28,65 ±0,03	3,97 ±0,01	ND	ND	ND	0,39 ±0,00	ND	ND	<LOQ	ND	1,93 ±0,01	1,03 ±0,00	0,46 ±0,00	1,01 ±0,00
<b>Suco 51</b>	Bordô Casa de Bento	7,16 ±0,02	18,92 ±0,02	124,86 ±0,53	21,93 ±0,01	13,65 ±0,02	5,42 ±0,01	ND	<LOQ	18,78 ±0,05	6,89 ±0,03	<LOQ	ND	0,92 ±0,01	0,76 ±0,01	ND	0,94 ±0,01
<b>Suco 52</b>	Bordô orgânico Casa de Bento	1,86 ±0,01	1,81 ±0,00	99,09 ±0,27	16,29 ±0,05	<LOQ	ND	ND	0,63 ±0,00	ND	ND	<LOQ	ND	2,79 ±0,02	1,01 ±0,00	ND	4,47 ±0,05
<b>Suco 53</b>	Assemblage Garibaldi	3,53 ±0,00	21,16 ±0,05	40,16 ±0,01	8,91 ±0,01	15,62 ±0,01	5,84 ±0,02	0,50±0,00	ND	16,73 ±0,08	6,943 ±0,03	<LOQ	<LOQ	1,95 ±0,00	2,48 ±0,00	1,10 ±0,00	0,97 ±0,00
<b>Suco 54</b>	Assemblage Casa Madeira	24,21 ±0,08	2,49 ±0,00	81,69 ±0,07	24,13 ±0,00	1,67 ±0,00	<LOQ	ND	<LOQ	3,69 ±0,02	1,35 ±0,01	ND	ND	3,91 ±0,00	1,06 ±0,01	0,09 ±0,01	0,50 ±0,00
<b>Suco 55</b>	Assemblage Salton	2,34 ±0,00	2,35 ±0,00	6,28 ±0,01	2,90 ±0,00	1,72 ±0,00	0,56 ±0,00	ND	ND	2,51 ±0,02	1,03 ±0,02	<LOQ	ND	0,46 ±0,00	0,54 ±0,00	0,71 ±0,01	1,64 ±0,00
<b>Suco 56</b>	Assemblage orgânico Mena Kaho	5,25 ±0,00	18,87 ±0,02	130,76 ±0,15	31,52 ±0,01	4,33 ±0,01	0,65 ±0,01	ND	0,58 ±0,01	7,53 ±0,04	2,06 ±0,01	<LOQ	ND	2,86 ±0,01	2,05 ±0,00	0,53 ±0,00	1,24 ±0,00

<LOQ: abaixo do limite de quantificação. ND: não detectado. Cada valor representa a média (n=3) ± o desvio padrão. Compostos: cianidina-3,5-diglicosídeo (CY); malvidina-3-O-glicosídeo (OE); malvidina-3,5-diglicosídeo (MA); peonidina-3,5-diglicosídeo (PE); (+)-catequina (CAT); (-)-epicatequina (EPI); (-)-epicatequina galato (EG); (-)-epigallocatequina galato (EGG); procianidina B1 (PB1); procianidina B2 (PB2); taxifolina (T); quempferol (K); miricetina (M); quercetina (Q); rutina (RU); *trans*-resveratrol (R).

O segundo suco com a maior quantidade de compostos foi aquele elaborado com a variedade Bordô (Suco 5). Este é rico, especialmente, em antocianinas com exceção da cianidina-3,5-diglicosídeo que foi encontrada em níveis mais baixos. Esta antocianina está presente em maior quantidade no Suco 3 (BRS-Violeta), conforme mencionado anteriormente e, em segundo lugar, no suco elaborado com a variedade BRS-Cora (Suco 1). Esta última variedade foi a que apresentou a menor quantidade total de compostos fenólicos dentre os sucos convencionais. Os sucos elaborados com as variedades Concord (Suco 6) e BRS-Rúbea (Suco 7) também apresentaram quantitativos menores de compostos fenólicos quando comparados aos demais do grupo. Enquanto que os sucos elaborados com as variedades BRS-Carmem (Suco 9) e BRS-Magna (Suco 4) possuem valores intermediários de compostos fenólicos.

### **5.3.2 Sucos elaborados com uvas cultivadas em sistema orgânico**

Seleção 13 foi a variedade que apresentou maior quantidade de compostos fenólicos dentre os sucos orgânicos e isso se deve especialmente ao fato desta possuir altos índices de antocianinas, principalmente malvidina-3,5-diglicosídeo e peonidina-3,5-diglicosídeo (Sucos 29 e 30). O Suco 28, menos rico em compostos fenólicos e o único dos três sucos dessa variedade que foi elaborado com uvas enxertadas no porta-enxerto 043-43, apresentou níveis mais elevados de cianidina-3,5-diglicosídeo e níveis mais baixos de malvidina-3-O-glicosídeo e peonidina-3,5-diglicosídeo do que os Sucos 29 e 30. Além disso, o Suco 28 foi o único dos três a apresentar quantitativo de resveratrol acima do LOQ.

As cultivares Bordô e BRS-Violeta também apresentaram altos teores de antocianinas, mais especificamente malvidina-3,5-diglicosídeo nos sucos elaborados com a variedade Bordô (Suco 10 ao Suco 13) e antocianinas diglicosiladas nos sucos elaborados com a variedade BRS-Violeta (Sucos 24 e 25). Os sucos elaborados com essas variedades também têm em comum a presença da epigallocatequina galato, flavanol pouco encontrado nas amostras estudadas. Além destas variedades, a epigallocatequina galato também foi encontrada no Suco 31 elaborado com a variedade BRS-Rúbea.

Em se tratando de compostos não antociânicos, estes foram encontrados em grande quantidade nos sucos elaborados com a variedade Isabel Precoce,



especialmente naquelas amostras elaboradas com uvas cultivadas em sistema sem cobertura (Sucos 20 e 22). Sendo que o maior destaque está nas quantidades de catequina e epicatequina encontradas no Suco 22. Além disso, o Suco 22 também foi o que apresentou o maior quantitativo de resveratrol dentre as amostras de sucos orgânicos e, assim como nos sucos convencionais, a taxifolina só foi encontrada acima do LOQ nessa variedade (Sucos 20 e 22).

Também em concordância com os resultados encontrados nas amostras de sucos convencionais, BRS-Cora foi a cultivar que apresentou níveis mais baixos de compostos fenólicos dentre os sucos orgânicos. Sendo que o suco elaborado com as uvas que foram enxertadas no porta-enxerto P1103 (Suco 27) apresentou mais do que o dobro da quantidade dos compostos fenólicos que o Suco 26 (porta-enxerto 043-43). Os sucos elaborados com as cultivares Concord (Suco 14 ao Suco 17) e BRS-Rúbea (Suco 31 ao Suco 33) também apresentaram níveis mais baixos de compostos fenólicos quando comparados às demais amostras do grupo. Os sucos elaborados com as variedades BRS-Carmem (Suco 34 ao Suco 37) e BRS-Magna (Suco 18 e Suco 19) possuem valores intermediários de compostos fenólicos e, no caso da BRS-Magna, assim como nos sucos convencionais, não foi detectado o estilbeno resveratrol.

O porta-enxerto P1103, em termos quantitativos, apresentou melhores resultados. Tanto a média do somatório das concentrações dos compostos antociânicos quanto a média do somatório das concentrações dos compostos não antociânicos é maior para o porta-enxerto P1103 do que para o porta-enxerto 043-43. Quanto à cobertura, o cultivo sem cobertura apresentou, em geral, médias mais elevadas, excetuando-se a média do somatório das concentrações de antocianinas das cultivares enxertadas no porta-enxerto 043-43. Essas informações são mostradas com mais detalhes na Tabela 5.7.

**Tabela 5.7** – Média do somatório das concentrações de compostos fenólicos (antocianinas e compostos não antociânicos), em mg L<sup>-1</sup>, nas amostras de sucos orgânicos.

	<b>043-43 sem cobertura</b>	<b>043-43 com cobertura</b>	<b>P1103 sem cobertura</b>	<b>P1103 com cobertura</b>
Média Σ antocianinas	95,11	110,32	150,35	137,50
Média Σ não antociânicos	43,85	15,06	46,18	18,01
<b>Média Σ total</b>	<b>138,96</b>	<b>125,38</b>	<b>196,53</b>	<b>155,51</b>

### **5.3.3 Sucos elaborados com uvas cultivadas sob diferentes níveis de adubação de solo**

Os sucos elaborados com a variedade Niágara Rosada são muito pobres em antocianinas. De fato, das antocianinas pesquisadas, só foram encontradas duas: a cianidina-3,5-diglicosídeo e muito pouco da malvidina-3-O-glicosídeo. Dentre as antocianinas, a cianidina-3,5-diglicosídeo é a que possui coloração rosada no pH do suco (ANANGA *et al.*, 2013), o que é evidenciado pela coloração natural das uvas dessa variedade.

Quanto aos compostos não antociânicos, somente foram encontrados os flavanóis catequina, epicatequina e as procianidinas B1 e B2; e o flavonol quercetina. Nenhum outro composto foi encontrado acima do LOQ. O Suco 41, com nível intermediário de adubação do solo, foi o que apresentou a maior quantidade de compostos fenólicos do grupo. Nos três sucos com níveis mais altos de adubação do solo (Sucos 41, 42 e 43), foi detectado o estilbeno resveratrol apesar de que com níveis abaixo do LOQ.

### **5.3.4 Sucos elaborados com uvas de diferentes safras**

Os sucos estudados neste experimento foram analisados juntos, na mesma data. Isso significa que os sucos da safra de 2017 tinham um pouco mais de três anos no momento da análise, enquanto que os sucos de 2018 tinham dois anos e os de 2019 eram os mais novos. Os sucos da safra de 2017 possuem menos compostos fenólicos do que aqueles da safra de 2018 e estes possuem menor quantidade do que os da safra de 2019. Essa característica é observada em todos os compostos estudados exceto na miricetina que apresentou maiores quantidades nas amostras mais antigas. No caso da miricetina, uma possível explicação pode ser que os compostos envolvidos na síntese desta, como o quempferol, a quercetina e a taxifolina, possam gerar mais miricetina com o passar do tempo (ver Figura 3.8). Esses fenômenos podem ser um indicativo da estabilidade dos compostos fenólicos no suco de uva ao longo do tempo. No entanto, é difícil fazer qualquer afirmação nesse sentido e estudos específicos de estabilidade precisam ser realizados.

Com relação às variedades estudadas neste experimento, fica evidente o que já foi evidenciado nos experimentos anteriores. Os sucos elaborados com a variedade Bordô são ricos em antocianinas, especialmente malvidina-3,5-diglicosídeo. Já a BRS-Magna é mais rica em compostos não antociânicos, especialmente flavanóis. O resveratrol foi encontrado acima do LOQ nas duas variedades somente na safra de 2019.

### **5.3.5 Sucos comerciais**

As amostras comerciais analisadas são bastante variadas. Os poucos sucos varietais disponíveis no comércio são todos da variedade Bordô. Já os assemblage são de composição desconhecida, podendo ser compostos das variedades mais diversas, inclusive da espécie *Vitis vinifera*. Isso pode ser observado no Suco 53 que foi o único de todos os sucos analisados (não apenas dentre os sucos comerciais) em que foi detectada a presença do composto quempferol, provavelmente indicando uma variedade vinífera em sua composição.

A amostra que apresentou maior quantidade total dos compostos fenólicos analisados foi o Suco 51 elaborado com uvas da cultivar Bordô. Ele é rico em antocianinas, especialmente malvidina-3,5-diglicosídeo. Com relação às antocianinas, foi encontrada maior quantidade total destas (somatório das 4 antocianinas analisadas) no Suco 56, assemblage elaborado com uvas orgânicas. O outro suco orgânico do grupo (Suco 52), elaborado com uvas da variedade Bordô, possui a maior concentração de resveratrol, não apenas dentre os sucos comerciais, mas de todas as amostras de suco analisadas.

Dos compostos fenólicos não antociânicos, o Suco 53 (varietal Bordô orgânico) foi o que apresentou a maior quantidade destes, seguido do Suco 51 (varietal Bordô), rico especialmente em flavanóis. Por outro lado, os Sucos 50 (varietal Bordô) e 55 (assemblage) são pobres em praticamente todos os compostos. Isso se deve, muito provavelmente, ao sistema produtivo utilizado em sua elaboração, especialmente com relação à etapa crítica de aquecimento (ver item 3.2.4) em que, dependendo do sistema utilizado, pode haver diluição e/ou baixa extração de suco, e, por consequência, de compostos fenólicos. De acordo com informações passadas pelos fabricantes, o Suco 50 (UvaSó) foi elaborado utilizando-se a panela extratora por

arraste de vapor na etapa de aquecimento. Já o Suco 55 (Salton) foi elaborado em um sistema chamado Flash Détente, em que o aquecimento se dá em um sistema tubular acoplado a uma câmara de vácuo onde se dá o resfriamento acelerado das bagas (GUERRA *et al.*, 2016; THERON, 2018).

### **5.3.6 Avaliação geral da composição fenólica dos sucos**

Objetivando-se uma avaliação geral dos resultados encontrados na caracterização fenólica das amostras de suco de uva analisadas, os resultados quantitativos de todos os sucos são apresentados de forma conjunta na Figura 5.1 utilizando como ferramenta de visualização um mapa de calor. O mapa de calor é uma representação gráfica baseada em uma escala de cores que varia, neste caso, conforme as quantidades de compostos fenólicos encontradas.

O suco que apresentou a maior quantidade total de compostos fenólicos das 56 amostras analisadas foi elaborado com uvas de cultivo convencional da variedade BRS-Violeta (Suco 3). Isso se deve especialmente à alta concentração de malvidina-3,5-diglicosídeo que está em níveis bem superiores aos demais sucos. Além da malvidina-3,5-diglicosídeo, o Suco 3 também possui a quantidade mais elevada de peonidina-3,5-diglicosídeo, mas nesse caso a diferença para as demais amostras não é tão elevada. O segundo suco com a maior quantidade de compostos fenólicos foi aquele elaborado com uvas orgânicas da variedade teste Seleção 13 (Suco 29). Essa cultivar mostrou-se rica em antocianinas, apresentando níveis mais altos que todas as outras amostras, exceto o Suco 3.

Com relação ao somatório de compostos não antociânicos nos Sucos 3 e 29, a quantidade encontrada no Suco 3 é mais do que o dobro da quantidade encontrada no Suco 29. No entanto, o Suco 3 não possui os maiores níveis de compostos não antociânicos das 56 amostras analisadas, muito pelo contrário, este possui um valor intermediário desses compostos quando comparado aos outros sucos. O suco mais rico em compostos não antociânicos foi elaborado com uvas orgânicas da variedade Isabel Precoce (Suco 22) e apresentou valores elevados de catequina, epicatequina, procianidina B1 e procianidina B2.

	Variedade	CY	OE	MA	PE	CAT	EPI	EG	EGG	PB1	PB2	T	K	M	Q	RU	R	Σantocian.	Σnão antocian	TOTAL
Suco1	BRS-Cora	30,31	0,11	0,50	0,73	1,31	1,06	ND	ND	2,88	1,49	ND	ND	0,59	0,15	0,25	<LOQ	31,65	7,73	39,38
Suco2	Isabel	2,17	35,59	8,04	4,11	5,40	2,51	<LOQ	ND	4,02	2,05	<LOQ	ND	<LOQ	0,28	0,42	0,44	49,91	15,11	65,01
Suco3	BRS-Violeta	86,06	3,19	328,59	146,43	74,64	1,77	ND	ND	7,32	2,03	ND	ND	2,76	0,26	ND	<LOQ	564,26	88,78	653,05
Suco4	BRS-Magna	19,40	1,12	89,31	24,81	14,89	0,66	ND	ND	3,81	1,73	ND	ND	1,76	0,20	ND	ND	134,63	22,25	156,88
Suco5	Bordó	2,79	18,91	165,86	33,87	6,92	1,87	<LOQ	ND	4,82	2,94	ND	ND	1,93	0,22	0,21	<LOQ	221,43	18,72	240,15
Suco6	Concord	13,81	4,33	6,17	8,84	7,00	3,38	<LOQ	ND	6,64	3,59	ND	ND	<LOQ	0,20	0,16	ND	33,15	20,97	54,13
Suco7	BRS-Rúbea	25,00	0,26	4,27	0,88	11,61	2,19	<LOQ	ND	5,10	3,65	<LOQ	ND	0,73	0,29	0,45	<LOQ	30,41	24,02	54,43
Suco8	Isabel Precoce	<LOQ	54,39	9,65	6,68	5,40	2,04	ND	ND	3,07	1,52	0,81	ND	ND	<LOQ	<LOQ	0,50	70,72	13,36	84,08
Suco9	BRS-Carmem	3,03	8,86	80,71	24,47	15,32	3,93	ND	ND	6,06	2,10	ND	ND	0,56	<LOQ	<LOQ	<LOQ	117,07	27,97	145,03
Suco10	Bordó 043-43 sem cobertura	4,89	13,49	90,71	18,67	19,45	9,76	0,31	ND	17,44	6,10	<LOQ	ND	1,44	0,28	0,32	0,25	127,74	55,34	183,08
Suco11	Bordó 043-43 com cobertura	0,81	1,56	134,83	4,23	1,69	0,79	ND	<LOQ	2,47	1,56	ND	ND	0,45	0,20	0,16	<LOQ	141,43	7,32	148,76
Suco12	Bordó P1103 sem cobertura	5,60	26,91	198,39	42,65	4,24	0,65	ND	ND	4,27	1,31	<LOQ	ND	1,68	<LOQ	0,16	ND	273,55	12,31	285,86
Suco13	Bordó P1103 com cobertura	2,51	6,31	168,95	16,39	10,75	1,74	0,30	0,68	17,32	4,95	<LOQ	ND	1,00	0,23	0,35	0,36	194,16	37,68	231,84
Suco14	Concord 043-43 sem cobertura	9,43	6,99	6,01	6,70	11,19	2,18	<LOQ	ND	14,88	3,79	<LOQ	ND	1,52	0,42	0,18	<LOQ	29,13	34,16	63,29
Suco15	Concord 043-43 com cobertura	12,65	2,18	28,40	12,22	9,09	1,80	0,17	ND	17,68	3,72	<LOQ	ND	0,30	0,25	0,17	<LOQ	55,44	33,17	88,61
Suco16	Concord P1103 sem cobertura	12,30	9,87	14,91	10,64	10,70	4,99	0,19	ND	13,85	4,65	<LOQ	ND	1,69	0,26	0,09	<LOQ	47,72	36,42	84,14
Suco17	Concord P1103 com cobertura	10,96	5,14	23,60	8,91	10,10	2,00	0,28	ND	14,25	3,95	<LOQ	ND	0,44	0,20	0,09	<LOQ	48,62	31,33	79,94
Suco18	BRS-Magna 043-43 com cobertura	19,52	0,60	106,12	17,10	7,07	0,56	ND	ND	3,48	1,32	ND	ND	0,43	0,20	ND	ND	143,34	13,06	156,41
Suco19	BRS-Magna P1103 com cobertura	26,32	0,66	117,24	25,93	6,03	0,55	ND	ND	2,73	1,20	ND	ND	0,38	0,16	ND	ND	170,15	11,06	181,21
Suco20	Isabel Precoce 043-43 sem cobertura	1,30	70,84	7,64	7,13	26,41	10,99	0,22	ND	16,73	6,12	0,54	ND	0,44	0,32	0,23	0,78	86,91	62,78	149,69
Suco21	Isabel Precoce 043-43 com cobertura	0,94	22,46	13,45	8,92	11,11	4,60	<LOQ	ND	7,72	2,46	<LOQ	ND	<LOQ	0,17	0,14	0,56	45,77	26,76	72,52
Suco22	Isabel Precoce P1103 sem cobertura	1,42	107,25	10,42	9,03	85,72	32,21	0,34	ND	23,24	9,04	0,66	ND	0,88	0,46	0,21	1,53	128,13	154,28	282,41
Suco23	Isabel Precoce P1103 com cobertura	0,81	22,22	17,49	7,64	7,53	3,64	ND	ND	9,14	2,64	<LOQ	ND	0,19	0,20	0,14	0,27	48,16	23,76	71,92
Suco24	BRS-Violeta 043-43 com cobertura	95,55	1,16	124,21	62,76	6,05	<LOQ	ND	0,65	4,72	0,95	ND	ND	0,79	0,16	ND	1,14	283,68	14,45	298,13
Suco25	BRS-Violeta P1103 com cobertura	86,89	0,76	77,34	57,25	7,87	0,47	ND	0,51	4,10	0,87	ND	ND	0,52	<LOQ	ND	1,38	222,24	15,74	237,98
Suco26	BRS-Cora 043-43 com cobertura	18,20	0,44	2,25	1,09	1,06	0,57	ND	<LOQ	3,53	1,25	ND	ND	<LOQ	<LOQ	0,08	0,25	21,97	6,74	28,71
Suco27	BRS-Cora P1103 com cobertura	11,54	9,29	17,10	16,24	1,78	0,79	ND	ND	4,55	1,40	ND	ND	0,45	0,17	0,20	<LOQ	54,16	9,34	63,51
Suco28	Seleção 13 043-43 com cobertura	24,60	36,55	111,83	35,16	8,61	0,83	ND	ND	6,11	1,15	<LOQ	ND	ND	0,16	0,10	0,50	208,13	17,46	225,60
Suco29	Seleção 13 P1103 sem cobertura	7,46	72,36	111,34	111,38	18,89	4,78	ND	ND	11,34	2,21	ND	ND	1,20	0,43	0,42	ND	302,55	39,27	341,81
Suco30	Seleção 13 P1103 com cobertura	7,87	56,89	112,06	134,25	10,21	1,00	ND	ND	6,03	1,17	<LOQ	ND	<LOQ	0,14	0,07	<LOQ	311,07	18,62	329,70
Suco31	BRS-Rúbea 043-43 com cobertura	0,91	3,86	25,24	19,52	2,03	0,75	<LOQ	0,50	6,41	1,79	<LOQ	ND	0,44	0,26	0,38	<LOQ	49,53	12,55	62,09
Suco32	BRS-Rúbea P1103 sem cobertura	32,83	3,04	2,52	1,39	8,04	1,09	0,16	ND	6,80	2,72	<LOQ	ND	0,88	0,26	0,54	<LOQ	39,78	20,49	60,28
Suco33	BRS-Rúbea P1103 com cobertura	44,22	1,35	15,95	2,03	1,97	0,76	ND	ND	5,60	1,72	<LOQ	ND	0,39	0,14	0,24	<LOQ	63,55	10,82	74,36
Suco34	BRS-Carmem 043-43 sem cobertura	2,15	7,06	105,29	22,15	12,22	1,55	ND	ND	7,07	1,78	<LOQ	ND	0,41	<LOQ	0,11	<LOQ	136,65	23,13	159,78
Suco35	BRS-Carmem 043-43 com cobertura	1,51	1,57	28,72	11,75	1,79	<LOQ	ND	ND	1,38	0,58	ND	ND	ND	ND	0,31	0,31	43,55	4,07	47,62
Suco36	BRS-Carmem P1103 sem cobertura	2,13	5,43	81,07	21,71	6,91	0,95	ND	ND	4,91	1,09	ND	ND	ND	ND	0,47	0,47	110,34	14,34	124,68
Suco37	BRS-Carmem P1103 com cobertura	1,70	4,12	89,71	29,86	1,90	<LOQ	ND	ND	1,57	<LOQ	ND	ND	ND	ND	0,28	0,28	125,39	3,75	129,14
Suco38	Niágara Rosada adubação 1	4,36	0,09	ND	ND	11,08	5,29	ND	ND	11,43	3,12	ND	ND	ND	0,17	ND	ND	4,45	31,09	35,54
Suco39	Niágara Rosada adubação 2	3,53	0,05	ND	ND	10,81	2,75	ND	ND	7,58	2,79	ND	ND	ND	0,12	ND	ND	3,58	24,05	27,63
Suco40	Niágara Rosada adubação 3	4,06	0,06	ND	ND	12,11	6,41	ND	ND	10,74	3,15	ND	ND	ND	0,17	ND	ND	4,12	32,58	36,70
Suco41	Niágara Rosada adubação 4	3,69	0,08	ND	ND	16,25	10,68	ND	ND	12,71	4,34	ND	ND	ND	0,34	ND	<LOQ	3,77	44,32	48,10
Suco42	Niágara Rosada adubação 5	3,51	0,06	ND	ND	15,00	9,84	ND	ND	10,93	3,79	<LOQ	ND	ND	0,20	ND	<LOQ	3,57	39,76	43,33
Suco43	Niágara Rosada adubação 6	3,58	0,06	ND	ND	9,52	5,17	ND	ND	7,16	2,26	ND	ND	ND	0,17	ND	<LOQ	3,64	24,28	27,91
Suco44	Bordó safra 2017	2,61	6,84	115,26	22,24	0,57	<LOQ	<LOQ	ND	2,62	0,62	ND	ND	2,03	0,26	0,20	ND	146,94	6,30	153,24
Suco45	BRS-Magna safra 2017	10,89	0,29	52,69	7,84	1,53	0,47	ND	ND	3,94	2,41	ND	ND	1,82	0,46	ND	<LOQ	71,71	10,64	82,34
Suco46	Bordó safra 2018	5,46	8,02	158,25	28,85	1,49	0,48	ND	<LOQ	4,16	1,88	ND	ND	1,82	0,31	0,24	<LOQ	200,59	10,39	210,98
Suco47	BRS-Magna safra 2018	17,36	0,60	83,67	16,19	16,72	1,25	<LOQ	<LOQ	14,99	4,83	ND	ND	1,71	0,46	ND	0,49	117,83	40,45	158,27
Suco48	Bordó safra 2019	3,71	14,87	215,90	43,28	19,74	13,93	0,28	ND	5,29	4,96	ND	ND	1,74	0,16	0,08	0,54	277,75	46,72	324,47
Suco49	BRS-Magna safra 2019	21,51	1,07	112,63	22,45	76,04	14,57	ND	ND	16,04	5,21	ND	ND	1,65	0,25	ND	1,42	157,65	115,17	272,82
Suco50	Bordó UvaSó	0,70	0,46	28,65	3,97	ND	ND	ND	0,39	ND	ND	<LOQ	ND	1,93	1,03	0,46	1,01	33,78	4,83	38,61
Suco51	Bordó Casa de Bento	7,16	18,92	124,86	21,93	13,65	5,42	ND	<LOQ	18,78	6,89	<LOQ	ND	0,92	0,76	ND	0,94	172,87	47,36	220,23
Suco52	Bordó orgânico Casa de Bento	1,86	1,81	99,09	16,29	<LOQ	ND	ND	0,63	ND	ND	<LOQ	ND	2,79	1,01	ND	4,47	119,06	8,90	127,96
Suco53	Assemblage Garibaldi	3,53	21,16	40,16	8,91	15,62	5,84	0,50	ND	16,73	6,94	<LOQ	<LOQ	1,95	2,48	1,10	0,97	73,76	52,13	125,89
Suco54	Assemblage Casa Madeira	24,21	2,49	81,69	24,13	1,67	<LOQ	ND	<LOQ	3,69	1,35	ND	ND	3,91	1,06	0,09	0,50	132,53	12,28	144,80
Suco55	Assemblage Salton	2,34	2,35	6,28	2,90	1,72	0,56	ND	ND	2,51	1,03	<LOQ	ND	0,46	0,54	0,71	1,64	13,86	9,18	23,05
Suco56	Assemblage orgânico Mena Kaho	5,25	18,87	130,76	31,52	4,33	0,65	ND	0,58	7,53	2,06	<LOQ	ND	2,86	2,05	0,53	1,24	186,40	21,85	208,25

ND 653,05 mg L<sup>-1</sup>

Figura 5.1 – Mapa de calor da concentração de compostos fenólicos, em mg L<sup>-1</sup>, nas amostras de suco de uva analisadas.

<LOQ: abaixo do limite de quantificação. ND: não detectado. Cada valor representa a média (n=3). Compostos: cianidina-3,5-diglicosídeo (CY); malvidina-3-O-glicosídeo (OE); malvidina-3,5-diglicosídeo (MA); peonidina-3,5-diglicosídeo (PE); (+)-catequina (CAT); (-)-epicatequina (EPI); (-)-epicatequina galato (EG); (-)epigallocatequina galato (EGG); procianidina B1 (PB1); procianidina B2 (PB2); taxifolina (T); quempferol (K); miricetina (M); quercetina (Q); rutina (RU); *trans*-resveratrol (R). Sucos convencionais de 1 a 9, sucos orgânicos de 10 a 37, sucos de uvas cultivadas com adubação do solo de 38 a 43, sucos de diferentes safras de 44 a 49 e sucos comerciais de 50 a 56.

A comparação entre sucos convencionais e orgânicos de mesma variedade, mostra que as amostras orgânicas apresentaram sucos com valores maiores de compostos fenólicos para as variedades BRS-Cora, BRS-Magna, Bordô, Concord, BRS-Rúbea, Isabel Precoce e BRS-Carmem. A exceção foi a variedade BRS-Violeta que apresentou resultados mais elevados de compostos fenólicos no suco convencional. As variedades Isabel e Seleção 13 não puderam ser comparadas, pois não foram cultivadas nas duas condições (sistemas convencional e orgânico).

Tanto no grupo de sucos convencionais como nos sucos orgânicos, pode-se observar cores mais frias no mapa de calor, indicando menor quantidade de compostos fenólicos, na variedade BRS-Cora (Sucos 1 e 26). Além da BRS-Cora a cultivar Niágara Rosada, estudada no experimento de adubação, também apresenta tons mais frios no mapa de calor e está entre as menos ricas em compostos fenólicos conforme já discutido no item 5.3.3. Das 56 amostras de suco estudadas, a que possui a menor quantidade total de compostos fenólicos é o Suco 55 (Assemblage – Salton) que, apesar de não apresentar tantos compostos não detectados ou abaixo do limite de quantificação, apresentou níveis baixos para praticamente todos os compostos.

Avaliando os compostos fenólicos individualmente no mapa de calor, é possível observar que a malvidina-3,5-diglicosídeo é o composto que possui cores mais quentes indicando valores mais elevados de compostos fenólicos nas amostras de suco. A peonidina-3,5-diglicosídeo é o segundo composto fenólico mais presente nas amostras analisadas. Dentre os compostos não antociânicos, destaca-se a catequina seguida pela procianidina B1. Quempferol foi encontrado em apenas uma amostra conforme já discutido no item 5.3.5 e, além deste, taxifolina, epicatequina galato e epigalocatequina galato foram os compostos fenólicos encontrados em menores quantidades.

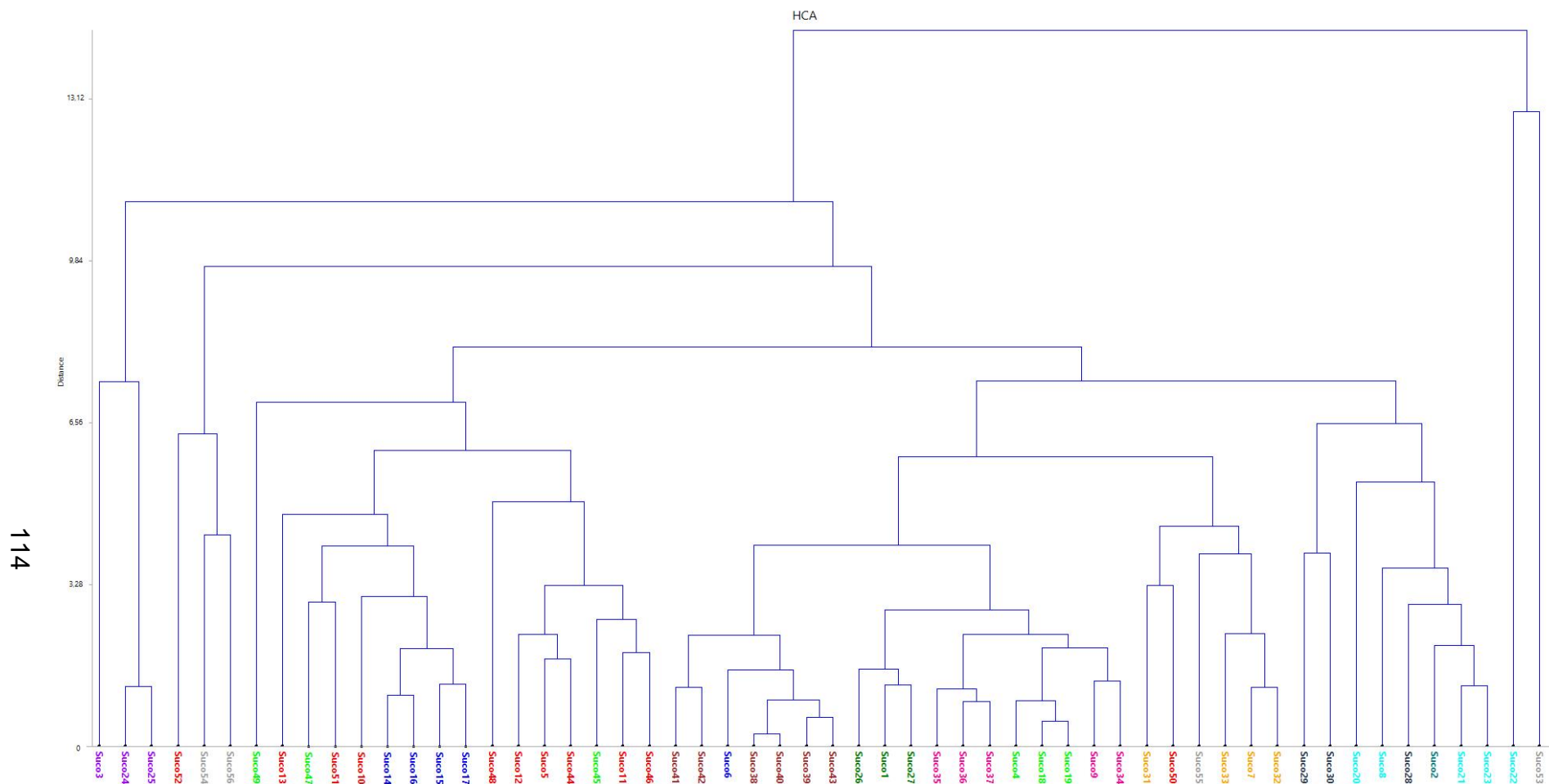
Com relação ao sistema produtivo, ao se comparar os sucos comerciais (elaborados em sistemas diversos) com aqueles produzidos no suquificador integral, é possível observar que este último, em termos de compostos fenólicos, gera sucos de qualidade comparável aos sucos produzidos por outros sistemas de elaboração.

### 5.3.7 Análise multivariada

A análise multivariada foi conduzida através das concentrações encontradas para os 16 compostos fenólicos avaliados nas 56 amostras de suco de uva. Os sucos foram diferenciados por cores de acordo com as variedades das uvas utilizadas em sua elaboração. Foram realizadas análises por HCA e PCA e os resultados encontrados são apresentados nas Figuras 5.2, 5.3 e 5.4.

A análise do dendograma (Figura 5.2) evidencia uma tendência de agrupamentos por variedades. No entanto, duas amostras, o Suco 22 (Isabel Precoce orgânico) e o Suco 53 (comercial Assemblage Garibaldi), se mostraram distintas e, por isso, encontram-se completamente separadas das demais. Estas, apesar de estarem no mesmo cluster, não possuem muita semelhança já que a distância euclidiana entre elas é elevada. A separação destas amostras das demais também fica evidente nos gráficos de PCA (Figuras 5.3 e 5.4). Avaliando os pesos dos compostos fenólicos para esses sucos (Figura 5.4), é possível observar que o Suco 22 é diferenciado dos demais especialmente por causa do seu conteúdo de epicatequina e de procianidinas B1 e B2. De fato, esse foi o suco que apresentou as maiores quantidades desses compostos. Já o perfil do Suco 53 é grandemente influenciado pelos compostos epicatequina galato e rutina, presentes em maior quantidade nessa amostra, mas principalmente pelo quempferol, composto que, conforme mencionado anteriormente, só foi encontrado neste suco.

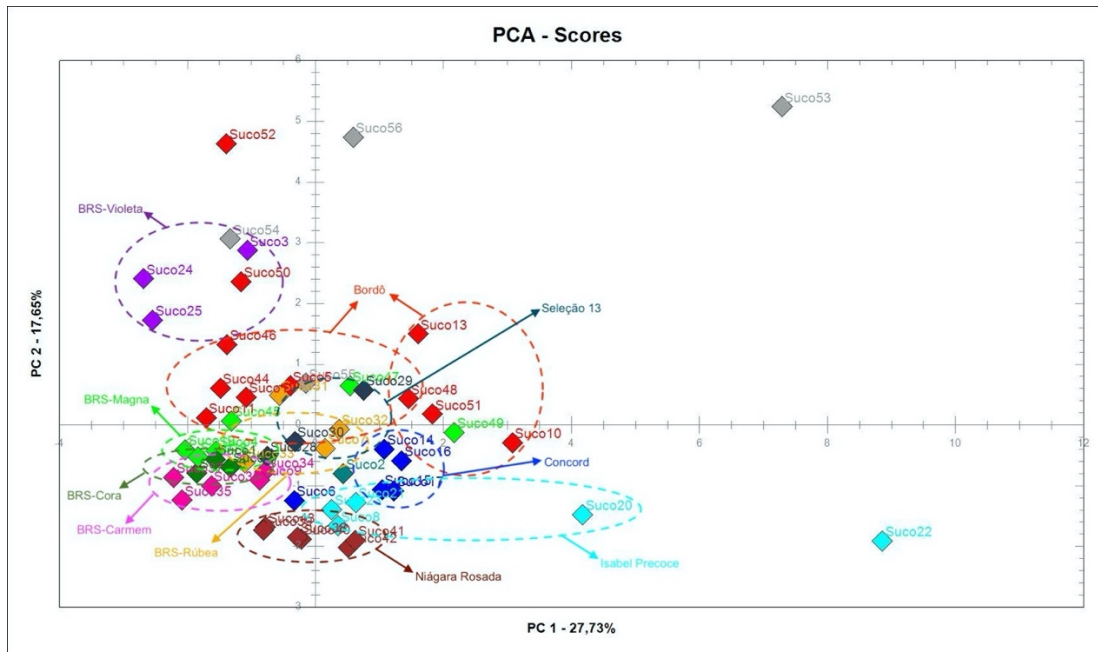
O dendograma mostra dois outros grupos de clusters também separados dos demais, mas cuja distância euclidiana não é tão expressiva. No primeiro desses dois clusters foram agrupados os sucos elaborados com a variedade BRS-Violeta (Sucos 3, 24 e 25), destacada por seu alto conteúdo de antocianinas. O segundo cluster agrupou 3 amostras de sucos comerciais (Sucos 52, 54 e 56), duas das quais foram elaboradas com uvas orgânicas. Malvidina-3,5-diglicosídeo, peonidina-3,5-diglicosídeo, epigallocatequina galato e miricetina são os compostos com maior influência sobre esses sucos.



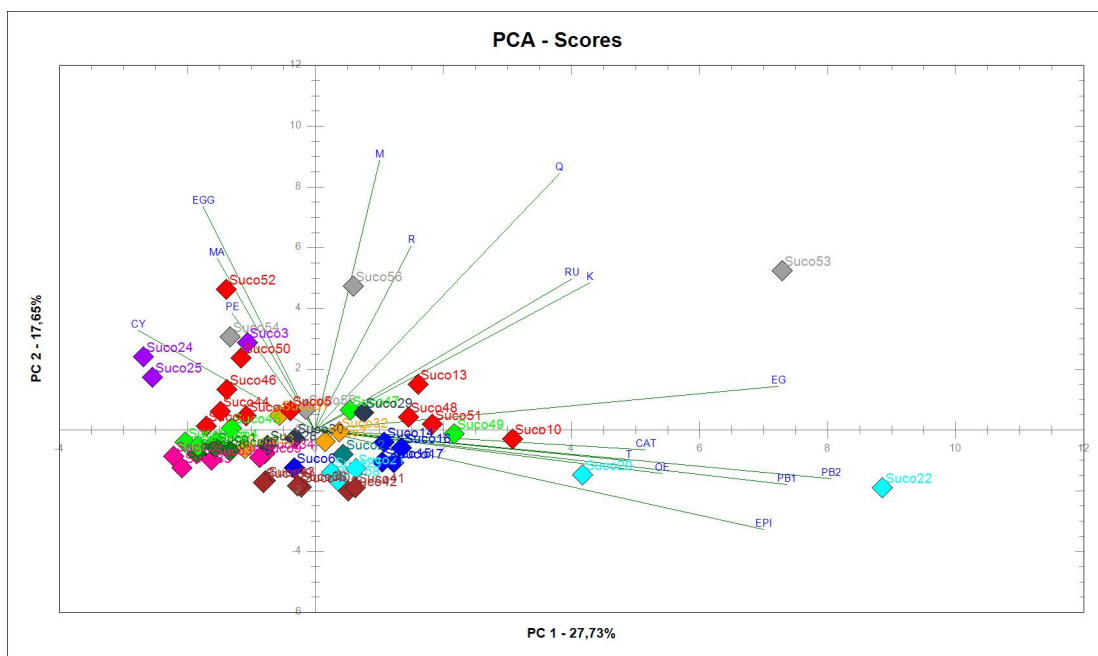
114

**Figura 5.2** – Dendrograma das amostras de suco de uva estudadas. A descrição das amostras pode ser obtida na Figura 5.1. BRS-Cora (verde musgo), Isabel (verde), BRS-Violeta (roxo), BRS-Magna (verde claro), Bordô (vermelho), Concord (azul), BRS-Rúbea (laranja), Isabel Precoce (azul claro), BRS-Carmem (rosa), Seleção 13 (cinza escuro), Niágara Rosada (marrom) e Assemblage (cinza claro).





**Figura 5.3** – Gráfico de escores de PC1 versus PC2 para os dados autoescalados com destaque circular para os agrupamentos das amostras analisadas. A descrição das amostras pode ser obtida na Figura 5.1. BRS-Cora (verde musgo), Isabel (verde), BRS-Violeta (roxo), BRS-Magna (verde claro), Bordô (vermelho), Concord (azul), BRS-Rúbea (laranja), Isabel Precoce (azul claro), BRS-Carmem (rosa), Seleção 13 (cinza escuro), Niágara Rosada (marrom) e Assemblage (cinza claro).



**Figura 5.4** – Gráfico biplot de escores e de pesos de PC1 versus PC2 das amostras avaliadas. A descrição das amostras e dos compostos fenólicos pode ser obtida na Figura 5.1. BRS-Cora (verde musgo), Isabel (verde), BRS-Violeta (roxo), BRS-Magna (verde claro), Bordô (vermelho), Concord (azul), BRS-Rúbea (laranja), Isabel Precoce (azul claro), BRS-Carmem (rosa), Seleção 13 (cinza escuro), Niágara Rosada (marrom) e Assemblage (cinza claro).

As demais amostras foram agrupadas em dois grandes clusters. O menor deles é composto basicamente por 3 variedades: BRS-Magna, Bordô e Concord. Os sucos elaborados com uvas orgânicas da variedade Concord são muito semelhantes (distância euclidiana pequena) e estão todos no mesmo agrupamento, com exceção do Suco 6 (Concord convencional), menos rico em compostos fenólicos, especialmente procianidina B1, o que o diferencia dos demais dessa variedade. Com relação aos sucos elaborados com a variedade Bordô, é possível observar grande semelhança entre os Sucos 5 (convencional – uvas cultivadas na Embrapa), 44 (safra 2017 – uvas cultivadas em Muçum) e 12 (orgânico P1103 sem cobertura – uvas cultivadas na Embrapa) e entre os Sucos 11 (orgânico 043-43 com cobertura - Embrapa) e 46 (safra 2018 - Muçum). Isso pode ser visualizado também no gráfico de PCA destacado (Figura 5.3).

Os sucos elaborados com a cultivar BRS-Magna: Suco 45 (safra 2017 – uvas cultivadas em Muçum), 47 (safra 2018 – uvas cultivadas em Muçum) e 49 (safra 2019 – uvas cultivadas em Muçum), apesar de estarem dentro do mesmo grande cluster, não são muito semelhantes entre si. Essa diferença é, possivelmente, explicada pela safra. Já no outro grande cluster estão os Sucos 4 (convencional – uvas cultivadas na Embrapa), 18 (orgânico 043-43 com cobertura – uvas cultivadas na Embrapa) e 19 (orgânico P1103 com cobertura – uvas cultivadas na Embrapa) que apresentam bastante similaridade entre si especialmente com relação aos dois sucos orgânicos (Sucos 18 e 19).

As amostras com maior similaridade dentre as 56 amostras estudadas na análise multivariada foram os Sucos 38 e 40 (menor distância euclidiana), elaborados com a cultivar Niágara Rosada. No caso dessa cultivar, a epicatequina parece ser o parâmetro de maior peso influenciando esse agrupamento (Figura 5.4). Além da Niágara Rosada, também se observou uma tendência de agrupamento das amostras de suco elaboradas com as variedades BRS-Cora, BRS-Carmem e BRS-Rúbea.

Por fim, influenciados especialmente pelo peso dos compostos malvidina-3-O-glicosídeo, catequina e taxifolina foram agrupados no mesmo cluster os sucos das variedades Isabel, Isabel Precoce e Seleção 13. No caso da Isabel Precoce, os Sucos 21 e 23 (com cobertura) são os mais próximos demonstrando que, para esta variedade, o tipo de cobertura do cultivo orgânico tem grande influência sobre o perfil fenólico dos sucos. Já no caso da cultivar teste Seleção 13, a cobertura não parece

influenciar tanto no perfil fenólico quanto o tipo de porta-enxerto, já que os Sucos 29 e 30 (porta enxerto P1103) são mais semelhantes entre si do que com o Suco 28 (porta enxerto 043-43).

#### **5.4 Conclusões**

A partir da avaliação dos resultados analíticos e quimiométricos, foi possível verificar que as amostras de suco de uva produzidas no Rio Grande do Sul e analisadas neste estudo tem composição fenólica variável e grandemente influenciada pelas cultivares de uvas utilizadas na elaboração de cada suco. As antocianinas são os compostos fenólicos mais presentes nos sucos produzidos no estado. A variedade tradicional Bordô e as variedades desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Uva e Vinho BRS-Violeta e Seleção 13 são as mais ricas em compostos fenólicos, especialmente antocianinas. Das antocianinas a que aparece em maior quantidade nas amostras analisadas é a malvidina-3,5-diglicosídeo, já em menor quantidade está a malvidina-3-O-glicosídeo.

Dentre os compostos não antocianínicos, os sucos elaborados no Rio Grande do Sul são ricos em catequina e procianidina B1 sendo que a variedade Isabel Precoce é a mais ricas nesses compostos. Quempferol, taxifolina, epicatequina galato e epigallocatequina galato foram os compostos menos presentes nas amostras avaliadas. Os sucos elaborados com as variedades BRS-Cora e Niágara Rosada foram as que apresentaram menor quantidade de compostos fenólicos. Dentre os sucos comerciais, os sucos varietais (Bordô) se mostraram mais ricos em compostos fenólicos do que os sucos assemblage. O resveratrol, que não foi encontrado em algumas amostras, está presente em maior quantidade em uma amostra de suco comercial varietal.

Por fim, é possível concluir que os sucos de uva produzidos no estado do Rio Grande do Sul possuem uma ampla variedade de compostos fenólicos das mais diversas classes e com perfis influenciados especialmente pela variedade de uva utilizada em sua elaboração. O método desenvolvido e validado é uma ferramenta útil na avaliação e estudo da qualidade e do perfil fenólico de amostras de suco de uva, bem como pode servir como mola propulsora no incentivo ao consumo desta bebida com qualidades nutracêuticas.



**6. CAPÍTULO 3: Estudo das propriedades nutracêuticas do suco de uva  
frente a um modelo de doença de Alzheimer**

---



## 6.1 Introdução

O uso de animais em pesquisa com intuito de avaliar a atividade biológica de um determinado analito é um tema polêmico e que abrange uma série de desafios éticos. A utilização de animais em laboratórios é, atualmente, regida no Brasil e no mundo pelos princípios dos 3Rs (do inglês “*reduction*” - redução, “*refinement*” - refinamento e “*replacement*” - substituição), cujo objetivo primordial é promover um uso mais humanizado de animais em pesquisa (NATIONAL CENTRE FOR THE REPLACEMENT, REFINEMENT AND REDUCTION OF ANIMALS IN RESEARCH, 2020). A legislação brasileira sugere que, sempre que possível, se escolham modelos alternativos ao uso de animais (BRASIL, 2014). Neste contexto, o nematoide *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) se apresenta como uma alternativa interessante.

*C. elegans* é um nematoide de vida livre e que não parasita humanos. Seu corpo é pequeno e fácil de ser visualizado e estudado, possui um ciclo de vida curto e ninhadas numerosas. Em 1974, BRENNER demonstrou as semelhanças genéticas e a possibilidade de transgenia para expressão de proteínas associadas a patologias humanas que fazem deste verme uma ferramenta interessante no estudo da atividade biológica de compostos fenólicos bioativos (CULETTO; SATTELLE, 2000; LINK, 1995).

A doença de Alzheimer corresponde a 90% dos casos de demência reportados (WEINER; LIPTON, 2009). Além do histórico familiar e do fator genético, o principal fator de risco é o envelhecimento. As características mais marcantes que definem a doença de Alzheimer são a perda progressiva da memória e outros aspectos cognitivos e não cognitivos como falta de orientação cronológica e geográfica, falhas de linguagem, apraxia, apatia, agitação, distúrbios de humor, dentre outros. A sobrevivência média dos pacientes com doença de Alzheimer, após o diagnóstico, é de 4 a 8 anos. A expectativa de vida é reduzida em cerca de 50%, dependendo da idade do paciente no diagnóstico (TEIXEIRA *et al.*, 2015; WEINER; LIPTON, 2009).

Numerosos estudos têm comprovado os benefícios da atividade antioxidante dos compostos fenólicos bioativos (CARDOZO *et al.*, 2013; MARCHI *et al.*, 2014; VINSON; TEUFEL; WU, 2001). No entanto, pouco tem sido pesquisado com relação à atividade biológica especificamente com relação ao suco de uva. Levando-se em consideração que a uva é uma das frutas mais cultivadas ao redor do mundo, que o

suco de uva possui um processo de elaboração relativamente simples e que esta bebida, não alcoólica, é adequada ao consumo de praticamente qualquer tipo de pessoa; é de extrema importância que novos estudos surjam com a intenção de investigar a capacidade desta de reduzir ou minimizar as consequências de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como a doença de Alzheimer.

Uma das principais características patológicas da doença de Alzheimer é a presença, no cérebro, de placas  $\beta$ -amiloides extracelulares, formadas pela clivagem sequencial da proteína precursora de amiloide (SILVA, 2018; WEINER; LIPTON, 2009). A cepa transgênica CL2006 do nematoide *C. elegans* expressa a forma mais tóxica do peptídeo  $\beta$ -amiloide (1-42), sob controle do promotor muscular constitutivo *unc-54* da parede corporal, exibindo um fenótipo de paralisia progressiva (ALEXANDER; MARFIL; LI, 2014; LINK, 1995; LUBLIN; LINK, 2013). Esta cepa é utilizada como modelo de doença de Alzheimer, pois permite averiguar a capacidade de um analito em retardar ou diminuir os efeitos gerados pela agregação  $\beta$ -amiloide no verme. Dessa forma, utilizando-se a cepa transgênica CL2006 do nematoide *C. elegans*, foram avaliadas as propriedades nutracêuticas do suco de uva. O artigo gerado a partir desse estudo é apresentado a seguir.



## 6.2 Artigo a ser submetido ao periódico *Neurotoxicity Research*

### **Grape juice reduces the effects of amyloid $\beta$ aggregation in *Caenorhabditis elegans*, an Alzheimer's disease model**

**Natalia Alejandra Pisoni Canedo-Reis<sup>a\*</sup>, Flávia Suelen de Oliveira Pereira<sup>b</sup>,  
Daiana Silva de Ávila<sup>b</sup>, Celito Crivellaro Guerra<sup>c</sup>, Leticia Flores da Silva<sup>c</sup>, Ana  
Maria Bergold<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Grupo de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans* (GBToxCe), Universidade Federal do Pampa, BR 472 – Km 585, CEP 97501-970, Uruguaiana, RS, Brazil

<sup>c</sup>LACEM – Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas, Embrapa Uva e Vinho, Rua Livramento, 515, CEP 95701-008, Bento Gonçalves, RS, Brazil

#### ABSTRACT

Alzheimer's disease is the most common neurodegenerative disorder. It is characterized by the presence of neuritic plaques that consist primarily of aggregated amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) peptides. The nematode *Caenorhabditis elegans* can be genetically modified to express human A $\beta$  with the purpose of being used as an important *in vivo* model for Alzheimer's disease. Grape juice is rich in bioactive phenolic compounds that can combat oxidative stress-related diseases, including Alzheimer's. This study shows the nutraceutical properties of grape juice on reducing the effects of A $\beta$  aggregation in transgenic *Caenorhabditis elegans*. BRS-Cora juice reduced the effects of A $\beta$  aggregation in every concentration of grape juice tested and no toxic effects were found. Bordo, Isabel, Isabel Precoce, BRS-Magna, BRS-Rubea and BRS-Violeta juices also presented promising results. Grape juice showed little toxicity to worms and, in some cases, was also able to increase worm's longevity.

Keywords: grape juice, phenolic compounds, *Caenorhabditis elegans*, Alzheimer's Disease, nutraceutical.

### 6.2.1 Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder and the most common cause of senile dementia characterized by progressive loss of memory and impairment of cognitive ability (LUBLIN; LINK, 2013; WEINER; LIPTON, 2009). One of the pathological hallmarks of this disease is the presence of neuritic plaques that consist primarily of aggregated amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) peptides derived from a transmembrane protein named amyloid precursor protein (APP) (JAYASENA *et al.*, 2013; WEINER; LIPTON, 2009). The A $\beta$  toxic potential is related to its conformational state and peptide length, being A $\beta$  (1–42) oligomers considered the most toxic form (BURDICK *et al.*, 1992; WALSH; SELKOE, 2007). It is not completely understood why these plaques are formed; many factors seem to be involved and oxidative damage is thought to be one of the most relevant (JAYASENA *et al.*, 2013; JOMOVA *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2006; VALKO *et al.*, 2007).

Bioactive phenolic compounds are secondary metabolites produced in plants when they are under stress situations (biotic and abiotic) (CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006; DIXON; PAIVA, 1995). They are a heterogeneous group of substances with antioxidant properties. Largely present in grapes and their derivatives, such as grape juice, these substances have an important role in preventing oxidative stress-related diseases. Several studies suggest anti-amyloidogenic effects produced by phenolic compounds (JAYASENA *et al.*, 2013; MA *et al.*, 2016; ONO *et al.*, 2003; REGITZ *et al.*, 2016). Grapes are one of the fruits most produced worldwide with approximately 75 million tons generated each year (OIV, 2018). Grape juice is a non-alcoholic drink, therefore suitable for all kinds of people. Grape juice consumption has grown largely over the years and Brazilian's integral grape juice commercialization, in 2018, was about 150 million liters (MELLO, 2019). The vast availability of grape juice and the incentive to its consumption can bring new perspectives to AD. This puts a spotlight on grape juice and its nutraceutical value is starting to be studied with greater interest (MARCHI *et al.*, 2014; SHANMUGANAYAGAM *et al.*, 2007; TOSCANO *et al.*, 2015).

Grape varieties intended for grape juice elaboration must have an adequate sugar/acidity relation and pleasant flavor and aroma. *V. labrusca* L. (also called american) grapes and their hybrids (*V. labrusca* x *V. vinifera* L.) maintain those characteristics even after pasteurization process and are, for that reason, the most indicated cultivars for grape juice production. The phenolic profile of grape juice is variable according to the grape variety used in its elaboration (Chapter 1). Nutraceuticals, such as grape juice rich in phenolic compounds, may have great potential to combat oxidative stress-related diseases, including AD.

An important tool in the investigation of the effects of natural compounds in AD treatment is the nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). It is a free-living nematode found worldwide which has many of the distinct cell types associated with complex functions in mammals (BRENNER, 1974; CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015; CULETTO; SATTELLE, 2000). Approximately 42% of human disease genes have an orthologue in *C. elegans*. In addition, these worms can be genetically manipulated and strains carrying human genes can be generated, which enables the investigation of neurodegenerative diseases (CULETTO; SATTELLE, 2000). *C. elegans* does not produce A $\beta$  naturally, therefore, transgenic strains that express human A $\beta$  in their body wall muscle cells or neurons are being used as AD model. Over the nematode's lifetime, the phenotypical manifestations of the disease appear, like paralysis, oxidative stress and neurodegeneration. These characteristics make *C. elegans* an interesting model for studying pathology and therapy in AD (ALEXANDER; MARFIL; LI, 2014).

In this context, the aim of this study was to evaluate the ability of grape juice to reduce the effects of A $\beta$  aggregation in transgenic *C. elegans* strain CL2006, which expresses the human 42 amino acid sequence of A $\beta$ .

## **6.2.2 Material and Methods**

### **6.2.2.1 Chemicals**

Agar, calcium chloride and sodium phosphate were obtained from Dinâmica Química Contemporânea (Indaiatuba, SP, Brazil). Sodium chloride and sodium hydroxide were obtained from CRQ Produtos Químicos Eireli (Diadema, SP, Brazil).

Peptone was obtained from Kasvi (São José dos Pinhais, PR, Brazil). Cholesterol was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Magnesium sulfate was obtained from Êxodo Científica (Sumaré, SP, Brazil). Streptomycin was obtained from Ouro Fino (Cravinhos, SP, Brazil). Potassium phosphate was obtained from Synth (Diadema, SP, Brazil). Levamisole was obtained from Biogénesis Bagó (Curitiba, PR, Brazil).

#### **6.2.2.2 Grape juice samples**

Grape juices were elaborated with grapes from experimental vineyards of Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation – Grape and Wine Research Center) in Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brazil. Nine integral grape juices were produced, individually, with grapes from 2019 harvest. Grape varieties used were either traditional cultivars (Isabel, Bordo, Concord and Isabel Precoce) or cultivars developed by Embrapa Grape and Wine's Genetic Improvement Program (BRS-Cora, BRS-Violeta, BRS-Magna, BRS-Rubea and BRS-Carmem).

All grape juices were prepared in an innovative system denominated Integral Juicer. The Integral Juicer was developed by researchers from Embrapa Grape and Wine Research Center with the purpose of offering an appropriate production system for small-scale grape juice producers. It consists of an inclined rotating tank that has, on the outside wall, a liquid that serves as a heater for the inside part, where grapes, already destemmed and crushed, are put in. The grapes inside the tank are heated and grape juice is collected on the bottom valve of the tank (GUERRA *et al.*, 2016).

#### **6.2.2.3 Strains**

CL2006 [*dvl*s2(pCL12(*unc-54*/human-A $\beta$  1–42 minigene) + *pRF4*)] strain was obtained from *Caenorhabditis* Genetics Center (University of Minnesota, MN, USA). CL2006 is a transgenic *C. elegans* that expresses human-A $\beta$  1–42 under the control of the muscle-specific promoter *unc-54*, leading to progressive adult paralysis (LINK, 1995).

*Escherichia coli* OP50 and NA22 were obtained from *Caenorhabditis* Genetics Center (University of Minnesota, MN, USA).

#### **6.2.2.4 *C. elegans* maintenance and synchronization**

The nematodes were maintained at 15°C on *Nematode Growth Medium* (NMG) seeded with *E. coli* OP50 or NA22 (synchronization plates) feeding strains. To obtain age-synchronized animals, nematodes were transferred from the maintenance plates to fresh NMG plates seeded with *E. coli* NA22 strain. The worms were maintained at 15°C until they reach the reproductive period. The gravid worms were collected from plates with distilled water and washed for bacteria removal. After that process, bleaching solution (NaOH 1 M, NaClO 1% and distilled water) was added to break the cuticle of worms and release the eggs, the mixture was then agitated for 4 minutes. Following, three washes with M9 buffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.04 M and NaCl 0.085 M) were done in order to remove bleaching solution from the eggs. In the end, the eggs were transferred to new plates and maintained for 14 hours until they hatched and released L1 larvae, used in treatments.

#### **6.2.2.5 *C. elegans* treatment**

Approximately 2000 L1 synchronized worms were chronically treated, in duplicate, with 3 different concentrations of each grape juice sample: 0.5, 1 and 2%. The grape juice concentrations studied were based on previous studies regarding the nutraceutical effects of grape juice (MARCHI *et al.*, 2014; PAIOTTI *et al.*, 2013; TOSCANO *et al.*, 2015). The control group received only distilled water. Centrifugation was conducted for 3 minutes at 7000 rpm at 20°C, supernatant was withdrawn and worms were transferred to NMG plate seeded *E. coli* OP50 and maintained at 20°C for 48 hours. After 48 hours, survival, body size, brood size, longevity, and paralysis assays were conducted. Assays were all conducted in triplicate.

#### **6.2.2.6 Toxicity assays**

After 48 hours of treatment, three endpoints were assessed. First, the number of live worms was counted to determine the survival rate. Then, three worms from each group were transferred to individual plates seeded with a round lawn of *E. coli* OP50 at the center. Daily, for four days, the worms were transferred to new plates and the

number of their progeny scored. Finally, the effects of the treatment over the body length and area of the worms was verified. Ten treated worms were placed on slides containing levamisole (1mM). Images were obtained using a Nikon Eclipse 50i microscope (Tokyo, Japan), and measurements by ImageJ software (Madison, WI, USA). The results were compared to control.

#### **6.2.2.7 Paralysis rate**

The paralysis assay evaluates the treatment's ability to prevent A $\beta$  aggregation. In the transgenic *C. elegans* strain CL2006, the A $\beta$  aggregation in the muscles is age-dependent (as in humans) and it leads to progressive paralysis of the worm, a clear phenotype that can be scored along with the longevity assay. The progression of paralysis is easily observed through the worm's roller phenotype as opposed to the sinusoidal movement phenotype in non-transgenic *C. elegans*, that does not express the human 42 amino acid sequence of A $\beta$  (LINK, 1995). As time goes by, animals stop moving at all and are completely paralyzed. Every day, paralyzed animals were counted in the longevity plates until all animals were paralyzed. Experiments were conducted in duplicates. The results found were compared to control.

#### **6.2.2.8 Longevity**

To evaluate longevity and, consequently, aging, 25 worms at the L4 larval stage were transferred to NGM plates seeded with *E. coli* OP50 at the center and maintained at 20°C. Daily, all living worms were counted and transferred to another plate. The process was repeated every day until all animals were dead (no pharynx contraction observed). Experiments were done in duplicate. The results found were compared to control.

#### **6.2.2.9 Statistical analysis**

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 7 software (La Jolla, CA, USA). For group comparison, one-way analysis of variance (ANOVA) was performed for survival, length, area and brood size, followed by Dunnett's post hoc

test. For paralysis and longevity assays, two-way ANOVA was performed, followed by Tukey's post hoc test.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

### **6.2.3 Results**

#### **6.2.3.1 Toxicity assays**

Survival results are shown in Figure 6.1. Results vary according to grape variety used in the elaboration of each juice sample and the treatment's concentration. With a concentration of 0.5% of grape juice, there were no significant changes in survival, compared to control, in any of the grape juice samples studied. Concord juice (GJ6) decreased survival significantly with 2% of grape juice, while Isabel Precoce juice (GJ8) decreased survival with 1% of grape juice.

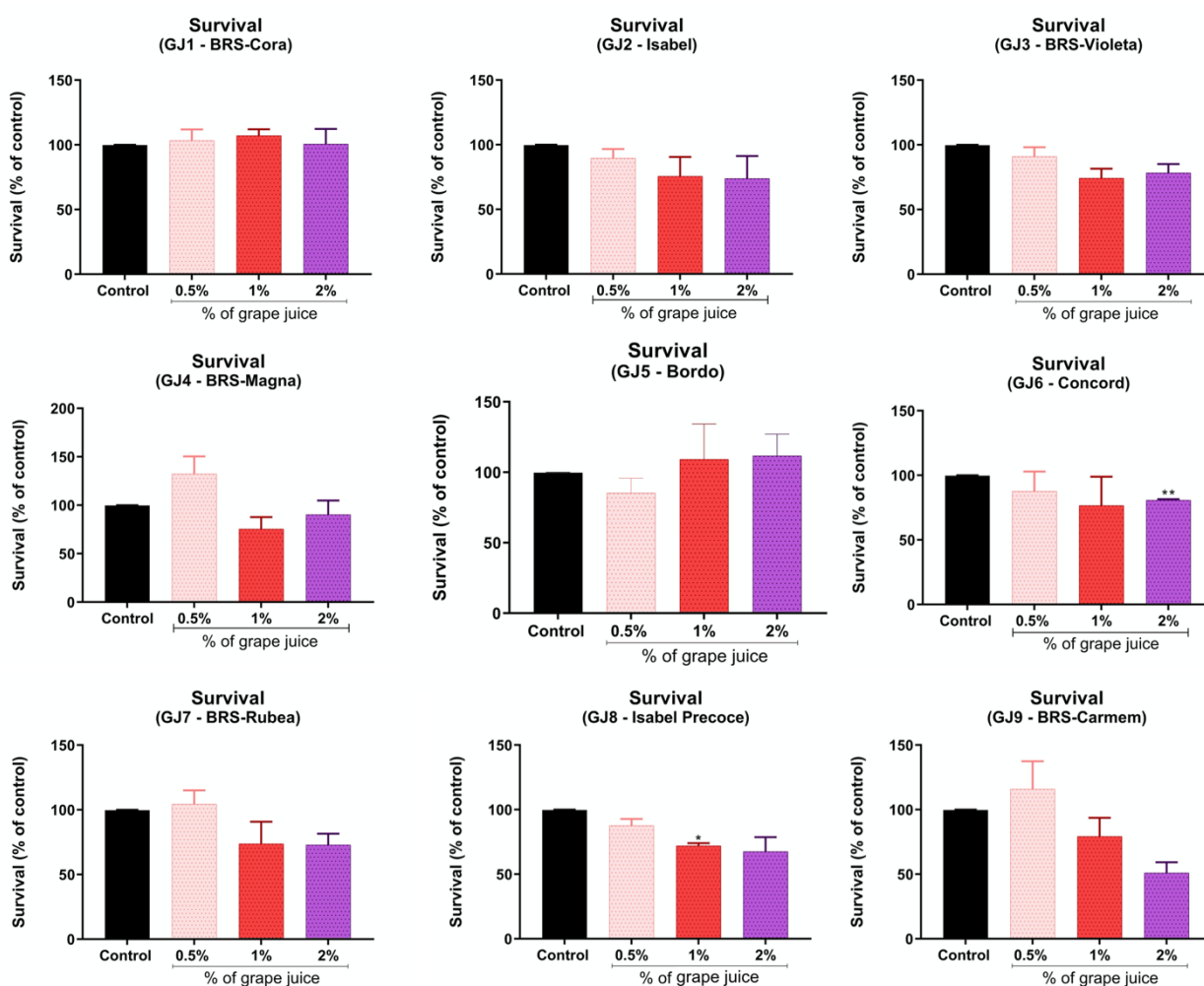
Length (Figure 6.2) and area of worms (Figure 6.3) did not show significant alterations, compared to control, in any grape juice sample and with any of the concentrations studied. *C. elegans* progeny (Figure 6.4) was not altered significantly, compared to control, with a concentration of 0.5 and 2% of grape juice in any of the grape juice samples studied. GJ 2 (Isabel) and GJ4 (BRS-Magna) altered brood size significantly with 1% of grape juice.

#### **6.2.3.2 Paralysis rate**

Paralysis rate results (Figure 6.5) show that grape juice has a positive action retarding A $\beta$  aggregation effects in worms. GJ1 (BRS-Cora), GJ2 (Isabel) and GJ8 (Isabel Precoce) were able to slow the paralysis process significantly in every concentration of grape juice tested, compared to control. BRS-Violeta juice (GJ3) was able to reduce paralysis rate significantly with 0.5 and 1% of grape juice while BRS-Magna juice (GJ4) was able to delay paralysis with concentrations of 1 and 2% of grape juice. Bordo juice (GJ5) reduced paralysis rate with 2% of grape juice and BRS-Rubea juice (GJ7) slowed paralysis rate significantly with 0.5% of grape juice. GJ6 (Concord) and GJ9 (BRS-Carmem) showed no significant difference from control in any of the concentrations studied.

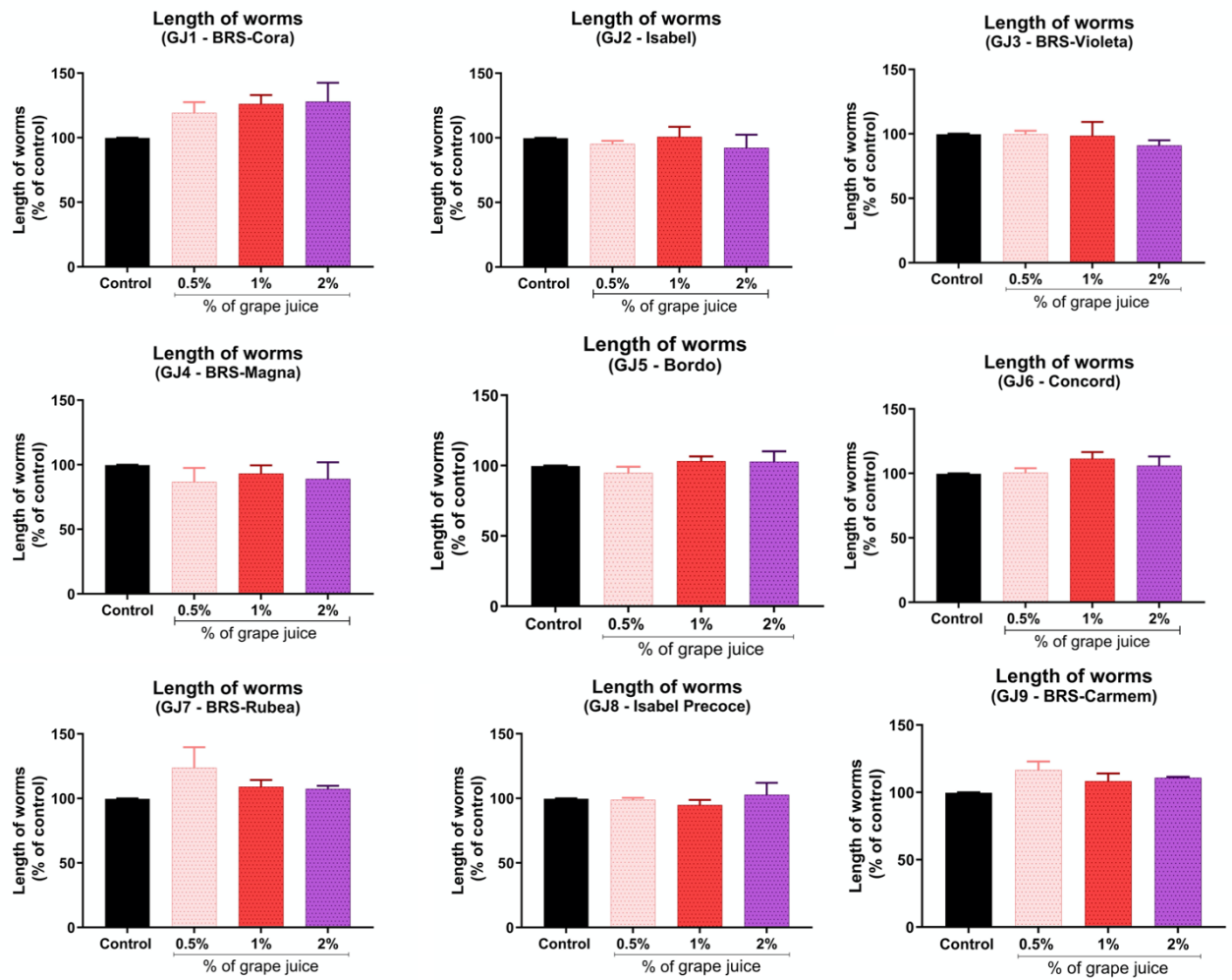
### 6.2.3.3 Longevity

Longevity results are shown in Figure 6.6. BRS-Magna juice (GJ4) increased significantly longevity with 0.5% and 1% of grape juice. On the other hand, grape juices 3 (BRS-Violeta), 6 (Concord), 8 (Isabel Precoce) and 9 (BRS-Carmem) decreased longevity significantly at the highest concentration of grape juice (2%). GJ1 (BRS-Cora), GJ2 (Isabel), GJ5 (Bordo) and GJ7 (BRS-Rubea) showed no significant difference in longevity when compared to control.

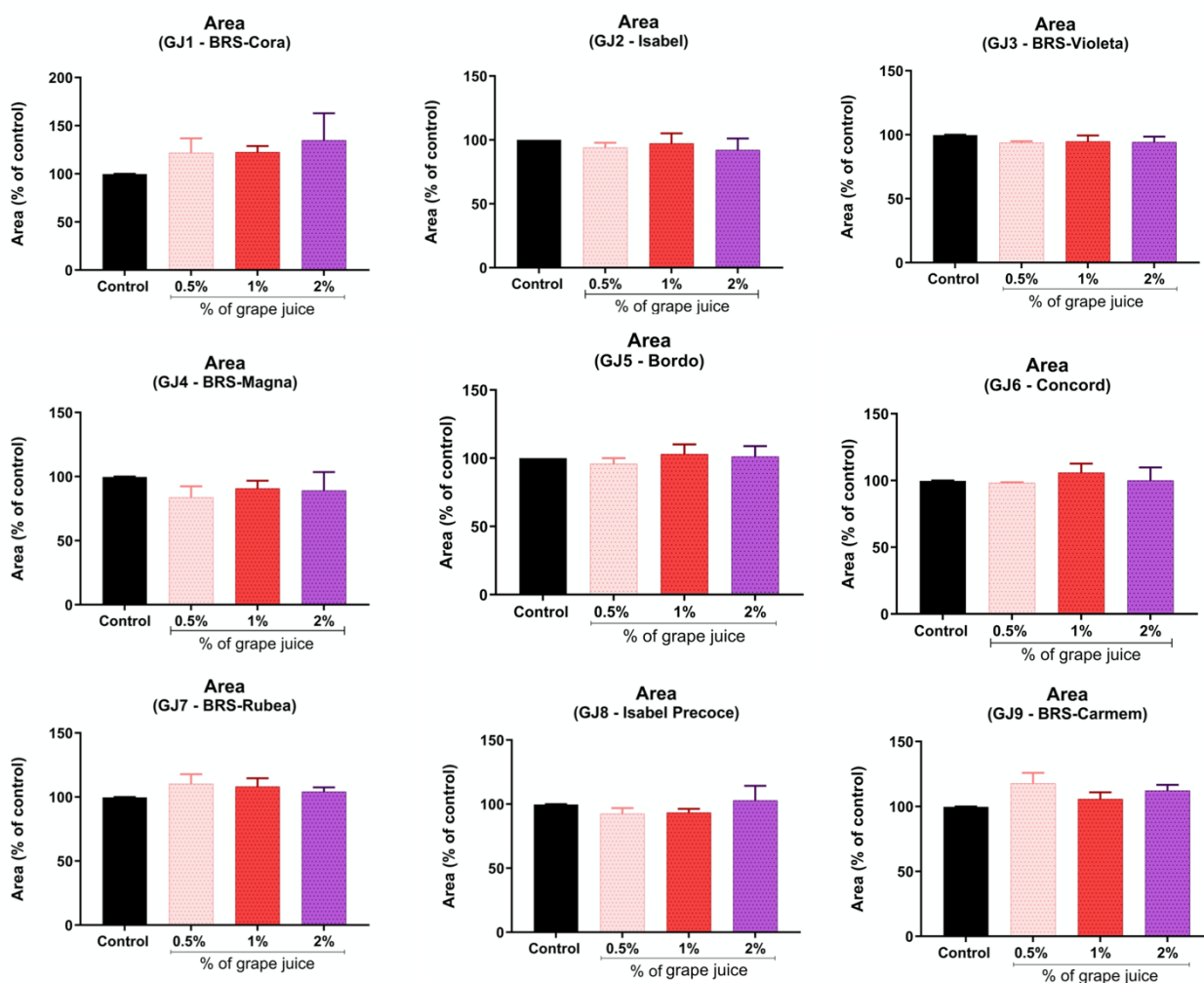


**Figure 6.1** – Survival of worms in different concentrations of grape juice compared to control. Grape varieties used in the production of each grape juice (GJ) sample: BRS-Cora (GJ1), Isabel (GJ2), BRS-Violeta (GJ3), BRS-Magna (GJ4), Bordo (GJ5), Concord (GJ6), BRS-Rubea (GJ7), Isabel Precoce (GJ8), BRS-Carmem (GJ9). The results were compared to control by one-way ANOVA, followed by Dunnett's post-hoc. Results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . \* represents differences in relation to control with  $*p < 0.05$  and  $**p < 0.01$ .

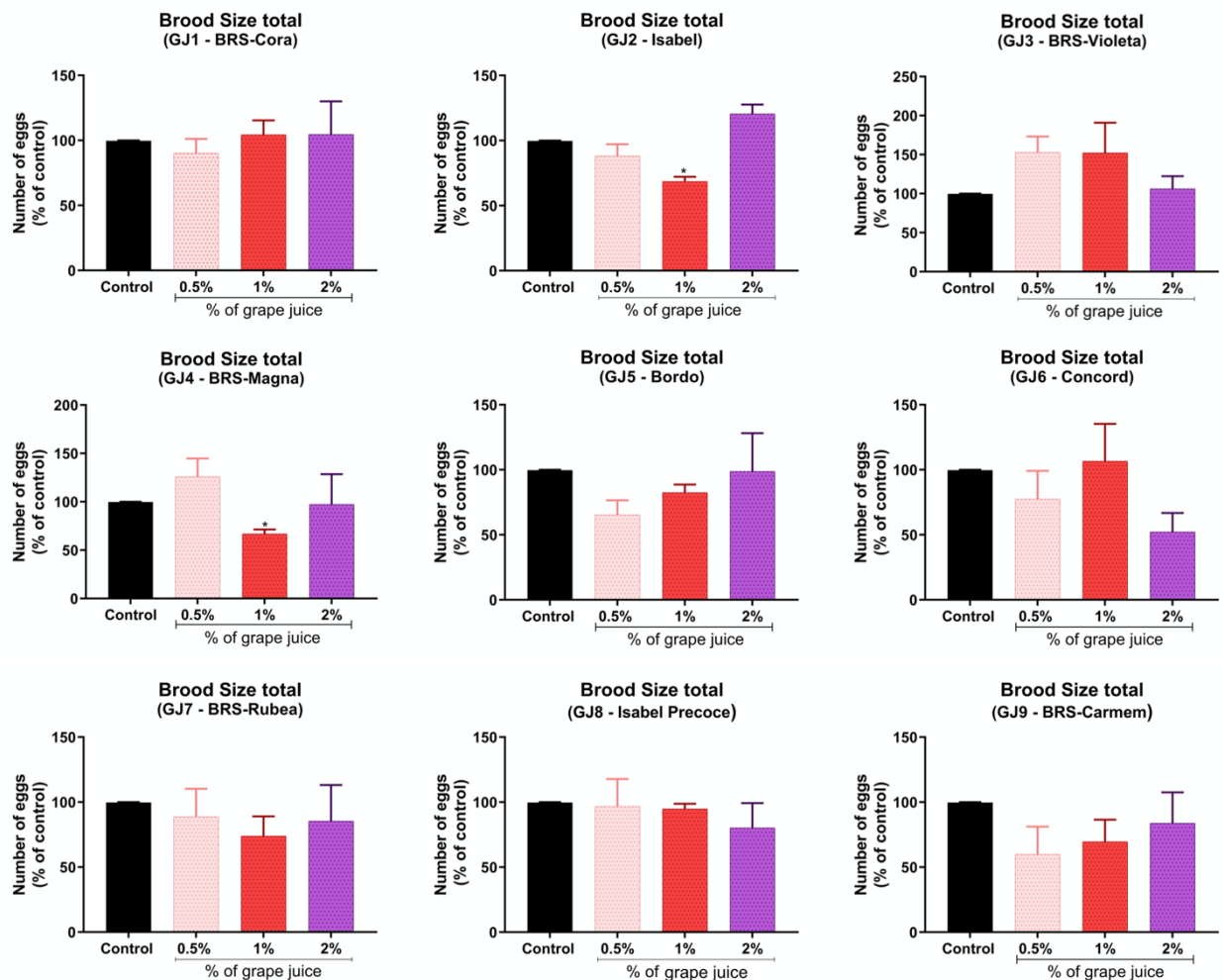




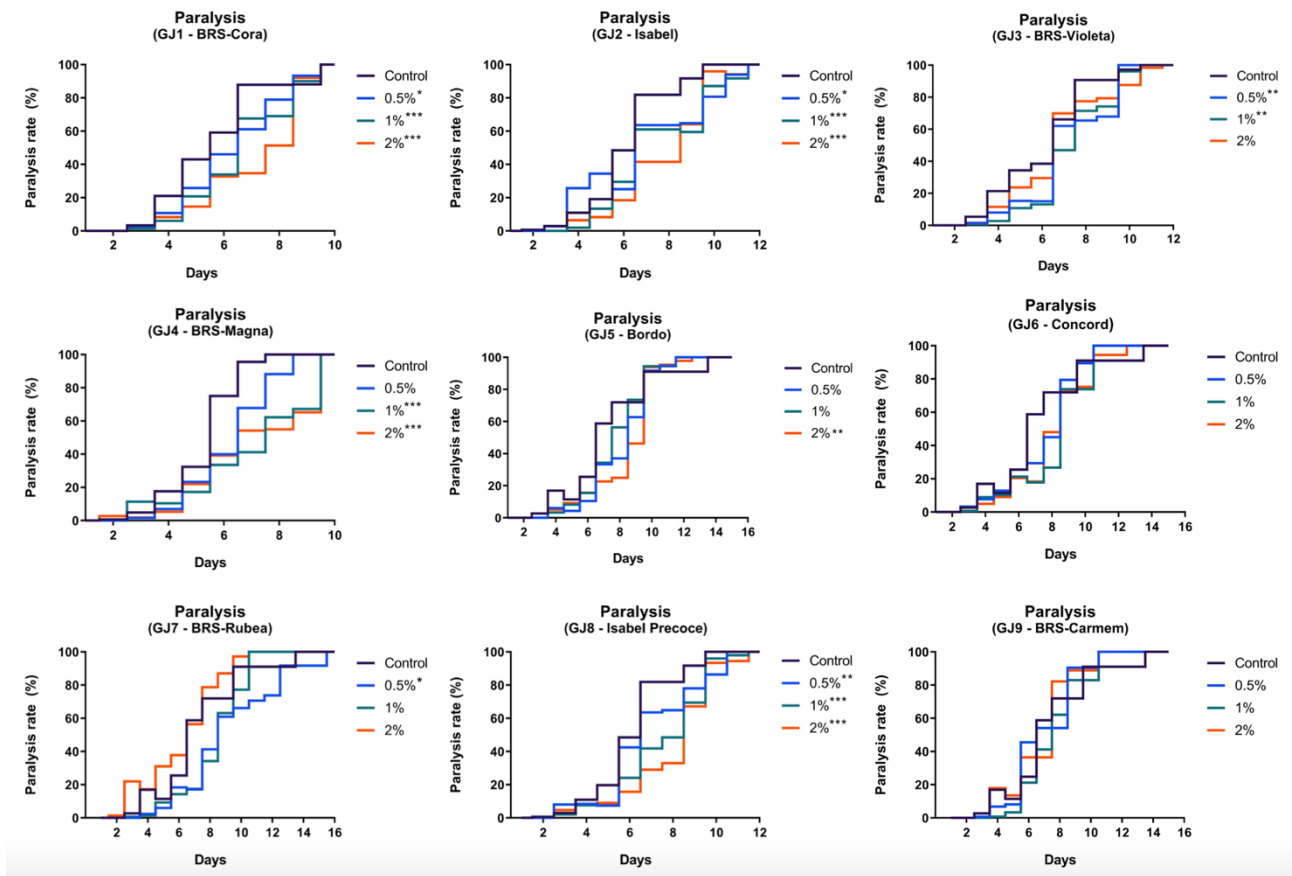
**Figure 6.2** – Length of worms in different concentrations of grape juice compared to control. Grape varieties used in the production of each grape juice (GJ) sample: BRS-Cora (GJ1), Isabel (GJ2), BRS-Violeta (GJ3), BRS-Magna (GJ4), Bordo (GJ5), Concord (GJ6), BRS-Rubea (GJ7), Isabel Precoce (GJ8), BRS-Carmem (GJ9). The results were compared to control by one-way ANOVA, followed by Dunnett’s post-hoc.



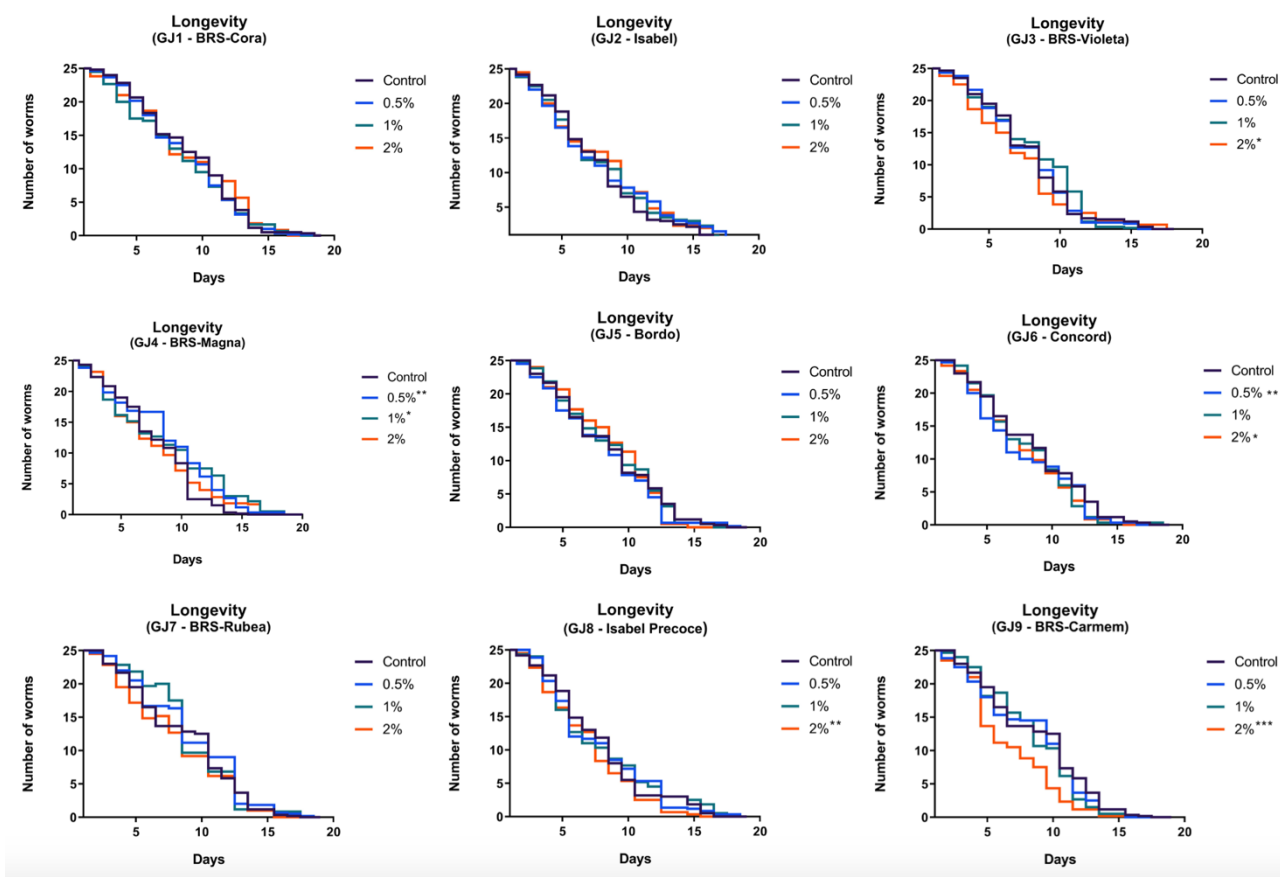
**Figure 6.3** – Area of worms in different concentrations of grape juice compared to control. Grape varieties used in the production of each grape juice (GJ) sample: BRS-Cora (GJ1), Isabel (GJ2), BRS-Violeta (GJ3), BRS-Magna (GJ4), Bordo (GJ5), Concord (GJ6), BRS-Rubea (GJ7), Isabel Precoce (GJ8), BRS-Carmem (GJ9). The results were compared to control by one-way ANOVA, followed by Dunnett’s post-hoc.



**Figure 6.4** – Brood size of worms in different concentrations of grape juice compared to control. Grape varieties used in the production of each grape juice (GJ) sample: BRS-Cora (GJ1), Isabel (GJ2), BRS-Violeta (GJ3), BRS-Magna (GJ4), Bordo (GJ5), Concord (GJ6), BRS-Rubea (GJ7), Isabel Precoce (GJ8), BRS-Carmem (GJ9). The results were compared to control by one-way ANOVA, followed by Dunnett’s post-hoc. Results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . \* represents differences in relation to control with  $*p < 0.05$ .



**Figure 6.5** – Paralysis rate of worms in different concentrations of grape juice compared to control. Grape varieties used in the production of each grape juice (GJ) sample: BRS-Cora (GJ1), Isabel (GJ2), BRS-Violeta (GJ3), BRS-Magna (GJ4), Bordo (GJ5), Concord (GJ6), BRS-Rubea (GJ7), Isabel Precoce (GJ8), BRS-Carmem (GJ9). The results were compared to control by two-way ANOVA repeated measures, followed by Tukey's post-hoc. Results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . \* represents differences in relation to control with  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  and  $***p < 0.001$ .



**Figure 6.6** – Longevity of worms in different concentrations of grape juice compared to control. Grape varieties used in the production of each grape juice (GJ) sample: BRS-Cora (GJ1), Isabel (GJ2), BRS-Violeta (GJ3), BRS-Magna (GJ4), Bordo (GJ5), Concord (GJ6), BRS-Rubea (GJ7), Isabel Precoce (GJ8), BRS-Carmem (GJ9). The results were compared to control by two-way ANOVA repeated measures, followed by Tukey’s post-hoc. Results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . \* represents differences in relation to control with  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  and  $***p < 0.001$

### 6.2.3.4 Discussion

Oxidative stress plays an important role in the development and progression of AD. At the same time,  $A\beta$  aggregation is capable of inducing oxidative stress (JAYASENA *et al.*, 2013; JOMOVA *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2006; VALKO *et al.*, 2007). Grape juice is rich in bioactive phenolic compounds that are responsible for its antioxidant activity. The same grape juice samples analyzed in this study had their phenolic profile previously studied (Chapter 1). Figure 4.2 of the cited Chapter presents the concentration of phenolic compounds, in  $\text{mg L}^{-1}$ , in the grape juice samples analyzed. The first nine samples (GJ1-GJ9) presented in Figure 4.2 are the same

juices studied here and it is possible to observe that the phenolic profile of grape juice samples varies according to grape variety used in its elaboration.

Overall, BRS-Cora juice (GJ1), Isabel juice (GJ2), BRS-Magna juice (GJ4) and Isabel Precoce juice (GJ8) presented very interesting results on retarding the effects of A $\beta$  aggregation in worms. GJ1, GJ2 and GJ8 reduced paralysis in all three concentrations of grape juice studied. GJ4 was able to retard paralysis with 1 and 2% of grape juice and showed positive effect on worm's longevity. Principal component analysis (PCA) results presented in Figure 4.4 of Chapter 1 show that Isabel and Isabel Precoce juices are especially influenced by resveratrol, malvidin-3-O-glucoside (GJ2 and GJ8) and taxifolin (GJ8). In fact, GJ2 and GJ8 are the only ones, among the nine samples of grape juice analyzed, where the stilbene resveratrol was found. GJ8 was also the only juice that presented enough taxifolin (flavanonol) to be quantified. Conversely, these three compounds were not detected or were under limit of quantification (LOQ) in GJ1 and GJ4 samples. GJ1 has a considerable amount of cyanidin-3,5-diglucoside while GJ4 is richer in malvidin-3,5-diglucoside and flavanols especially catechin. BRS-Cora juice (GJ1) was the only juice that did not cause any sign of toxicity to worms, not affecting negatively their body and brood size, survival or longevity. No toxic effects were found in any of the samples studied when animals were treated with 0.5% of grape juice, only with higher concentrations.

GJ3 (BRS-Violeta) was able to reduce the effects of A $\beta$  aggregation in worms with the two lower concentrations of grape juice. With a higher concentration of grape juice longevity was negatively affected. GJ3 presents the highest quantities of phenolic compounds of all grape juice samples tested. It is very rich in anthocyanins, especially malvidin-3,5-diglucoside and peonidin-3,5-diglucoside, and flavanols (catechin and procyanidin B1). GJ5 (Bordo) and GJ7 (BRS-Rubea) were able to delay paralysis with 2 and 0.5% of grape juice, respectively. GJ5 presents higher quantities of malvidin-3,5-diglucoside, while GJ7 has very little. Both of them present similar concentrations of non-anthocyanic compounds. GJ5 and GJ7 did not present any toxic effects to worms.

Concord juice (GJ6) and BRS-Carmem juice (GJ9) were the only two samples that did not present a significant effect on reducing paralysis. In terms of toxicity, these samples presented toxic effects in longevity and survival assays, especially with higher concentrations of grape juice. It is not clear why only GJ6 and GJ9 were not able to

reduce paralysis in worms. Concord is a traditional *V. labrusca* grape while BRS-Carmem is a hybrid cultivar developed by Embrapa Grape and Wine's Genetic Improvement Program. BRS-Carmem has Concord cultivar in its genealogy (CAMARGO; MAIA; RITSCHER, 2008). More studies need to be conducted in order to address this issue.

Results found in this study show that grape juice is able to reduce the effects of A $\beta$  aggregation in transgenic *C. elegans* which expresses the human 42 amino acid sequence of A $\beta$ . Except for Concord (GJ6) and BRS-Carmem (GJ9) cultivars, all the other seven cultivars studied presented positive effects against A $\beta$  aggregation. As mentioned before, it is well known the antioxidant capacity of phenolic compounds. For instance, several studies show resveratrol's antioxidant activity including in AD models (BASS *et al.*, 2007; CHEN; REZAIZADEHNAJAFI; WINK, 2013; FOUAD; RIZK, 2019; LEKLI; RAY; DAS, 2010; REGITZ *et al.*, 2016), but this compound is certainly not the only responsible for the biological activity of grape juice. Samples where there was no resveratrol present also were able to reduce paralysis. Quercetin (found in almost every sample), flavanols and anthocyanins also have important antioxidant activity reported (BADSHAH; KIM; KIM, 2015; FOUAD; RIZK, 2019; LA CRUZ *et al.*, 2013; REGITZ; MARIE DUSSLING; WENZEL, 2014; ZHANG *et al.*, 2019).

It is not possible to name a single or more important phenolic compound. There seems to exist a synergic activity between them which can be responsible for the nutraceutical effects observed in the present study. Moreover, not only the phenolic compound profile, but also the concentration balance between them should be taken into consideration. In worms treated with a lower concentration of grape juice, no toxic effects were observed, but, on the other hand, some juices only were able to reduce paralysis when animals were treated with higher concentrations of grape juice (BRS-Magna and Bordo) where some toxicity was found (BRS-Magna). Additionally, grapes and their derivatives have several other compounds that may also contribute to the nutraceutical effects observed. More specific studies can be conducted in order to better understand the mechanisms involved.

Considering that AD is a progressively debilitating disease, strategies that can improve the quality of life and delay AD consequences are highly desirable. Especially taking under consideration that the human population is aging and is more susceptible

to senile dementia. The findings of this study are of great interest because they show that grape juice might be able to delay or prevent AD in humans.

#### **6.2.4 Conclusion**

Nine integral grape juices produced, individually, with nine different grape varieties were evaluated. Grape juices proved to be able to reduce paralysis with little or none toxicity to worms found. BRS-Cora juice reduced the effects of A $\beta$  aggregation in every concentration of grape juice tested with no signs of toxicity. BRS-Magna juice was able to retard paralysis with higher concentrations of grape juice and showed positive effect on worm's longevity. Isabel and Isabel Precoce juices reduced paralysis in all three concentrations of grape juice studied.

The present study provided evidence that grape juice can reduce the effects caused by A $\beta$  aggregation in worms and might be able to delay AD consequences in humans. Grape juice can become an important ally against AD.

#### **6.2.5 Declaration of interests**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### **6.2.6 Acknowledgments**

The authors would like to acknowledge the financial support from the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and Pharmaceutical Sciences Graduate Program of the Federal University of Rio Grande do Sul (PPGCF- UFRGS). They are also grateful to the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) for providing grape juice samples and to Universidade Federal do Pampa for providing laboratory infrastructure and all the tools needed in this research.



## 6.2.7 References

ALEXANDER, A. G.; MARFIL, V.; LI, C. Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. **Frontiers in Genetics**, [s. l.], v. 5, 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2014.00279/abstract>>. Acesso em: 1 mar. 2020.

BADSHAH, H.; KIM, T. H.; KIM, M. O. Protective effects of anthocyanins against amyloid beta-induced neurotoxicity in vivo and in vitro. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 80, p. 51–59, 2015.

BASS, T. M.; WEINKOVE, D.; HOUTHOOFD, K.; GEMS, D.; PARTRIDGE, L. Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. **Mechanisms of Ageing and Development**, [s. l.], v. 128, n. 10, p. 546–552, 2007.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 71–94, 1974.

BURDICK, D.; SOREGHAN, B.; KWON, M.; KOSMOSKI, J.; KNAUER, M.; HENSCHEN, A.; YATES, J.; COTMAN, C.; CHARLES, G. Assembly and aggregation properties of synthetic alzheimer's A4/β amyloid peptide analogs. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 267, p. 546–554, 1992.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; RITSCHHEL, P. **BRS-Carmem - Nova cultivar de uva tardia para suco. Comunicado Técnico 84**. 1. ed. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2008.

CHEN, W.; REZAIZADEHNAJAFI, L.; WINK, M. Influence of resveratrol on oxidative stress resistance and life span in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 65, n. 5, p. 682–688, 2013.

CORSI, A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. **A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans***. 2015. Disponível em: <[http://www.wormbook.org/chapters/www\\_celegansintro/celegansintro.html#sec3](http://www.wormbook.org/chapters/www_celegansintro/celegansintro.html#sec3)>. Acesso em: 9 fev. 2020.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. **Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet**. UK: Blackwell Publishing, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.2237>>. Acesso em: 22 abr. 2019.

CULETTO, E.; SATTELLE, D. B. A role of *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. **Human Molecular Genetics**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 869–977, 2000.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 7, p. 1085–1097, 1995.

FOUAD, G. I.; RIZK, M. Z. Possible neuromodulating role of different grape (*Vitis vinifera* L.) derived polyphenols against Alzheimer's dementia: treatment and mechanisms. **Bulletin of the National Research Centre**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 108, 2019.

JAYASENA, T.; POLJAK, A.; SMYTHE, G.; BRAIDY, N.; MÜNCH, G.; SACHDEV, P. The role of polyphenols in the modulation of sirtuins and other pathways involved in Alzheimer's disease. **Ageing Research Reviews**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 867–883, 2013.

JOMOVA, K.; VONDRAKOVA, D.; LAWSON, M.; VALKO, M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 345, n. 1–2, p. 91–104, 2010.

KIM, T.-S.; PAE, C.-U.; YOON, S.-J.; JANG, W.-Y.; LEE, N. J.; KIM, J.-J.; LEE, S.-J.; LEE, C.; PAIK, I.-H.; LEE, C.-U. Decreased plasma antioxidants in patients with Alzheimer's disease. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 344–348, 2006.

LA CRUZ, A. A. D.; HILBERT, G.; MENGIN, V.; RIVIÈRE, C.; OLLAT, N.; VITRAC, C.; BORDENAVE, L.; DECROOCQ, S.; DELAUNAY, J.-C.; MÉRILLON, J.-M.; MONTI, J.-P.; GOMÈS, E.; RICHARD, T. Anthocyanin phytochemical profiles and anti-oxidant activities of *Vitis candicans* and *Vitis doaniana*. **Phytochemical Analysis**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 446–452, 2013.

LEKLI, I.; RAY, D.; DAS, D. K. Longevity nutrients resveratrol, wines and grapes. **Genes & Nutrition**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 55–60, 2010.

LINK, C. D. Expression of human  $\beta$ -amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 92, p. 9368–9372, 1995.

LUBLIN, A. L.; LINK, C. D. Alzheimer's disease drug discovery: in vivo screening using *Caenorhabditis elegans* as a model for  $\beta$ -amyloid peptide-induced toxicity. **Drug Discovery Today: Technologies**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. e115–e119, 2013.

MA, H.; DASILVA, N. A.; LIU, W.; NAHAR, P. P.; WEI, Z.; LIU, Y.; PHAM, P. T.; CREWS, R.; VATTEM, D. A.; SLITT, A. L.; SHAIKH, Z. A.; SEERAM, N. P. Effects of a standardized phenolic-enriched maple syrup extract on  $\beta$ -Amyloid aggregation, neuroinflammation in microglial and neuronal cells, and  $\beta$ -Amyloid induced neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 41, n. 11, p. 2836–2847, 2016.

MARCHI, P.; PAIOTTI, A. P. R.; NETO, R. A.; OSHIMA, C. T. F.; RIBEIRO, D. A. Concentrated grape juice (G8000<sup>TM</sup>) reduces immunoexpression of iNOS, TNF-alpha, COX-2 and DNA damage on 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced-colitis. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 819–827, 2014.

MELLO, L. M. R. De. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2018. Comunicado Técnico 210**. 1. ed. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2019.

OIV. **2018 World Vitiviniculture Situation. OIV Statistical Report on World Vitiviniculture**. Paris: International Organisation of Vine and Wine, 2018.

ONO, K.; YOSHIKE, Y.; TAKASHIMA, A.; HASEGAWA, K.; NAIKI, H.; YAMADA, M. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease: Anti-amyloidogenic effects of polyphenols. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 172–181, 2003.

REGITZ, C.; FITZENBERGER, E.; MAHN, F. L.; DUSSLING, L. M.; WENZEL, U. Resveratrol reduces amyloid-beta (A $\beta$ 1–42)-induced paralysis through targeting proteostasis in an Alzheimer model of *Caenorhabditis elegans*. **European Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 741–747, 2016.

REGITZ, C.; MARIE DUSSLING, L.; WENZEL, U. Amyloid-beta (A $\beta$ 1-42)-induced paralysis in *Caenorhabditis elegans* is inhibited by the polyphenol quercetin through activation of protein degradation pathways. **Molecular Nutrition & Food Research**, [s. l.], v. 58, n. 10, p. 1931–1940, 2014.

SHANMUGANAYAGAM, D.; WARNER, T. F.; KRUEGER, C. G.; REED, J. D.; FOLTS, J. D. Concord grape juice attenuates platelet aggregation, serum cholesterol and development of atheroma in hypercholesterolemic rabbits. **Atherosclerosis**, [s. l.], v. 190, n. 1, p. 135–142, 2007.

TOSCANO, L. T.; TAVARES, R. L.; TOSCANO, L. T.; SILVA, C. S. O. Da; ALMEIDA, A. E. M. De; BIASOTO, A. C. T.; GONÇALVES, M. da C. R.; SILVA, A. S. Potential ergogenic activity of grape juice in runners. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, [s. l.], v. 40, n. 9, p. 899–906, 2015.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

WALSH, D. M.; SELKOE, D. J. A $\beta$  oligomers - a decade of discovery. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 101, n. 5, p. 1172–1184, 2007.

WEINER, M. F.; LIPTON, A. M. (EDS.). **The American Psychiatric Publishing textbook of Alzheimer disease and other dementias**. 1st ed ed. Washington, DC: American Psychiatric Publishing, 2009.

ZHANG, J.; WU, J.; LIU, F.; TONG, L.; CHEN, Z.; CHEN, J.; HE, H.; XU, R.; MA, Y.; HUANG, C. Neuroprotective effects of anthocyanins and its major component cyanidin-3-O-glucoside (C3G) in the central nervous system: An outlined review. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 858, p. 172500, 2019.



## 7. DISCUSSÃO GERAL

---



Quando se pensa em compostos fenólicos bioativos, a primeira imagem que vem à mente da maioria das pessoas é o vinho. Este passou a ser mais estudado a partir da descoberta do paradoxo francês, enquanto que os estudos com suco de uva eram menos numerosos, despertando pouco interesse da comunidade científica. Isso se deve a uma série de fatores, dentre eles o fato de que a produção de suco de uva é limitada a determinadas regiões do planeta como a América do Norte, Brasil e Ásia e isso faz com que essa bebida seja cada vez mais popular nesses lugares, mas nem tanto em outras regiões do globo. No entanto, esse cenário tem mudado nos últimos anos pois há um crescente interesse relacionado às questões de saúde e uma maior preocupação com relação à ingestão de álcool. Isso tem gerado um aumento relevante na produção e consumo do suco de uva, trazendo crescimento econômico para as regiões com culturas vitícolas e despertando o interesse de pesquisadores.

Neste contexto, o estudo apresentado nesta tese objetivou uma avaliação abrangente do perfil fenólico e das propriedades nutraceuticas de amostras de suco de uva elaboradas no estado do Rio Grande do Sul. A primeira e mais extensa parte desta pesquisa foi o desenvolvimento e validação de um método analítico que permitisse quantificar uma série de compostos fenólicos em suco de uva.

A escolha dos compostos a serem analisados pelo método levou em consideração diversos fatores. Em primeiro lugar, com base na literatura e em conhecimentos prévios sobre o tema, buscou-se escolher compostos com sabida relevância para as variedades de uva específicas para suco (americanas e híbridas), como as antocianinas diglicosiladas. Também foram incluídos aqueles compostos com atividade biológica bem descrita na literatura, como o resveratrol e a quercetina. A taxifolina foi incluída por ser precursora de uma série de outras moléculas de interesse. Em relação à rota sintética, também se pensou que, se as uvas rústicas são ricas em antocianinas, também deveriam possuir flavanóis, já que os precursores são os mesmos. Esse fato se confirmou na maioria das amostras com relação à catequina, epicatequina e às procianidinas B1 e B2. No entanto, os flavanóis ligados ao ácido gálico (epicatequina galato e epigallocatequina galato) quase não foram encontrados nas amostras analisadas. Também, foram escolhidos alguns compostos mais comuns da espécie *V. vinifera*, como o quempferol, para que o método fosse o mais abrangente possível, podendo ser utilizado para analisar sucos produzidos em outros

continentes como o europeu. E, por fim, foi levada em consideração a disponibilidade de padrões comerciais e a viabilidade de aquisição dos mesmos.

Inicialmente, o método começou a ser desenvolvido objetivando determinar 19 compostos fenólicos. No entanto, ao longo dos processos de desenvolvimento e validação três deles tiveram de ser eliminados. Ao final, o método possibilita a quantificação de 16 compostos fenólicos distribuídos em cinco diferentes classes. A exclusão desses três compostos não eliminou nenhuma das classes previamente representadas.

Dentre os compostos que tiveram de ser excluídos, o primeiro deles, eliminado ainda durante o processo de desenvolvimento, é o *trans*-piceido, que pertence à classe dos estilbenos e nada mais é do que o resveratrol ligado a uma molécula de glicose (ver Figura 3.8). O problema encontrado com esse composto foi que, ao injetar o padrão, o pico com a massa correspondente ao piceido apresentava baixíssima intensidade, enquanto que havia um pico de grande intensidade justamente na massa e no tempo de retenção correspondentes ao resveratrol. Existem duas explicações possíveis para esse fenômeno: a primeira é que o padrão piceido poderia estar degradado e a segunda é que estivesse ocorrendo fragmentação na fonte, quebrando a molécula de piceido justamente na ligação com o açúcar. Pensando na possibilidade de fragmentação, foram testadas diferentes voltagens de cone, mas nenhuma das tentativas resolveu ou atenuou o problema.

O segundo composto eliminado, também na etapa de desenvolvimento do método, foi a antocianina delfinidina-3,5-diglicosídeo. A dificuldade encontrada com essa antocianina foi o formato do pico. Com 2% (v/v) de ácido fórmico na fase móvel, o formato de pico da delfinidina-3,5-diglicosídeo era muito ruim. Para se conseguir um formato de pico melhor para essa molécula seria necessário colocar pelo menos 5% (v/v) de ácido fórmico, deixando o pH da fase móvel muito baixo e prejudicando a análise dos compostos não antociânicos.

O terceiro e último composto excluído do método foi a epigallocatequina que pertence à classe dos flavanóis. Esta foi eliminada durante a validação porque, apesar de ter atingido os resultados esperados em todos os outros parâmetros avaliados, esta não foi aprovada na exatidão. O teste de exatidão da epigallocatequina foi repetido três vezes, mas, infelizmente, em todas as repetições só se conseguiu uma recuperação de aproximadamente 20% do padrão adicionado à amostra.



Inicialmente, cogitou-se a possibilidade de detectar e quantificar compostos fenólicos também em cascas de uva. A intenção era avaliar o rendimento do suquificador na elaboração do suco de uva integral, ou seja, avaliar o quanto dos compostos presentes nas cascas estavam passando para o suco. Com base na literatura (BURIN *et al.*, 2014; CARERI *et al.*, 2004; CARRERA *et al.*, 2012; SILVA, 2016; TOMAZ *et al.*, 2016), muitas tentativas foram feitas para extrair os compostos das cascas. As cascas utilizadas nos testes foram liofilizadas, congeladas com nitrogênio líquido ou utilizadas frescas. Os solventes extratores testados foram etanol 70% (v/v), etanol 70% (v/v) acidificado com ácido fórmico, metanol 50% (v/v), metanol 50% (v/v) acidificado com ácido fórmico e acetonitrila 26% (v/v) acidificada com ácido fórmico. Com relação à agitação das cascas com o solvente, foram testados diferentes tempos de agitação: 1, 3, 6, 8 ou 16 horas. Com relação ao tempo no ultrassom, foi testado sem ultrassom, com 10, 12, 15, 24 ou 36 minutos de sonicação. Essas variáveis foram testadas combinadas entre si de diversas formas. No entanto, após muitas tentativas, a avaliação quantitativa indicou que a maioria dos compostos não antociânicos não puderam ser extraídos e alguns foram extraídos em quantidades muito baixas. Já as antocianinas foram extraídas, mas, em sua maioria, a quantidade encontrada nos extratos foi inferior àquela encontrada nos sucos, evidenciando uma eficiência inadequada do processo de extração. A explicação para essa dificuldade em extrair os compostos das uvas pode estar na espécie (*Vitis labrusca*) cujas paredes celulares são mais rígidas que as da espécie *Vitis vinifera* (CREASY; CREASY, 2009). Novos e mais aprofundados testes são necessários para encontrar um método de extração eficiente.

Ao final, o método obtido e validado é bastante representativo, pois é capaz de detectar e quantificar compostos fenólicos quantitativamente importantes, das mais diversas classes e que são comumente encontrados tanto nas variedades de uvas *Vitis labrusca* quanto nas variedades *Vitis vinifera*. O fato do método ter sido desenvolvido em um equipamento de UPLC com detector de massas possibilitou a análise de um grande número de compostos em um curto espaço de tempo. Isso se deve não somente à eficiência do sistema de UPLC, mas também à especificidade do detector de massas que permite que se trabalhe com co-eluições desde que substâncias de mesma relação massa/carga estejam bem resolvidas entre si e a especificidade de cada pico seja devidamente comprovada. Sistemas de UPLC geram

um investimento financeiro inicial maior para o laboratório, mas que pode ser compensado ao longo do tempo com a redução do tempo de análise e também dos solventes utilizados. A diminuição da quantidade de solventes químicos utilizados está de acordo com os conceitos da Química Verde que busca processos químicos que reduzam ou eliminem o uso e geração de substâncias nocivas ao meio ambiente.

A segunda etapa do trabalho foi a análise quantitativa de compostos fenólicos em amostras de suco de uva utilizando o método desenvolvido e validado. Inicialmente, se pretendia fazer uma comparação entre os sucos elaborados com o suquificador integral e aqueles elaborados com a panela extratora por arraste de vapor. Para isso, seriam utilizadas duas variedades de uva (Bordô e BRS-Magna) cultivadas na cidade de Muçum. No entanto, essa estratégia foi abandonada tendo em vista que a questão da diluição do suco por parte da panela extratora já estava bem esclarecida. Ao mesmo tempo, novos projetos desenvolvidos na Embrapa Uva e Vinho envolvendo suquificador integral, permitiram a análise de 49 amostras de suco de uva.

O objetivo de aplicar o método validado a diferentes sucos incluiu também analisar sucos integrais disponíveis no mercado. No entanto, um número razoável de marcas foi eliminado devido à adição de conservantes e/ou antioxidantes na sua composição. Além disso, foram poucos os sucos comerciais varietais encontrados (somente da variedade Bordô). Por uma questão econômica, a maioria das vinícolas opta por elaborar seus sucos com uma mistura de variedades de uvas disponíveis na região. Essa mistura é variável em cada safra, em função também da disponibilidade dessas uvas. Isso pode incluir variedades próprias para vinho (*Vitis vinifera*) que, por um motivo ou outro, não tenham sido usadas para esse fim. Foram então obtidas sete amostras comerciais, totalizando 56 sucos analisados.

Durante a análise dos sucos, a etapa crítica foi encontrar a diluição adequada para a quantificação de cada composto. Como a concentração dos compostos fenólicos em cada uma das 56 amostras de suco era completamente desconhecida, foram feitas e injetadas várias diluições da mesma amostra: 5, 20, 50, 250, 750 e 1500 vezes. Um por um, começando da menor diluição até a mais alta, os compostos foram sendo quantificados conforme a diluição mais apropriada dentro do intervalo de linearidade de cada composto. O fato de terem sido analisadas amostras tão distintas evidencia a aptidão do método em diferenciá-las e quantificá-las corretamente. Os

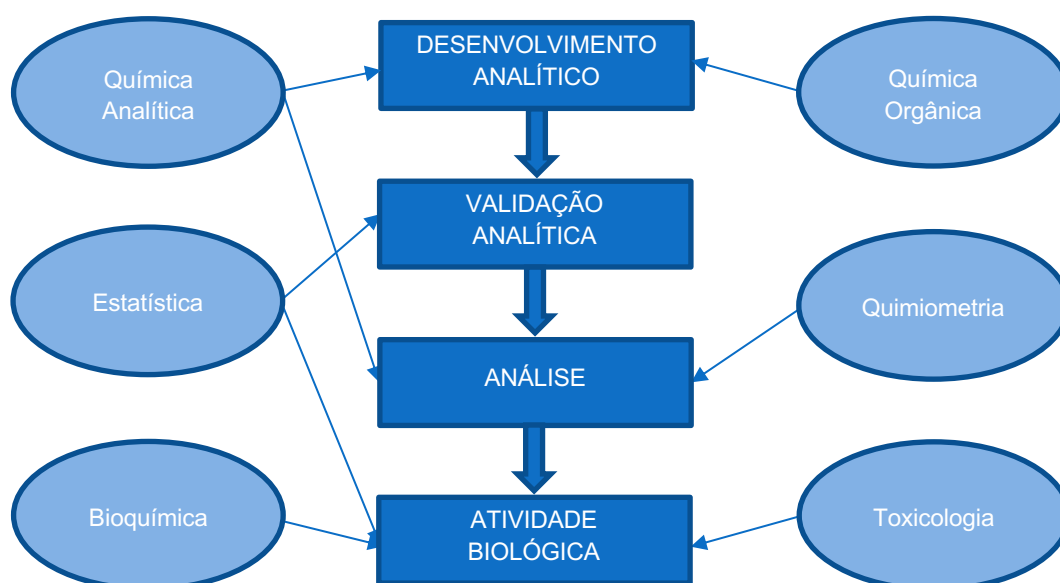
resultados encontrados, além de apresentarem, pela primeira vez, o perfil fenólico de sucos de uva produzidos e comercializados no Rio Grande do Sul, também mostram a qualidade dos sucos elaborados pelo suquificador integral bem como o potencial das variedades de uva que foram ou estão sendo desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Uva e Vinho. Foi realizada a análise multivariada de todos os resultados quantitativos encontrados em conjunto com Laboratório de Quimiometria e Instrumentação Analítica (LAQIA) do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A etapa final, mas não menos importante, do estudo apresentado nesta tese foi a comprovação das propriedades nutracêuticas do suco de uva através de uma avaliação de sua atividade biológica. Muitos trabalhos mostram os efeitos benéficos do consumo de compostos fenólicos bioativos. No entanto, não são muitos os estudos científicos especificamente com suco de uva.

Objetivando utilizar métodos menos agressivos com relação ao uso de animais em pesquisa, surgiu, primeiramente, a ideia de se trabalhar com *Zebrafish* (*Danio rerio*). No entanto, essa opção foi eliminada por falta de embasamento na literatura e por não termos encontrado um laboratório parceiro disposto a desenvolver o estudo nos moldes que tínhamos imaginado (utilizando o suco de uva como tal nos ensaios e não apenas os compostos fenólicos de forma isolada). Surgiu então a possibilidade de se trabalhar com o *C. elegans*, em conjunto com o Grupo de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans* da Universidade Federal do Pampa, em Uruguaiana. Esse modelo abriu uma janela de possibilidades. Seria possível avaliar a atividade antioxidante propriamente dita ou estudar a ação do suco de uva frente a um modelo de doença específico.

A doença de Alzheimer é uma das maiores preocupações do século 21. Muitas pesquisas têm sido realizadas em busca de uma possível cura, mas o que se sabe hoje é que a melhor arma contra o Alzheimer é a prevenção. Tendo em vista as características oxidativas da doença de Alzheimer, o modelo escolhido para a avaliação da atividade biológica do suco de uva foi a cepa transgênica de *C. elegans* que expressa o A $\beta$  humano. Os resultados encontrados mostram o potencial do suco de uva na prevenção da doença de Alzheimer e a importância do incentivo ao consumo dessa bebida em todas as partes do mundo.

Em resumo, na presente tese foi desenvolvido e validado um método analítico para a determinação quantitativa de compostos fenólicos bioativos em suco de uva, bem como foi avaliado, pela primeira vez, o perfil fenólico de sucos de uva elaborados no estado do Rio Grande do Sul. Além disso, foi estudado o valor nutracêutico do suco de uva frente a um modelo de doença de Alzheimer. As principais áreas de conhecimento desenvolvidas foram a Química Analítica, Química Orgânica, Quimiometria, Bioquímica, Toxicologia e Estatística. A figura 7.1 apresenta um resumo das etapas e das áreas de conhecimento desenvolvidas nesta tese.



**Figura 7.1** – Resumo das etapas e das áreas de conhecimento desenvolvidas na tese.

## **8. CONCLUSÕES**

---



- a) O suco de uva é uma bebida rica em compostos fenólicos com ação antioxidante e, por esse motivo, possui elevado valor nutracêutico, além de uma crescente relevância no desenvolvimento econômico de regiões com culturas vitícolas.
- b) O método desenvolvido e validado para a determinação de compostos fenólicos em suco de uva é simples e rápido, sendo capaz de quantificar um grande número de compostos fenólicos em poucos minutos.
- c) A análise quantitativa das amostras de suco demonstrou que o método é adequado para o uso pretendido, apresentando resultados confiáveis e sendo apto a avaliar quantitativamente sucos de uva das mais diversas naturezas, condições, idades e estilos.
- d) Dentre as 11 variedades de uva testadas, os sucos elaborados com as cultivares Bordô, BRS-Violeta e Seleção 13 são as mais ricas em compostos fenólicos, especialmente antocianinas.
- e) A malvidina-3,5-diglicosídeo é o composto fenólico encontrado em maior quantidade nos sucos. Dos compostos não antociânicos, o composto encontrado em maior quantidade foi a catequina.
- f) O estudo da atividade biológica do suco de uva mostrou que este é capaz de reduzir os efeitos da agregação A $\beta$  em um modelo de doença de Alzheimer, retardando suas consequências.





## 9. REFERÊNCIAS

---



ABE, L. T.; MOTA, R. V. Da; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 394–400, 2007.

ALEXANDER, A. G.; MARFIL, V.; LI, C. Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. **Frontiers in Genetics**, [s. l.], v. 5, 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2014.00279/abstract>>. Acesso em: 1 mar. 2020.

ANANGA, A.; GEORGIEV, V.; OCHIENG, J.; PHILLS, B.; TSOLOVA, V. Production of anthocyanins in grape cell cultures: a potential source of raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries. In: **The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive**. [s.l.] : IntechOpen, 2013. p. 247–287.

ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM, K. R. (EDS.). **Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications**. Boca Raton, FL: CRC, Taylor & Francis, 2006.

BADSHAH, H.; KIM, T. H.; KIM, M. O. Protective effects of anthocyanins against amyloid beta-induced neurotoxicity in vivo and in vitro. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 80, p. 51–59, 2015.

BASS, T. M.; WEINKOVE, D.; HOUTHOOFD, K.; GEMS, D.; PARTRIDGE, L. Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. **Mechanisms of Ageing and Development**, [s. l.], v. 128, n. 10, p. 546–552, 2007.

BLAINSKI, A.; LOPES, G.; DE MELLO, J. Application and analysis of the Folin-Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. **Molecules**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 6852–6865, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. **Diário Oficial da União (DOU), Brasília, DF**. 5 jun. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 24, de 30 de agosto de 2012. **Diário Oficial da União (DOU), Brasília, DF**. 31 ago. 2012.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014. **Diário Oficial da União (DOU), Brasília, DF**. 4 jul. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde - MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. **Diário Oficial da União (DOU), Brasília, DF**. 25 jul. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 14, de 8 de fevereiro de 2018. **Diário Oficial da União (DOU), Brasília, DF**. 9 mar. 2018.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 71–94, 1974.

BRERETON, R. G. **Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant**. 1. ed. Chichester: Wiley, 2003. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1198/tech.2004.s738>>. Acesso em: 10 nov. 2019.

BRESOLIN, B.; GULARTE, M. A.; MANFROI, V. Água exógena em suco de uva obtido pelo método de arraste a vapor. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 922–933, 2013.

BURDICK, D.; SOREGHAN, B.; KWON, M.; KOSMOSKI, J.; KNAUER, M.; HENSCHEN, A.; YATES, J.; COTMAN, C.; CHARLES, G. Assembly and aggregation properties of synthetic alzheimer's A4/ $\beta$  amyloid peptide analogs. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 267, p. 546–554, 1992.

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

CABRAL, V. de O. S. **Desenvolvimento qualitativo da uva Niagara Rosada cultivada no norte fluminense**. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Tese (Doutorado), 2009.

CAMARGO, U. A. **Isabel Precoce - Alternativa para a Vitivinicultura Brasileira. Comunicado Técnico 54**. 1. ed. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2004.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G. **BRS-Cora - Nova cultivar de uva para suco, adaptada a climas tropicais. Comunicado Técnico 53**. 1. ed. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2004.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; NACHTIGAL, J. C. **BRS-Violeta - Nova Cultivar de Uva para Suco e Vinho de Mesa. Comunicado Técnico 63**. 1. ed. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2005.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; RITSCHER, P. **BRS-Carmem - Nova cultivar de uva tardia para suco. Comunicado Técnico 84**. 1. ed. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2008.

CAMARGO, UMBERTO ALMEIDA; DIAS, M. F. **BRS-Rúbea. Comunicado Técnico 33**. 1. ed. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 1999.

CARDOZO, M. G.; MEDEIROS, N.; DOS SANTOS LACERDA, D.; DE ALMEIDA, D. C.; HENRIQUES, J. A. P.; DANI, C.; FUNCHAL, C. Effect of chronic treatment with conventional and organic purple grape juices (*Vitis labrusca*) on rats fed with high-fat diet. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 33, n. 8, p. 1123–1133, 2013.

CARERI, M.; CORRADINI, C.; ELVIRI, L.; NICOLETTI, I.; ZAGNONI, I. Liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry of cis-resveratrol and trans-resveratrol: development, validation, and application of the method to red wine, grape, and winemaking by products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 52, n. 23, p. 6868–6874, 2004.

CARRERA, C.; RUIZ-RODRÍGUEZ, A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 732, p. 100–104, 2012.

**Catálogo - Panela extratora de suco a vapor (suqueira) - Hauber Macanuda**. [s.d.]. Disponível em: <[http://assets.cimm.com.br/uploads/cimm/produto/ficha/28486/EXTRATORAS\\_DE\\_SUCO\\_A\\_VAPOR\\_PSM\\_MANUAL\\_DE\\_INSTRU\\_ES\\_0814.pdf](http://assets.cimm.com.br/uploads/cimm/produto/ficha/28486/EXTRATORAS_DE_SUCO_A_VAPOR_PSM_MANUAL_DE_INSTRU_ES_0814.pdf)>. Acesso em: 4 abr. 2019.

CHEN, W.; REZAIZADEHNAJAFI, L.; WINK, M. Influence of resveratrol on oxidative stress resistance and life span in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 65, n. 5, p. 682–688, 2013.

CORSI, A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. **A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans***. 2015. Disponível em: <[http://www.wormbook.org/chapters/www\\_celegansintro/celegansintro.html#sec3](http://www.wormbook.org/chapters/www_celegansintro/celegansintro.html#sec3)>. Acesso em: 9 fev. 2020.

CREASY, G. L.; CREASY, L. L. **Grapes**. Wallingford, UK; Cambridge, MA: CABI, 2009.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. **Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet**. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.2237>>. Acesso em: 22 abr. 2019.

CULETTO, E.; SATTELLE, D. B. A role of *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. **Human Molecular Genetics**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 869–977, 2000.

**Cultivares de uva e porta-enxertos de alta sanidade - Niagara Rosada**. [s.d.]. Disponível em: <[https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/cultivares-e-porta-enxertos/cultivares-de-dominio-publico/asset\\_publisher/rE0HjHq6jP8J/content/cultivar-niagararosa/1355300](https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/cultivares-e-porta-enxertos/cultivares-de-dominio-publico/asset_publisher/rE0HjHq6jP8J/content/cultivar-niagararosa/1355300)>. Acesso em: 12 jan. 2020.

DA SILVA, L. F.; GUERRA, C. C.; FORESTI, A.; BERGOLD, A. M. Verification of the selectivity of a liquid chromatography method for determination of stilbenes and flavonols in red wines by mass spectrometry. **Chemical Papers**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 661–672, 2017.

DANI, C.; OLIBONI, L. S.; VANDERLINDE, R.; BONATTO, D.; SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally-produced grapes. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 45, n. 12, p. 2574–2580, 2007.

DANI, C.; OLIBONI, L. S.; VANDERLINDE, R.; PRA, D.; DIAS, J. F.; YONEAMA, M. L.; BONATTO, D.; SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. Antioxidant activity and phenolic and mineral content of Rose grape juice. **Journal of Medicinal Food**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 188–192, 2009.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 7, p. 1085–1097, 1995.

DUTRA, M. da C. P.; RODRIGUES, L. L.; DE OLIVEIRA, D.; PEREIRA, G. E.; LIMA, M. dos S. Integrated analyses of phenolic compounds and minerals of Brazilian organic and conventional grape juices and wines: Validation of a method for determination of Cu, Fe and Mn. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 269, p. 157–165, 2018.

EVORA, P. R. B.; PEARSON, P. J.; SECCOMBE, J. F.; SCHAFF, H. V. Lesão de isquemia-reperfusão. aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s. l.], v. 66, p. 7, 1996.

FAO. **Codex standard for grape juice preserved exclusively by physical means - CODEX STAN 82-1981 (World-wide Standard)**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1981.

FAO-OIV. **TABLE and dried grapes- Non-alcoholic products of the vitivinicultural sector intended for human consumption. FAO-OIV FOCUS 2016**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations and International Organisation of Vine and Wine, 2016.

FLAMINI, R.; MATTIVI, F.; ROSSO, M.; ARAPITSAS, P.; BAVARESCO, L. Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 19651–19669, 2013.

FOUAD, G. I.; RIZK, M. Z. Possible neuromodulating role of different grape (*Vitis vinifera* L.) derived polyphenols against Alzheimer's dementia: treatment and mechanisms. **Bulletin of the National Research Centre**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 108, 2019.

FRACASSETTI, D.; LAWRENCE, N.; TREDoux, A. G. J.; TIRELLI, A.; NIEUWOUDT, H. H.; DU TOIT, W. J. Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 128, n. 4, p. 1136–1142, 2011.

**GENOMENET**. 2019. Disponível em: <[www.genome.jp](http://www.genome.jp)>. Acesso em: 7 abr. 2019.

GRISWOLD, M. G. *et al.* Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, [s. l.], v. 392, n. 10152, p. 1015–1035, 2018.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry: a textbook**. Berlin ; New York: Springer, 2004.

GUERRA, C. C. Vinho tinto. In: **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. 1. ed. São Paulo: Edgar Blücher, 2010. v. 1p. 492.

GUERRA, C. C. Polifenóis da uva e do vinho. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 90–100, 2012.

GUERRA, C. C.; BITARELO, H.; BEN, R. L.; MARIN, A. **Sistema para elaboração de suco de uva integral em pequenos volumes: Suquificador Integral. Documentos, 96**. 1. ed. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2016.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – *quo vadis?* **Trends in Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 125–130, 2011.

HE, F.; MU, L.; YAN, G.-L.; LIANG, N.-N.; PAN, Q.-H.; WANG, J.; REEVES, M. J.; DUAN, C.-Q. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. **Molecules**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 9057–9091, 2010.

HELPER, G. A.; BOCK, F.; MARDER, L.; FURTADO, J. C.; COSTA, A. B. Da; FERRÃO, M. F. ChemoStat, um software gratuito para análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, [s. l.], v. 38, p. 575–579, 2015.

HOFFMAN, A.; CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G. **Sistema de produção de uvas rústicas para processamento em regiões tropicais do Brasil**. 2005. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasRusticasParaProcessamento/index.htm>>. Acesso em: 7 fev. 2019.

HOFFMANN, E. De; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. 3rd ed ed. Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ: J. Wiley, 2007.

HOLTON, T. A.; CORNISH, E. C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 7, p. 1071–1083, 1995.

ICH. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. [s.l.] : International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, 2005.

JACKSON, R. S. **Wine science: principles and applications**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier Acad. Press, 2008.

JAYASENA, T.; POLJAK, A.; SMYTHE, G.; BRAIDY, N.; MÜNCH, G.; SACHDEV, P. The role of polyphenols in the modulation of sirtuins and other pathways involved in Alzheimer's disease. **Ageing Research Reviews**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 867–883, 2013.

JOMOVA, K.; VONDRAKOVA, D.; LAWSON, M.; VALKO, M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 345, n. 1–2, p. 91–104, 2010.

JÚNIOR, E. da S. P.; MEDEIROS, N. da S.; DANI, C.; FUNCHAL, C. Suco de uva: fonte de compostos bioativos com benefício à saúde. **Nutrição Brasil**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 185–191, 2013.

KIM, T.-S.; PAE, C.-U.; YOON, S.-J.; JANG, W.-Y.; LEE, N. J.; KIM, J.-J.; LEE, S.-J.; LEE, C.; PAIK, I.-H.; LEE, C.-U. Decreased plasma antioxidants in patients with Alzheimer's disease. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 344–348, 2006.

LA CRUZ, A. A. D.; HILBERT, G.; MENGIN, V.; RIVIÈRE, C.; OLLAT, N.; VITRAC, C.; BORDENAVE, L.; DECROOCQ, S.; DELAUNAY, J.-C.; MÉRILLON, J.-M.; MONTI, J.-P.; GOMÈS, E.; RICHARD, T. Anthocyanin phytochemical profiles and anti-oxidant activities of *Vitis candicans* and *Vitis doaniana*. **Phytochemical Analysis**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 446–452, 2013.

LAGO-VANZELA, E. S.; DA-SILVA, R.; GOMES, E.; GARCÍA-ROMERO, E.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Phenolic composition of the edible parts (flesh and skin) of Bordô grape (*Vitis labrusca*) using HPLC–DAD–ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 59, n. 24, p. 13136–13146, 2011.

LEKLI, I.; RAY, D.; DAS, D. K. Longevity nutrients resveratrol, wines and grapes. **Genes & Nutrition**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 55–60, 2010.

LIMA, M. dos S.; SILANI, I. de S. V.; TOALDO, I. M.; CORRÊA, L. C.; BIASOTO, A. C. T.; PEREIRA, G. E.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; NINOW, J. L. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 161, p. 94–103, 2014.

LINK, C. D. Expression of human  $\beta$ -amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 92, p. 9368–9372, 1995.

LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J.; QUIRÓS, A. R.-B. De. Trans-stilbenes in commercial grape juices: quantification using HPLC approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 1769, 2016.

LUBLIN, A. L.; LINK, C. D. Alzheimer's disease drug discovery: in vivo screening using *Caenorhabditis elegans* as a model for  $\beta$ -amyloid peptide-induced toxicity. **Drug Discovery Today: Technologies**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. e115–e119, 2013.

LUTZ, M.; CASTRO, E.; GARCÍA, L.; HENRÍQUEZ, C. Bioavailability of phenolic compounds in grape juice cv. Autumn Royal. **CyTA - Journal of Food**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 48–54, 2014.



MA, H.; DASILVA, N. A.; LIU, W.; NAHAR, P. P.; WEI, Z.; LIU, Y.; PHAM, P. T.; CREWS, R.; VATTEM, D. A.; SLITT, A. L.; SHAIKH, Z. A.; SEERAM, N. P. Effects of a standardized phenolic-enriched maple syrup extract on  $\beta$ -Amyloid aggregation, neuroinflammation in microglial and neuronal cells, and  $\beta$ -Amyloid induced neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 41, n. 11, p. 2836–2847, 2016.

MAEDA, H.; DUDAREVA, N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Biology**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 73–105, 2012.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Da. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 659–664, 2005.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 79, n. 5, p. 727–747, 2004.

MARCHI, P.; PAIOTTI, A. P. R.; NETO, R. A.; OSHIMA, C. T. F.; RIBEIRO, D. A. Concentrated grape juice (G8000™) reduces immunoexpression of iNOS, TNF-alpha, COX-2 and DNA damage on 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced-colitis. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 819–827, 2014.

MARCON, A. R. **Avaliação da incorporação de água exógena em suco de uva elaborado por diferentes processos**. Caxias do Sul: Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Dissertação (Mestrado), 2013.

MARTINO, K. G.; PAUL, M. S.; PEGG, R. B.; KERR, W. L. Effect of time–temperature conditions and clarification on the total phenolics and antioxidant constituents of muscadine grape juice. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 327–330, 2013.

MARZAROTTO, V. Suco de Uva. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Ed.). **Bebidas não-alcoólicas: ciência e tecnologia**. 1. ed. São Paulo: Edgar Blücher, 2010. v. 2p. 385.

MELLO, L. M. R. De. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2016. Comunicado Técnico 199**. 1. ed. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2017.

MELLO, L. M. R. De. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2017. Comunicado Técnico 207**. 1. ed. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2018.

MELLO, L. M. R. De. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2018. Comunicado Técnico 210**. 1. ed. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2019.

MELLO, L. M. R. De; MACHADO, C. A. E.; FIALHO, F. B.; GUZZO, L. C.; HOFF, R.; ZANESCO, R.; SILVA, S. M. R. Da. **Cadastro Vitícola do Rio Grande do Sul - 2013 a 2015**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2017.

MENET, M.-C. Principes de la spectrométrie de masse. **Revue Francophone des Laboratoires**, [s. l.], v. 2011, n. 437, p. 41–53, 2011.

NASCIMENTO, N. C. Do; FETT-NETO, A. G. Plant secondary metabolism and challenges in modifying its operation: an overview. **Methods in Molecular Biology**, [s. l.], v. 643, p. 1–13, 2010.

**National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research**. 2020. Disponível em: <<https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>>. Acesso em: 2 mar. 2020.

NATIVIDADE, M. M. P.; CORRÊA, L. C.; SOUZA, S. V. C. De; PEREIRA, G. E.; LIMA, L. C. de O. Simultaneous analysis of 25 phenolic compounds in grape juice for HPLC: method validation and characterization of São Francisco Valley samples. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 110, p. 665–674, 2013.

OIV. **2017 World Vitiviniculture Situation. OIV Statistical Report on World Vitiviniculture**. Paris: International Organisation of Vine and Wine, 2017.

OIV. **2018 World Vitiviniculture Situation. OIV Statistical Report on World Vitiviniculture**. Paris: International Organisation of Vine and Wine, 2018.

OIV. **Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis**. Paris: International Organisation of Vine and Wine, 2019. a. v. 1

OIV. **Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis**. Paris: International Organisation of Vine and Wine, 2019. b. v. 2

ONO, K.; YOSHIKE, Y.; TAKASHIMA, A.; HASEGAWA, K.; NAIKI, H.; YAMADA, M. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease: Anti-amyloidogenic effects of polyphenols. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 172–181, 2003.

PADILHA, C. V. da S.; MISKINIS, G. A.; DE SOUZA, M. E. A. O.; PEREIRA, G. E.; DE OLIVEIRA, D.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; LIMA, M. dos S. Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 228, p. 106–115, 2017.

PAIOTTI, A. P. R.; NETO, R. A.; MARCHI, P.; SILVA, R. M.; PAZINE, V. L.; NOGUTI, J.; PASTRELO, M. M.; GOLLÜCKE, A. P. B.; MISZPUTEN, S. J.; RIBEIRO, D. A. The anti-inflammatory potential of phenolic compounds in grape juice concentrate (G8000™) on 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 110, n. 06, p. 973–980, 2013.

PAZZINI, C. E. F.; COLPO, A. C.; POETINI, M. R.; PIRES, C. F.; DE CAMARGO, V. B.; MENDEZ, A. S. L.; AZEVEDO, M. L.; SOARES, J. C. M.; FOLMER, V. Effects of red wine Tannat on oxidative stress induced by glucose and fructose in erythrocytes in vitro. **International Journal of Medical Sciences**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 478–486, 2015.

PELUCCHI, C.; TRAMACERE, I.; BOFFETTA, P.; NEGRI, E.; VECCHIA, C. L. Alcohol consumption and cancer risk. **Nutrition and Cancer**, [s. l.], v. 63, n. 7, p. 983–990, 2011.

PIETTA, P.; MINOGGIO, M.; BRAMATI, L. Plant polyphenols: structure, occurrence and bioactivity. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. [s.l.] : Elsevier, 2003. v. 28p. 257–312.

REGITZ, C.; FITZENBERGER, E.; MAHN, F. L.; DUSSLING, L. M.; WENZEL, U. Resveratrol reduces amyloid-beta ( $A\beta_{1-42}$ )-induced paralysis through targeting proteostasis in an Alzheimer model of *Caenorhabditis elegans*. **European Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 741–747, 2016.

REGITZ, C.; MARIE DUSSLING, L.; WENZEL, U. Amyloid-beta ( $A\beta_{1-42}$ )-induced paralysis in *Caenorhabditis elegans* is inhibited by the polyphenol quercetin through activation of protein degradation pathways. **Molecular Nutrition & Food Research**, [s. l.], v. 58, n. 10, p. 1931–1940, 2014.

RENAUD, S.; DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the french paradox for coronary heart disease. **The Lancet**, [s. l.], v. 339, n. 8808, p. 1523–1526, 1992.

RIBEIRO, L. F.; RIBANI, R. H.; FRANCISCO, T. M. G.; SOARES, A. A.; PONTAROLO, R.; HAMINIUK, C. W. I. Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. **Journal of Chromatography B**, [s. l.], v. 1007, p. 72–80, 2015.

RICE-EVANS, C. Screening of phenolics and flavonoids for antioxidant activity. In: **Antioxidant Food Supplements in Human Health**. 1. ed. San Diego, California: Academic Press, 1999. p. 496.

RITSCHHEL, P.; MAIA, J. D. G.; CAMARGO, U. A.; ZANUS, M. C.; DE SOUZA, R. T.; FAJARDO, T. V. M. **BRS-Magna - Nova cultivar de uva para suco com ampla adaptação climática. Comunicado Técnico 125**. 1. ed. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2012.

RIZZON, L. A.; MANFROI, V.; MENEGUZZO, J. **Elaboração de suco de uva na propriedade vitícola. Documentos, 21**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 1998.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. **Suco de uva**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007.

SHANMUGANAYAGAM, D.; WARNER, T. F.; KRUEGER, C. G.; REED, J. D.; FOLTS, J. D. Concord grape juice attenuates platelet aggregation, serum cholesterol and development of atheroma in hypercholesterolemic rabbits. **Atherosclerosis**, [s. l.], v. 190, n. 1, p. 135–142, 2007.

SILVA, L. F. Da. **Uvas e vinhos tintos da campanha gaúcha: compostos fenólicos e atividade biológica**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Tese (Doutorado), 2016.

SILVA, L. F. Da; GUERRA, C. C.; KLEIN, D.; BERGOLD, A. M. Solid cation exchange phase to remove interfering anthocyanins in the analysis of other bioactive phenols in red wine. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 227, p. 158–165, 2017.

SILVA, G. M. M. **Caracterização dos mecanismos subjacentes da ação neuroprotetora do extrato de guaraná (*Paullinia cupana*) no organismo modelo *Caenorhabditis elegans***. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Curso de Biomedicina. Dissertação (mestrado), 2018.

SILVA, P. R.; VERDI, A. R.; FRANCISCO, V. L. F. dos S.; BAPTISTELLA, C. da S. L. Tradição do cultivo da uva Niagara no estado de São Paulo. **Revista de Informações Econômicas**, [s. l.], v. 36, p. 33–42, 2006.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentals of analytical chemistry**. 9. ed. Boston, MA: Cengage, 2014.

SNOPEK, L.; MLCEK, J.; SOCHOROVA, L.; BARON, M.; HLAVACOVA, I.; JURIKOVA, T.; KIZEK, R.; SEDLACKOVA, E.; SOCHOR, J. Contribution of red wine consumption to human health protection. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 1684, 2018.

SÓLYOM, K.; SOLÁ, R.; COCERO, M. J.; MATO, R. B. Thermal degradation of grape marc polyphenols. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 159, p. 361–366, 2014.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? **Comptes Rendus Biologies**, [s. l.], v. 327, p. 649–662, 2004.

SOUSA, J. S. I. **Uvas para o Brasil**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1996.

STALMACH, A.; EDWARDS, C. A.; WIGHTMAN, J. D.; CROZIER, A. Identification of (poly)phenolic compounds in concord grape juice and their metabolites in human plasma and urine after juice consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 59, n. 17, p. 9512–9522, 2011.

TEIXEIRA, J. B.; SOUZA JUNIOR, P. R. B. De; HIGA, J.; THEME FILHA, M. M. Mortality from Alzheimer's disease in Brazil, 2000-2009. **Cadernos de Saúde Pública**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 850–860, 2015.

THERON, C. **WineLand Media**. 2018. Disponível em: <<https://www.wineland.co.za/flash-detente-technology>>. Acesso em: 7 jan. 2020.

TOMAZ, I.; MASLOV, L.; STUPIĆ, D.; PREINER, D.; AŠPERGER, D.; KAROGLAN KONTIĆ, J. Multi-response optimisation of ultrasound-assisted extraction for recovery of flavonoids from red grape skins using response surface methodology: Optimization of UAE for recovery of flavonoids from grape skins by RSM. **Phytochemical Analysis**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 13–22, 2016.

TOSCANO, L. T.; TAVARES, R. L.; TOSCANO, L. T.; SILVA, C. S. O. Da; ALMEIDA, A. E. M. De; BIASOTO, A. C. T.; GONÇALVES, M. da C. R.; SILVA, A. S. Potential ergogenic activity of grape juice in runners. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, [s. l.], v. 40, n. 9, p. 899–906, 2015.

USP 40. **United States Pharmacopoeia**. 40. ed. Rockville, MD: United States Pharmacopoeial Convention, 2017.

VACCARI, N. F. de S.; SOCCOL, M. C. H.; IDE, G. M. Compostos fenólicos em vinhos e seus efeitos antioxidantes na prevenção de doenças. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 71–83, 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VARGAS, P. N.; HOELZEL, S. C. Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 5, 2008.

VENTURIN, L. **Estabelecimentos produtores de vinhos e bebidas**, 2014.

VERGARA, N. **Fabricação de suco de uva integral cresce mais de 100% no Brasil**. 2017. Disponível em: <<https://www.correiodopovo.com.br/not%C3%ADcias/rural/fabrica%C3%A7%C3%A3o-de-suco-de-uva-integral-cresce-mais-de-100-no-brasil-1.224290>>. Acesso em: 31 mar. 2019.

VINSON, J. A.; TEUFEL, K.; WU, N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. **Atherosclerosis**, [s. l.], v. 156, n. 1, p. 67–72, 2001.

WALSH, D. M.; SELKOE, D. J. A $\beta$  oligomers - a decade of discovery. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 101, n. 5, p. 1172–1184, 2007.

WEINER, M. F.; LIPTON, A. M. (EDS.). **The American Psychiatric Publishing textbook of Alzheimer disease and other dementias**. 1st ed ed. Washington, DC: American Psychiatric Publishing, 2009.

WHELAN, A. P.; SUTHERLAND, W. H. F.; MCCORMICK, M. P.; YEOMAN, D. J.; DE JONG, S. A.; WILLIAMS, M. J. A. Effects of white and red wine on endothelial function in subjects with coronary artery disease: Wine and coronary artery disease. **Internal Medicine Journal**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 224–228, 2004.

ZHANG, J.; WU, J.; LIU, F.; TONG, L.; CHEN, Z.; CHEN, J.; HE, H.; XU, R.; MA, Y.; HUANG, C. Neuroprotective effects of anthocyanins and its major component cyanidin-3-O-glucoside (C3G) in the central nervous system: An outlined review. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 858, p. 172500, 2019.



## 10. ANEXOS

---





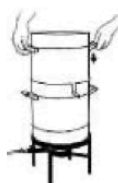
**Hauber***Qualidade Que é Marca!**Macanuda®*

**Panelas extratoras de suco a vapor (suqueiras).  
Modelos PSM. Construção em aço inox**

Equipamento composto de 03 peças básicas (exceto modelo PSM-7, composto de 2 peças), desenvolvido para quem deseja produzir sucos de frutas. O sistema permite extrair o máximo de sabor, aroma e vitamina das frutas, num processo higiênico e que preserva as características naturais. Fornecido em 03 capacidades: 7,0; 18,0; 30,0 e 80,0 kg (capacidades baseada em baga de uva). Você pode fazer sucos com uma grande variedade de frutas.



Comece montando a Base (B) sobre o fogareiro. Encha a panela (base) Com água até o frizo superior



Engate o Depósito de líquidos (C) sobre a base (B)



Engate o Depósito de Frutas (D) sobre o Depósito de Líquidos (C).



Complete o Depósito de Frutas (D) com frutas a seu critério.



Tampe e feche a torneira do Depósito (C). Acenda o fogareiro e deixe ferver a água da base (B) até transformar em vapor. Não deixe o depósito sem água enquanto está em funcionamento a suqueira.

**NOTA:**

O modelo PSM-7 possui a base (depósito de água) conjugado com o depósito de suco. A água é adicionada por um tubo lateral.

*Após transfir o suco do depósito (C) para um recipiente esterilizado ou diretamente para as garrafas (com este procedimento o suco se conserva de 06 a 12 meses.*

*O suco estará pronto para ser consumido ou armazenado.*

*Observação: o suco obtido no primeiro processo (que leva em torno de 1,30 h), recomendamos recolocar na suqueira (diretamente no depósito de frutas).*

- Use as frutas da época para rentabilizar mais a produção.
- Lave bem o equipamento antes do primeiro uso, utilizando água e sabão, para tirar o odor característico do produto novo.
  - Lave muito bem as frutas antes de utilizar, retirando a poeira e resíduos químicos.
  - Guarde os sucos em garrafas esterilizadas para aumentar a sua durabilidade.
- Para esterilizar, lave bem as garrafas com uma solução de água com 1% de água clorada (sanitária).
  - Encha as garrafas com o suco quente e feche com tampas herméticas.
  - O suco de uva deve ser feito utilizando apenas os bagos, sem o cacho.
- Frutas grandes como pêssegos, maçãs e abacaxis, devem ser cortadas para um melhor aproveitamento do espaço do depósito.
- Os restos das frutas que permanecem no depósito podem ser aproveitados na fabricação de geléias e schimiers.

Outras Máquinas & Equipamentos de Nossa Linha



**HAUBER** **MACANUDA**