



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – ICTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - PPGCTA

**PERFIL DE ANTOCIANINAS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE
VINHOS TINTOS BRASILEIROS**

Mariana de Vasconcellos Dullius

Porto Alegre

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – ICTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - PPGCTA

**PERFIL DE ANTOCIANINAS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE
VINHOS TINTOS BRASILEIROS**

Mariana de Vasconcellos Dullius

Engenheira Agrônoma – UFRGS – 2005/1

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos como um dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em
Ciência e Tecnologia de Alimentos**

Porto Alegre

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Dullius, Mariana de Vasconcellos
Perfil de Antocianinas e Potencial Antioxidante
de Vinhos Tintos Brasileiros / Mariana de
Vasconcellos Dullius. -- 2012.
156 f.

Orientador: Plinho Francisco Hertz.
Coorientador: Alessandro de Oliveira Rios.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. cor em vinhos. 2. conteúdo de polifenóis. 3.
neutralização de radicais-livres. 4. malvidina-3-
monoglicosídeo. 5. terroir brasileiro. I. Hertz,
Plinho Francisco, orient. II. Rios, Alessandro de
Oliveira, coorient. III. Título.

Mariana de Vasconcellos Dullius

Engenheira Agrônoma – UFRGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para a obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Aprovada em:

Homologado em:

Pela Banca Examinadora:

Por:

**Plinho Francisco Hertz
Orientador – PPGCTA/UFRGS**

**José Maria Wiest
Coordenador do Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos – PPGCTA**

**Alessandro de Oliveira Rios
Co-orientador – PPGCTA/UFRGS**

**Carlos Eugenio Daudt
Banca – PPGCTA/UFSM**

**Vitor Manfro
Diretor do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos ICTA/UFRGS**

**Maria do Carmo Ruaro Peralba
Banca – PPGQ/UFRGS**

**Isa Beatriz Noll
Banca – PPGCTA/UFRGS**

Àquele que SEMPRE acreditou:

Pai, a ti, dedico.

AGRADECIMENTOS

Passam-se os anos. Acumulam-se as pessoas, os abraços, as mãos amigas... Podemos fazer as coisas sozinhos... Mas, sem dúvida alguma, elas se tornam mais divertidas quando são compartilhadas... Um trabalho sério, pode se fazer descontraído... E um desafio difícil, consegue se converter em uma linda jornada...

Hoje é só o último dia dessa trajetória, mas certamente, os momentos mais bonitos e mais gratificantes foram construídos ao longo dela... Em cada gesto simples, em cada atitude parceira, em cada passo que se deu mais longe...

Muitos foram os tropeços... E o que existe de mais bonito nesse resultado final, é saber que um tombo não impediu a retomada do caminho e que a razão permitiu enxergar que nem sempre o percurso mais fácil era o mais apropriado... Mas certamente, foi na coragem – para não confessar, teimosia – e, especialmente, na cordial acolhida dos amigos, que eu encontrei forças para erguer a cabeça e olhar mais longe... E ver com mais clareza aonde eu queria chegar.

Mas, se eu confio cegamente naquele que chamo de amigo, devo confessar que a mesma segurança não deposito na minha memória. Inumeráveis foram as mãos que se estenderam a mim, inexauríveis foram os abraços que me recomfortaram, incalculáveis foram os cérebros que comigo pensaram junto...

Não esperem que eu mencione nomes, pois, inevitável – e imperdoável – seria o deslize que, injustamente, me faria não recordar alguém... Em vez disso, sintam-se abraçados, sintam-se recompensados, pois esse trabalho também foi feito por vocês... Compartilhem comigo dessa vitória, e recebam, de coração, essas simples palavras que aqui escrevo:

O meu mais sincero MUITO OBRIGADO a todos vocês que, de fato, contribuíram para que hoje eu esteja aqui... Mais longe...
E mais perto de onde ainda quero chegar!

*Se dois homens vêm andando por uma estrada, cada um com um pão,
e, ao se encontrarem, trocarem os pães, cada um vai embora com um.*

*Se dois homens vêm andando por uma estrada, cada um com uma
ideia, e, ao se encontrarem, trocarem as ideias, cada um vai embora
com duas.*

Provérbio Chinês

PERFIL DE ANTOCIANINAS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE VINHOS TINTOS BRASILEIROS¹

Autor: Mariana de Vasconcellos Dullius
Orientador: Prof. Plinho Francisco Hertz

RESUMO

A atividade antioxidante (AOX) de vinhos é decorrente, dentre outros fatores, da presença de substâncias fenólicas, como as antocianinas que, além de contribuírem para a formação da cor, devido a sua capacidade redutora, são capazes de neutralizar moléculas de radicais-livres. No presente trabalho, 92 amostras de vinhos tintos da safra 2008/2009, provenientes de diversas regiões do país, agrupadas de acordo com a sua similaridade (UF e fisiografia), foram analisados quanto à cor, através de parâmetros de luz, saturação e tonalidade; à concentração de antocianinas totais (por espectrofotometria diferencial e por CLAE); à caracterização dos pigmentos (por CLAE); à concentração de polifenóis totais (IPT) (pelo método de *Folin Ciocalteu's*); e à atividade antioxidante (por DPPH⁺), sendo que as duas últimas características foram avaliadas sob a forma de evolução temporal. Os resultados mostram que, em relação ao perfil evolutivo, pelo menos um dos grupos difere ($p < 0,05$) nos tempos. A região Vale do Rio São Francisco (VSF) exibiu, tanto os mais elevados valores de IPT em todos os tempos de análise [($t_{zero}=4.516$; $t_{25}=3.516$; $t_{35}=2.475$; $t_{45}=2.027$; $t_{55}=1.598$) mg.L^{-1} GAE], quanto a mais alta AOX, nos quatro primeiros dos cinco momentos avaliados. A região Oeste do Paraná (OPR) apresentou os mais baixos resultados para ambos os parâmetros considerados em todos os tempos medidos, sendo que os valores de IPT corresponderam a 47, 52, 54, 58 e 63% e os valores de AOX a 49, 55, 57, 61 e 79% dos valores encontrados para VSF. No decorrer das 55 semanas avaliadas, as diferenças entre os grupos tende a diminuir. Em relação aos pigmentos, 12 padrões comerciais permitiram comparar os vinhos no que diz respeito as presença e a quantificação destes compostos. À exceção de dois, todos os vinhos analisados por CLAE confirmaram a malvidina-3-monoglicosídeo (Mv-3G), como o composto antociânico predominante. O Vale dos Vinhedos (Vvi) apresentou os maiores conteúdos, tanto do pigmento majoritário da uva (Mv-3G – 38,66 $\mu\text{.L}^{-1}$), quanto da cianidina-3-monoglicosídeo (Cn-3G – 0,914 $\mu\text{.L}^{-1}$), composto antociânico mais relatado em alimentos. Correlações fortes e muito fortes foram observadas entre IPT e AOX e fortes entre antocianinas totais (expressas em Mv-3G por espectrofotometria diferencial) e Mv-3G (quantificada por CLAE). ANOVA mostrou que, em CLAE, não houve diferenças ($p < 0,1$) entre as regiões, indicando que variações internas nos grupos, sobressaíram-se às evidenciadas pelas regiões, não sendo possível caracterizá-las conforme o tipo nem a concentração de antocianinas.

Palavras-Chave: conteúdo de polifenóis, neutralização de radicais-livres, pigmentos antociânicos, cor em vinhos, malvidina-3-monoglicosídeo, *terroir* Brasileiro

¹Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos (especialidade/linha de pesquisa em Qualidade de Alimentos e projeto de pesquisa em Química e Bioquímica de Alimentos), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Março de 2012.

ANTHOCYANINS PROFILE AND SCAVENGING PROPERTIES OF BRAZILIAN RED WINES¹

Author: Mariana de Vasconcellos Dullius
Supervisor: Prof. Plinho Francisco Hertz

ABSTRACT

The antioxidant capacity (AOX) of wines is due, among other factors the phenolic substances, such as anthocyanins that, beyond to color contribution, present scavenging properties, having effect on radical oxygen species (ROS). In this study, 92 samples of 2008/2009 vintage Brazilian red wines, from dissimilar production areas, were grouped according to similarities (Federal State and physiographic attributes) and analyzed in terms of color, through light, saturation and hue parameters; in terms of total anthocyanin concentration (by pH-differential spectrophotometric methods and high performance liquid chromatography (HPLC)); in terms of pigment characterization (HPLC); in terms of total polyphenols concentration (IPT) (Folin *Ciocalteu's* method); and in terms of its scavenging properties (DPPH⁺), being the last two attributes analyzed over time evolution profile. The results showed that for the evolution profile, at least one of the groups differed ($p < 0,05$) in the evaluated times. The "Vale do Rio São Francisco" (VSF) region exhibited not only the most elevated values for IPT in all analyzed sampling [($t_{zero}=4,516$; $t_{25}=3,516$; $t_{35}=2,475$; $t_{45}=2,027$; $t_{55}=1,598$) mg.L^{-1} GAE], as the most AOX in the first four from the five evaluated moments. The "Oeste do Paraná" (OPR) presented the lowest results for both IPT and AOX parameters, in all measuring times, and the IPT values corresponded to 47, 52, 54, 58 e 63%, while the AOX values to 49, 55, 57, 61 e 79% from values found for VSF. Over the 55 weeks, the differences among groups tended to diminish. Considering the pigments, 12 commercial standards allowed to compare wines based on presence and concentration of these compounds. Except for two samples, all the HPLC-analyzed wines confirmed the malvidin-3-monoglucoside, as the anthocyanin most abounding in wines. The VVi exhibited the highest levels, even for the grape major pigment (Mv-3G – $38.66 \mu\text{.L}^{-1}$), as for cianidin-3-monoglucoside (Cn-3G – $0.914 \mu\text{.L}^{-1}$), the most reported anthocyanin in food. Strong and very strong correlations were found among IPT and AOX, while total anthocyanins (in Mv-3G base, by pH-differential analysis) and Mv-3G concentration (by HPLC) exhibited strong linear associations. ANOVA showed that, in terms of chromatographic analysis, no differences ($p < 0,1$) among regions were found, indicating that inside-groups variations were high enough to not allow the characterization according to qualitative and quantitative anthocyanin profile.

Keywords: polyphenolic content, scavenging properties, anthocyanin pigments, wine color, malvidin-3-monoglucoside, Brazilian *terroir*

¹Master of Science dissertation on Food Science and Technology (concentration área/research line on Food Quality, research project in Food Chemistry and Biochemistry), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, March, 2012.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVO	20
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
4.1. Embasamento Sócio-Econômico-Cultural	21
4.2. A Videira, a Uva e a Baga	23
4.2.1. Pluralidade Vitícola	23
4.2.2. Caracterização do Fruto e de sua Produção	24
4.2.3. Considerações Relacionadas ao Potencial Brasileiro	26
4.3. Relações Clima-Planta	27
4.4. Compostos Polifenólicos	31
4.5. Antocianinas	34
4.6. Ciclo dos Compostos Polifenólicos na Planta	39
4.6.1. Agentes Condicionantes para a Síntese	39
4.6.2. Biossíntese e Armazenamento na Planta	40
4.7. Influência Enológica na Formação de Cor em Vinhos Tintos	43
4.7.1. Etapas Mecânicas e Físicas	43
4.7.2. Etapas Químicas e Biológicas	44

4.8. Efeitos no Organismo Humano	48
4.8.1. Paradoxo Francês	48
4.8.2. Ação Protetora contra Enfermidades	50
4.9. Caracterização de Diferentes Regiões Brasileiras	51
4.9.1. Vale dos Vinhedos	51
4.9.2. Serra Gaúcha	53
4.9.3. Vale do Rio São Francisco	54
4.9.4. Campanha Gaúcha	56
4.9.5. Campos de Cima da Serra	58
4.9.6. Serra de Santa Catarina	59
4.9.7. Oeste do Paraná	61
4.10. ANÁLISES DE POLIFENÓIS, COR E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM VINHOS	63
4.10.1. Metodologia para Quantificação de Polifenóis Totais	63
4.10.2. Metodologias para Medida da Atividade Antioxidante	64
4.10.3. Metodologias para Análise de Cor	65
4.10.4. Metodologias para Qualificação e Quantificação de Antocianinas	68
4.10.4.1. <i>Espectrofotometria por pH-diferencial</i>	68
4.10.4.2. <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	69
5. RESULTADOS	71

5.1. EVOLUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM VINHOS TINTOS BRASILEIROS	72
5.2. COLOR AND ANTHOCYANINS CHARACTERIZATION OF BRAZILIAN RED WINE	94
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	134
7. REFERÊNCIAS	138
8. ANEXOS	154
8.1. Dados de IPT e AOX para Missões e Alto Feliz	155
8.2. Gráfico comparativo entre metodologias – DPPH⁺ e ABTS⁺	156

LISTA DE FIGURAS

4.3. Relações Clima-Planta

- Figura 1: Estádios fenológicos da videira de acordo com Eichorn e Lorenz (1984) **28**

4.5. Antocianinas

- Figura 2: Alimentos representativos das principais antocianinas e distribuição da cromaticidade **35**

- Figura 3: Antocianidinas e antocianinas com importância em alimentos e suas variações em relação às moléculas de açúcar ligadas à cadeia lateral: a) cianidina aglicona; b) cianidina-3-monoglicosídeo; c) cianidina-3,5-diglicosídeo; d) delphinidina aglicona; e) delphinidina-3-monoglicosídeo; f) malvidina aglicona; g) malvidina-3-monoglicosídeo; h) malvidina-3,5-diglicosídeo; i) pelargonidina aglicona; j) pelargonidina-3-monoglicosídeo; k) pelargonidina-3,5-diglicosídeo; e l) peonidina aglicona **36**

- Figura 4: Substituições nas cadeias laterais do cátion flavílium que determinam a estabilidade das diferentes antocianidinas, sendo a) delphinidina; b) cianidina; c) pelargonidina; d) petunidina; e) peonidina; e f) malvidina. Símbolos: hidrogênio (círculo vermelho); oxigênio (círculo azul); e carbono (círculo cinza) **37**

4.9.1. Vale dos Vinhedos

- Figura 5: Delimitação Geográfica do Vale dos Vinhedos **51**

- Figura 6: Classificação climática de Köppen **52**

4.9.3. Vale do Rio São Francisco

- Figura 7: Região do Vale do Rio São Francisco **55**

4.9.4. Campanha Gaúcha

Figura 8: Divisão territorial e política da região da Campanha Gaúcha **56**

Figura 9: Diversidade edáfica do Estado do Rio Grande do Sul com destaque para a região da Campanha **57**

4.9.5. Campos de Cima da Serra

Figura 10: Variação climática anual no Estado do Rio Grande do Sul, com destaque para a região dos Campos de Cima da Serra **59**

4.9.6. Serra de Santa Catarina

Figura 11: Zoneamento agroclimático para a cultura de *Vitis vinifera* no Estado de Santa Catarina **60**

4.9.7. Oeste do Paraná

Figura 12: Probabilidade da ocorrência de geada no Estado do Paraná **62**

4.10.3. Metodologias para Análise de Cor

Figura 13: Diagrama de cromaticidade de 1931 **66**

Figura 14: Diagrama de cromaticidade tridimensional com coordenadas retangulares (L, a*, b*). **67**

Figura 15: Diagrama de cromaticidade tridimensional com coordenadas cilíndricas (L, C, h) **67**

4.10.4.1. Espectrofotometria por pH-diferencial

Figura 16: Características espectrais de antocianinas a pH 1,0 e 4,5 **68**

5.1. Evolução de Compostos Fenólicos e da Atividade Antioxidante de Vinhos Tintos Brasileiros.

Figura 1: Evolução dos compostos fenólicos (IPT) de vinhos tintos procedentes de diferentes regiões do Brasil no período de zero a 55 semanas. Dados médios para as amostras das regiões Vale dos Vinhedos (Vvi), Serra Gaúcha (SGa), Vale do Rio São Francisco (VSF), Campanha Gaúcha (Cam), Campos de Cima da Serra (CCS), Serra de Santa Catarina (SSC) e Oeste do Paraná (OPR) **81**

Figura 2: Evolução da atividade antioxidante (AOX) de vinhos tintos procedentes de diferentes regiões do Brasil no período de zero a 55 semanas. Dados médios para as amostras das regiões Vale dos Vinhedos (Vvi), Serra Gaúcha (SGa), Vale do Rio São Francisco (VSF), Campanha Gaúcha (Cam), Campos de Cima da Serra (CCS), Serra de Santa Catarina (SSC) e Oeste do Paraná (OPR) **82**

Figura 3. Dados de insolação durante o período reprodutivo da videira para as regiões de Bento Gonçalves e Petrolina. Os dados Petrolina* correspondem ao período de seis meses que se estende de abril de 2009 a Setembro de 2009, por considerar a possibilidade de que o ciclo reprodutivo da planta possa ter acontecido neste período em vez daquele primeiro **83**

Figura 4. Variação de temperatura ambiente no local de estocagem dos vinhos durante o período de análise **85**

Figura 5. Variação da umidade ambiente no local de estocagem dos vinhos durante o período de análise **86**

5.2. Color and Anthocyanins Characterization of Brazilian Red Wines

Figure 1. Two-dimensional representation of color ranging from yellowish (northwest position) to reddish (southeast position) samples **115**

Figure 2. Color parameters comparison among samples from “Serra Gaúcha”, “Campanha Gaúcha”, “Vale do Rio São Francisco” and “Vale dos Vinhedos” Brazilian wine producer regions **116**

Figure 3. pH analysis in two different moments: the beginning of all analysis work and the end of all analysis work **118**

Figure 4. Distribution of the amounting ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of Cn-3G in the analyzed samples of each evaluated Brazilian region (a, b, and d). * The data refer to the average of the duplicate **121/122**

Figure 5. Distribution of the amounting ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of Mv-AG in the analyzed samples of each evaluated Brazilian region (a, b, c and d). * The data refer to the average of the duplicate **123/124**

Figure 6. Distribution of the amounting ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of Mv-3G in the analyzed samples of each evaluated Brazilian region (a, b, c and d). * The data refer to the average of the duplicate **125/126**

Figure 7. Distribution of the amounting ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of "Pg-3,5DG" in the analyzed samples of each evaluated Brazilian region (a, b, c and d). * The data refer to the average of the duplicate **127/128**

Figure 8. Distribution of the amounting ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of Dp-AG in the analyzed samples of each evaluated Brazilian region (b and d). * The data refer to the average of the duplicated **129**

Figure 9. Distribution of the amounting ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of Dp-3G in the analyzed samples of each evaluated Brazilian region (a and b). * The data refer to the average of the duplicated **130**

Figure 10. Example of a sample with five (1, 2, 3, 5 and 7) identified and quantified compounds ($>\text{LOD}$; $>\text{LOQ}$) and two (4 and 6) peaks under LOD and LOC values **131**

Figure 11. Correlation established between anthocyanins resulting data analyzed by HPLC **132**

Figure 12. Table of Contents graphics **133**

LISTA DE TABELAS

5.1. Evolução Temporal de Compostos Fenólicos e de Atividade Antioxidante de Vinhos Tintos Brasileiros.

Tabela 1: Classificação das amostras por variedade (merlot/cabernet sauvignon); região fisiográfica a qual pertencem (ESN=Encosta Superior do Nordeste; Ser=Sertão; Cam=Campanha Gaúcha; CCS=Campos de Cima da Serra; PSe=Planalto Serrano; e PGu=Planalto de Guarapuava); região de procedência do vinho (VVi=Vale dos Vinhedos; SGa=Serra Gaúcha; VSF=Vale do Rio São Francisco; Cam=Campanha Gaúcha; CCS=Campos de Cima da Serra; SSC=Serra de Santa Catarina; e OPR=Oeste do Paraná); e Unidade da Federação na qual tiveram origem (RS, BA, PE, SC e PR) **78**

Tabelas 2-6. Condições climáticas (precipitação, temperatura mínima, temperatura máxima, temperatura média e amplitude térmica) para o período de florescimento à colheita, dadas pelas principais estações meteorológicas das regiões em estudo. Os dados Petrolina* correspondem ao período de seis meses que se estende de abril de 2009 a Setembro de 2009, por considerar a possibilidade de que o ciclo reprodutivo da planta possa ter acontecido neste período em vez daquele primeiro. Fonte: Dados de Uruguaiana e Caxias do Sul (CemetRS/Fepagro); Dados de Bagé, Petrolina, Petrolina* e São Joaquim (INMET); dados de Bento Gonçalves (EMBRAPA, 2012) **79/80**

5.2. Color and Anthocyanins Characterization of Brazilian Red Wines

Table 1. Total color parameter variation ΔE^* of samples from “Vale dos Vinhedos”, Serra Gaúcha”, Vale do Rio São Francisco” and “Campanha Gaúcha” Brazilian wine producer regions **117**

Table 2. Total monomeric anthocyanin malvidin-monoglucoside expressed (*32, **33) **119**

Table 3. Identified peaks (IP), retention time (Rt), limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) found for the twelve analyzed standards **120**

1. INTRODUÇÃO

A história do vinho vem sendo escrita com a história da humanidade. Diversos países têm no vinho uma parte de seu histórico preservado, pois o vinho está inserido nestas sociedades, como parte do patrimônio cultural, como responsável pela movimentação da economia, como alicerce para o planejamento de políticas públicas de desenvolvimento e, ainda, como impulsionador da pesquisa que proporciona a geração de informação e a consolidação de conhecimentos que dão suporte e alimentam as universidades e centros de investigação científica.

Cientes da relevância do vinho e preocupados com a preservação deste patrimônio, diversos países, tradicionalmente envolvidos com a atividade de cultivo de videiras (viticultura) e a elaboração de vinhos (vinicultura), vêm trabalhando exaustivamente na busca por meios que os permitam salvaguardar as características de seus produtos baseados na originalidade e irreprodutibilidade. Entre esses meios, está a criação de indicações de procedência e de denominações de origem de produto. Através dessas ferramentas, consolida-se, por meios legais, a elaboração de vinhos exclusivos, os quais têm na sua personalidade a sua principal virtude.

A obtenção de vinhos únicos, não é, entretanto, uma ferramenta meramente legal. Ela está baseada em conceitos extensivamente estudados e trabalhados em vitivinicultura, entre os quais tem destaque o *terroir*, que, de um modo bastante simplificado, pode ser descrito como a interação de componentes de um sistema que envolve características do solo sobre o qual está sendo cultivada a videira, do clima sob o qual está inserida essa planta e do manejo – faça este referência, ora aos procedimentos agronômicos adotados no campo na hora de cultivar a variedade, ora à metodologia enológica aplicada ao processo de elaboração do vinho. Embora esse conceito possa ser aplicado a qualquer cultivo agrícola, é no cultivo da videira (*Vitis* sp.) que ele vem sendo amplamente trabalhado.

O *terroir* consiste, portanto, num conceito de caracterização. Para estratificá-lo, e melhor compreendê-lo, pode-se falar em caracterização a nível macro – envolvendo os três elementos anteriormente expostos – e a nível micro – onde então, cada um dos três conceitos mencionados pode ser exaustivamente

subdividido, de modo a buscar uma caracterização com o maior detalhamento possível. Com essa caracterização bem descrita, é possível que sejam estabelecidas comparações e, assim, podem-se confirmar as diferenças, que justificam a personalidade, a originalidade e a irreprodutibilidade de vinhos, gerando o argumento científico necessário para a consolidação das indicações de procedência e das denominações de origem.

Outra abordagem relevante é a de que os vinhos, por procederem de uvas, conservam consigo parte da composição daquelas, incluindo a presença de compostos que, hoje em dia, são diversas vezes apontados como benéficos da saúde humana. Entre eles, encontram-se além das já conhecidas vitaminas e dos minerais, os atualmente comentados compostos antioxidantes, entre os quais se destacam os polifenóis, que abrangem os compostos flavonoides e não-flavonoides. Dentro da imensa família dos flavonoides, têm destaque as antocianinas, as quais são responsáveis ainda por aportar a cor característica ao vinho tinto. A todas essas substâncias mencionadas, atribui-se o nome genérico de compostos bioativos, os quais são imensamente desejáveis em vinhos, e têm sua concentração nestes, variável em função de inúmeros fatores, que vão, desde a espécie do gênero *Vitis*, até as condições de armazenamento na garrafa.

São bastante diversos os compostos antioxidantes encontrados na uva, e conseqüentemente no vinho. E, das seis antocianidinas (antocianina desprovida do açúcar) frequentemente encontradas em alimentos, a videira (*Vitis* spp.) é a única espécie que apresenta cinco delas. Dessa forma, a imensa possibilidade de combinações dessas substâncias, influenciada por todos os fatores do *terroir* já previamente descritos, dá origem a vinhos que – como parte da sua personalidade – apresentam padrões distintos de perfil de antocianinas e de potencial antioxidante.

Mesmo diante deste cenário de variáveis, esta dissertação apresenta o estudo do perfil de antocianinas e a determinação do potencial antioxidante visando à caracterização do vinho tinto brasileiro com base nesses parâmetros. Dessa forma, busca-se contribuir, pelo menos em parte, na caracterização do vinho brasileiro em si.

2. OBJETIVO

Avaliar de forma qualitativa e quantitativa o perfil de antocianinas e o potencial antioxidante de vinhos tintos brasileiros.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estabelecer as condições cromatográficas para separar as antocianinas, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- ✓ Qualificar e quantificar as principais antocianinas encontradas em vinhos tintos brasileiros através da interpretação de cromatogramas gerados por CLAE;
- ✓ Avaliar colorimetricamente vinhos tintos através dos sistemas internacionais de cor da escala de Munsell (Y, x, y), CIE Lab, L*, a*, b* e L*, C*, h de coordenadas bidimensionais, e tridimensionais retangulares ou cilíndricas;
- ✓ Determinar a diferença total da cor entre vinhos, através do parâmetro ΔE^* ;
- ✓ Avaliar o potencial antioxidante de vinhos tintos brasileiros;
- ✓ Gerar informações que contribuam para a consolidação de denominações de origem para o vinho brasileiro;
- ✓ Gerar conhecimento para o estabelecimento de uma base de dados do vinho tinto brasileiro;
- ✓ Contribuir cientificamente para os diferentes segmentos da cadeia do vinho, incluindo entre eles o setor produtivo, o setor da comercialização, o setor de consumo e o setor da fiscalização;
- ✓ Repassar os conhecimentos e procedimentos desenvolvidos a Laboratórios Nacionais de Controle Agropecuário e a Secretaria de Defesa Agropecuária/MAPA.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Embasamento Sócio-Econômico-Cultural

O vinho brasileiro vem ganhando destaque e hoje já se pode afirmar que constitui um grande elemento para a economia do país. Segundo dados do AGRIANUAL (2009), em 2009, foram produzidas no Brasil 1.310.189 toneladas de uva, das quais 872.189 t são provenientes do Sul, e dessas, a grande maioria, 737.363 t, tem origem no Estado do Rio Grande do Sul. Segundo esta mesma fonte, pode-se estimar a importância dessa atividade agrícola para os estados sulinos quando se avalia a área cultivada. Dos quase 80 mil hectares de área de videiras, praticamente 60 mil se encontram na Região Sul do Brasil e, outra vez, o Rio Grande do Sul lidera o ranking com 48,3 mil hectares cultivados. (AGRIANUAL, 2009).

Dados anuais publicados pelo IBGE (2007) de 1990 a 2007, que têm em conta as 63 principais lavouras temporárias ou permanentes, colocam a uva como o oitavo produto mais importante, logo atrás da cana de açúcar, do tomate, do abacaxi, da maçã, da batata-inglesa, da laranja e da cebola. Em termos de produtividade, pode-se observar um aumento de 13,7 mil kg.ha⁻¹ em 1990 para 17,2 mil kg.ha⁻¹ em 2007 (IBGE, 2007).

Dados do Cadastro Vitícola de 2004 a 2009 (EMBRAPA, 2009), mostram que a quantidade de uva processada em 2009 foi de 534,13 milhões de toneladas, das quais, 462,02 milhões de toneladas estão representadas pelas uvas comuns (*Vitis* spp.) e 72,10 milhões de toneladas correspondem às uvas viníferas (*Vitis vinifera*). No decorrer do período de 2004 a 2009, a média de produção de vinhos situou-se na faixa dos 361,5 milhões de litros, sendo que o ano de 2006 apresentou a menor produção (276,33 milhões de litros) e o de 2008 alcançou o maior volume (427,97 milhões de litros). O ano de 2009 registrou o quarto maior valor de produção para o período analisado (341,82 milhões de litros) (EMBRAPA, 2009).

Cabe salientar que, mesmo considerando as diferenças de produção entre as safras de 2004 a 2009, o volume de vinho comum e o volume de vinho de viníferas não variam muito ao longo do período analisado, embora, quando comparados os dois, o vinho comum supera, em média, quatorze vezes o volume de vinho de

viníferas (EMBRAPA, 2009), justificando com distinção a representatividade que a uva americana e seus híbridos têm para a vitivinicultura brasileira.

O cultivo de videiras no Brasil também se expandiu em termos geográficos. A viticultura de clima temperado, concentrada nos Estados do Sul e do Sudeste, os quais representam juntos aproximadamente 88% da área de vinhedos e mais de 98% da produção de uva destinada ao processamento (IBRAVIN, 2010^a), vem abrindo espaço para as novas fronteiras vitícolas, como pode ser o caso da viticultura tropical do Vale do São Francisco.

Dados de comercialização de vinhos no Brasil mostram que houve acréscimo de 1,3% no primeiro semestre de 2010 – o melhor resultado desde 2006 – e valores de venda de 42,5 milhões de litros de vinho, frente aos 42 milhões comercializados no mesmo período de 2009. Deste volume, 2,32 milhões apenas correspondem a vinhos de viníferas, um volume 17,8% maior que o observado para o primeiro trimestre de 2009, sendo o maior volume registrado desde 2007, quando a venda de vinhos finos chegou a 3,13 milhões de litros (IBRAVIN, 2010^b). Boa parte do crescimento em volume comercializado de vinho de viníferas deve-se à entrada no mercado de novos rótulos brasileiros oriundos de regiões incipientes na vitivinicultura, as quais vêm ampliando a fronteira vitivinícola nacional e proporcionando ao consumidor produtos de distintos *terroirs*.

O crescimento da produção de uvas e vinhos, bem como a expansão e a diversificação das regiões produtoras fazem deste setor um dos mais importantes da agroindústria brasileira. Deste modo, a necessidade de obtenção de dados que caracterizem os produtos obtidos e que sirvam de base para a avaliação da qualidade e da autenticidade é de extrema importância (VALE, 2008).

O conceito de Indicação Geográfica (IG) foi sendo desenvolvido lentamente no transcurso da história de forma natural, quando produtores, comerciantes e consumidores comprovaram que alguns produtos de determinados lugares apresentavam qualidades particulares, atribuíveis a sua origem geográfica, e começaram a denominá-los com o nome geográfico de sua procedência (SEBRAE, 2006). Esse fenômeno teve início com certos produtos, como os vinhos, nos quais o efeito dos fatores naturais era mais evidente (SEBRAE, 2006) porque, como bem destaca Kramer (2007), os vinhedos expressam de tal forma o lugar em que são

cultivados que, nossa apreciação e julgamento, os relacionam diretamente com a fonte.

O fato de as denominações de origem existirem desde 1911 (Champagne, na França) no Velho Mundo, e de, segundo Kramer (2007), virem sendo criadas em todo o Novo Mundo, só ressalta a sua importância. Segundo esse mesmo autor, “sem elas, os vinhos existem num mundo sem gravidade, sem pertencerem a um lugar que se permita delinear, sendo impossível rastrear os presumíveis motivos de sua distinção” (KRAMER, 2007).

Toda a denominação de origem deve ser registrada no Bureau Internacional da Organização Mundial de Propriedade Intelectual (OMPI) – para que esteja protegida internacionalmente. De acordo com Bauemer (1991), há duas razões principais para proteger: primeiramente porque os consumidores devem ser protegidos contra práticas enganosas; e segundo porque geralmente a denominação envolve o nome de um país, de uma região ou de uma localidade, o que amplia o interesse desses lugares pelo estabelecimento da certificação. É justamente com a inclusão do termo “controlada” à denominação de origem, que algumas regiões mais tradicionais buscaram imprimir a sua responsabilidade sobre o produto produzido (KRAMER, 2007).

Assim sendo, a denominação de origem controlada (DOC) deve ser considerada sinal de distinção e de autenticidade de produto, e sua utilização deve ser restrita às empresas vinícolas que se situam dentro do perímetro abrangido pela DOC, não deixando de se constituir, na verdade, numa modalidade de propriedade intelectual, da mesma forma que o pode ser uma patente, uma marca registrada ou um direito autoral (CHADDAD, 1995).

4.2. A Videira, a Uva e a Baga

4.2.1. Pluralidade Vitícola

A uva pode ser considerada uma clássica fruta do Velho Mundo, da mesma forma que a azeitona, o figo e a tâmara. Desde a Era do Bronze, as uvas vêm sendo usadas como alimento – se proporcionam bagas grandes, suculentas e doces – e na

elaboração de bebidas – quando seus frutos são pequenos e geralmente ácidos (HORNSEY, 2007).

À medida que o Homem foi se dedicando ao cultivo da videira, foi também selecionando aquelas plantas que apresentavam características agronomicamente mais interessantes. Dessa forma, com o passar dos anos, preponderaram àquelas, plantas representativas da Família *Vitaceae*, do Gênero *Vitis* e dos subgêneros *Euvitis* e *Muscadiniae*, distribuídos em regiões de média latitude da América do Norte e Eurásia (HORNSEY, 2007; GIOVANINNI, 2008). Dentro do subgênero *Muscadiniae*, há duas espécies com importância: *Vitis rotundifolia* e *Vitis munsoniana*, sendo que sua importância reside especialmente na resistência à filoxera (*Phylloxera vastatrix*), sendo exploradas como material genético na produção de portaenxertos (GIOVANINNI, 2008). Todas as outras espécies remanescentes estão agrupadas dentro do subgênero *Euvitis* (HORNSEY, 2007), e, dentro dele, subdividem-se em: videiras européias, cuja única representante é a espécie *Vitis vinifera*, e todas as suas variedades; videiras asiáticas, cuja espécie de mais destacada importância é a *Vitis amurensis* devido a sua capacidade de tolerar temperaturas de até -40 °C (GIOVANINNI, 2008); e videiras americanas, que compõem a imensa maioria de espécies. Mesmo com a diversidade de espécies existentes, quase 95% dos vinhedos comerciais atualmente existentes no mundo é constituída de clones obtidos de variedades viníferas, enquanto que no Brasil, contrariando a todas as tendências, 85% da produção está representada pelas videiras americanas ou híbridas (GIOVANINNI, 2008). Cerca de 50% da produção brasileira de uva está representada por uma única variedade, a Isabel (*V. vinifera* x *V. labrusca*) (RIZZON e MIELE, 2006).

Assim sendo, o que geralmente se trabalha é a idéia de que uvas apropriadas para a vinificação pertencem ao gênero *Vitis vinifera* (HORNSEY, 2007), embora, esteja claro que no Brasil, as videiras americanas (*Vitis* spp.) e suas híbridas, desempenham um papel considerável na vitivinicultura.

4.2.2. Caracterização do Fruto e de sua Produção

A uva consiste num fruto não-climatérico (COOMBE, 1976), ou seja, que não é capaz de amadurecer depois de colhido. Dessa forma, a maturação de compostos

polifenólicos só ocorre enquanto se mantém estabelecido o vínculo do fruto à planta através do pedúnculo, sendo de fundamental importância a definição do momento ideal de colheita.

O padrão de crescimento da uva é representado por uma dupla curva sigmóide, na qual duas fases distintas são interrompidas por um intervalo de crescimento (HORNSEY, 2007; BOSS, DAVIES e ROBINSON, 1996; COOMBE, 1976). Durante a primeira fase, a baga acumula carboidratos que são aplicados no desenvolvimento das sementes, na multiplicação e expansão celular e na síntese de ácidos orgânicos (COOMBE, 1992). Já na segunda fase, quando se dá a maturação da baga, há: perda da rigidez da polpa e da película; acumulação de carboidratos solúveis e decréscimo do conteúdo total de ácidos orgânicos (FAMIANI *et al.*, 2000). Adicionalmente, em cultivares de uva tinta, antocianinas e outros flavonoides são sintetizados nessa segunda fase, e, num passo seguinte, são acumulados no epicarpo do fruto, conferindo a ele a pigmentação característica (FAMIANI *et al.*, 2000). Outros compostos polifenólicos, tais como as proantocianidinas, ou também chamados, taninos condensados, exibem um diferente momento de síntese, a qual inicia a partir da floração e, num padrão geral de acúmulo em plantas, são armazenados nas sementes e nos tegumentos (BOGS *et al.*, 2006).

É na primeira fase de crescimento que o fruto está exclusivamente sendo alimentado pelo xilema da planta, marcando esta como a fase mais suscetível ao déficit hídrico. A escassez de água influencia diretamente na expansão, reduzindo o tamanho final do fruto (THOMAS, MATTHEWS e SHACKEL, 2006), embora uma parte dessa redução possa também ser atribuída aos efeitos da maior concentração de ácido abscísico (ABA), que, ao limitar a divisão celular, provoca redução no tamanho final do fruto. Com a redução do tamanho final da baga, a relação epiderme/polpa é modificada (ROBY e MATTHEWS, 2004) e há maior concentração de pigmentos e compostos antioxidantes no fruto.

A partir do início da segunda fase de crescimento, quando a mudança de cor consiste num evento visualizável, ocorre o abrandamento de tecidos, além, é claro de que os frutos começam a acumular substâncias pigmentantes. Nessa fase, o fruto passa a estar conectado à videira através do floema (THOMAS, MATTHEWS e SHACKEL, 2006) e, substâncias de reserva, produzidas e armazenadas em outros órgãos da planta (folhas e raízes), passam a ser acumuladas no fruto. O déficit

hídrico, quando acontece depois da mudança de cor, diminui o conteúdo de polpa do fruto, outra vez modificando a relação epiderme/polpa e, quando muito intenso, enfraquece a epiderme através da redução da atividade da enzima pectinometilesterase (PME) (ROBY e MATTHEWS, 2004). Dessa forma, constituintes básicos da película como os taninos e as antocianinas sobressaem-se e o mosto destes frutos acaba sendo muito mais rico em derivados extraíveis da película (CHATELET *et al.*, 2008).

Embora a videira tenha preferência por crescer em áreas onde a água esteja prontamente disponível (RIAZ *et al.*, 2007), a planta apresenta – devido a sua rusticidade – facilidade de adaptação em ambientes hostis, podendo ser encontrada em ambientes extremamente áridos, como é o caso de regiões do Chile, da Austrália, da Espanha e até mesmo do Brasil (Petrolina – PE e Norte da Bahia). Essa adaptação está intimamente relacionada a mecanismos que a planta desenvolve como forma de combater o estresse, entre os quais se encontra a síntese de compostos polifenólicos (PASCHOLATI e LEITE, 1995).

4.2.3. Considerações Relacionadas ao Potencial Brasileiro

Devido a sua extensão continental, no Brasil, podem ser atualmente descritas diferentes regiões de cultivo para a videira, das quais se esperam distintas expressões varietais. Giovaninni e Manfroi (2009) definiram cinco diferentes *terroirs* para o Estado do Rio Grande do Sul (Serra Gaúcha, Serra do Sudeste ou Alto Camaquã, Campanha Gaúcha, Campos de Cima da Serra e Costa do Guaíba), dois para o Estado de Santa Catarina (Vale do Rio do Peixe e Serra Catarinense) e um para o conjunto que engloba os Estados da Bahia, Pernambuco e Minas Gerais, denominado Vale do São Francisco.

De acordo com Giovaninni e Manfroi (2009), em cada *terroir* brasileiro serão encontradas particularidades regionais, ambientais e climáticas, que influenciarão a matéria prima, base para a obtenção de vinhos. É de se esperar que, somando-se as particularidades de clones às características próprias de cada variedade e à adaptabilidade de cada cepa às diferentes regiões, gerem-se produtos viticolamente distintos que, quando combinados com todas as peculiaridades enológicas possíveis

de serem adotadas em cada elaboração, estar-se-á falando de uma enorme diversidade de produtos potencialmente capazes de serem explorados.

Assim sendo, o estabelecimento de perímetros fisicamente semelhantes, bem como a adoção de práticas e métodos de cultivos apropriados, visa – conciliando interesses comuns, de produtores – a esclarecer as práticas, a definir os métodos legais para a obtenção de produtos e a atuar na fiscalização de Denominações de Origem Controlada (DOC) (KRAMER, 2007).

4.3. Relações Clima-Planta

Agronomicamente falando, é fundamental ter-se em consideração que toda e qualquer condição ambiental exerce efeito sobre o desenvolvimento fenológico da planta. Por fenologia, entende-se o ramo da ecologia que estuda os fenômenos periódicos dos seres vivos e suas relações com as condições do ambiente, tais como temperatura, luz, umidade, etc. (DE FINA e RAVELO, 1973). Já por desenvolvimento, compreende-se que se trate das variações de volume, de peso, de forma e de estrutura nos seres vivos, sejam elas visíveis ou invisíveis (BERGAMASCHI, 2009).

As espécies vegetais, de acordo com o ciclo de desenvolvimento, são classificadas como perenes quando os indivíduos permanecem vivos por diversos anos, como é o caso da videira. Tal espécie é também agrupada entre aquelas que alternam entre um ciclo vegetativo e um período de repouso, dentro do mesmo ano. Não obstante, a videira é ainda considerada uma planta capaz de cumprir uma periodicidade anual, apresentando etapas fenológicas (figura 1) que acompanham as oscilações do ambiente. A ocorrência de uma estação seca (exemplo do semi-árido) ou de um inverno frio pode exigir um período de repouso (dormência), intercalado a períodos vegetativos. Assim, a planta cumpre um ciclo anual, embora a espécie seja classificada como perene (BERGAMASCHI, 2009).

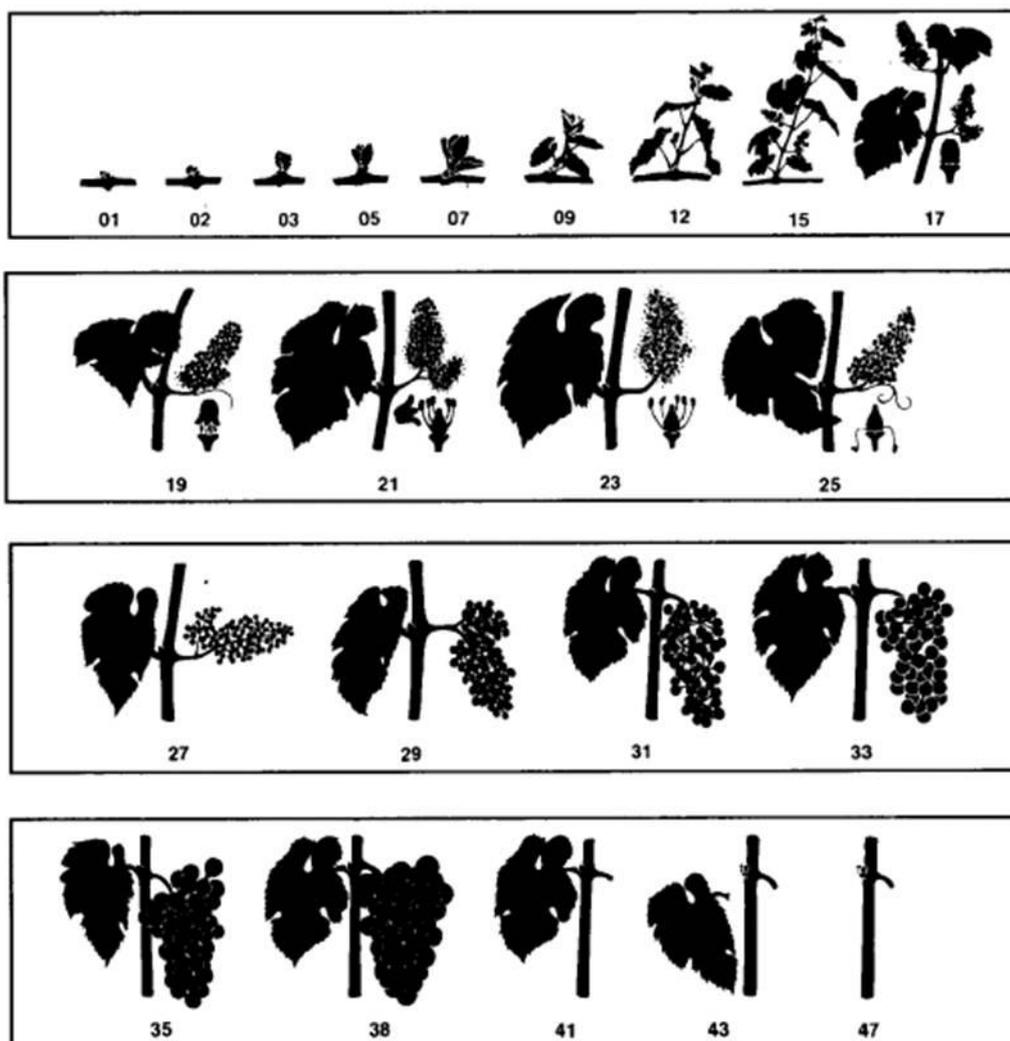


Figura 1: Estádios fenológicos da videira em semanas de acordo com Eichorn e Lorenz, 1984. 01) gemas dormentes; 02) inchamento de gemas; 03) algodão; 05) ponta-verde; 07) primeira folha separada; 09) duas ou três folhas separadas; 12) cinco ou seis folhas separadas e inflorescência visível; 15) alongamento da inflorescência e flores agrupadas; 17) inflorescência desenvolvida e flores separadas; 23) 50% das flores abertas (pleno florescimento); 25) 80% das flores abertas; 27) frutificação (limpeza de cachos); 29) grãos tamanho “chumbinho”; 31) Grãos tamanho “ervilha”; 33) início da compactação do cacho; 35) início da maturação; 38) maturação plena; 41) maturação dos sarmentos.

Fonte: Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/circular/cir056.pdf>. Acessado em: 14/02/2012

Outros conceitos importantes de serem mencionados são o foto-período e os graus-dia. O foto-período consiste no intervalo de tempo do dia em que há luz. Em regiões equatoriais, a variação do foto-período é praticamente nula, e os dias e as noites se mantêm em aproximadamente 12 horas cada. À medida que as latitudes se elevam, o foto-período varia, as estações climáticas tornam-se mais bem

definidas, os verões se caracterizam por dias longos e noites curtas e o inverno por noites longas e dias curtos (BERGAMASCHI, 2009).

O conhecimento da duração de cada uma das fases fenológicas é imprescindível para a viticultura de qualidade, uma vez que permite a racionalização do manejo da cultura a campo (MANDELLI *et al.* 2004), sendo possível uma melhor gestão das práticas necessárias ao cultivo, tais como as podas, as quebras de dormência, as aplicações de defensivos e/ou reguladores de crescimento, o manejo hídrico, entre outros, além, evidentemente de permitir um melhor uso da mão-de-obra, com significativa otimização dos recursos investidos (MURAKAMI, 2002).

Temperaturas de medianas a altas encurtam o ciclo vegetativo da planta, antecipando a maturação (SALAMONI, 2009). Pelo fato de que a síntese dos compostos de carbono é dependente das reservas acumuladas pela planta, através do processo fotossintético, e transferidas ao fruto nas fases de amadurecimento, o encurtamento do ciclo implica menor período de acúmulo, culminando com reservas energéticas mais baixas (SALAMONI, 2009). Neste sentido, Tarara *et al.* (2008) comprovaram que o aumento da temperatura provoca um incremento da atividade respiratória da planta gerando um declínio na acidez titulável atribuída à degradação de compostos ácidos da planta. A presença de tais compostos determina o pH do fruto, e um equilíbrio adequado entre as substâncias da baga influencia as propriedades tamponantes dos vinhos.

Tarara *et al.* (2008) reforçam a existência de uma sinergia entre fatores como a radiação solar e a temperatura do fruto para a expressão do perfil e da concentração de antocianinas em bagas da variedade merlot. Observou-se que radiações solares elevadas influenciam a temperatura da baga (YAMANE e SHIBAYAMA, 2006; MORI *et al.*, 2007, XU *et al.*, 2011) e que esse fato pode ser o responsável pela redução dos compostos fenólicos na baga, especialmente das antocianinas. Tal situação pode ser explicada já que, de acordo com Deloire e Hunter (2005), somente cerca de 10% do total da radiação solar global incidente é necessário para que sejam produzidos os efeitos benéficos associados à maturação do fruto. Segundo esses mesmos autores, ao se aumentar o nível de radiação solar, pode-se incorrer em riscos de escaldadura no fruto.

A temperatura atua de diversas formas na videira. Para desencadear o processo de dormência, temperaturas inferiores a 20 °C são exigidas, enquanto que

a saída do repouso vegetativo e o início da brotação, temperaturas entre 10 e 13 °C – ainda que nunca superiores a 18 °C – fazem-se necessárias (PEDRO JÚNIOR e SENTELHAS, 2003). Segundo esses mesmos autores, já na fase de desenvolvimento da baga, temperaturas ideais encontram-se na faixa dos 22 °C e, para a maturação, em torno de 27 °C situa-se a condição ótima.

No caso de regiões subtropicais e tropicais, em que não há uma demarcação muito precisa das estações do ano, o regime de chuvas acaba tendo uma relevância maior, já que o excesso de umidade nos cachos proporciona as indesejáveis podridões nos frutos, as quais comprometem a qualidade da uva para o processo de vinificação (TAVARES *et al.* 2004). Nesse sentido, a tomada de decisões das práticas agrícolas, tais como a poda de frutificação e a quebra da dormência, pode ser ajustada de modo a fazer com que as fases reprodutivas do ciclo fenológico da videira coincidam com os períodos de menor precipitação assegurando sanidade ao produto.

Devido ao fato de que as diversas variedades de uva respondem de forma diferenciada a soma de graus-dia necessários para o cumprimento do ciclo vegetativo do ano, da poda de inverno à colheita, tanto o efeito da soma térmica torna-se necessário, para o vencimento adequado das etapas fenológicas, quanto o efeito do frio é imprescindível, para que os fenômenos a ele relacionados contribuam com a qualidade de cada um dos estádios do ciclo da planta (BERGAMASCHI, 2009).

Tonnieto (1999) propôs considerar as condições térmicas relativas ao frio noturno sob a forma de um índice (índice nictotérmico). O índice informa as condições térmicas relativas à média das temperaturas mínimas ocorridas entre o período que se estende da mudança de cor das bagas à maturação das uvas, algo, considerando o ciclo normal da videira, compreendido entre dezembro e fevereiro.

Em áreas temperadas, o efeito do frio é muito importante, mormente para a delimitação das áreas apropriadas para o cultivo das diferentes variedades de videira, já que a entrada/saída dos ciclos vegetativos constitui uma característica varietal, devendo ser levada em consideração na hora de se tomar decisões a respeito do zoneamento agroclimático (BERGAMASCHI, 2009).

A regularidade e a intensidade de baixas temperaturas são fundamentais, pois oscilações durante o período de dormência podem fazer, ou com que a planta

permaneça por um maior período em repouso, ou com que acabem acontecendo brotações e florações desuniformes, permitindo ainda que um determinado percentual de gemas permaneça improdutivo naquele ano (PETRI, *et al.*, 1996).

De acordo com Villanova *et al.* (1972) *apud* Moura *et al.* (2007), o zero-vegetativo consiste em temperaturas igual ou inferiores a 10 °C, nas quais a videira reduz ao mínimo o seu dispêndio energético, a fim de apenas assegurar a manutenção do seu metabolismo basal.

Ainda que na fase final do ciclo sejam absolutamente definidoras as interações clima-planta, decisões agronômicas, tais como práticas de manejo do dossel, ajustes de rendimento de cachos/planta e decisões sobre o momento ideal para a colheita, etc., alteram as exigências térmicas da videira, marcando significativamente o ciclo produtivo da planta (MOURA *et al.* (2007).

A prática de se trabalhar mais de uma safra anual, devido aos drásticos contrastes climáticos que podem existir entre os diferentes períodos do ano, constitui um excelente sistema para o estudo e a compreensão das relações clima-planta e seus efeitos nas propriedades das uvas e, conseqüentemente, dos vinhos (XU *et al.*, 2011). Ainda que, no Brasil, até mesmo informações acerca do comportamento de ciclos normais de produção para regiões incipientes na vitivinicultura sejam escassas.

4.4. Compostos Fenólicos

Em seu ambiente natural, as plantas convivem com diversos tipos de estresse, sejam eles abióticos – provocados pelo vento, radiação, temperatura – ou bióticos, quando são decorrentes da ação de organismos vivos sobre as plantas (VULETA *et al.*, 2010). O estresse biótico pode ser exemplificado com a ação de microrganismos fitopatogênicos que – ao interferirem na homeostase celular, através de processos infecciosos – acarretam danos aos vegetais. Esses processos podem ser mais ou menos intensos em função de diversos fatores, tal como a predisposição da planta (genética, nutricional, etc.). Contudo, salvo em situações de alta pressão populacional do microorganismo e/ou alta suscetibilidade do hospedeiro, tais processos tendem a ser gradativos. Já o estresse abiótico, por não raro ocorrer em curtos espaços de tempo (VULETA *et al.*, 2010), pode levar a planta à morte com

facilidade. Igualmente, é sabido que esse tipo de estresse é capaz de operar como uma consistente força evolutiva, induzindo adaptações em populações de plantas (SORENSEN, KRISTENSEN e LOESCHCKE 2003). São exemplos de estresse abiótico a intensidade luminosa, as temperaturas extremas e a escassez hídrica, fenômenos que tendem a coexistir em períodos de seca (VULETA *et al.*, 2010).

Também é notório que plantas expostas a condições ambientais estressantes são estimuladas à superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS – do inglês *Reactive Oxygen Species*). Tais moléculas são derivadas tóxicas do oxigênio gasoso (O₂) e têm a particularidade de danificar macromoléculas celulares, como lipídios, proteínas e até mesmo o DNA (APEL e HIRT, 2004). Como consequência, há perda da homeostase celular e da planta como um todo e, dessa forma, há um prejuízo para a maioria dos processos metabólicos, incluindo reduções nos níveis de fotossíntese e da fotorrespiração (MITTLER, 2002; SUZUKI E MITTLER, 2006).

Concentrações elevadas de ROS conduzem à morte celular, contudo, em concentrações intermediárias ou mínimas, ROS podem ter uma importante função regulatória, pois contêm o vigor e induzem à formação de diversos antioxidantes e de mecanismos de reparo celular (TEMPLE, PERRONE, e DAWES, 2005).

Com o objetivo de minimizar os danos provocados por ROS, as plantas desenvolveram um sistema de defesa antioxidante de alta eficiência, o qual inclui tanto mecanismos enzimáticos como componentes não enzimáticos (VULETA *et al.*, 2010). Entre os mecanismos enzimáticos, encontram-se três principais enzimas, com atividade anti-ROS: a superóxido-dismutase (SOD); a catalase (CAT) e a polifenoloxidase (POD) (SCANDALIOS, 1993; GECHEV *et al.*, 2002). Entre os mecanismos não enzimáticos, encontram-se substâncias como o ascorbato, a glutatona e o tocoferol, além de diversos compostos carotenóides e polifenólicos (SCANDALIOS, 1993). Muitas vezes, ambos os mecanismos são ativados de forma conjunta, de modo a reforçarem a defesa geral da planta (VULETA *et al.*, 2010).

Entre os compostos fenólicos presentes na baga, os de maior destaque são: flavonoides – que correspondem às antocianinas, aos flavonóis e às proantocianidinas (também denominadas de taninos condensados) – e os não-flavonoides, onde os estilbenos constituem os principais representantes do grupo (KENNEDY, MATTHEWS e WATERHOUSE, 2002).

Entre os flavonóis de destacada importância, encontram-se a quercetina e a miricetina (MATTIVI *et al.*, 2006). Já o resveratrol é considerado o estilbeno mais bioativo em videiras (BAVARESCO *et al.*, 2008). Quimicamente, é conhecido por 3,5,4'-trihidróxiestilbeno e apresenta dois isômeros ópticos: cis-resveratrol e trans-resveratrol. A este último – por ser o único que apresenta atividade biológica – atribuem-se todos os benefícios associados ao resveratrol (ALVES, 2006).

A película de uvas frescas contém entre 50 e 100 mg.g⁻¹ de resveratrol e no vinho tinto a sua concentração fica em torno de 1,5 a 3 mg.L⁻¹ (JEANDET, BESSIS e GAUTERON, 1991). Embora o resveratrol esteja presente em menor concentração em outros vinhos que não tintos, quantidades apreciáveis desse composto foram relatadas para vinhos brancos e rosados (ROMERO-PÉREZ *et al.*, 1996).

A capacidade antioxidante de vinhos geralmente é medida através do Índice de Polifenóis Totais (IPT) (MAMEDE e PASTORE, 2004) e, devido à constituição variável destes compostos no fruto, há variações muito grandes entre os potenciais anti-ROS dos vinhos. Estas mesmas autoras apontam que parte dessa diferença também é atribuída a diferenças entre as estruturas dos diversos polifenóis.

Landrault *et al.* (2001) e Xu *et al.* (2010) descrevem correlações importantes entre o conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante de vinhos e, ainda que Xu *et al.* (2011) afirmem que, justamente devido a essa relevante associação linear, uvas com maior riqueza em compostos fenólicos também apresentaram maior atividade antioxidante, maior conteúdo destas substâncias não implica necessariamente atividade antioxidante mais elevada (RIVERO-PÉREZ, MUÑÍZ, GONZÁLEZ-SANJOSÉ, 2007). Parece que a atividade antioxidante de vinhos está mais relacionada ao tipo de compostos fenólicos presentes (RICE-EVANS, MILLER, 1996) sendo que flavonoides, proantocianidinas e antocianinas são os que apresentam maior potencial antioxidante (RICE-EVANS, MILLER, 1996; FRANKEL, WATERHOUSE e TEISSEDRE, 1995).

Kliwer e Torres (1972) *apud* Bohn (2007) relatam que ainda que as temperaturas diurnas tenham efeito sobre a coloração das uvas, as temperaturas noturnas exercem efeito ainda maior. Tomana *et al.* (1979) *apud* Bohn (2007) comprovam um aumento no teor de antocianinas causado por temperaturas mais baixas durante a maturação do fruto. Mori *et al.* (2007) demonstraram que temperaturas diurnas de 35 °C e noturnas de 20 °C, do início da troca de cor

(*véraison*) até o final da colheita, reduziram o conteúdo total de antocianinas em cabernet sauvignon. As temperaturas ótimas de acúmulo de compostos pigmentantes foi relatada por Yamane e Shibayama (2006) como estando compreendidas entre o intervalo de 18 °C para temperaturas noturnas e 24 °C para temperaturas diurnas. Pirie (1977) em estudo anterior, já havia chegado à conclusão de que entre 17 °C noturnos e 26 °C diurnos situa-se a faixa ideal de temperaturas para o acúmulo adequado de substâncias de cor na uva.

Em relação às propriedades antioxidantes, Xu *et al.* (2011) verificaram comportamento distinto, por diferentes métodos, para videiras com ciclo vegetativos distribuídos em diferentes períodos do ano (verão ou inverno). Estes mesmos autores mostraram que quando os frutos foram colhidos no inverno, além de haver conteúdo fenólico aumentado, compostos antociânicos específicos, representados por glicosídeos de delphinidina, de cianidina, de peonidina e de malvidina, intensificaram as suas concentrações.

4.5. Antocianinas

As antocianinas constituem uma das principais classes de pigmentos vegetais que atuam em múltiplas funções eco-fisiológicas, as quais incluem a sinalização para insetos polinizadores e dispersores de sementes (GROTEWOLD, 2006) além da proteção às condições de estresse vegetal (GOULD, 2004).

As antocianinas têm capacidade foto-inibitória e são capazes de aliviar o estresse foto-oxidativo das células vegetais através da absorção de energia *quanta* que, em outro caso, seria interceptada pela clorofila (HARVAUX e KLOPPSTECH, 2001). Assim sendo, as antocianinas desempenham um importante papel na proteção das membranas tilacóides da célula vegetal, pois capturam e sequestram ROS antes que eles possam causar danos estruturais a essas formações celulares (HARVAUX e KLOPPSTECH, 2001). Estes mesmos autores, em estudos com mutantes de *Arabidopsis* (*Arabidopsis sp.*), demonstraram que tal mecanismo consiste numa estratégia de foto-proteção a longo prazo da qual a planta dispõe.

Sendo derivadas da rota fenilpropanoide, as antocianinas apresentam coloração que varia do vermelho ao azul (figura 2), passando pela púrpura e pelo violeta (VAN TUNEN e MOL, 1991).

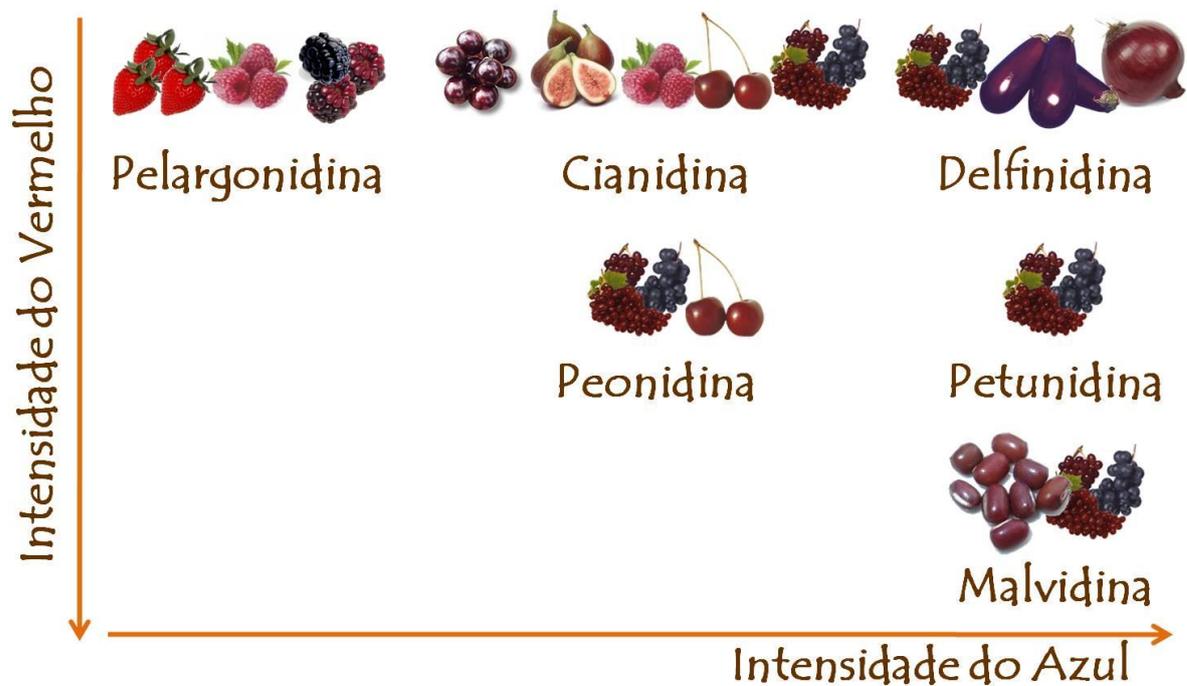


Figura 2: Alimentos representativos das principais antocianinas e distribuição da cromaticidade
 Fonte: Adaptado de Fennema, 2000

Bioquimicamente, trata-se de compostos heterosídeos formados pela combinação de uma aglicona (antocianidina) e de um açúcar, geralmente glicose (GIOVANINNI e MANFROI, 2009). Embora existam aproximadamente 400 antocianinas diferentes (KONG *et al.*, 2003), cerca de 22 agliconas são conhecidas, sendo 18 delas de ocorrência natural e seis com destacada importância (figura 3) em alimentos: pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina e malvidina (FRANCIS, 2000), das quais todas, com exceção da pelargonidina, têm ocorrência relatada na uva (COULTATE, 2004).

A distribuição mais comum das seis antocianinas em alimentos segue a seguinte proporção: cianidina (50%); pelargonidina, peonidina e delfinidina (cada uma com 12%); e petunidina e malvidina (contribuindo individualmente com 7%) (KONG *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2010). Ainda que varie conforme a casta, na uva, a malvidina é sempre a antocianidina majoritária (COULTATE, 2004).

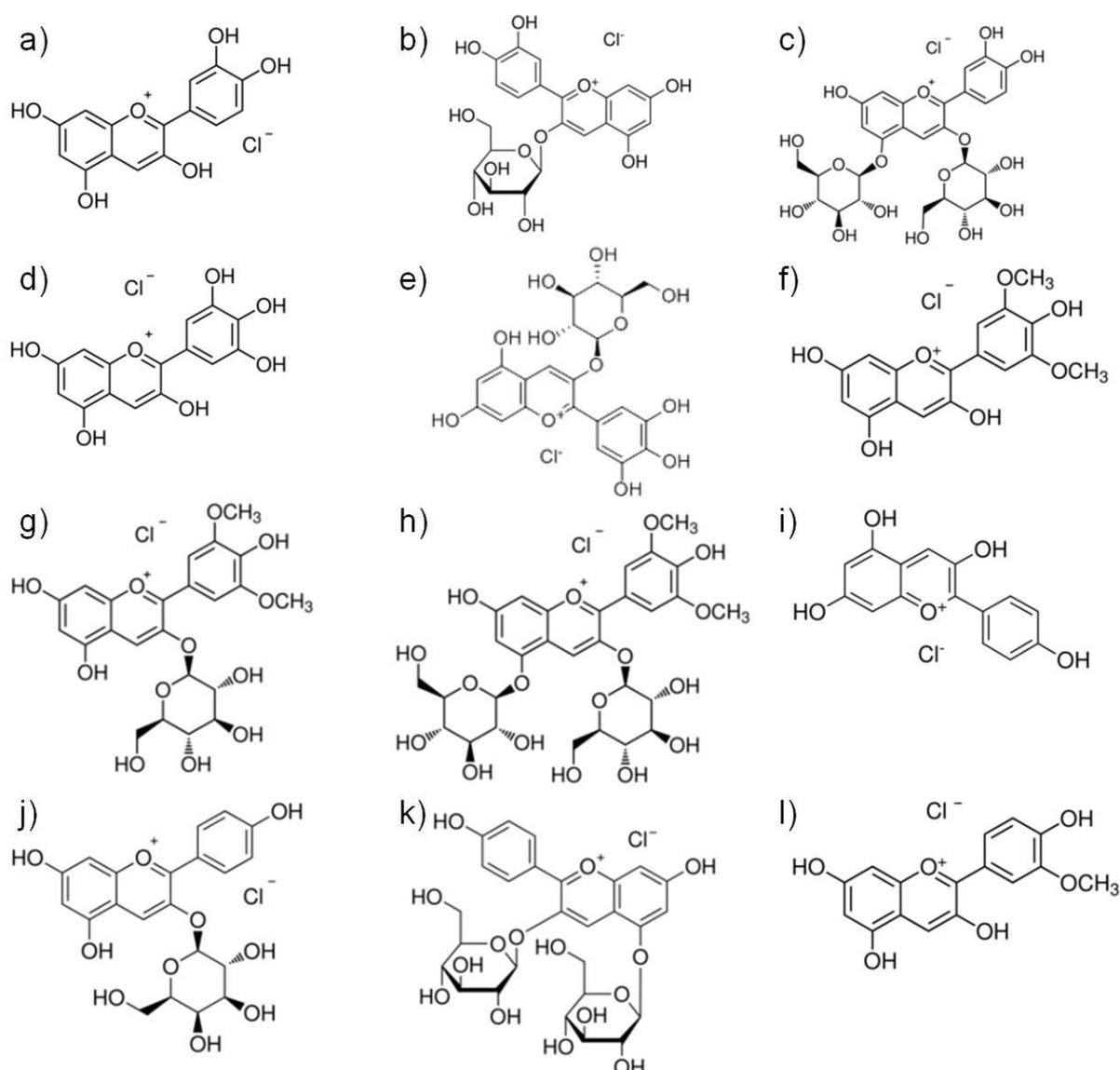


Figura 3: Antocianidinas com importância em alimentos e suas variações em relação às moléculas de açúcar ligadas à cadeia lateral: a) cianidina aglicona; b) cianidina-3-monoglicosídeo; c) cianidina-3,5-diglicosídeo; d) delphinidina aglicona; e) delphinidina-3-monoglicosídeo; f) malvidina aglicona; g) malvidina-3-monoglicosídeo; h) malvidina-3,5-diglicosídeo; i) pelargonidina aglicona; j) pelargonidina-3-monoglicosídeo; k) pelargonidina-3,5-diglicosídeo; e l) peonidina aglicona

Fonte: Adaptado a partir de imagens disponíveis em: www.sigmaaldrich.com. Acessado em: 07/09/2011

De acordo com Tanaka, Sasaki e Ohmnya (2008), as antocianidinas diferenciam-se entre si em função do número e da posição dos grupos metilados e hidroxilados ligados à estrutura básica do cátion flavílium (figura 4). As antocianidinas são modificadas pelos grupos glicosilados e acilados, dando origem a

centenas de diferentes moléculas de antocianinas, que diferem entre si quanto à cromaticidade e à estabilidade (TANAKA, SASAKI e OHMYA, 2008).

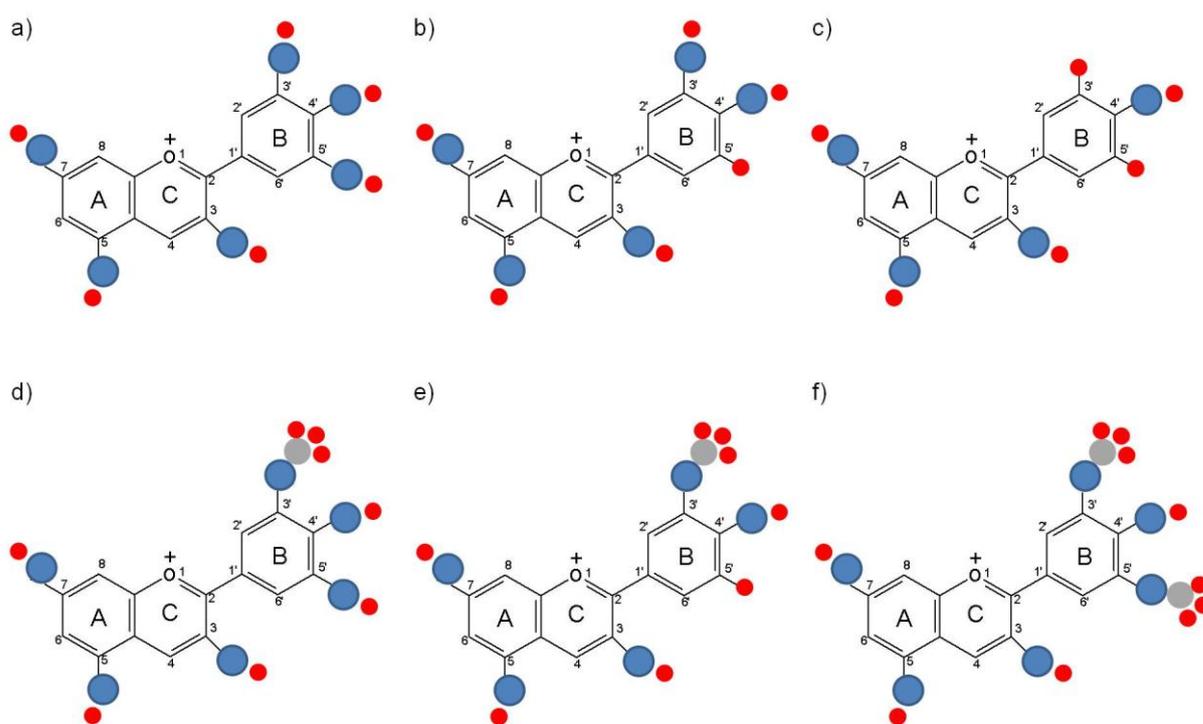


Figura 4: Substituições nas cadeias laterais do cátion flavílium que determinam a estabilidade das diferentes antocianidinas, sendo a) delphinidina; b) cianidina; c) pelargonidina; d) petunidina; e) peonidina; e f) malvidina. Símbolos: hidrogênio (círculo vermelho); oxigênio (círculo azul); e carbono (círculo cinza)

Fonte: Adaptado de Coultate (2004)

É característico de *Vitis vinifera* a existência de uma molécula de glicose ligada na terceira posição do anel fenólico, ao passo que outras espécies de videiras são diglicosiladas nas terceira e quinta posições do mesmo anel (RIBÉREAU-GAYON e STONESTREET, 1965). As antocianinas podem também sofrer esterificação do açúcar glicose, na sexta posição do anel, sendo que os principais ácidos que as podem esterificar são: o caféico, o *p*-cumárico e o acético (COULTATE, 2004).

A estabilidade das antocianinas é afetada pelas cadeias laterais ligadas à estrutura básica do cátion flavílium. Baseando-se no grau de metilação das moléculas, para as seis antocianidinas com destaque em alimentos, pode ser construída uma escala de estabilidade onde a malvidina, por possuir dois radicais

metilados, representa a mais estável das antocianidinas, o que pode ser muito determinante para a definição da cor de vinhos. Também é importante mencionar que átomos de hidrogênio ligados à cadeia lateral conferem mediana estabilidade às antocianinas e que o radical hidroxil é o que confere ao pigmento maior suscetibilidade aos processos de degradação (TANAKA, SASAKI e OHMYA, 2008).

O cátion flavílium é deficiente em elétrons e conseqüentemente altamente reativo, instável e suscetível a ataques por vários reagentes nucleofílicos, incluindo água, peróxidos, dióxido de enxofre, entre outros. Segundo Viguera e Bridle (1999), esses ataques ocorrem principalmente nas posições C-2 e C-4 (figura 4), sendo que a posição C-4 parece ser a mais suscetível, provavelmente devido a um menor impedimento estérico.

Muito pouco é conhecido sobre a estabilidade e o catabolismo de antocianinas em plantas, entretanto, maior estabilidade e variedade de tons estão associadas à presença de resíduos acilados e cinâmicos, até porque, as pontes de hidrogênio que se formam entre a hidroxila hemiacetálica do resíduo e alguma hidroxila livre da estrutura do cátion flavílium tende a proteger o cromóforo (BROUILLARD *et al.*, 2003).

A estabilidade é ainda associada ao fenômeno da copigmentação, resultante da união entre moléculas de antocianinas e outros compostos fenólicos, geralmente incolores ou amarelados (KORZUCHOWSKA e WILSKA, 1996), como podem ser as flavonas, os taninos e os estilbenos.

A caracterização do perfil de antocianinas, associando-o a uma variedade especificamente, é perfeitamente possível. De acordo com trabalhos realizados por diversos autores com a variedade barbera, importante casta italiana, há uma prevalência de malvidina (42%), seguida de delphinidina e petunidina em proporções muito semelhantes (16% e 15% respectivamente), cianidina (7%) e peonidina (4%). As formas aciladas representam 16% do total de antocianinas (DI STEFANO e MAGGIOROTTO, 1995).

Dados de maturação de fruto, que consideram conteúdo fenólico e perfil de antocianinas juntos, permitem uma excelente separação, independente de safra, de clones da cultivar barbera de mais de dois anos com uma certeza de até 75% (FERRANDINO e GUIDONI, 2010). Estudos com outras variedades, e que incluam a análise de perfis de diferentes flavonoides, podem ser úteis para caracterizar

identidades varietais com base em parâmetros metabólicos, além de permitir a diferenciação de comportamentos em resposta a fatores como temperatura e radiação em nível clonal (FERRANDINO e GUIDONI, 2010).

4.6. Ciclo dos Compostos Polifenólicos na Planta

4.6.1. Agentes Condicionantes para a Síntese

Sinais químicos são importantes elementos na adaptação ao estresse. Desde meados dos anos 80, evidências têm sido previstas no papel da sinalização de compostos sintetizados em raízes secas de diferentes espécies, incluindo a videira (*Vitis spp.*) (LOVEYS e DÜRING, 1984; DAVIES e ZHANG, 1991). Assim sendo, as espécies do gênero *Vitis* caracterizam-se pela capacidade de sintetizar grandes quantidades de compostos fenólicos, os quais conferem ao fruto a coloração e o sabor característicos e, transferem ao vinho importantes propriedades atreladas à qualidade e à capacidade de conservação (BROUILLARD, 1983; BROUILLARD, CHASSAING e FOUGEROUSSE, 2003).

Polifenóis, como o próprio nome diz, são compostos que contemplam em sua estrutura diversos anéis aromáticos do tipo fenol. Têm origem no catabolismo de açúcares, estando presentes na baga das uvas (*Vitis spp.*) desde a sua formação (FENNEMA, 2000), embora se encontrem distribuídos em outras partes da planta.

O estresse é o principal mecanismo que desencadeia a produção de polifenóis. De acordo com Pascholati e Leite (1995), em resposta a qualquer tipo de estresse – seja ele de origem biótica ou abiótica – elicitores são estimulados e ativam a produção de fitoalexinas. Tais compostos são de grande importância, pois, trata-se de moléculas quimicamente diversas, mas que acabam sendo agrupadas em classes semelhantes de compostos, sendo os derivados do fenilpropanóide, os derivados de flavonóides e isoflavonóides e os sesquiterpenos os de maior ocorrência na uva e, portanto, os de maior interesse nos vinhos (HAMMERSCHMIDT, 1999).

A maior parte das fitoalexinas consiste em compostos polifenólicos com atividade antirradical-livre ou antioxidante. São exemplos o capsidiol e a capsaicina,

extraídos de pimentas, a pisatina, isolada da ervilha (*Pisum sativum*); e o resveratrol (HAMMERSCHMIDT, 1999), abundantemente encontrado na película da uva (*Vitis* sp.) e no vinho tinto. A maior rusticidade associada às variedades americanas e seus híbridos pode estar associada a uma maior concentração desse tipo de compostos.

A deficiência hídrica estimula a síntese de compostos polifenólicos na planta, e o momento e a intensidade em que ocorre determina alterações importantes na cor e no flavor do vinho posteriormente elaborado (CHAVES *et al.*, 2010). De forma contribuinte, o déficit hídrico fortalece o sistema foto-protetor no fruto (DELUC *et al.*, 2009), justamente porque induz a planta à formação de antocianinas, conforme demonstrado por Vuleta *et al.* (2010), evidenciando ser um fator com impacto positivo na qualidade do vinho elaborado a partir de uvas tintas (BRAVDO *et al.*, 1985).

Roby *et al.* (2004) apontam para um efeito direto e importante do impacto do estresse hídrico sobre o conteúdo de taninos e antocianinas da baga, ainda que tal impacto afete de forma diferenciada os tecidos do fruto, sendo que o conteúdo de tais compostos no epicarpo é menos influenciado que àquele encontrado no mesocarpo interno.

Em vinhedos sob sistema de irrigação, o vigor da planta pode ser estimulado de forma exagerada, fazendo com que a planta desvie energia que poderia ser usada na produção de frutos para o seu próprio crescimento, o que, segundo Bravdo *et al.* (1985), gera um impacto negativo na pigmentação de frutos e no conteúdo de açúcar, implicando queda na qualidade de vinho.

4.6.2. Biossíntese e Armazenamento na Planta

Os compostos fenólicos encontram-se majoritariamente no exocarpo de frutos e endocarpo das sementes (COULTATE, 2004).

Sabe-se que as antocianinas, ausentes em uvas brancas devido a uma mutação multialélica, são sintetizadas através da ativação da rota de síntese dos flavonoides (WALKER *et al.*, 2007). Acumulam-se frequentemente em folhas jovens e vão sendo degradadas à medida que a folha vai alcançando o estágio de maturidade plena (CHALKER-SCOTT, 1999). Pelo fato de que antocianinas são

capazes de absorver a luz, tanto na região do visível como do ultravioleta do espectro, a acumulação em folhas jovens tem por objetivo a proteção solar, já que aqueles compostos atuam como um filtro de radiação, assegurando a integridade e a funcionalidade do aparato fotossintético contra os possíveis danos provocados pela luz ultravioleta e pelo efeito fotoinibitório decorrente das altas intensidades de luz visível incidentes na folha jovem.

Vuleta *et al.* (2010) comprovaram, trabalhando com *Iris pumila*, um tipo de lírio, que o mecanismo de síntese de antocianinas está estreitamente relacionado ao estresse luminoso, pois ao comparar populações à sombra e ao sol, as primeiras apresentaram menores concentrações do pigmento, da mesma forma que observaram que as concentrações eram maiores na estação do verão, quando justamente a radiação solar e a demanda hídrica são mais elevadas. Somando-se à bem descrita relação existente entre a síntese de antocianinas e o estresse luminoso, também existem evidências entre aqueles compostos e o estresse osmótico (CHALKER-SCOTT, 1999). A síntese de antocianinas pode ser induzida por efeitos de salinidade dos solos (DUTT, BAL e BANDYOPADHYAY, 1991; ERYILMAZ, 2006) ou por condições de estiagem (SHERWIN e FARRANT, 1998; YANG *et al.*, 2000;). Além disso, espécies com alta concentração de antocianinas em nível foliar são frequentemente encontradas em ambientes caracterizados pela baixa fertilidade de solos (SPYROPOULOS e MAVROMMATIS, 1978).

Em relação à antocianina, a base da molécula é composta por dois anéis aromáticos e um oxigênio contido num anel heterocíclico. Um dos anéis aromáticos é derivado da fenilalanina e o segundo anel procede da ação da enzima chalcona-sintetase (CHS), que condensa uma das moléculas de *p*-cumaril-coA com três moléculas de malonil-coA para produzir uma molécula de tetra-hidróxi-chalcona. CHS é a primeira enzima comprometida com a rota de biossíntese da antocianina (OREN-SHAMIR, 2009).

Os fatores determinantes da concentração de antocianinas em vinhos tintos são muito variados. Desde as características adquiridas durante o processo de cultivo das uvas, até os tratamentos pré e pós-colheita, em momentos anteriores à vinificação, todos podem influenciar no perfil e no teor final dos pigmentos antocianínicos em tais bebidas (VALE, 2008).

Diferenças observadas na morfologia e na composição da parede celular podem explicar as diferenças varietais observadas, no que diz respeito à facilidade de extração – maior ou menor – de antocianinas da epiderme para o mosto durante o processo de elaboração do vinho (ROMERO-CASCALES *et al.*, 2005). Estes mesmos autores demonstraram que, embora algumas variedades apresentem alto conteúdo de compostos antociânicos, ainda assim elas oferecem dificuldades na hora de extraí-los (ROMERO-CASCALES *et al.*, 2005), fato esse sustentado pelas diferenças morfológicas e constitucionais da parede celular.

Antocianinas são frequentemente acumuladas de forma transitória, aparecendo e desaparecendo durante o desenvolvimento de plantas ou quando ocorrem mudanças nas condições ambientais (CHALKER-SCOTT, 1999). Acumulam-se nos vacúolos das células vegetais (FENNEMA, 2000), estando presentes na epiderme, no caso de uvas tintas, e nestes mesmos compartimentos celulares de epiderme e polpa, no caso de uvas tintoreiras. Dentro do vacúolo, encontram-se sob a forma de moléculas livres, não complexadas e sua estabilidade e cromaticidade estão atreladas a condições intra-vacuolares, tais como pH, coexistência com flavonoides incolores e copigmentação, e formação de complexos com íons metálicos (MAZZA e MINIATI, 1993; TANAKA, SASAKI e OHMIYA, 2008).

As antocianinas estão localizadas majoritariamente no tecido epidérmico das plantas, embora possam estar distribuídas tanto no tecido paliçádico e mesofílico esponjoso das folhas quanto na polpa de frutas e órgãos de reserva subterrâneos de plantas (SUGAWARA e IGARASHI, 2008).

De acordo com Oren-Shamir (2009), pelo fato de que a cor de frutas, de flores e de folhas é um dos mais importantes fatores econômicos de uma diversidade de produtos agrícolas, uma melhor compreensão da degradação de antocianinas pode revelar maneiras de inibir este processo e, dessa forma, aumentar a pigmentação mesmo sob condições de baixa síntese.

As diferenças entre uvas tintas dão-se, predominantemente, pelo tipo e pela concentração de antocianinas, o que estende, aos compostos fenólicos, fundamental importância à hora de caracterizar o vinho (CABRITA, SILVA e LAUREANO, 2003). A caracterização de conjuntos de substâncias antociânicas, por sua vez, amplia a utilização da ferramenta de diferenciação, dando a possibilidade de uma caracterização ao nível de variedade, uma vez que são substâncias sintetizadas nas

células das uvas, estando em estreita dependência do seu patrimônio enzimático, que por sua vez é uma expressão da informação codificada em nível de genes (CRAVERO e DI STEFANO, 1990).

Em relação ao resveratrol, principal polifenol da uva, sua síntese e catálise ocorrem através da ação da enzima estilbeno-sintetase (STS), a qual compartilha os mesmos substratos usados pela enzima chalcona-sintetase, que atua na produção de flavonoides (VERSARI *et al.*, 2001). O resveratrol é sintetizado por diversos vegetais em resposta a condições adversas, como estresse, radiação UV e infecção por fungos (FLOREANI *et al.*, 2003). É acumulado majoritariamente na película das bagas e nas sementes, e há relatos de que tenha sido encontrado tanto em variedades tintas como brancas, em concentrações variadas, dependentes de condições bióticas e abióticas.

Existem duas formas isoméricas, *cis* e *trans* (STOJANOVIC, SPRINZ e BREDE, 2001), sendo que todas as propriedades atribuídas ao resveratrol estão associadas ao isômero *trans*, que é a forma mais estável e a única biologicamente ativa.

4.7. Influencia Enológica na Formação de Cor em Vinhos Tintos

4.7.1. Etapas Mecânicas e Físicas

À hora de elaborar o vinho tinto, diversas etapas mecânicas e físicas são determinantes na concentração de compostos polifenólicos totais no vinho, entre elas, o desengace e o esmagamento são as que mais influenciam.

O desengace, ou separação da ráquis, objetiva separar o engaço do restante do cacho, antes que se proceda ao esmagamento da uva propriamente dita. A constituição da ráquis é quase que exclusivamente feita por taninos, os quais, em não maturando completamente, acentuam sabores herbáceos, amargos e uma adstringência exagerada, comprometendo o equilíbrio. Giovaninni e Manfroi (2009) salientam que, se esmagado junto, o engaço contribuirá com a diluição do mosto, interferindo na composição mineral e influenciando, especialmente na cor e no álcool, já que, devido a características estruturais, é capaz de extrair a cor do meio e

fixá-la, bem como é capaz de absorver o álcool presente do meio, reduzindo em até 0,5 °GL o teor de álcool de vinhos tintos.

O esmagamento proporciona a primeira separação entre o suco e as partes sólidas através do rompimento das bagas e extravasamento do conteúdo da polpa com conseqüente exposição das sementes. Esse processo, de acordo com Giovaninni e Manfroi (2009), facilita a maceração e permite uma melhor extração dos compostos fenólicos.

4.7.2. Etapas Químicas e Biológicas

A maceração, a fermentação, a estabilização e a evolução do vinho são as fases que especialmente interferem na concentração de compostos polifenólicos.

De acordo com Giovaninni e Manfroi (2009), a passagem de compostos polifenólicos – como as antocianinas e os taninos – da uva para o mosto durante a fermentação é a que envolve a maior complexidade de fatores, os quais, associados, constituem a cinética global da maceração. Para estes autores, essa cinética de transferência dos compostos está intimamente associada ao grau de maturação fenólica e ao grau de maturação da parede celular.

Romero-Cascales *et al.* (2005) sugerem que o conteúdo de antocianinas e a intensidade de cor resultantes nos vinhos não apresentam correlação com o conteúdo total de antocianinas que estava presente na uva, visto que, mesmo após uma maceração prolongada por 15 dias, ainda assim havia retenção de compostos de cor na epiderme da baga, indicando que a extração não consegue ser total. Quando a maceração é acompanhada de microoxigenação (MOX), os vinhos resultantes apresentam maior intensidade de cor, bem como maior degradação durante o envelhecimento (CANO-LÓPEZ *et al.*, 2007).

O tipo de levedura utilizada na vinificação também é um fator determinante, embora sua influência na concentração de compostos fenólicos permaneça como algo pouco conhecido (CARIDI *et al.* 2004).

Fatores tais como as características do solo, o manejo do enxofre e o tipo de adubação utilizada no vinhedo, influenciam enormemente no pH da uva e, posteriormente do vinho. Segundo Giovaninni e Manfroi (2009), as uvas da Serra Gaúcha possuem, em geral, pH em torno de 3 a 3,5, podendo ser influenciados

também pela cultivar utilizada e pela definição do ponto de colheita. Segundo estes mesmos autores, nos últimos anos, o pH das uvas e, conseqüentemente dos vinhos, vem subindo, especialmente no Estado do Rio Grande do Sul, ao que tudo indica, em função de um aumento da adubação potássica, ao uso de portaenxertos extratores do íon K^+ e, ainda, devido à adoção de sulfitos no manejo fitossanitário do vinhedo ou durante a vinificação (GIOVANINNI e MANFROI, 2009). A grande preocupação é que as antocianinas são instáveis em pH's elevados, e a estabilidade da cor dos vinhos fica comprometida com essa perda da acidez. Em relação especificamente ao dióxido de enxofre, tal composto desempenha papel fundamental na hora de elaborar vinhos, devido à ação seletiva sobre os microrganismos, à ação antioxidante que impede alterações cromáticas e organolépticas, à ação antioxidásica, especificamente efetuada sobre enzimas, à ação reguladora exercida sobre a temperatura de fermentação e à ação conservante, explorada durante as condições de armazenamento (RIZZON, MANFROI e MENEGUZZO, 2003). Segundo Delanoe *et al.* (1987) *apud* Blasi (2004), somente o enxofre sob a forma de SO_2 livre, ou seja, não combinado a moléculas do vinho ou do mosto, desempenha os papéis anteriormente mencionados. Pela legislação brasileira (ANVISA, 2009), o nível máximo de enxofre permitido em vinhos de até 15% v/v é de 350 mg.L^{-1} , entretanto, a regulamentação não faz referência ao percentual restritivo para o enxofre livre, ficando esse sujeito às oscilações de pH naturalmente associadas aos processos evolutivos.

Durante o armazenamento, ocorre lentamente a evolução de vinhos, com a modificação da cor e o arredondamento de aromas e sabores. Isso acontece porque micro-quantidades de oxigênio são liberadas da rolha de cortiça, provocando vagorosamente a oxidação dos polifenóis presentes no vinho. No caso específico das antocianinas, sua degradação pode ser estimada através da degradação da sua forma aglicona, pois, cada uma destas últimas, ao se degradar, dá origem ao seu ácido fenólico correspondente (FLESCHHUT *et al.*, 2006).

Não haveria maturação do vinho se não houvesse degradação de polifenóis, pois é justamente devido à extensa polimerização dos compostos antioxidantes que a dureza e a adstringência do vinho são perdidas, o que alerta para a situação que vinhos de maior idade já apresentem maior degradação de compostos fenólicos, exibindo predominância de tons amarelos sobre os vermelhos (KRAMER, 2007).

A degradação das antocianinas também envolve mecanismos enzimáticos, os quais incluem as polifenol-oxidases (POD's) (OREN-SHAMIR, 2009). Entretanto, acredita-se que enzimas com atividade β -glicosidase precedam às POD'S, retirando os resíduos de açúcar e facilitando a reação de oxidação subsequente (OREN-SHAMIR, 2009).

Para um jovem vinho permanecer vermelho durante anos, suas antocianinas necessitam estar combinadas com taninos, para que sejam consolidados pigmentos genuínos do vinho – que não são mais pigmentos da uva – mesmo que seus precursores sejam aqueles encontrados na epiderme e na semente do fruto (BROUILLARD *et al.*, 2003).

Landrault *et al.* (2001) analisaram a atividade antioxidante e caracterizaram os compostos fenólicos de 34 diferentes amostras de vinhos tintos franceses de 10 distintas variedades viníferas de um período de safras de 1986 a 1999. Valores médios para catequinas situaram-se em $177,72 \text{ mg.L}^{-1}$, embora o intervalo tenha variado entre $61,7 \text{ mg.L}^{-1}$ e $825,4 \text{ mg.L}^{-1}$. A atividade antioxidante estabeleceu valores semelhantes para as safras de 1996 a 1999, situando-as em 20 mmol.L^{-1} . Para os cinco anos anteriores (de 1991 a 1995) observou-se atividade 33% inferior. As variedades que demonstraram resultados mais interessantes de atividade antioxidante foram a pinot noir, a egiodolà, a mouvèdre, a syrah, a cabernet sauvignon e a merlot. Estes mesmos autores avaliaram a atividade antioxidante de vinhos brancos também. Dos brancos analisados, um chardonnay feito com uma técnica especial de maceração que inclui sementes e películas junto durante seis dias e à temperatura de $28 \text{ }^\circ\text{C}$ revela os maiores resultados de atividade antioxidante, chegando a $13,8 \text{ mmol.L}^{-1}$, equiparando-o a valores normalmente encontrados para tintos. Entretanto, ao compararem um vinho branco de 1999 com um vinho tinto do mesmo ano, há uma diferença média de 10 mmol.L^{-1} a menos na amostra de vinho branco (LANDRAUT *et al.*, 2001).

Cano-López *et al.* (2007) avaliaram o efeito da micro-oxigenação (MOX) em vinhos da variedade vinífera monastrell. Observou-se maior intensidade de cor em vinhos MOX quando comparados aos controles, sem MOX, o que se observa em função da maior área sob o pico de detecção dos compostos. A evolução dos compostos durante o envelhecimento do vinho foi semelhante, ainda que a

degradação tenha sido maior em vinhos com MOX em função de que estes possuíam um maior conteúdo de compostos fenólicos.

Manfroi *et al.* (2007) compararam vinhos brasileiros tratados com diferentes taninos enológicos na safra 2006. Vinhos controle (sem taninos) apresentaram menor IPT, ainda que as diferenças não tenham sido significativas. Já para a capacidade antioxidante, houve diferença significativa entre os tratamentos, com clara influência dos taninos sobre a mesma. Os vinhos tratados com o *pool* de taninos aplicado no mosto e com tanino de acácia apresentaram os maiores valores. Em relação a esse último comportamento, pode-se especular que o tanino de acácia apresenta diferenças nas características dos polifenóis e/ou contém compostos não fenólicos com ação antioxidante, que podem determinar uma diferente atividade, quando comparado ao tanino de quebracho. Isto foi sugerido por Zanus, Gurak e Zorzan (2005) que testaram vinhos das cultivares tannat e ancellotta, e comprovaram o mesmo comportamento, sendo que a cultivar tannat apresentou maiores médias para a capacidade antioxidante, enquanto a ancellotta apresentou a maior quantidade de compostos fenólicos totais.

Em trabalho realizado com vinhos da Califórnia, diversos vinhos tintos de diferentes safras (de 1987 a 1992) e distintas variedades viníferas (cabernet sauvignon, merlot, pinot noir, petit syrah e zinfandel) foram avaliados quanto a sua capacidade de inibição da oxidação do mau colesterol, o LDL (do inglês *Low Density Lipoprotein*). Os resultados expressos em equivalente de ácido gálico – GAE (do inglês Gallic Acid Equivalent) (% a 10 μM GAE) mostraram que a inibição do LDL pelos vinhos tintos variou de 37% a 65%. Quanto à presença de malvidina-3-glicosídeo, os valores variaram desde zero (cabernet sauvignon 1987) até 90,2 mg.L^{-1} (cabernet sauvignon 1991), evidenciando que, para uma mesma variedade, a idade do vinho é um fator determinante para a presença deste composto, pois, no vinho mais antigo, uma possível degradação completa da malvidina-3-glicosídeo impossibilitou a detecção do composto. Em relação à cianidina, os resultados são bastante diversos: tal composto não foi detectado em cinco (zinfandel 1990; dois cabernet sauvignon 1987; cabernet sauvignon 1989; e pinot noir 1992) dos 14 vinhos avaliados, sendo que aquele que apresentou o maior teor de cianidina alcançou valores de 9,5 mg.L^{-1} (petit syrah 1987). Dessa forma, pode-se intuir que a aglicona (cianidina) apresenta comportamentos distintos de evolução que a forma

glicosilada (malvidina-3-glicosídeo), pois não é possível estabelecer relações entre a sua concentração e a idade dos vinhos, o que levanta a possibilidade de que a presença deste composto esteja bastante mais vinculada à variedade de uva. Por fim, ao serem analisados dados de resveratrol, encontrou-se como valor mínimo 0,338 mg.L⁻¹ (petit syrah 1987; mesma amostra que apresentou maior valor para a cianidina) e como valor máximo 2,969 mg.L⁻¹ (merlot 1991), o que demonstra comportamento semelhante para este composto àquele encontrado para a malvidina-3-glicosídeo no que diz respeito à associá-lo com a idade do vinho (FRANKEL, WATERHOUSE e TEISSEDRE, 1995).

Em relação a vinhos elaborados com a variedade isabel, não havia qualquer estudo até que Nixdorf e Herмосín-Gutiérrez (2010) justificaram a necessidade de que se conhecesse a composição fenólica e a atividade antioxidante de vinhos brasileiros elaborados a partir desta, que talvez seja a variedade mais importante numa esfera nacional. Partindo de amostras de Veranópolis (Serra Gaúcha), Mauá (PR) e Londrina (PR), de duas diferentes safras (2005 e 2008) estes autores avaliaram a capacidade antioxidante através da atividade DPPH e caracterizaram tais compostos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Sessenta compostos fenólicos diferentes foram identificados, entre os quais, 30 antocianinas, 2 vitisinas, 10 hidróxi-fenil-pirano-antocianinas, 5 derivados do ácido hidróxi-cinâmico e 13 flavonóis. A malvidina foi a antocianidina predominante. O diglicosídeo de malvidina foi identificado por detector MS (do inglês *Mass Spectrophotometer*). A capacidade antioxidante em equivalente de TROLOX – TEAC (do inglês *Total Equivalent Antioxidant Capacity*) foi maior para os vinhos de Veranópolis, situando-se entre 4,2 e 6,3 mmol.L⁻¹, enquanto os demais vinhos situaram-se na faixa de 2,6 a 3 mmol.L⁻¹ (NIXDORF e HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010).

4.8. Efeitos no Organismo Humano

4.8.1. Paradoxo Francês

Sempre se dedicou muito esforço na busca por elucidar qual o verdadeiro papel da alimentação na prevenção de doenças cardiovasculares, e a dita Dieta

Mediterrânea vem sendo constantemente apontada como o modelo correto a ser adotado, justamente pelo fato de contemplar alimentos ricos em conteúdo de antioxidantes, os quais são reconhecidos pela sua contribuição positiva à saúde, através da contenção dos eventos oxidativos associados a muitas doenças (DELL'AGLI, BUSCIALÀ e BOSISIO, 2004). Entretanto, o que sempre chamou a atenção foi o fato de que num país como a França, cuja dieta básica inclui altos níveis de gordura nas preparações, os índices de doenças coronarianas, geralmente associadas a essa má-alimentação, pudessem ser tão baixos. Instaurou-se a dúvida conhecida como o “Paradoxo Francês”, fenômeno que contempla baixos índices de mortalidade por doenças do coração mesmo quando a dieta adotada inclui altos índices de lipídios (CRIQUI e RINGEL, 1994). As respostas para o fenômeno podem ser atribuídas à influência do estilo de vida francês, que inclui o vinho em sua dieta (BÖHM, ROSENKRANZ e LAUFS, 2004).

Em experimentos realizados (FRANKEL, WATERHOUSE e KINSELLA, 1993; MAXWELL, CRUICKSHANK e THORPE, 1994) com indivíduos que recebiam uma dieta rica em gorduras, o aumento da atividade oxidante foi significativa, mas, quando os mesmos indivíduos, ao ingerir a refeição, consumiam uma dose moderada de vinho tinto, comprovou-se um aumento da capacidade antioxidante em nível de plasma sanguíneo.

Boa parte dos benefícios é atribuída ao efeito do álcool que, especialmente em indivíduos com metabolismos lentos de degradação dessa substância (baixa atividade da enzima álcool-desidrogenase), reduz o risco de infarto (BÖHM, ROSENKRANZ e LAUFS, 2004), além de permitir elevação nos níveis de lipoproteína de alta densidade – HDL (do inglês *High Density Lipoprotein*) (HINES *et al.*, 2001). Assim sendo, um consumo concomitante de vinho com a dieta normal de indivíduos reduz os níveis de oxidação do mau colesterol, o LDL, o qual está vinculado ao desenvolvimento de aterosclerose (LUIS, 2000).

Assim mesmo, há uma parte dos benefícios que se atribui diretamente aos compostos fenólicos presentes no vinho, pois eles apresentam atividade antioxidante mais eficiente que o tocoferol (FRANKEL, WATERHOUSE e KINSELLA, 1993). Com o intuito de comprovar que o benefício pudesse estar presente em outros compostos do vinho, que não no álcool, Pace-Asiak *et al.* (1995) revelam estudos nos quais se comprova o efeito de que substâncias fenólicas presentes no

vinho tinto, tais como o *trans*-resveratrol e a quercetina têm em inibir a agregação plaquetária. Keevil *et al.* (2000) buscaram entender se as substâncias benéficas associadas ao vinho poderiam estar presentes em sucos de uva também, e, num estudo em que buscam inibir a agregação plaquetária com três diferentes tipos de suco – uva, laranja e pomelo –, justificam que apenas o suco de uva alcança tal resultado, devido às concentrações mais elevadas de polifenóis que possui.

4.8.2. Ação Protetora contra Enfermidades

Diversos estudos epidemiológicos já abordaram a ação protetora de um consumo moderado de álcool (KLATSKY, ARMSTRONG e FRIEDMAN, 1992; LONGNECKER, 1994). Entre os principais resultados, destacam-se aqueles que sugerem que o vinho tinto apresenta a capacidade de reduzir o risco de mortalidade por doenças coronarianas (MC ELDUFF e DOBSON, 1997).

Recentemente, pesquisadores franceses demonstraram como diferentes doses de compostos polifenólicos do vinho tinto (RWPC – do inglês *Red Wine Phenolic Compounds*) podem interferir positivamente em diferentes enfermidades. De acordo com Baron-Menguy *et al.* (2007), baixas e altas doses de RWPC têm efeito pró e antiangiogênico na neo-vascularização pós-química *in vivo*. Devido a este único efeito duplo dos RWPC, são visualizáveis boas perspectivas tanto na prevenção de isquemias (baixas doses) como no combate ao câncer (altas doses) (BARON-MENGUY *et al.*, 2007).

O resveratrol é um dos compostos presentes no vinho que mais tem sido pesquisado, pois devido a suas propriedades de inibição da agregação plaquetária, diminui-se o risco de formação de coágulos sanguíneos e, portanto, atribui-se a ele um papel importante na hora de prevenir as doenças cardíacas (HINES *et al.*, 2001).

Já especificamente para as antocianinas, são relatadas ações antiinflamatórias, antimicrobianas e antitumorais (WANG, COA e PRIOR, 1997) e, devido justamente a esse leque de atividades possíveis de serem desempenhadas, é que as antocianinas são apontadas como contribuintes nas ações preventivas de doenças relacionadas com o estresse oxidativo, tais como as doenças coronarianas e os cânceres (BARON-MENGUY *et al.*, 2007).

4.9. Caracterização de Diferentes Regiões Brasileiras

O primeiro degrau para se construir uma verdadeira caracterização, passa por compreender as particularidades das regiões em termos edafo-climáticos, para, associando a esses as práticas agrícolas, ser possível a definição de conceitos importantes, como o zoneamento agrícola, um artifício utilizado a fim de delimitar regiões, onde as condições ambientais, edáficas e econômicas, caracterizem a maior probabilidade possível de sucesso em termos de produtividade e rentabilidade, a uma determinada cultura (OMETTO, 1981).

4.9.1. Vale dos Vinhedos

Ainda que faça parte da grande região da Serra Gaúcha, o Vale dos Vinhedos consiste em um cenário particular dentro daquele ambiente.

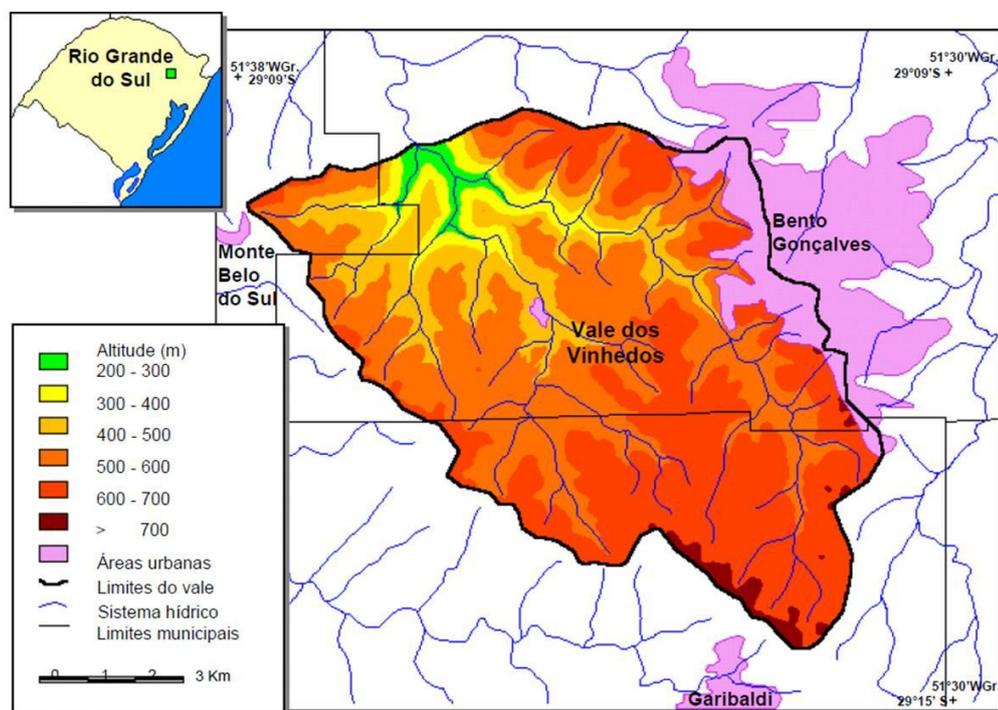


Figura 5: Delimitação Geográfica do Vale dos Vinhedos

Fonte: Adaptado por Ivanira Falcade de Falcade *et al.* (1999)

Seis anos depois da sua fundação em 1995, a Associação dos Produtores de Vinhos Finos do Vale dos Vinhedos (APROVALE), trabalhando em conjunto com a

Em termos agroclimáticos, a região é caracterizada pelo tipo Cfa, segundo a classificação de Köppen (figura 6), que define um clima subtropical úmido, no qual o mês menos chuvoso apresenta uma precipitação superior a 60 mm, o que assegura uma condição permanente de umidade na região, e quente, já que o mês de mais elevada temperatura apresenta médias iguais ou superiores aos 22 °C.

4.9.2. Serra Gaúcha

A vitivinicultura na Serra Gaúcha foi estabelecida a partir da colonização italiana iniciada em 1875, como atividade tipicamente de agricultura familiar, que envolve atualmente mais de 11 mil propriedades vitícolas (TONNIETO, 2002). Dentro da grande região da Serra Gaúcha – excluindo-se o Vale dos Vinhedos – Pinto Bandeira foi a primeira Indicação de procedência concedida, em 2010 (INPI, 2012).

Na Serra Gaúcha, o período vegetativo da videira inicia ao final de agosto/início de setembro, e se estende até outubro para algumas cultivares (MANDELLI, 2002). De acordo com esse mesmo autor, o ciclo total da cabernet sauvignon é de aproximadamente 189 dias e a exigência térmica situa-se em torno de 1.385 graus-dia, enquanto que a merlot distribui o seu desenvolvimento de poda à colheita numa média de 174 dias, com uma soma térmica de 1.553 graus-dia, sendo considerada mais precoce e mais exigente em temperatura (MANDELLI, 2002).

Devido às particularidades do clima subtropical característico da região, Tonnieto e Carbonneau (1999) ressaltam que, na região da Serra Gaúcha, zonas de encostas são preferenciais, pois nessas condições, a drenagem do terreno é facilitada. Os benefícios são ainda mais visíveis quando essas áreas inclinadas estão voltadas para o norte, já que assim, favorece-se a incidência de radiação – fator especialmente importante no inverno, quando as condições sanitárias das plantas se veem prejudicadas pelo excesso de umidade, e no verão por contribuir com os processos de maturação. Ainda assim, são desejáveis essas áreas pelo fato de que apresentam condições menos férteis que as zonas de vale, retendo o vigor das plantas e permitindo colheitas de maior qualidade. Em resumo, encostas, com

fachada para o Norte constituem as áreas preferenciais de exploração de videiras na Serra Gaúcha.

Westphalen e Maluf (2000), caracterizando as áreas bioclimáticas para o cultivo de *Vitis vinifera* L. nas regiões da Serra do Nordeste do Rio Grande do Sul concluíram que, em relação aos índices apresentados por regiões vitícolas tradicionais de outros países, a Serra Gaúcha apresenta um excedente hídrico, o que faz com que o manejo a campo necessariamente seja mais criterioso, de forma a contornar as excelentes condições proporcionadas para a incubação de fitopatógenos e difusão de moléstias relacionadas ao cultivo da videira, que, se não controladas, culminarão com a redução na qualidade da uva ali cultivada.

Em regiões subtropicais, como é o caso da Serra Gaúcha, as elevadas altitudes atuam como um fator compensador das baixas latitudes (inferiores àquelas que caracterizam os climas temperados. Como resultado dessa contrapartida tem-se maior intensidade de frio invernal, e temperaturas mais amenas durante o ciclo vegetativo.

4.9.3. Vale do Rio São Francisco

São recentes as considerações de especialistas que rotulam uma região tropical, de clima quente e seco, como possa ser o semiárido brasileiro, como apta para a elaboração de vinhos finos de qualidade (PEREIRA *et al.*, 2009). Fazendo uso da descoberta desse potencial, a região do Submédio do Vale do Rio São Francisco (figura 7), localizada entre os paralelos 8 e 9 °S, em pleno Sertão nordestino, vem gerando, em seus aproximados 800 ha, uma produção anual de cerca de 8 milhões de litros, que já responde por aproximadamente 15% da produção nacional de vinhos finos, atrás apenas do Estado do Rio Grande do Sul (PEREIRA *et al.*, 2010). Desde a implantação do primeiro perímetro irrigado, em 1968, as taxas anuais de crescimento econômico situam-se acima de 10% (CORREIA, 2001).

A classificação de Köppen caracteriza o clima do Submédio do Vale do São Francisco como sendo do tipo BSh, definido como tropical semi-árido, com temperatura média anual em torno dos 26 °C, pluviosidade de aproximadamente 500 mm e altitude de 330 m em relação ao nível do mar (TEIXEIRA & AZEVEDO, 2006).

No VSF o período vegetativo é manejado para coincidir com o período seco (TEIXEIRA, 2010) reduzindo as possibilidades de ocorrência de problemas sanitários, especialmente doenças fúngicas (TAVARES *et al.* 2004). Nesse caso, trata-se de dois ciclos, onde um (março a julho) é de produção e outro é de formação (setembro a dezembro) (CAMARGO, 2004).

A fisiologia da videira é alterada no VSF, pois, ao não ocorrerem temperaturas abaixo de 10 °C, a videira vegeta continuamente, permitindo ao produtor programar a colheita o ano inteiro, evitando os picos de safra, e rentabilizar-se nos períodos de entressafra (CAMARGO e COELHO, 2007). O repouso vegetativo é alcançado com a redução da lâmina de água de irrigação (SOARES, 2004).

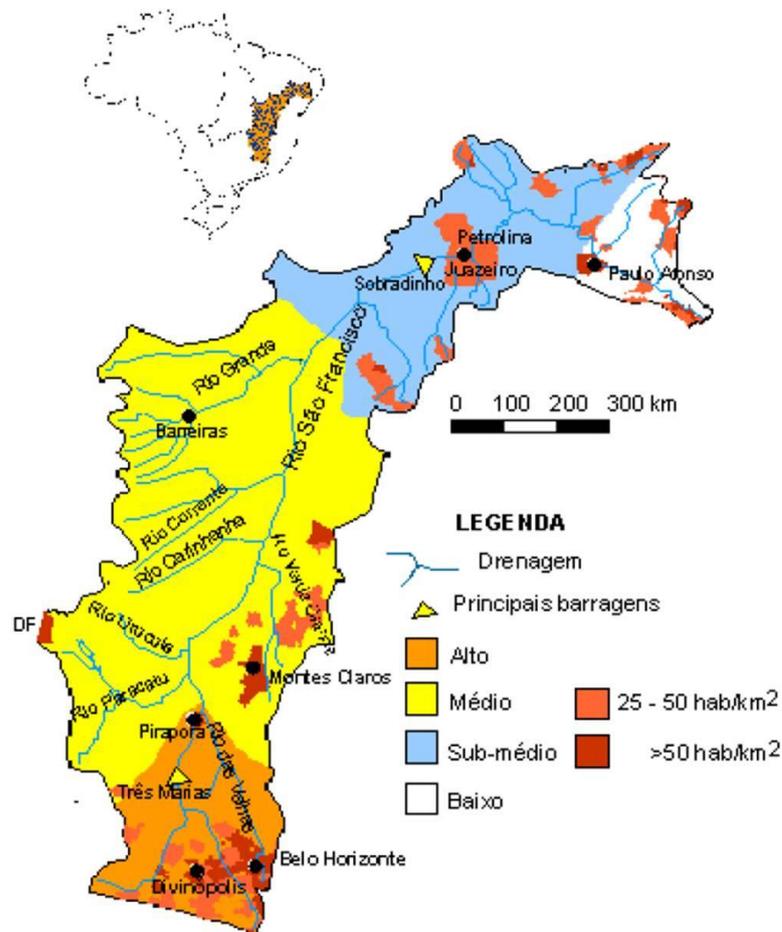


Figura 7: Região do Vale do Rio São Francisco

Fonte: CBHVSF – Comitê da Bacia Hidrográfica do Vale do São Francisco, 2010

O Submédio do Vale do São Francisco detém a única Indicação Geográfica para produtos da Região Nordeste, é a Indicação de Procedência para uvas de mesa e mangas. O certificado foi concedido pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) no dia 7 de julho de 2009, ao Conselho da União das Associações e Cooperativas dos Produtores de Uvas de Mesa e Mangas do Vale do Submédio São Francisco (UNIVALE) (INPI, 2009).

4.9.4. Campanha Gaúcha

Ainda que haja registros do cultivo de videira em Alegrete, Uruguaiana e Bagé desde 1930 (LONA, 2006), a vitivinicultura na região da Campanha, começou sua expansão a partir da década de '70, quando pesquisadores da Universidade de Davis, na Califórnia, juntamente com pesquisadores da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) identificaram uma larga faixa de terra na fronteira do Brasil com o Uruguai, de aproximadamente 270 mil hectares, que, em função de condições edafoclimáticas, seriam fortemente apropriadas para o cultivo de uvas viníferas (FERREIRA, 2005).

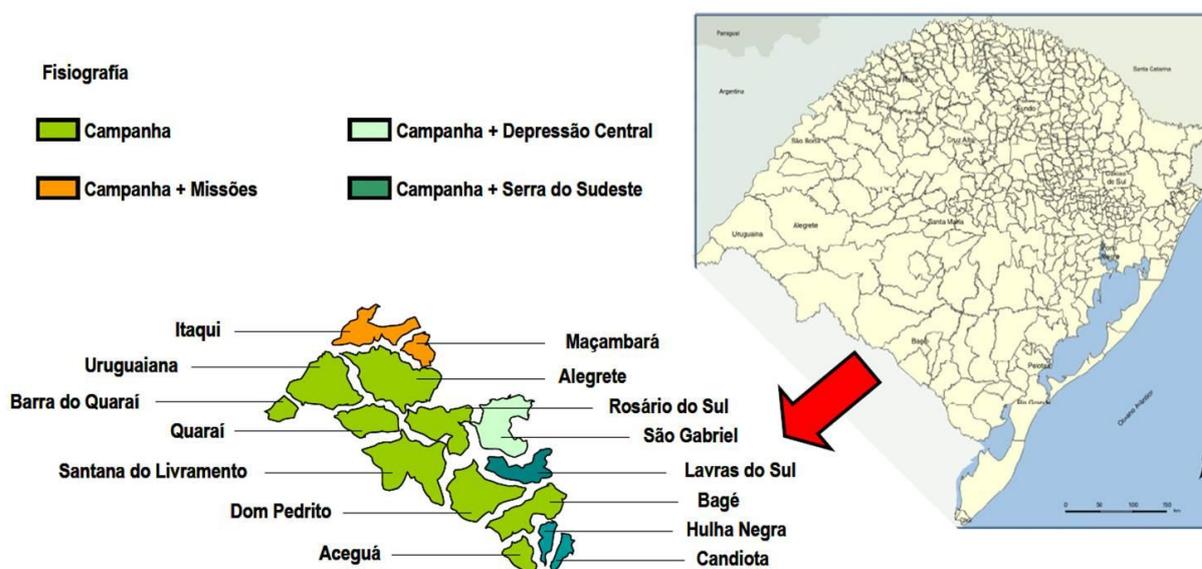


Figura 8: Divisão territorial e política da região da Campanha Gaúcha
Fonte: Adaptado de www.coreders.gov

A região é caracterizada pela presença de um *bioma* único no País, a pampa, compartilhado com outros três países – Uruguai, Argentina e Paraguai – e que consiste numa das mais extensas áreas de campo do mundo. É a maior das regiões fisiográficas gaúchas, compreendida entre os paralelos 29 e 32 °S e entre os meridianos 53,5 e 57,5 °W, englobando os municípios com as maiores áreas territoriais do Estado (figura 8).

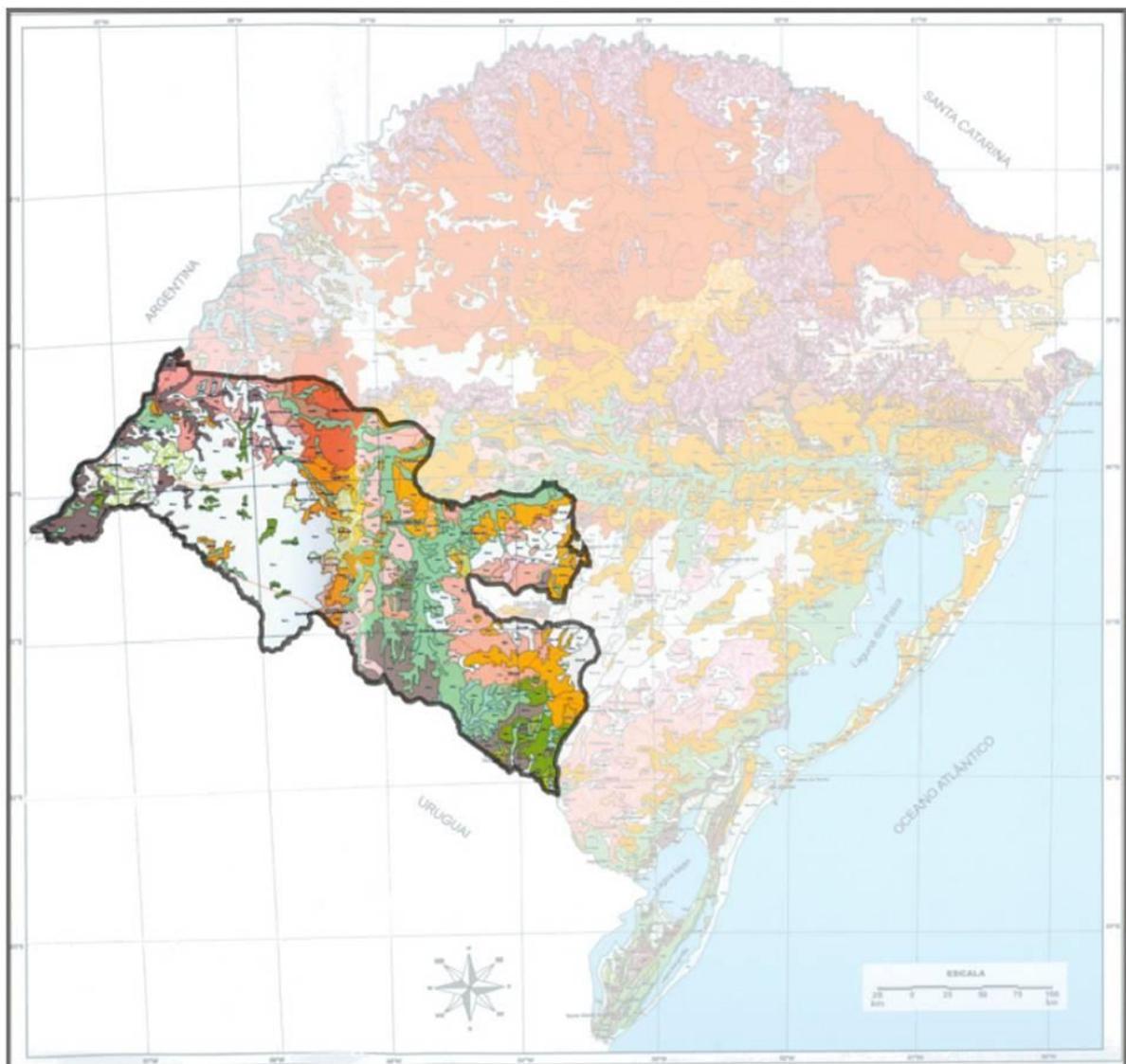


Figura 9: Diversidade edáfica do Estado do Rio Grande do Sul com destaque para a região da Campanha
Fonte: Adaptado de Streck *et al.* (2002)

Devido ao perfil econômico característico da região, representado pela pecuária e pela orizicultura, a vitivinicultura surgiu como uma alternativa ao produtor rural, consolidando-se e expandindo-se, em parte devido às condições edafoclimáticas, em parte, como bem descreve Dias (2007), devido à facilidade de cultivo associada ao seu relevo ondulado característico.

Segundo dados do IBGE (2010), a região sudoeste do Rio Grande do Sul, tinha, em 1990, aproximadamente 730 ha de uvas estabelecidos, que em 2009 alcançaram o patamar de 1.152 ha, representando um aumento de 63% para o período.

Em Uruguaiana, na Fronteira Oeste, temperaturas mais elevadas que aquelas encontradas na Serra adiantam a entrada da videira no ciclo vegetativo, concentrando as brotações no período de agosto, ainda que a possibilidade de ocorrência de geadas tardias no mês de setembro constitua um fator de risco ao adiantamento da quebra de dormência naquela região (MANDELLI, 2002).

As visivelmente diversas condições impressas pelos solos (figura 9), resultantes de matrizes minerais distintas e de processos geológicos diferenciados (STRECK, *et al.* 2002), associados à extensão territorial da Campanha, permitem um trabalho de *terroir* onde o fator edáfico, sem dúvida alguma, constituir-se-á em um componente imprescindível para a identidade dos vinhos daquela região.

4.9.5. Campos de Cima da Serra

Tradicionalmente uma zona de produção pecuária e de grãos, os Campos de Cima da Serra vêm chamando a atenção para a possibilidade do desenvolvimento de uma vitivinicultura de qualidade nos últimos anos.

Com um clima que, segundo a classificação de Köeppen, difere de todas as demais regiões gaúchas por ser do tipo Cfb, ou seja, mesotérmico, sempre úmido, mas caracterizado por verões brandos, nos quais a temperatura do mês mais quente apresenta média inferior a 22° C (figura 10).

Dessa forma, a escolha de variedades mais tolerantes ao frio, com menor exigência térmica para o vencimento das fases fenológicas e com ciclos mais curtos que permitam manejar a fase vegetativa dentro do período em que as últimas geadas de primavera e as primeiras geadas de outono sejam menos prováveis,

reduzem o risco e aumentam a probabilidade de que se obtenham cultivos adequados à região, explorando o potencial de tipicidade que possa ser impresso pela região mais fria do Rio Grande do Sul.

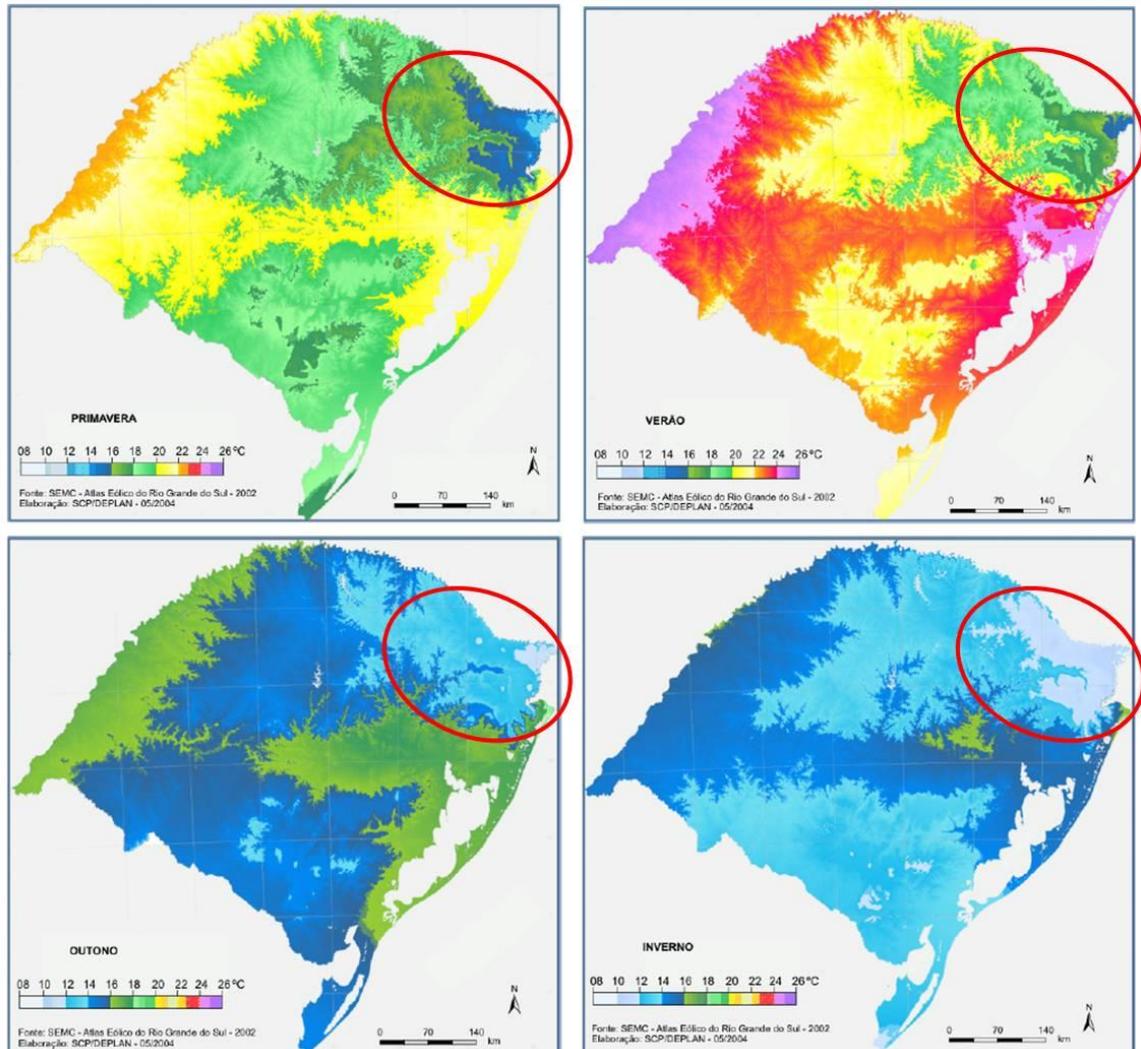


Figura 10: Variação climática anual no Estado do Rio Grande do Sul, com destaque para a região dos Campos de Cima da Serra
 Fonte: Adaptado de SEMC – Atlas Eólico do Rio Grande do Sul (2002), elaborado por SCP/DEPLAN (2004)

4.9.6. Serra de Santa Catarina

Com um clima que, segundo a classificação de Köppen, difere de todas as demais regiões catarinenses, por ser do tipo Cfb, ou seja, mesotérmico, sempre úmido, mas caracterizado por verões brandos, nos quais a temperatura do mês mais quente apresenta média inferior a 22° C, a Serra de Santa Catarina, por compartilhar

a mesma região geográfica de serra, apresenta características muito similares às aquelas encontradas na região rio-grandense dos Campos de Cima da Serra.

O zoneamento climático (figura 11) classifica a região da Serra de Santa Catarina como preferencial, com um acúmulo de mais de 600 horas de frio, para o cultivo da videira vinífera. Segundo Giovaninni e Manfroi (2009) existe uma segunda área de produção naquele Estado representada pelo Vale do Rio do Peixe, entretanto, ainda que constitua importância em volume, tal região está numa zona considerada Preferencial II, na qual o cultivo é recomendado com indução artificial de brotação, já que o somatório de horas de frio não ultrapassa o valor de 300 h.

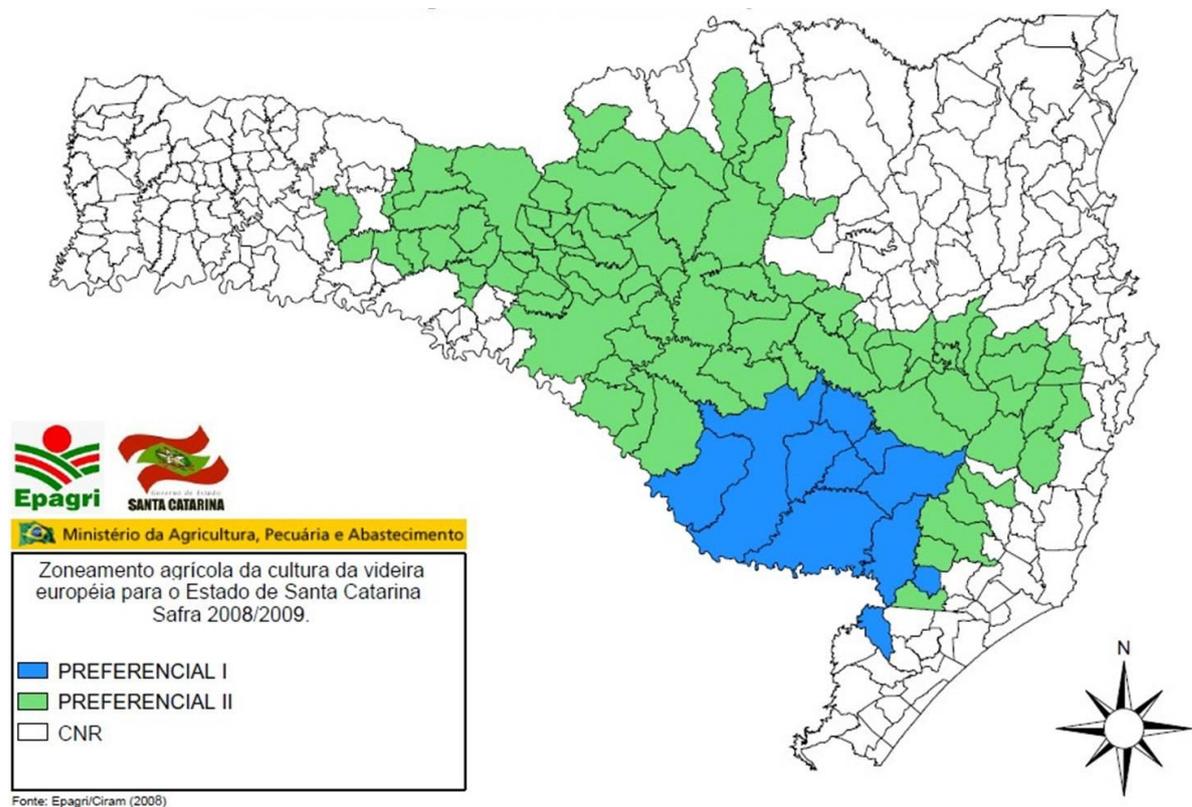


Figura 11: Zoneamento agroclimático para a cultura de *Vitis vinifera* no Estado de Santa Catarina
Fonte: Epagri/Ciram, 2008

A soma térmica na estação de crescimento pode ser verificada através do conceito de graus-dia (PEDRO JR *et al.*, 2003). Desta maneira pode se monitorar a atividade biológica do fruto durante a estação de crescimento. A soma térmica é útil como indicador da capacidade do local para a maturação de determinada variedade.

Contudo, é importante observar o padrão comportamental da soma térmica. É possível que duas localidades com a mesma soma térmica tenham diferentes janelas climático-fenológicas. Particularmente, latitudes maiores ou regiões de altitude frequentemente têm baixa soma térmica em ambas as pontas (fim e início da estação) fazendo-se necessário usar variedades que possam tolerar uma janela climática mais curta.

O frio, é uma característica intrínseca à Serra de Santa Catarina, entretanto, a escolha de variedades adaptadas, constitui um critério de decisão do produtor e, mais que isso, o seu desempenho, estará vinculado ao manejo também definido por ele. Baixa qualidade de vinhos pode estar associada a más práticas agrícolas, uma vez que a formação de substâncias químicas indesejáveis, como as metóxi-pirazinas, é decorrente de níveis insuficientes de radiação solar incidente e da dinâmica de água no solo entre outros fatores (HASHIZUME e SAMUTA, 1999). O acúmulo de tais componentes, depreciadores do aroma, dá-se, especialmente na primeira fase de crescimento do fruto (PEDRO JR. *et al.*, 2003), sendo comum a sua ocorrência quando fatores tais como variedades com incompatibilidade de ciclo combinam com situações de primaveras frias, nubladas e úmidas.

4.9.7. Oeste do Paraná

A região Oeste do Paraná apresenta características bastante semelhantes com a região Norte do Paraná, na qual a produção de uvas finas de mesa já consiste numa atividade consolidada, com duas safras anuais (KISHINO e ROBERTO, 2007). Entretanto, com o aumento do volume de produção e o reflexo dessa oferta exagerada na baixa remuneração ao produtor pela matéria-prima, desviou-se o foco da região para o cultivo de videiras viníferas, destinadas à elaboração de vinhos.

Devido ao clima subtropical característico (Cfa), sempre úmido e com verões quentes, as uvas européias destinadas à vinificação, provenientes da poda de agosto com posterior colheita em janeiro, podem acabar apresentando brotação desuniforme de gemas, além de estarem suscetíveis a problemas fitossanitários e à deficiente acumulação de compostos desejáveis, devido à coincidência da maturação com o período chuvoso da região (JUBILEU, SATO e ROBERTO, 2010).

O manejo de podas, o uso de reguladores de crescimento e o cultivo de variedades de ciclo longo permitem deslocar a maturação e a colheita para o outono, quando, de acordo com Jubileu, Sato e Roberto (2010), ocorrem condições mais favoráveis, como baixa precipitação, alta amplitude térmica e temperaturas mais baixas para a obtenção de uvas de qualidade tecnológica superior. Entretanto, esses mesmos autores reforçam o fato de que variedades de ciclo longo, como a cabernet sauvignon, nem sempre atingem a coloração desejada, fato que expõe que não necessariamente uma qualidade tecnológica superior corresponda a uma qualidade fenólica superior.

Kishino e Caramori (2007) comentam a imprescindibilidade do uso do regulador de crescimento cianamida hidrogenada como substituinte parcial da necessidade de frio e estimulador da brotação de gemas de forma uniforme, para a obtenção de um produto de qualidade superior.

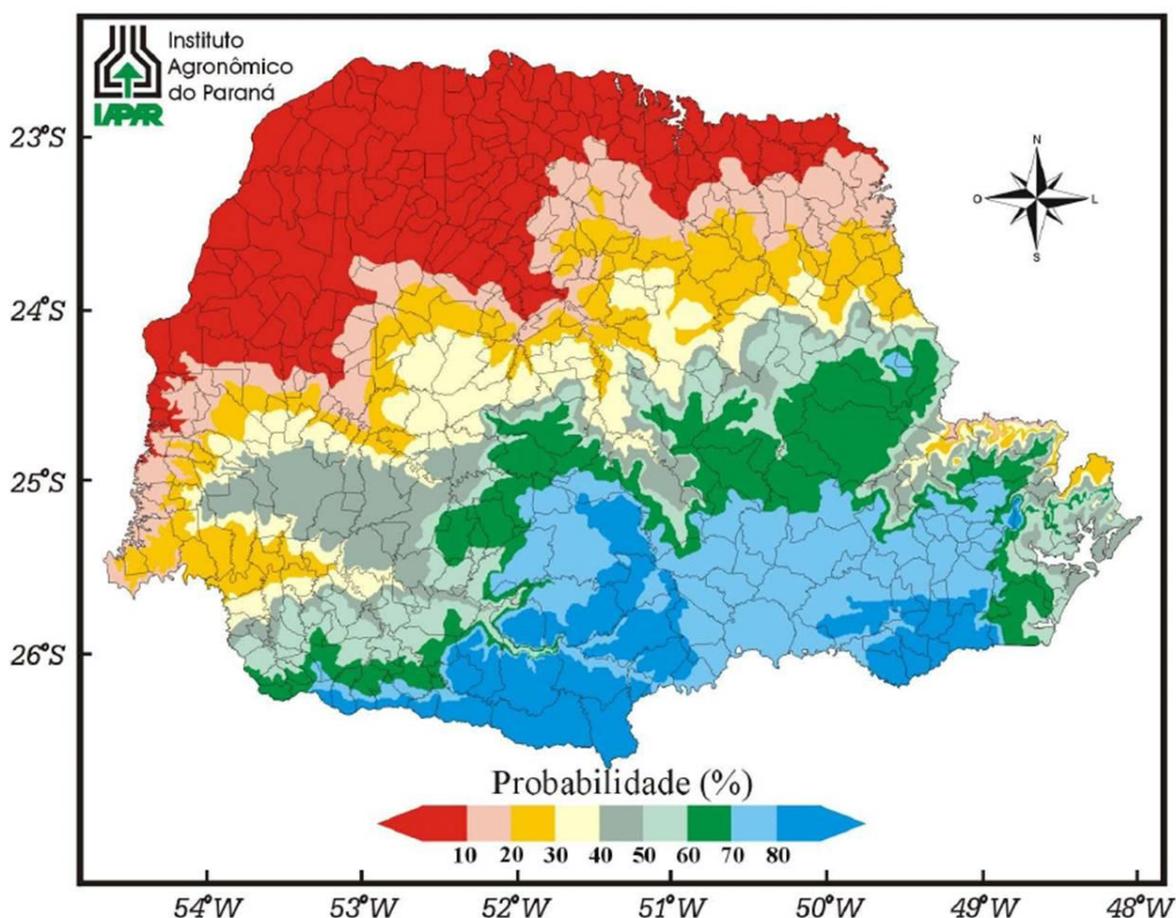


Figura 12: Probabilidade da ocorrência de geada no Estado do Paraná
Fonte: IAPAR, 2006

E se a falta de frio consegue ser gerenciada através do uso de reguladores de crescimento (KISHINO e CARAMORI, 2007), o deslocamento do ciclo da planta para momentos mais oportunos agroclimaticamente não deve se tornar um fator complicador, especialmente, tendo-se em vista que outra condição associada ao frio, a geada, apresenta uma probabilidade de ocorrência de menos de 10% na maior parte da região produtora do Oeste do Paraná, a qual se concentra no município de Toledo (IAPAR, 2006).

Dados do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) permitem destacar que, com o atraso da primeira geada de outono (após 20 de maio) e a precocidade da última geada de primavera (até 19 de agosto), resta um grande período do ano que permite o manejo vegetativo da videira, basta que sejam escolhidas as variedades adequadas e respeitadas as condições de cultivo que propiciem qualidades superiores às videiras, às uvas e aos vinhos (IAPAR, 2006).

4.10. Análises de Polifenóis, de Cor e de Atividade Antioxidante em Vinhos

4.10.1. Metodologia para Quantificação de Polifenóis Totais

Entre as metodologias descritas para a análise de polifenóis, Singleton, Orthofen e Lamuela-Raventós (1999) destacam a importância do protocolo executado a partir do método de Folin Ciocalteu's, descrito por primeira vez por Singleton (1965). Trata-se de um método, rotineiramente usado em laboratório pela sua adaptação a pequenas escalas, evitando o desperdício de reagentes e gerando pouco resíduo com a análise (WATERHOUSE, 2002). Curvas de calibração são elaboradas a partir de concentrações conhecidas de ácido gálico, pois devido ao fato de que o método quantifica o conteúdo total de fenólicos, a escolha daquele como padrão baseia-se, primeiramente no fato de que ele existe em baixa concentração em vinhos; num segundo aspecto, devido as suas propriedades de estabilidade e pureza; e, por fim, no seu relativo menor preço de aquisição como padrão comercial (WATERHOUSE, 2002). De acordo com esse mesmo autor, para o caso de vinhos brancos, a reação acontece com o produto na sua forma integral; já para o caso de

vinhos tintos, diluições de ajuste à faixa ótima de leitura em espectrofotômetro são previamente necessárias.

Alguns interferentes, como possam ser os açúcares redutores, os sulfitos e o ascorbato comprometem a viabilidade do método, entretanto, Waterhouse (2002) destaca que alguns desses fenômenos possam estar mais amplamente associados a vinhos brancos, especialmente sulfitos e ascorbato, que, pelo seu efeito de preservação, são adicionados em maior concentração a mostos e vinhos brancos.

Em geral, a resposta fenólica em Índice de Polifenóis Totais (IPT) acontece de acordo com o número de grupos fenólicos presentes nos compostos e, em vinhos, a maior vantagem do método está na equivalência de resposta que existe com o uso do ácido gálico como padrão, o qual reduz as oscilações a uma estreita faixa que varia de 0,87, para o ácido caféico, a 1,1, para a epicatequina, permitindo acurada precisão do nível de substâncias fenólicas mesmo com a enorme complexidade de compostos encontrada em vinhos (SINGLETON, 1974).

4.10.2. Metodologias para Medida da Atividade Antioxidante

A AOX das amostras pode ser determinada a partir de diferentes metodologias, entre as quais Brand-Williams (1995) destaca a de neutralização do radical instável 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH⁺) e Re *et al.* (1998) descrevem a por descoloração do também radical 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido-sulfônico), o ABTS⁺, ambas baseadas no princípio da captura de um radical orgânico formado.

Devido ao seu mais elevado efeito na supressão do radical, o 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-ácido carboxílico (RE *et al.*, 1998), ou também chamado TROLOX[®], é o composto utilizado como padrão para ambas as análises utilizadas. Curvas padrão com concentrações conhecidas desse composto, considerado um análogo do α -tocoferol (EUM e LEE, 2004), são construídas de forma a comparar a atividade antioxidante de diferentes matrizes, inclusive o vinho.

Em relação ao método de captura do radical instável DPPH⁺, Sharma e Bhat (2009) recopilaram uma série de informações reconhecendo que, em função da variação existente em protocolos baseados por esse princípio – desde a concentração do DPPH (22,5 a 250 μ M), passando pelo tempo de incubação (5 min

a 1 h), e que envolvem ainda condições de pH, da reação entre o solvente e matriz – tornam-se inapropriadas as comparações entre análises de diferentes laboratórios, cabendo apenas a comparação de amostras sob as mesmas condições de análises.

Já o método do ABTS, aprimorado por Re *et al.* (1998) e adaptado por EMBRAPA (2007), consiste na oxidação do composto ABTS pelo persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), gerando o íon-radical, o qual, em presença de antioxidantes doadores de elétrons, volta a ser estabilizado. Do mesmo modo que no método DPPH, influências, tanto da concentração de antioxidantes presentes, como do tempo de reação na inibição do cátion devem ser consideradas na determinação da atividade antioxidante (RE *et al.*, 1998).

Tanto no método DPPH (EMBRAPA, 2007^b), como no método ABTS (EMBRAPA, 2007), para um mesmo tempo de análise, uma descoloração mais intensa do radical original será observada quanto maior for a concentração de compostos antioxidantes presentes na amostra. As amostras devem ser diluídas conforme a necessidade, afim de que se ajustem às curvas-padrão.

4.10.3. Metodologias para Análise de Cor

A cor depende de percepções e de interpretações subjetivas (KONIKA-MINOLTA, 1998). Ao longo dos anos, diversas escalas de cores foram sendo construídas com o intuito de se conseguir quantificar, numericamente, uma informação: a cor. Em 1905, um artista americano chamado Albert Henry Munsell, criou, com uma série de pastilhas coloridas ordenadas de acordo com a sua tonalidade, luminosidade e saturação, a primeira escala de cores, denominada Escala de Munsell, permitindo, por primeira vez, a comparação de amostras segundo a sua cor (KONIKA-MINOLTA, 1998). Na sequência, métodos desenvolvidos por uma organização internacional dedicada à luz e à cor, a *Comission Internationale de L'Eclairage* (CIE), incorporou àquela primeira metodologia, suas próprias escalas (KONIKA-MINOLTA, 1998).

Hoje em dia, as escalas mais comumente utilizadas em indústrias de todos os tipos, inclusive de alimentos, baseiam-se naqueles primeiros critérios e em combinações deles para definir os valores para as cores.

As primeiras escalas, baseadas nos valores *tri-stimulus* X, Y, Z e Y, x, y, deram origem, em 1931, ao primeiro diagrama de cromaticidade, o qual enfrenta todas as dificuldades de uma escala bidimensional (figura 13). Escalas mais modernas, como a CIE L*, a*, b*, que incorpora uma terceira dimensão a uma escala de coordenadas retangulares (figura 14), e o sistema L*, C*, h, que conta com a terceira dimensão num sistema de coordenadas cilíndricas (figura 15), permitem diferenciar as cores no espaço (KONIKA-MINOLTA, 1998).

Através da escala CIE L*, a*, b*, valores globais de cor podem ser definidos através de uma equação que considera a variação entre esses parâmetros.

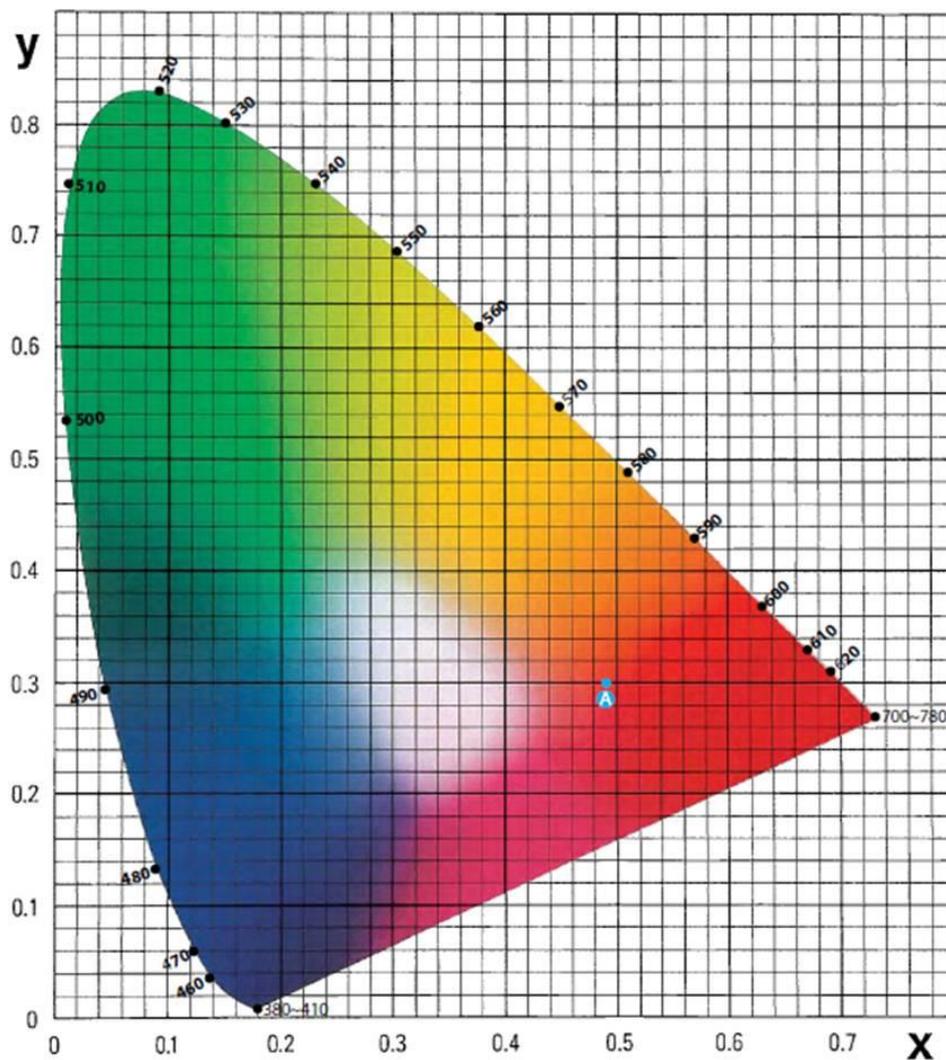


Figura 13: Diagrama de cromaticidade de 1931
Fonte: Konika Minolta (2003)

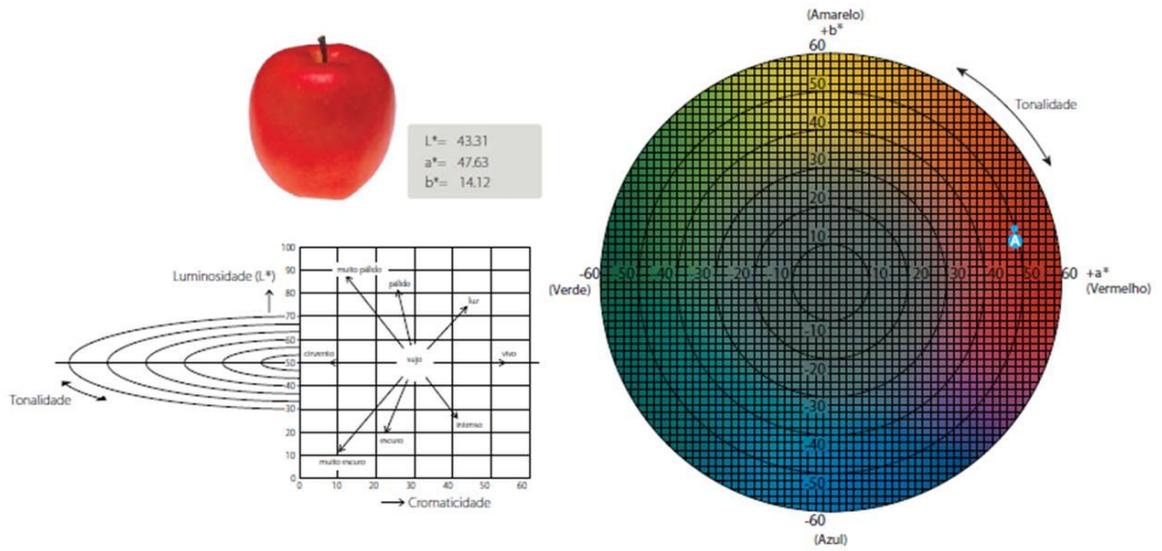


Figura 14: Diagrama de cromaticidade tridimensional com coordenadas retangulares (L , a^* , b^*)
 Fonte: Konika Minolta (2003)

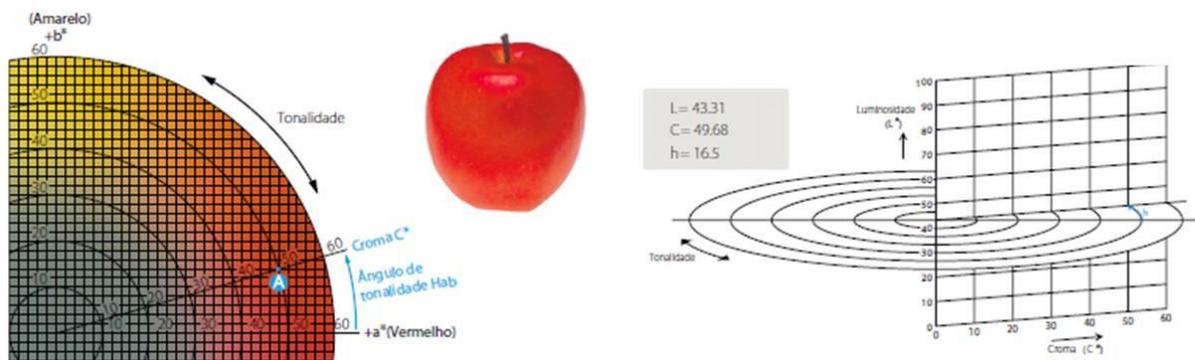


Figura 15: Diagrama de cromaticidade tridimensional com coordenadas cilíndricas (L , C , h)
 Fonte: Konika Minolta (2003)

4.10.4. Metodologias para Qualificação e Quantificação de Antocianinas

4.10.4.1. Espectrofotometria por pH-diferencial

Giusti e Wrolstad (2001), recopilaram uma série de informações acerca do método de quantificação de antocianinas através do conceito de espectrofotometria por diferença de pH. Trata-se de uma análise simples, cuja metodologia baseia-se na propriedade de transformação estrutural da região do cromóforo da antocianina, quando ocorre variação nas características de pH do meio em que se encontram os compostos (figura 16) (GIUSTI e WROLSTAD, 2001).

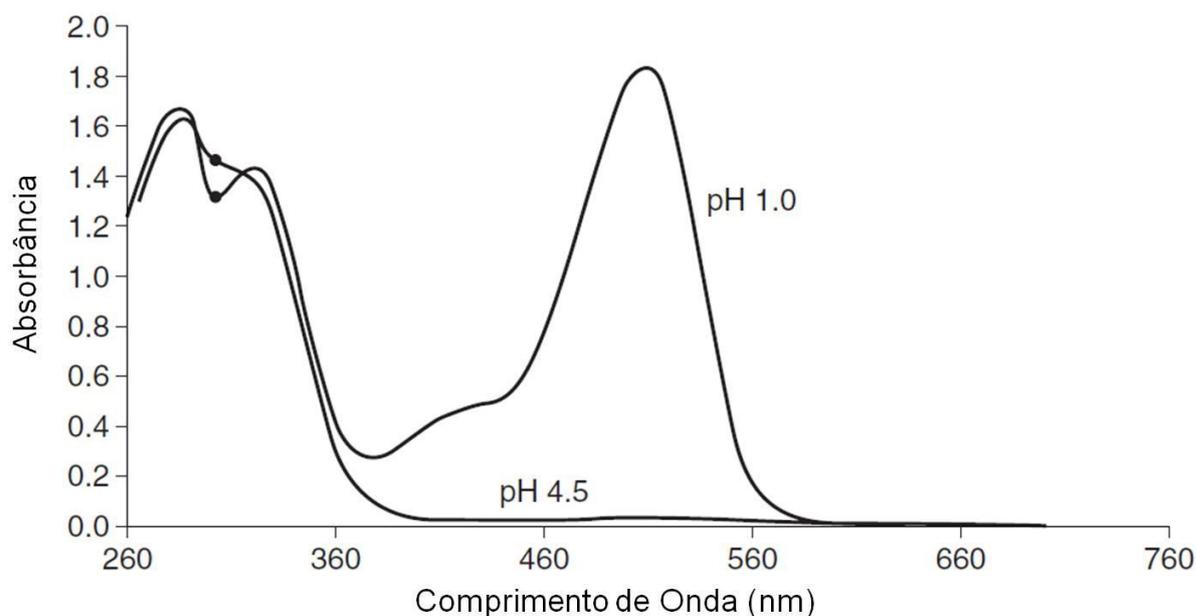


Figura 16: Características espectrais de antocianinas a pH 1,0 e 4,5.
Fonte: Giusti e Wrolstad (2001)

Essa transformação, baseia-se nas propriedades de alterações estruturais reversíveis, entre o cátion flavílium e a pseudo-base carbinol: em pH 1,0, as formas oxônicas (cátion flavílium) são predominantes e a solução exibida apresenta coloração que varia do laranja ao púrpura; já em pH 4,5, as formas hemiacéticas (pseudo-base carbinol) são favorecidas e não se observa cor, pois as antocianinas

não são capazes de absorver nesse pH quando são selecionados os comprimentos de onda em que exibem a máxima absorção (GIUSTI e WROLSTAD, 2001).

Para a análise, são selecionados dois comprimentos de onda, o de máxima absorção da forma predominante de antocianina, sendo, a malvidina considerada, no caso da uva e do vinho, e, portanto, aceito o comprimento de onda de 520 nm, e um segundo comprimento de onda é selecionado em 700 nm, de forma a corrigir a turbidez. A concentração total de antocianinas é calculada com base na Lei de Lambert-Beer, a qual estabelece uma relação exponencial entre a transmissão de luz através de uma determinada substância e a concentração dessa substância.

$$C = (A_{520/\text{pH } 1,0} - A_{700/\text{pH } 1,0}) - (A_{520/\text{pH } 4,5} - A_{700/\text{pH } 4,5}) \cdot D \cdot F$$

Nessa equação, C é a concentração total de antocianinas (mg.L^{-1}); A_{520} e A_{700} são, respectivamente, as absorbâncias a 520 e a 700 nm, ambas lidas com a amostra diluída em tampão a pH 1,0 e a pH 4,5; D é o fator de diluição da amostra; F é a média ponderada do coeficiente de extinção molar das principais antocianinas encontradas no alimento em questão (uva e vinho podem ser baseadas na malvidina-3-monoglicosídeo, cujo coeficiente de extinção molar a 520 nm é proposto por Niketic-Aleksic e Hrazdina (1972) como sendo $\epsilon = 28.000$) (GIUSTI e WROLSTAD, 2001).

4.10.4.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

Traduzida do inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), trata-se de um tipo de cromatografia líquida que emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel, eluída sobre altas pressões (JARDIM, COLLINS E GUIMARÃES, 2006).

Para a análise de matrizes complexas, como é o caso do vinho, a cromatografia líquida apresenta a vantagem de: detectar compostos, mesmo em quantidades muito pequenas, da ordem de 10^{-9} g (nanogramas) ou até de 10^{-12} (picogramas); permitir tempos reduzidos de análise, devido à alta eficiência da coluna e aos altos fluxos tolerados por esta; resolver com alto desempenho um

número variado de moléculas, as quais aparecem sinalizadas sob a forma de picos no cromatograma; identificar esses compostos com precisão, com base em uma infinidade de critérios, quais possam ser a comparação dos tempos de retenção dos padrões, a ordem de eluição dos componentes da amostra ou, em equipamentos mais sofisticados, pela confirmação, ou dos espectros de absorbância dos compostos (detector de arranjo de diodos), ou dos espectros de massas (espectrômetro de massas); quantificar as substâncias da amostra através da integração das áreas dos picos lidas pelo(s) detector(es) (JARDIM, COLLINS e GUIMARÃES, 2006).

A fase móvel desempenha função de arrastar os componentes da amostra e de separá-los, por isso a mistura de solventes que compõem a fase móvel é chamada de sistema de eluição, podendo ser isocrático (que mantém a mesma proporção de mistura dos solventes do início ao fim da corrida cromatográfica) ou em gradiente (onde a composição da fase móvel varia durante o processo de separação, de modo que a força cromatográfica – incremento gradual do solvente mais apolar do sistema com o decorrer do tempo de análise – se intensifique) (JARDIM, COLLINS E GUIMARÃES, 2006). De acordo com esses mesmos autores, salvas exceções, a maior parte dos problemas de separação pode ser solucionada com a utilização de misturas binárias de solventes e com o desenvolvimento da força cromatográfica. Contudo, para que haja um adequado processo de separação é tão necessário o ajuste apropriado do gradiente de eluição como a escolha da mistura de solventes que irão compor a fase móvel.

Devido às altas pressões de trabalho, qualquer material injetado na coluna do cromatógrafo deve ser previamente filtrado, da mesma maneira que todos os solventes devem ser de alto grau de pureza.

Em cromatografia de fase reversa, um dos eluentes é sempre a água – obtida em equipamentos de ultra-purificação – o quê assegura maior polaridade à fase móvel em relação à fase estacionária. A fase estacionária consiste em uma coluna de aço inoxidável, recheada de sílica, geralmente, revestida com estruturas de carbono que se diferenciam em função do número de carbonos que as compõem (JARDIM, COLLINS E GUIMARÃES, 2006). Devido à variedade de polifenóis presentes nos vinhos e a semelhança desses compostos em termos de estrutura,

função, absorção de luz e afinidade por solventes, a escolha de colunas que sejam específicas para antocianinas é uma ferramenta a qual se faz necessária.

Cabe ressaltar que, muitas vezes, a preparação de amostras consiste numa etapa prévia – como descrito por Chaovanalikit e Wrolstad (2004) – necessária para a adequada separação de matrizes complexas, como é o caso do vinho. Sendo este o caso, cartuchos de extração descartáveis, contendo o mesmo recheio que a coluna analítica, podem ser usados.

5. RESULTADOS

Os resultados desse trabalho estão apresentados sob a forma de artigos, descritos nos capítulos 7.1 e 7.2. O segundo artigo será submetido à revista *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, portanto, a redação utilizada para a sua apresentação segue as normas da *American Chemistry Society*. Em relação ao primeiro artigo, ainda não se definiu para qual revista se irá submeter, estando o documento formatado, portanto pelo padrão definido pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

5.1. EVOLUÇÃO TEMPORAL DE COMPOSTOS FENÓLICOS E DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE VINHOS TINTOS BRASILEIROS

Evolução Temporal de Compostos Fenólicos e de Atividade Antioxidante de Vinhos Tintos Brasileiros

Mariana de Vasconcellos Dullius^{†*}, Amanda Heemann Junges[‡], Flávio Varone Gonçalves[‡],
Alessandro de Oliveira Rios[†], Vitor Manfroí[†], Maria Goreti Rodrigues Vale[§],
Plinho Francisco Hertz[†]

[†]Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9.500, Agronomia, Prédio 43.212, Cep: 91.501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

[‡]Centro Estadual de Meteorologia, Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – CemetRS/FEPAGRO, Rua Gonçalves Dias, 570, Porto Alegre, RS, Brasil

[§]Instituto de Química, Departamento de Química Inorgânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9.500, Agronomia, Prédio 43.111, Cep: 91.501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

* A quem a correspondência deve ser enviada: mariana.dullius@gmail.com

RESUMO

A vitivinicultura, em comparação a outros locais do mundo, é uma atividade relativamente recente no Brasil, o que faz com que ainda não estejam absolutamente consolidadas as regiões de produção, baseadas nas suas características únicas de *terroir*, as quais possam dar origem às DOC's. Com base no estudo de 90 amostras de vinhos provenientes de sete diferentes regiões brasileiras, avaliados em cinco momentos no decorrer de um ano, o IPT e a AOX apresentaram evolução distinta. Através da ANOVA, pelo menos uma das regiões diferiu das demais em termos de IPT e AOX ($p < 0,05$). As variáveis estudadas apresentaram correlações fortes e muito fortes no decorrer do período considerado. A região VSF exibiu, tanto os mais elevados valores de IPT em todos os tempos de análise [($t_{zero}=4.516$; $t_{25}=3.516$; $t_{35}=2.475$; $t_{45}=2.027$; $t_{55}=1.598$) mg.L^{-1} GAE], quanto a mais alta AOX, nos quatro primeiros dos cinco momentos avaliados. A região OPR apresentou os mais baixos resultados para ambos os parâmetros considerados em todos os tempos medidos, sendo que os valores de IPT corresponderam a 47, 52, 54, 58 e 63% e os valores de AOX a 49, 55, 57, 61 e 79% dos valores encontrados para VSF. A evolução temporal de IPT e de AOX mostrou que as diferenças entre vinhos procedentes de regiões de origem distintas diminuem com o decorrer das 55 semanas e que, em t_{zero} , características aportadas por variáveis meteorológicas podem ter favorecido as diferenças, enquanto que em t_{55} as condições de estocagem aproximaram ao máximo os grupos.

Palavras-Chave: polifenóis totais, propriedades antirradicais-livres, variáveis meteorológicas, caracterização vitivinícola, *terroir* Brasileiro.

ABSTRACT

The wine production, when compared to other places worldwide, is a relatively recent activity in Brazil. Therefore the regions of production remain still not completely consolidated, and it could be done if it would have taken into consideration the unique characteristics of its *terroir*, which could allow to originate and consolidate the DOC's. This work brings evidence, based on the study of 90 samples of wine, having origin in seven distinct Brazilian regions, and evaluated in five different times with the past of one year, the IPT and the AOX tends to perform distinctively and for the ANOVA test, at least one of the regions differ for IPT and AOX ($p < 0,05$). The variables presented even strong or really strong correlation during the analyzed interval of time. The VSF region presented not only the most elevated values for IPT in all measured times [($t_{zero}=4.516$; $t_{25}=3.516$; $t_{35}=2.475$; $t_{45}=2.027$; $t_{55}=1.598$) mg.L^{-1} GAE] as the highest ones for AOX in four from the five times of analysis. On the other hand, the OPR region showed the lowest results among all regions in all measuring times, exhibiting IPT values of 47, 52, 54, 58 e 63% and AOX concentrations of 49, 55, 57, 61 e 79% from those found for VSF. The temporal evolution of IPT and AOX showed that the differences among wines coming from distinct regions become smaller with the past of the 55 weeks, and that, in t_{zero} , particularities printed by climate variables may had favored the differences, while in t_{55} , the stocking conditions approached groups to the most.

Keywords: total polyphenols, scavenger properties, climate variables, viticulture characterization, Brazilian *terroir*

INTRODUÇÃO

Devido a sua extensão continental, podem ser atualmente descritas diferentes regiões de cultivo para a videira no Brasil, das quais se esperam distintas expressões varietais. Giovaninni e Manfroi (2009) definiram cinco diferentes *terroirs* para o Estado do Rio Grande do Sul (Serra Gaúcha, Serra do Sudeste ou Alto Camaquã, Campanha Gaúcha, Campos de Cima da Serra e Costa do Guaíba), dois para o Estado de Santa Catarina (Vale do Rio do Peixe e Serra Catarinense) e um para o conjunto que engloba os Estados da Bahia, Pernambuco e Minas Gerais, denominado Vale do São Francisco.

De acordo com Giovaninni e Manfroi (2009), em cada *terroir* brasileiro serão encontradas particularidades regionais e ambientais, que influenciarão a matéria prima uva, base para a obtenção de vinhos. Somando-se as particularidades de

clones às características das variedades e à adaptabilidade das cepas às diferentes condições edafoclimáticas, geram-se produtos viticolamente distintos. Sendo assim, combinando-se os fatores citados às peculiaridades enológicas possíveis de serem adotadas na elaboração dos vinhos, estar-se-á falando de uma enorme diversidade de produtos potencialmente capazes de serem obtidos. Dessa forma, o estabelecimento de áreas ambientalmente semelhantes, com a adoção de práticas e métodos de cultivos próprios, visa a definir métodos legais para a obtenção de produtos típicos e a atuar na fiscalização de denominações de origem controlada (DOC's) (KRAMER, 2007).

Diversas propriedades dos vinhos podem ser usadas para a sua caracterização, entre as quais, o seu conteúdo fenólico e as suas capacidades em neutralizar moléculas de espécies reativas de oxigênio (do inglês Reactive Oxygen Species – ROS). A atividade antioxidante (AOX) de vinhos geralmente é medida através de métodos que exigem dos compostos com atividade antirradical-livre (anti-ROS) presentes nos vinhos a neutralização de soluções orgânicas contendo espécies reativas de oxigênio (ROS) (Re *et al.*, 1998). Por sua vez a concentração de polifenóis presentes pode ser determinada pelo Índice de Polifenóis Totais (IPT) (MAMEDE e PASTORE, 2004) e, devido à constituição variável destes compostos no fruto, há variações muito grandes entre os potenciais anti-ROS dos vinhos.

Polifenóis são compostos que contemplam em sua estrutura diversos anéis aromáticos do tipo fenol. Têm origem no catabolismo de açúcares, estando presentes na baga das uvas (*Vitis* spp.) desde a sua formação (FENNEMA, 2000). Além de nos frutos, são encontrados amplamente distribuídos em outras partes da planta. Mamede e Pastore (2004) apontam que parte da diferença das atividades anti-ROS dos vinhos também é atribuída a variações entre as estruturas dos diversos polifenóis.

Uma série de fatores – enzimáticos e não enzimáticos – desenvolvidos pela planta como forma de responder ao estresse oxidativo determinam a síntese dos polifenóis (VULETA *et al.*, 2010). Entre os mecanismos não enzimáticos, encontram-se substâncias como ascorbato, glutatona e tocoferol além de diversos compostos carotenóides e polifenólicos (SCANDALIOS, 1993). Muitas vezes, esses mecanismos são ativados conjuntamente para reforçarem as defesas da planta (VULETA *et al.*, 2010).

Landrault *et al.* (2001) descrevem correlações entre o conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante de vinhos. Entretanto, o maior conteúdo destas substâncias fenólicas não implica, necessariamente, maior atividade antioxidante (RIVERO-PÉREZ, MUÑÍZ, GONZÁLEZ-SANJOSÉ, 2007). A atividade antioxidante de vinhos parece estar mais relacionada ao tipo de compostos fenólicos presentes (RICE-EVANS e MILLER, 1996). Nesse sentido, flavonóides, proantocianidinas e antocianinas são os que apresentam maior potencial antioxidante (FRANKEL, WATERHOUSE e TEISSEDE, 1995; RICE-EVANS e MILLER, 1996).

Entre os compostos fenólicos presentes na baga, encontram-se: flavonóides – que correspondem às antocianinas, aos flavonóis e às proantocianidinas (também denominadas de taninos condensados ou flavan-3-óis) – e os não-flavonóides, onde os estilbenos constituem os principais representantes do grupo (KENNEDY, MATTHEWS e WATERHOUSE, 2002).

Entre os flavonóis mais recorrentes em vinhos, encontram-se a quercetina e a miricetina (MATTIVI *et al.*, 2006). O 3,5,4'- trihidróxi-estilbeno, ou resveratrol, é considerado o estilbeno mais bioativo em videiras (BAVARESCO *et al.*, 2008). Apresenta-se sob a forma de dois isômeros ópticos, o *cis*-resveratrol e o *trans*-resveratrol. A este último – por ser o único que apresenta atividade biológica – atribuem-se todos os benefícios para a saúde associados ao resveratrol (ALVES, 2006).

As videiras cultivadas em áreas de elevada altitude, onde a radiação ultravioleta (UV) e a concentração de ácido abscísico (ABA) são mais intensas, podem sintetizar maiores quantidades de resveratrol (CELOTTI *et al.*, 1996, BERLI, 2011) e de antocianinas (MATEUS *et al.*, 2001). A irradiação pela luz UV-B parece estar associada com o aumento na concentração da enzima responsável pela biossíntese dos flavonóides (BERLI, 2011), sendo que estes protegem o material genético das plantas contra danos provocados pelos raios-UV (KOLOUCHOVÁ-HANZLÍKOVÁ *et al.*, 2004).

Segundo Kramer (2007), não haveria maturação do vinho se não houvesse degradação de compostos polifenólicos, pois é justamente devido à extensa polimerização dos compostos antioxidantes que a dureza e a adstringência do vinho são perdidas. Vinhos de maior idade apresentam avançada degradação de compostos polifenólicos, com predominância, em termos de tonalidade, do amarelo sobre o vermelho (KRAMER, 2007). Além da importância na evolução dos vinhos, os

compostos fenólicos, devido a sua propriedade antioxidante, são relatados em estudos epidemiológicos pela sua ação protetora aos sistemas biológicos (KLATSKY, ARMSTRONG e FRIEDMAN, 1992; LONGNECKER, 1994). Entre os principais resultados encontrados em diversas pesquisas, destacam-se: aqueles que sugerem que o vinho tinto apresenta a capacidade de reduzir o risco de mortalidade por doenças coronarianas (MC EL DUFF e DOBSON, 1997); aqueles que apontam que a ingestão moderada de vinhos aporta uma adequada concentração de compostos fenólicos, os quais podem contribuir para diminuição no risco de isquemias (BARON-MENGUY *et al.*, 2007); aqueles que associam uma alta concentração de compostos fenólicos pela dieta à prevenção de tumores malignos (BARON-MENGUY *et al.*, 2007); aqueles que destacam o resveratrol pelas suas propriedades de inibição da agregação plaquetária e pela diminuição do risco de formação de coágulos sanguíneos (HINES *et al.*, 2001); e aqueles que atribuem às antocianinas ações anti-inflamatórias, antimicrobianas e antitumorais (WANG, COA e PRIOR, 1997).

Esse trabalho tem como objetivo comparar vinhos tintos de diferentes regiões brasileiras, em termos de IPT e da AOX, e caracterizar o perfil de regiões com potencial para estabelecimento e consolidação de DOC's.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras: Noventa (90) garrafas de vinhos tintos apresentados na Amostra Nacional de Vinhos de 2009 (ANAVI 2009), classificadas de acordo com a sua localidade ou região de origem pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Uva e Vinho), foram obtidas, desta mesma empresa, e armazenadas em frascos âmbar de 250 mL a 4 °C. As amostras foram reagrupadas (tabela 1), tendo-se em consideração: a Unidade da Federação na qual se situam (RS, BA, PE, SC, PR) e a região fisiográfica (ARENDI, 1997) da qual fazem parte (Encosta Superior do Nordeste (ESN); Sertão (Ser); Campanha Gaúcha (Cam); Campos de Cima da Serra (CCS); Planalto Serrano (PSe); e Planalto de Guarapuava (PGu). Dessa nova divisão, resultaram sete grandes grupos: Vale dos Vinhedos (VVi); Serra Gaúcha (SGa); Vale do Rio São Francisco (VSF); Campanha Gaúcha (Cam); Campos de

Cima da Serra (CCS); Serra Catarinense (SCa); e Oeste do Paraná (OPR): 4), com 11, 45, 2, 12, 7, 9 e 4 amostras respectivamente. As amostras foram identificadas por número seguido de uma letra minúscula (a, b, c, d, e, f) que define o grupo, seguindo a sequência descrita anteriormente. A região fisiográfica ESN foi dividida em dois grupos: VVi e SGa, por levar em conta o fato de que a primeira já possui Indicação de Procedência (IP) e pudesse constituir um *cluster* de amostras com características distintas. Após a classificação, as amostras foram redistribuídas em frascos âmbar de 15 mL e mantidas à temperatura e umidade ambiente até as análises. Em cada tempo de análise, um frasco de 15 mL de cada amostra era analisado e, na sequência, descartado.

Procedimentos Analíticos: As análises de IPT e AOX foram realizadas em cinco períodos: tempo zero (t_{zero}); 25 (t_{25}), 35 (t_{35}), 45 (t_{45}) e 55 semanas após o tempo zero (t_{55}). O IPT dos vinhos foi determinado através do método de *Folin Ciocalteu's*, descrito em (SINGLETON, ORTHOFEN e LAMUELA-RAVENTÓS, 1999; WATERHOUSE, 2002). As amostras foram diluídas em água destilada e usadas em 10, 10, 15, 15 e 20% de concentração, respectivamente, em cada um dos cinco tempos de análise. As leituras foram executadas em comprimento de onda de 765 nm no espectrofotômetro UV-Vis-3000 PRO (Amersham-Biosciences). Os reagentes utilizados foram de grau analítico e as reações foram conduzidas em triplicata, na penumbra. O IPT foi calculado a partir de curvas de calibração tendo o ácido gálico (Sigma-Aldrich) como padrão. Os resultados foram expressos em $mg.L^{-1}$ de ácido gálico, ou em equivalente de ácido gálico (GAE). Foram elaborados gráficos com a evolução temporal dos resultados médios de cada região avaliada. A AOX das amostras foi determinada usando o método de neutralização do radical instável 1,1-difenil-2-picril-hidrazil ($DPPH^+$) descrito em (BRAND-WILLIAMS, 1995). As amostras foram diluídas em água destilada e usadas em 2, 2, 4, 4 e 6% de concentração, respectivamente para cada tempo avaliado. As leituras foram executadas em espectrofotômetro UV-Vis-3000 PRO (Amersham-Biosciences) no comprimento de onda de 515 nm. Os reagentes utilizados foram de grau analítico e as reações foram conduzidas em triplicata, na penumbra. A AOX foi calculada através de curvas de calibração construídas tendo o TROLOX (Sigma-Aldrich) como um antioxidante padrão. Os resultados foram expressos em μM de TROLOX ou em Capacidade Antioxidante Equivalente ao TROLOX (TEAC). Foram elaborados gráficos com a evolução temporal dos resultados médios de cada região avaliada.

Tabela 1: Identificação das amostras por: Unidade da Federação na qual tiveram origem (RS, BA, PE, SC e PR); região fisiográfica a qual pertencem (ESN=Encosta Superior do Nordeste; Ser=Sertão; Cam=Campanha Gaúcha; CCS=Campos de Cima da Serra; PSe=Planalto Serrano; e PGu=Planalto de Guarapuava); região de origem do vinho (VVi=Vale dos Vinhedos; SGa=Serra Gaúcha; VSF=Vale do Rio São Francisco; Cam=Campanha Gaúcha; CCS=Campos de Cima da Serra; SCa=Serra Catarinense; e OPR=Oeste do Paraná); e variedade de uva (merlot/cabernet sauvignon)

Amostra	Variedade	Região Fisiográfica	Região de Origem do Vinho	Unidade da Federação
1a	Merlot	ESN	Vvi	RS
2a	Cabernet Sauvignon	ESN	Vvi	RS
3a	Cabernet Sauvignon	ESN	Vvi	RS
4a	Merlot	ESN	Vvi	RS
5a	Merlot	ESN	Vvi	RS
6a	Cabernet Sauvignon	ESN	Vvi	RS
7a	Merlot	ESN	Vvi	RS
8a	Cabernet Sauvignon	ESN	Vvi	RS
9a	Merlot	ESN	Vvi	RS
10a	Merlot	ESN	Vvi	RS
11a	Cabernet Sauvignon	ESN	Vvi	RS
1b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
2b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
3b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
4b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
5b	Merlot	ESN	Sga	RS
6b	Merlot	ESN	Sga	RS
7b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
8b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
9b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
10b	Merlot	ESN	Sga	RS
11b	Merlot	ESN	Sga	RS
12b	Merlot	ESN	Sga	RS
13b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
14b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
15b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
16b	Merlot	ESN	Sga	RS
17b	Merlot	ESN	Sga	RS
18b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
19b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
20b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
21b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
22b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
23b	Merlot	ESN	Sga	RS
24b	Merlot	ESN	Sga	RS
25b	Merlot	ESN	Sga	RS
26b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
27b	Merlot	ESN	Sga	RS
28b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
29b	Merlot	ESN	Sga	RS
30b	Merlot	ESN	Sga	RS
31b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
32b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
33b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
34b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
35b	Merlot	ESN	Sga	RS
36b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
37b	Merlot	ESN	Sga	RS
38b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
39b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
40b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
41b	Cabernet Sauvignon	ESN	Sga	RS
42b	Merlot	ESN	Sga	RS
43b	Merlot	ESN	Sga	RS
44b	Merlot	ESN	Sga	RS
45b	Merlot	ESN	Sga	RS
1c	Cabernet Sauvignon	Ser	VSF	BA
2c	Cabernet Sauvignon	Ser	VSF	PE
1d	Merlot	Cam	Cam	RS
2d	Cabernet Sauvignon	Cam	Cam	RS
3d	Cabernet Sauvignon	Cam	Cam	RS
4d	Cabernet Sauvignon	Cam	Cam	RS
5d	Cabernet Sauvignon	Cam	Cam	RS
6d	Cabernet Sauvignon	Cam	Cam	RS
7d	Cabernet Sauvignon	Cam	Cam	RS
8d	Merlot	Cam	Cam	RS
9d	Cabernet Sauvignon	Cam	Cam	RS
10d	Cabernet Sauvignon	Cam	Cam	RS
11d	Cabernet Sauvignon	Cam	Cam	RS
12d	Cabernet Sauvignon	Cam	Cam	RS
1e	Cabernet Sauvignon	CCS	CCS	RS
2e	Cabernet Sauvignon	CCS	CCS	RS
3e	Merlot	CCS	CCS	RS
4e	Cabernet Sauvignon	CCS	CCS	RS
5e	Cabernet Sauvignon	CCS	CCS	RS
6e	Cabernet Sauvignon	CCS	CCS	RS
7e	Merlot	CCS	CCS	RS
1f	Cabernet Sauvignon	Pse	Sca	SC
2f	Merlot	Pse	Sca	SC
3f	Cabernet Sauvignon	Pse	Sca	SC
4f	Cabernet Sauvignon	Pse	Sca	SC
5f	Cabernet Sauvignon	Pse	Sca	SC
6f	Cabernet Sauvignon	Pse	Sca	SC
7f	Merlot	Pse	Sca	SC
8f	Cabernet Sauvignon	Pse	Sca	SC
9f	Cabernet Sauvignon	Pse	Sca	SC
1g	Cabernet Sauvignon	Pgu	OPR	PR
2g	Merlot	Pgu	OPR	PR
3g	Merlot	Pgu	OPR	PR
4g	Cabernet Sauvignon	Pgu	OPR	PR

Análise dos Resultados: Os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a 95% de probabilidade estatística. Correlações de Pearson foram aplicadas a um grau de significância de 95%. Os resultados foram discutidos de acordo com: tempo de análise em semanas; evolução temporal dos parâmetros IPT e AOX; região de origem das amostras (grupo); e variedade (merlot ou cabernet sauvignon).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por serem provenientes de regiões distintas, variáveis meteorológicas fornecidas pelo Centro Estadual de Meteorologia, Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (CemetRS/FEPAGRO) e pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) (tabelas 2-6) foram interpretadas na hora de explicar os resultados. Devido ao fato de os vinhos serem resultado de um processo de síntese e acúmulo de compostos fenólicos que tiveram origem na videira (HORNSEY, 2007), condições agroclimáticas devem ser levadas em consideração, de forma a compreender as possíveis diferenças existentes entre os grupos, as quais possam ser resultado da combinação do ambiente (clima, solo, planta) com o manejo (práticas agrônômicas e enológicas) adotado.

Tabelas 2-6. Variáveis meteorológicas obtidas das estações meteorológicas localizadas em Uruguaiana, Bagé, Caxias do Sul, Bento Gonçalves, Petrolina e São Joaquim, de outubro de 2008 a março de 2009. Fonte: Dados de Uruguaiana e Caxias do Sul (CemetRS/FEPAGRO); dados de Bagé, Petrolina, Petrolina* e São Joaquim (INMET); dados de Bento Gonçalves (EMBRAPA, 2012)

Precipitação Mensal (mm)							
Período	Uruguaiana	Bagé	Caxias do Sul	Bento Gonçalves	Petrolina	Petrolina*	São Joaquim
Outubro de 2008	236,3	97,9	267,3	309,6	0,0	90,2	382,8
Novembro de 2008	23,1	51,9	104,1	70,3	0,0	55,3	236,3
Dezembro de 2008	21,9	78,8	101,6	85,8	63,1	7,1	92,6
Janeiro de 2009	123,9	98,3	226,7	269,6	5,4	3,4	192,2
Fevereiro de 2009	146,5	156,1	148,7	144,5	121,4	3,4	111,5
Março de 2009	139,0	45,2	82,4	90,6	116,4	0,0	93,1

Temperatura Mínima Mensal (°C)							
Período	Uruguaiana	Bagé	Caxias do Sul	Bento Gonçalves	Petrolina	Petrolina*	São Joaquim
Outubro de 2008	14,1	12,5	11,7	13,1	21,0	23,5	10,2
Novembro de 2008	17,0	15,2	12,9	14,7	22,4	22,6	10,9
Dezembro de 2008	18,6	16,0	13,7	15,6	22,3	21,4	11,2
Janeiro de 2009	18,4	16,8	14,3	16,1	22,9	20,9	12,7
Fevereiro de 2009	19,2	17,7	15,7	17,8	22,1	21,1	14,3
Março de 2009	17,4	16,9	14,9	17,1	23,9	22,6	13,7

Tabelas 2-6 (cont.). Variáveis meteorológicas obtidas das estações meteorológicas localizadas em Uruguaiana, Bagé, Caxias do Sul, Bento Gonçalves, Petrolina e São Joaquim, de outubro de 2008 a março de 2009. Fonte: Dados de Uruguaiana e Caxias do Sul (CemetRS/Fepagro); dados de Bagé, Petrolina, Petrolina* e São Joaquim (INMET); dados de Bento Gonçalves (EMBRAPA, 2012)

Temperatura Máxima Mensal (°C)							
Período	Uruguaiana	Bagé	Caxias do Sul	Bento Gonçalves	Petrolina	Petrolina*	São Joaquim
Outubro de 2008	24,7	22,1	20,4	21,2	34,3	30,8	17,2
Novembro de 2008	30,4	27,5	23,3	25	35,5	29,0	18,5
Dezembro de 2008	32,1	27,9	24,8	26,2	33,4	29,5	21,3
Janeiro de 2009	31,5	29,1	24,1	25,7	34,0	30,2	21,0
Fevereiro de 2009	30,9	29,1	25,5	26,6	32,2	31,2	22,7
Março de 2009	30,1	27,4	25,0	26,2	33,0	34,2	22,4

Temperatura Média Mensal (°C)							
Período	Uruguaiana	Bagé	Caxias do Sul	Bento Gonçalves	Petrolina	Petrolina*	São Joaquim
Outubro de 2008	19,4	17,6	16,0	16,8	27,6	27,1	13,0
Novembro de 2008	23,7	21,4	18,1	19,4	28,7	25,9	14,0
Dezembro de 2008	25,4	22,1	19,2	20,3	27,9	25,5	15,3
Janeiro de 2009	25,0	22,6	19,2	20,4	28,5	25,6	15,9
Fevereiro de 2009	25,1	23,2	20,6	21,7	27,1	26,1	17,6
Março de 2009	23,8	22,2	19,8	21,0	28,5	28,3	16,9

Amplitude Térmica Mensal (°C)							
Período	Uruguaiana	Bagé	Caxias do Sul	Bento Gonçalves	Petrolina	Petrolina*	São Joaquim
Outubro de 2008	10,5	9,6	8,7	8,1	13,3	7,3	7,0
Novembro de 2008	13,5	12,4	10,4	10,3	13,1	6,4	7,6
Dezembro de 2008	13,5	11,9	11,1	10,6	11,1	8,1	10,1
Janeiro de 2009	13,0	12,3	9,8	9,6	11,1	9,3	8,3
Fevereiro de 2009	11,8	11,4	9,7	8,8	10,1	10,1	8,4
Março de 2009	12,7	10,6	10,2	9,1	9,1	11,6	8,7

* Dados fazem referência ao período de abril de 2009 a Setembro de 2009, por considerar a possibilidade de que o ciclo reprodutivo da planta possa ter acontecido neste período

Nas regiões analisadas, observou-se queda no IPT (Figura 1), ao longo de período, acompanhada pela perda da AOX (Figura 2). Foram observadas diferenças entre os valores iniciais e finais de cada região em estudo. Cabe salientar que o grande intervalo entre o tempo zero e o tempo 55 semanas fez com que o volume de ar dentro dos frascos fosse proporcionalmente elevado para o volume de vinho ali contido. Nessas condições, há efeito do oxigênio sobre as antocianinas (CANO-LÓPEZ *et al.*, 2007; KRAMER, 2007), cuja ação prolongada culmina com a perda de cor do vinho e formação de copolímeros de tonalidade amarelada, as quais imprimem no vinho uma aparência de envelhecido.

A maior diferença, em termos de valores iniciais e finais de IPT, foi observada nos vinhos provenientes da região VSF, em que as amostras partiram dos mais elevados valores de IPT (5.170 GAE) e AOX (17.125 TEAC) e caíram até 1804 GAE e 5.498 TEAC respectivamente. As regiões que menos oscilam, em termos de valores iniciais e finais de IPT, também são aquelas que partem de valores mais

baixos, como podem ser a região OPR (2.104 a 1.008 GAE; 8.397 a 4.346 TEAC) e a região da SGa (2.738 a 1.426 GAE; 9.669 a 5.169 TEAC). Pela ANOVA, pelo menos uma das regiões difere das demais ($p < 0,05$) para IPT e AOX.

A região do VSF apresentou os maiores dados de IPT e AOX. Quando analisados em termos qualitativos, os elevados valores de IPT e AOX não implicaram maior concentração de antocianinas (Dullius *et al.* dados não publicados). Sabe-se que, para a síntese de pigmentos, a variação térmica (diferenças entre as temperaturas mínimas e máximas do ar) é fundamental, e que o fato de haver elevado IPT não implica, obrigatoriamente, maior intensidade de cor (DOWNEY *et al.*, 2006, YAMANE *et al.*, 2006, MORI, *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2011). A elevada AOX encontrada em vinhos do VSF pode ser atribuída a outros componentes fenólicos incolores ou amarelos, tais como os estilbenos, as flavonas e os flavan-3-óis.

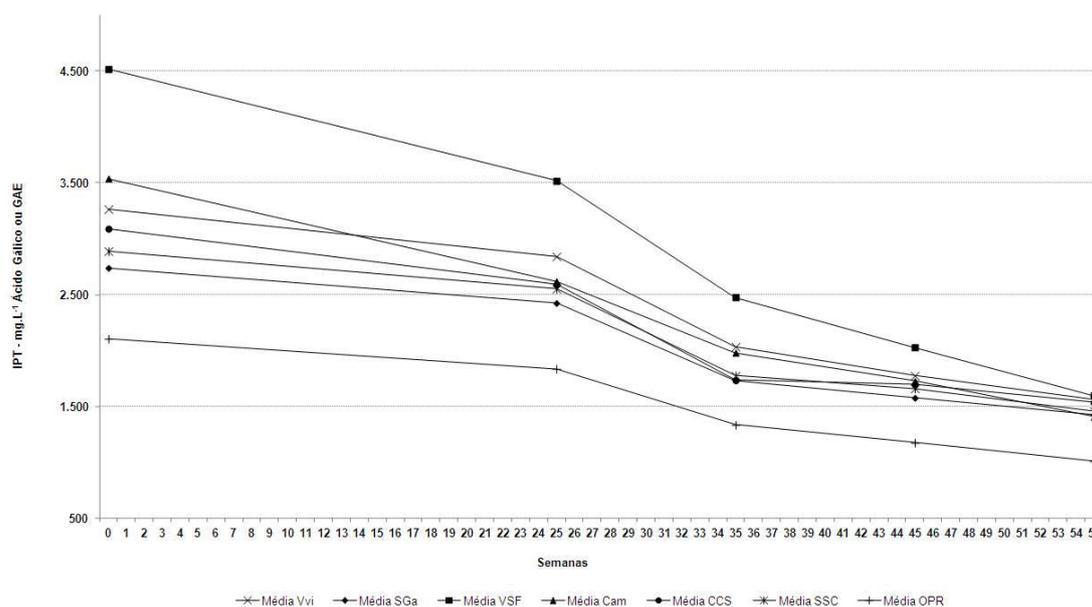


Figura 1: Evolução dos compostos fenólicos (IPT) de vinhos tintos procedentes de diferentes regiões do Brasil no período de zero a 55 semanas. Dados médios para as amostras das regiões Vale dos Vinhedos (Vvi), Serra Gaúcha (SGa), Vale do Rio São Francisco (VSF), Campanha Gaúcha (Cam), Campos de Cima da Serra (CCS), Serra de Santa Catarina (SSC) e Oeste do Paraná (OPR)

As condições de estresse hídrico a que estão submetidas as videiras no VSF, associadas a maior disponibilidade de radiação solar (com pouca variação inter-anual) podem fazer com que haja maior síntese de ácido abcísico (ABA) e de flavonóides. Berli (2011) encontrou alterações no perfil de antocianinas e de outros compostos fenólicos em uvas merlot tratadas com irradiação UV e ABA em máximas

concentrações e, com essa alteração, observou maior aumento naqueles compostos com maior AOX. O estresse hídrico, quando bem manejado, naturalmente leva a uma concentração de ABA na planta, especialmente quando for aplicada a estratégia de manter parcialmente seca a zona de raiz (STOLL *et al.*, 2000).

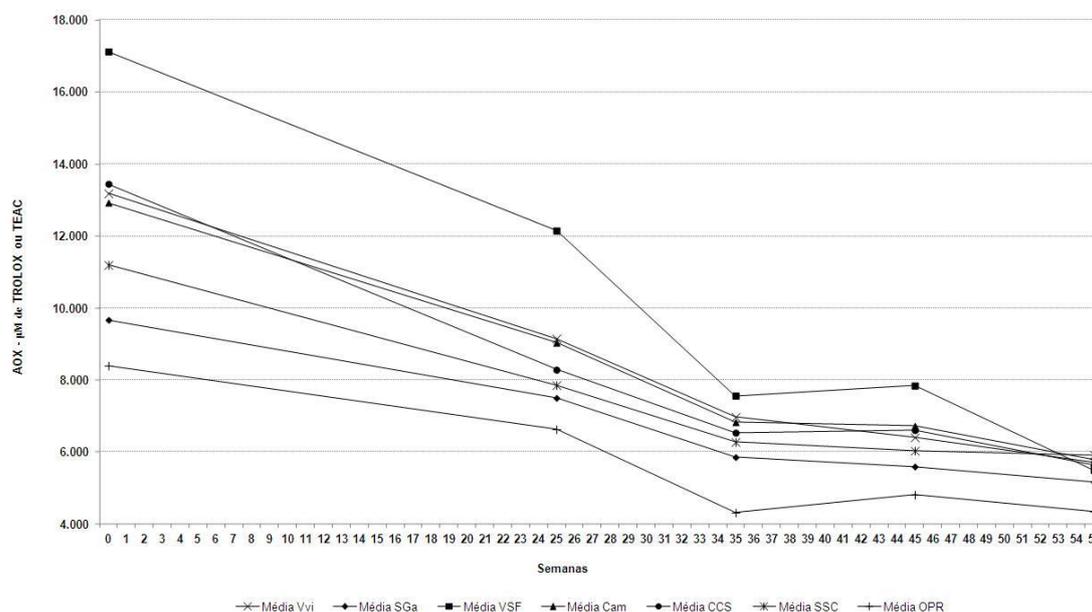


Figura 2: Evolução da atividade antioxidante (AOX) de vinhos tintos procedentes de diferentes regiões do Brasil no período de zero a 55 semanas. Dados médios para as amostras das regiões Vale dos Vinhedos (Vvi), Serra Gaúcha (SGa), Vale do Rio São Francisco (VSF), Campanha Gaúcha (Cam), Campos de Cima da Serra (CCS), Serra de Santa Catarina (SSC) e Oeste do Paraná (OPR)

A influência da insolação (número de horas de sol) e, conseqüentemente, da disponibilidade de radiação solar para as plantas pode auxiliar na interpretação dos resultados encontrados neste trabalho. No entanto, cabe salientar que não se pode afirmar que o período reprodutivo das videiras tenha ocorrido no mesmo período do ano em todas as regiões analisadas. Analisando-se os dados de insolação da região de Bento Gonçalves, observa-se que os períodos mais determinantes para a síntese de compostos fenólicos, os quais acontecem na fase final do ciclo reprodutivo (do início da troca de cor ao amadurecimento e colheita), não coincidem com os maiores valores de insolação do período analisado, os quais ocorreram antes desse período crítico mencionado. Assim sendo, os perfis temporais de IPT e AOX dos vinhos provenientes da região de Bento Gonçalves para a safra 2008/2009 são reflexo de uma condição menos favorecida, do ponto de vista da variável climática insolação.

Este aspecto certamente influenciou a síntese e o acúmulo de compostos na uva, tendo reflexo nos perfis temporais de IPT e AOX (PEDRO JR e SENTELHAS, 2003).

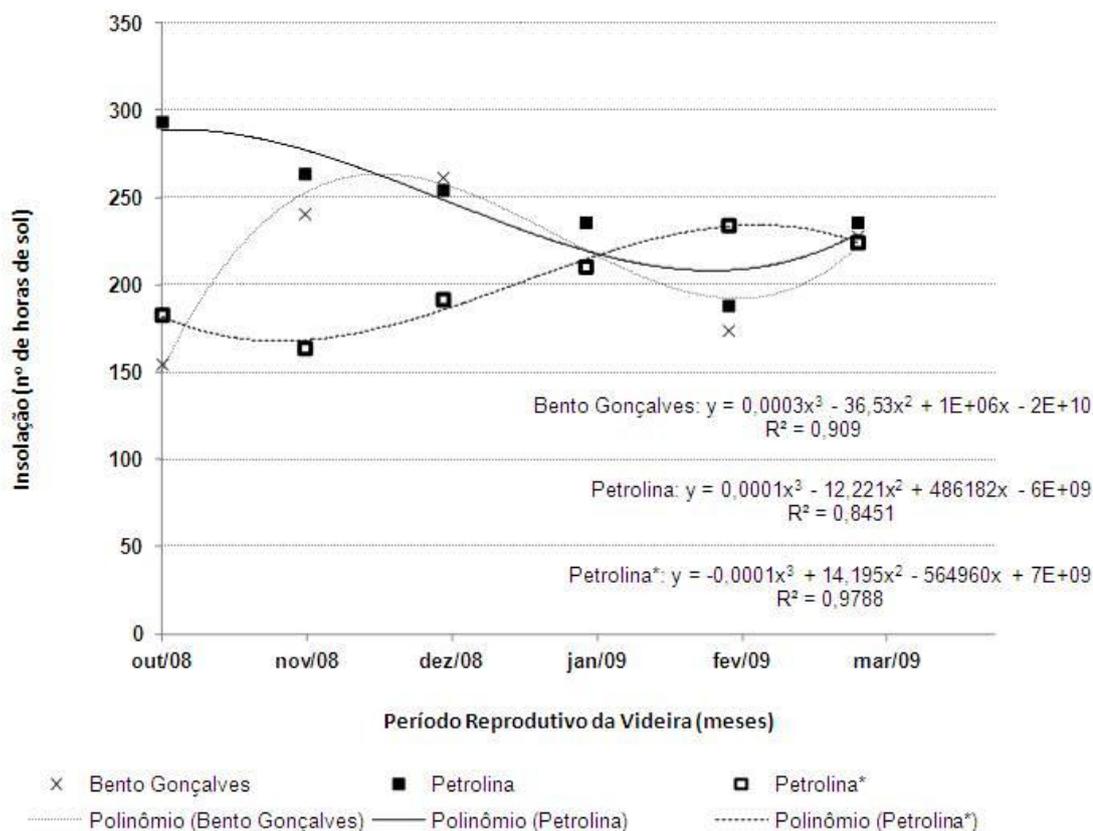


Figura 3. Insolação mensal (número de horas de sol) durante o período reprodutivo da videira (outubro de 2008 a março de 2009) das estações meteorológicas localizadas em Bento Gonçalves-RS e Petrolina-PE. Os dados Petrolina* correspondem ao período de Abril de 2009 a Setembro de 2009, por considerar a possibilidade de que o ciclo reprodutivo da planta possa ter acontecido neste período

Para a coloração adequada das bagas e para um desejável acúmulo de sólidos solúveis, são necessárias entre 1200 e 1400 horas de sol durante todo o ciclo vegetativo da videira, desde a saída da dormência até a colheita (PEDRO JR e SENTELHAS, 2003). As regiões que mais oferecem essa disponibilidade climática são VSF e Cam, justamente as regiões que apresentaram os mais altos valores iniciais de IPT e, também elevados valores para AOX, demonstrando que os vinhos elaborados com uvas daquelas regiões, são resultado de uma condição de síntese e acúmulo de polifenóis favorecida pela disponibilidade de horas de sol.

Regiões subtropicais são capazes de compensar em termos climáticos sua condição de baixa latitude quando se encontram situadas em elevada altitude.

Fatores como a amplitude térmica e a variação no fotoperíodo são intensificadas, portanto, em relevos de Serra (PEDRO JR e SENTELHAS, 2003). Dessa maneira, as regiões serranas VVi, CCS, SSC, SGa podem atribuir em parte o seu IPT e AOX a essa condição climática, importante para um melhor desempenho da cultura da uva.

Os valores mais baixos, em todos os tempos, para ambas as análises (IPT e AOX), ocorridos em OPR podem indicar uma série de possibilidades. Podem ser citadas: 1) o fato de a combinação das condições ambientais do ano agrícola 2008/2009 não ter favorecido a safra da uva vinífera, independentemente do manejo adotado; 2) o fato de que desempenhos mais elevados, em termos de IPT e AOX, naquele perímetro de produção da videira vinífera esteja limitado pelas condições ambientais existentes no OPR. Caso isso seja verdade, em uma sequência de anos analisados, seriam encontrados valores semelhantes aos desse trabalho. Estudos com variedades mais adaptadas àquele ambiente podem contribuir para um desempenho mais interessante do ponto de vista de IPT e AOX para OPR.

Em relação às amostras provenientes do VSF, embora não se possa determinar o período da floração à frutificação, a baixa amplitude térmica diária, distribuída uniformemente ao longo do ano (tabela 6), permite deduzir que são insuficientes as condições para a síntese de pigmentos. Entretanto, considerando-se que os maiores valores de insolação (figura 3) e os menores volumes de precipitação pluvial (tabela 2) ocorrem naquela região, a síntese de polifenóis pode ter sido favorecida. Com isso, ainda que não possam ser explicados pelo conteúdo de antocianinas (Dullius *et al.*, dados não publicados), os elevados valores de IPT e AOX encontrados neste trabalho, podem estar relacionados a outros tipos de compostos fenólicos. Pereira (2009) destaca que a maturação rápida da uva provocada por altas temperaturas do ar pode gerar um descompasso entre a maturação tecnológica e a maturação fenólica. Os vinhos resultantes apresentam baixa estabilidade de compostos de cor, altos pH's, alta sensibilidade à oxidação, taninos duros e adstringentes, o que dá a esse tipo de produto baixo potencial para a guarda (Pereira, 2009).

Em relação às variedades, merlot e cabernet sauvignon não apresentaram diferenças significativas pelo teste *t de student* para um α de 0,1. O fato de a análise ter sido realizada com todas as amostras de vinhos – e não especificamente por região – pode ter mascarado diferenças entre as variedades. Spinelli *et al.* (2006)

encontraram maiores teores de *trans*-resveratrol e estilbenos totais superiores em vinhos merlot quando comparados aos vinhos tannat e cabernet sauvignon. Dias (2009) também encontrou teores mais elevados de resveratrol na variedade merlot, o que pode culminar com IPT e AOX diferentes em função da variedade, já que, qualitativamente, as uvas diferem entre si e o tipo de composto fenólico predominante influencia a AOX de vinhos.

Já a análise de correlação entre os dados confirma a associação linear entre IPT e AOX. Para os tempos estudados, e segundo a classificação de Hair (2004), os dados apresentaram os seguintes valores de correlação: $t_{zero}=0,96$ (associação linear muito forte); $t_{25}=0,96$ (associação linear muito forte); $t_{35}=0,92$ (associação linear muito forte); $t_{45}=0,95$ (associação linear muito forte); e $t_{55}=0,83$ (associação linear forte). Esse resultado era esperado em função da capacidade antioxidante exercida pelos compostos fenólicos.

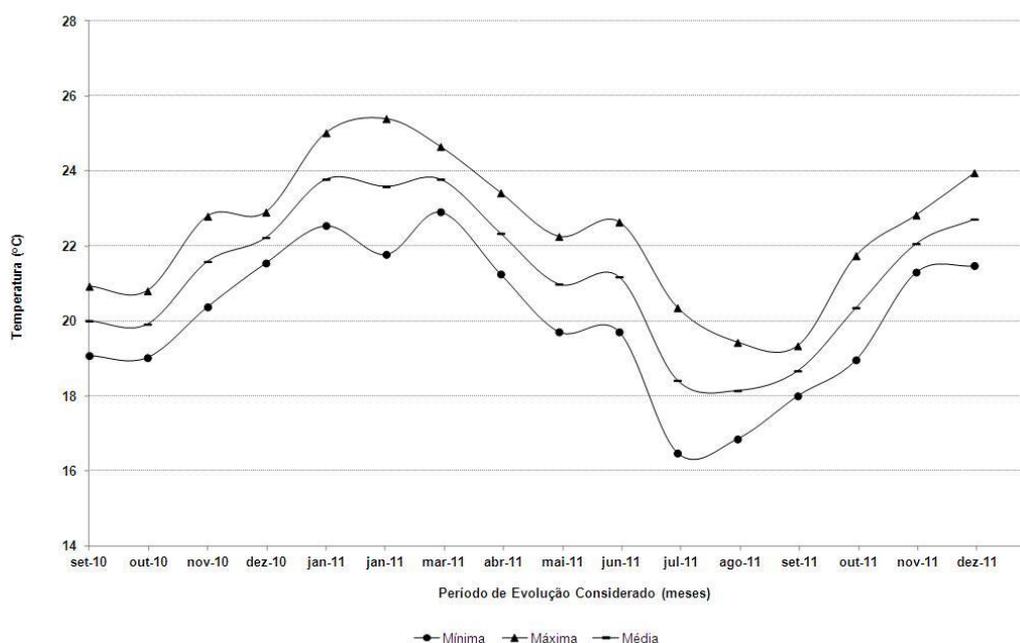


Figura 4. Variação de temperatura ambiente no local de estocagem dos vinhos durante o período de análise.

Nos períodos analisados, as maiores quedas nos valores de IPT e AOX são observadas entre t_{25} e t_{35} . Esse intervalo de tempo coincide com a maior queda de temperatura do ar no local de armazenamento dos vinhos, ocorrida entre março de 2011 e julho de 2011 (Figura 4) e com o mais longo período, em dias contínuos, nos quais a umidade relativa do ar permaneceu abaixo de 65% (Figura 5). A temperatura

do ar interfere na estabilidade de vinhos, e o efeito mais pronunciado desta influência se deu no final do verão. Neste período, a diminuição da temperatura do ar pode ter favorecido a precipitação dos compostos fenólicos e, conseqüentemente, a diminuição do IPT e da AOX dos vinhos analisados.

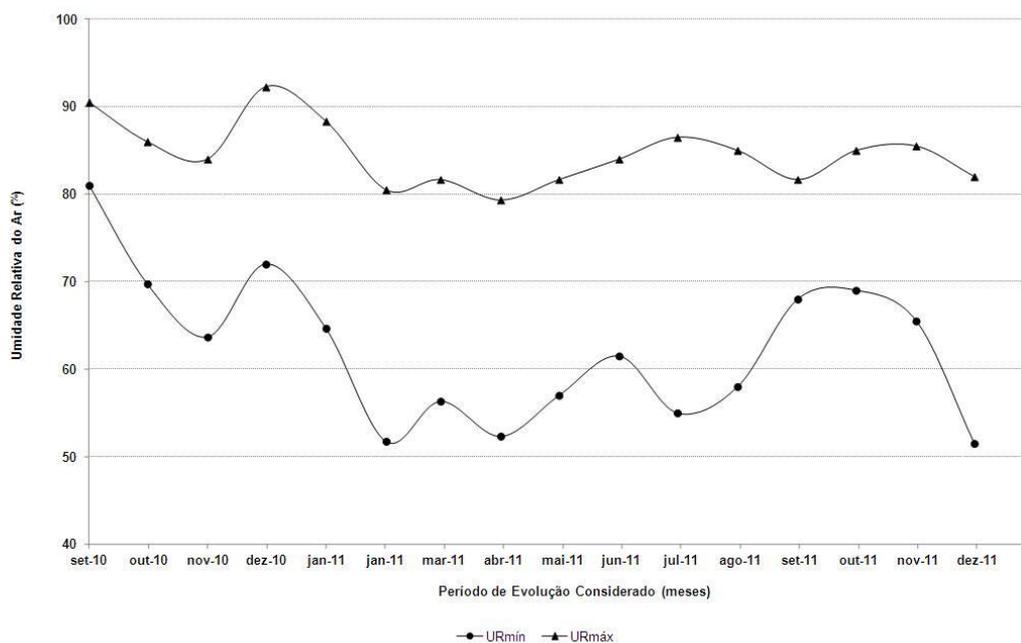


Figura 5. Variação da umidade ambiente no local de estocagem dos vinhos durante o período de análise.

O perfil de evolução temporal dos grupos, independentemente dos seus valores iniciais de IPT e AOX, tende a diminuir as diferenças entre si. Ao serem igualadas condições de temperatura, umidade e estocagem, as variações agroclimáticas e enológicas que definiram diferenças, em termos de IPT e AOX, aos vinhos provenientes de diferentes regiões brasileiras, foram reduzidas. As condições relativas ao armazenamento (temperatura, umidade e tipo de frasco) podem ter determinado o perfil temporal de evolução, minimizando em 55 semanas as diferenças finais entre os vinhos analisados, em termos de IPT e AOX.

CONCLUSÕES

- Os perfis de evolução temporal de IPT e AOX caracterizam-se pela diminuição dos valores no período de 0 a 55 semanas, independentemente da região fisiográfica de procedência dos vinhos.

2. Os vinhos provenientes das regiões VSF e VVi têm diferentes valores iniciais de IPT e AOX, sendo os maiores valores registrados pelos primeiros.

3. Os vinhos da região OPR exibem, durante o decorrer do período de análise, sempre os menores valores de IPT e de AOX.

4. Os vinhos de regiões caracterizadas ou pelas altas disponibilidades de radiação (VSF e Cam) ou pelas elevadas altitudes (VVi, CCS, SSC e SGa) apresentam maiores valores iniciais de IPT.

5. As diferenças em termos de disponibilidade de radiação solar e de amplitude térmica são associadas às diferenças em termos de valores de IPT e AOX de regiões como Vale do São Francisco (Petrolina) e Vale dos Vinhedos (Bento Gonçalves). A maior disponibilidade de radiação solar, com menor variabilidade do número de horas de sol no ano, está associada às maiores concentrações iniciais de IPT e AOX nos vinhos do VSF. No VVi, a concentração de polifenóis e a atividade antioxidante é decorrente da maior amplitude térmica que caracteriza o período de formação das bagas.

6. Ao final do período de análise, os valores de IPT e AOX não diferem entre vinhos provenientes de regiões distintas, o que pode estar associado ao efeito oxidativo do oxigênio contido nas garrafas e às condições de armazenagem (temperatura e umidade relativa do ar).

7. Vinhos de regiões brasileiras que apresentam condições climáticas diferenciadas conseguem ser caracterizados, em termos de IPT e AOX, de forma distinta.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O perfil evolutivo temporal de IPT e AOX pode ser uma informação a se ter em consideração na hora de se definir os perímetros DOC, baseados na tipicidade e autenticidade dos vinhos. Entretanto, cabe reforçar a necessidade de que sejam avaliadas séries mais longas de safras, que incluam maior número de amostras, especialmente das regiões incipientes na vitivinicultura, de forma a que se possa conhecê-las melhor e minimizar os riscos de que sejam tomadas conclusões precipitadas acerca das reais potencialidades das regiões.

A videira vinífera, como qualquer cultivo agrícola, apresenta variedades e clones que estão adaptados às regiões mais tradicionais de cultivo, sendo

necessários estudos agronômicos que venham a contribuir com a sua exploração em novas áreas de produção.

Para uma melhor caracterização das regiões, análises qualitativas dos polifenóis presentes nos vinhos deveriam ser consideradas, bem como o estudo de safras consecutivas, as quais permitiriam melhores compreensões acerca do comportamento típico das variáveis IPT e AOX. Além disso, informações específicas relacionadas ao manejo de enxofre feito pelas vinícolas precisam ser melhores conhecidas, de modo a eliminar o efeito AOX-pH-dependente proporcionado pelo enxofre não-combinado.

REFERÊNCIAS

ALVES, A. O. **Presença de trans-resveratrol em geléias de uva e sua relação com a radiação UV**. Santa Maria: UFSM – Universidade Federal de Santa Maria, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos), Centro de Ciências Rurais, Universidade de Santa Maria, 2006.

AREND, L. M. Geografia Física. *In: Rio Grande do Sul: Aspectos da Geografia*. HOFFMANN, G. R.; AREND, L. M.; SILVEIRA, J. C. B. da; BELLOMO, H. R.; NUNES, J. L. M. Porto Alegre, Martins Livreiro, 4ª ed., 104p, 1997.

BARON-MENGUY, C.; BOCQUET, A.; GUIHOT, A. L.; CHAPPARD, D.; AMIOT, M. J.; ANDRIANTSITOHAINA, R.; LOUFRANI, L.; HENRION, D. **Effects of red wine polyphenols on postischemic neovascularization model in rats: low doses are proangiogenic, high doses anti-angiogenic**. Federation of American Societies for Experimental Biology, Research Communication, 2007.

BAVARESCO, L.; GATTI, M.; PEZZUTTO, S.; FREGONI, M.; MATTIVI, F. **Effect of leaf removal on grape yield, berry composition and stilbene concentration**. American Journal of Enology and Viticulture, v. 59, p. 292-298, 2008.

BERLI, F.; FANZONE, M.; PICCOLI, P.; BOTTINI, R. **Solar UV-B and ABA are involved in phenol metabolism of *Vitis vinifera* L. increasing biosynthesis of berry skin polyphenols**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 59, p. 4874-4884, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity**. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie Food Science and Technology*, v. 28, p. 25-30, 1995.

CANO-LÓPEZ, M.; PARDO-MÍNGUEZ, F.; LÓPEZ-ROCA, J.M.; GÓMEZ-PLAZA, E. **Chromatic characteristics and anthocyanin profile of a micro-oxygenated red wine after oak or bottle maturation**. *European Food Research and Technology*, v. 225, p. 127-132, 2007.

CELOTTI, E.; FERRARINI, R.; ZIRONI, R.; CONTE, L. S. **Resveratrol content of some wines obtained from dried Valpolicella grapes: Recioto and Amarone**. *Journal of Chromatography A*, v. 730, p. 47-52, 1996.

DIAS, J. F. **Determinação dos conteúdos de resveratrol em vinhos tintos de duas regiões brasileiras**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2009. Dissertação (Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

DOWNEY, M. O.; DOKOOZLIAN, N. K.; KRSTIC, M. P. **Cultural practice and environmental impacts on the flavonoids composition of grapes and wine: a review of recent research**. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 57 p. 257-267, 2006.

DULLIUS, M. de V.; RIOS, A. de O.; MANFROI, V.; JABLONSKI, A.; VALE, M. G. R.; HERTZ, P. H. **Brazilian Red Wines Color and Anthocyanins Characterization**. Dados não publicados.

EMBRAPA. Dados mensais de 2001 a 2012. Disponível em: <http://www.cnpv.embrapa.br/prodserv/meteorologia/>. Acessado em 13/02/2012

FENNEMA, O.R. Colorantes. *In: Química de los Alimentos*. Editorial Acríbia, Zaragoza, Espanha, 2ª Ed., p. 773-854, 2000.

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

GIOVANINNI, E.; MANFROI, V. **Viticultura e enologia – elaboração de grandes vinhos nos Terroirs Brasileiros**. IFRS – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, 344 p., 2009.

HINNES, L. M.; STAMPFER, M. J.; MA, J.; GAZIANO, J. M.; RIDKER, P. M.;

HANKINSON, S. E.; SACKS, F.; RIMM, E. B.; HUNTER, D. J. **Genetic variation in alcohol dehydrogenase and the beneficial effect of moderate alcohol consumption on myocardial infarction**. *The New England Journal of Medicine*, v. 344, p. 549-555, 2001.

HORNSEY, I. **The chemistry and biology of winemaking**. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2007.

KENNEDY, J. A.; MATTHEWS, M. A.; WATERHOUSE, A. L. **Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids**. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 53, p. 268-274, 2002.

KLATSKY, A.L.; ARMSTRONG, M.A.; FRIEDMAN, G.D. **Alcohol and mortality**. *Annals of Internal Medicine*, v. 117, p. 646–654, 1992.

KOLOUCHOVÁ-HAZLÍKOVÁ, I.; MELZUCH, K.; FILIP, V.; SMIDRKAL, J. **Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines**. *Food Chemistry*, v. 87, p. 151-158, 2004.

KRAMER, M. Denominação e autenticidade. *In: Os sentidos do vinho*. Conrad editora do Brasil. p. 67-85, São Paulo, 2007.

LANDRAUT, N.; POUCHERET, P.; RAVEL, P.; GASC, F.; CROS, G.; TEISSEDRE, P.L. **Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages**. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 49, p. 3341-3348, 2001.

LONGNECKER, M. P. **Alcoholic beverage consumption in relation to risk of breast cancer: meta-analysis and review**. *Cancer Causes Control*, v. 5, p. 73-82, 1994.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. **Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante**. *Boletim CEPPA, Curitiba*, v. 22, p. 233-252, 2004.

MATEUS, N.; PROENÇA, S.; RIBEIRO, P.; MACHADO, J. M.; FREITAS, V. de. **Grape and wine polyphenolic composition of red *Vitis vinifera* varieties concerning vineyard altitude**. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, v. 3, n. 2, p. 102-110, 2001.

MATTIVI, F.; GUZZON, R.; VRHOVSEK, U.; STEFANINI, M.; VELASCO, R. **Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins**. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v. 53, p. 7692-7702, 2006.

MC'ELDUFF, P.; DOBSON, A. J. How alcohol and how often? *In: Population based case-control study of alcohol consumption and risk of a major coronary event*. British Medical Journal, v. 314, p. 1159-1164, 1997.

MORI, K.; GOTO-YAMAMOTO, N.; KITAYAMA, M.; HASHIZUME, K. **Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature**. Journal of Experimental Botany, v. 58, p. 1935-1945, 2007.

PEREIRA, G. E.; GUERRA, C. C.; MANFROI, L. Vitivinicultura e Enologia. *In: SOARES, J. M.; LEÃO, P. C. S. A Vitivinicultura no Semiárido brasileiro*. Petrolina: EMBRAPA Semi-Árido, 2009. 756 p.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay**. Free Radical Biology and Medicine, v. 2, p. 1231 – 1237, 1998.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J. **Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food**. Biochemistry Society Transactions, v.24, p. 790-795, 1996.

RIVERO-PÉREZ, M.D.; MUÑIZ, P.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ. **Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger capacity, and biomarkers of oxidative stress methodologies**. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v. 55, p. 5476-5483, 2007.

SCANDALIOS, J.G. **Oxygen stress and superoxide dismutases**. Plant Physiology, v. 101, p. 7-12, 1993.

SINGLETON, V. L.; ESAU, P. **Phenolic Substances in grape and wine, and their significance**. Advances in Food Research Supplement, v. 1, p. 1-261, 1969.

SPINELLI, F. R.; VANDERLINDE, R.; DUTRA, S. V.; PEDRUZZI, I.; MARCON, A. R.; BALARDIN, P. B. Teores de resveratrol em vinhos do Rio Grande do Sul. *In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA*, 58, 2006. Florianópolis, SC. *Anais...* Florianópolis, SBPC, 2006.

STOLL, M.; LOVEYS, B.; DRY, P. **Hormonal changes induced by partial rootzone drying of irrigated grapevine.** *Journal of Experimental Botany*, v. 51, p. 1627-1634, 2000.

VULETA, A.; JOVANOVIĆ, S. M.; SESLIJA, D.; TUCIĆ, B. **Seasonal dynamics of foliar antioxidative enzymes and total anthocyanins in natural populations of *Iris pumilla* L.** *Journal of Plant Ecology*, v. 3, n. 1, p. 59-69, 2010.

WANG, H.; COA, G.; PRIOR, R. L. **Oxygen radicals absorbing capacity of anthocyanins.** *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v. 45, p. 304-309, 1997.

WATERHOUSE, A. Determination of Total Phenolic. *In: Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Wiley, 2002, 11.1.1-11.1.8.

XU, C.; ZHANG, Y.; ZHU, L.; HUANG, Y.; LU, J. **Influence of growing season on phenolic compounds and antioxidant properties of grape berries from vines grown in subtropical climate.** *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 59, p. 1078-1086, 2011.

YAMANE, T.; SHIBAYAMA, K. **Effect of changes in the sensitivity to temperature on skin coloration in 'Aki Queen' grape berries.** *Journal of Japanese Society for Horticulture Science*, v. 75, p. 458-462, 2006.

5.2. COLOR AND ANTHOCYANINS CHARACTERIZATION OF BRAZILIAN RED WINE

Color and Anthocyanins Characterization of Brazilian Red Wines

Mariana de Vasconcellos Dullius[†], Alessandro de Oliveira Rios^{†*}, Vitor Manfroi[†], André Jablonski[‡], Maria Goreti Rodrigues Vale[§], Plinho Francisco Hertz[†]

[†]Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9.500, Agronomia, Prédio 43.212, Cep: 91.501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

[‡]Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia de Minas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9.500, Agronomia, Prédio 75, Cep: 91.501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

[§]Instituto de Química, Departamento de Química Inorgânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9.500, Agronomia, Prédio 43.111, Cep: 91.501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

*Corresponding author: telephone (+55) 51 3308-9937; fax (+55) 51 3308-7048; e-mail alessandro.rios@ufrgs.br

1 **Abstract**

2 Anthocyanins have a critical role into color stability and wine aging. It is also know that its
3 synthesis is related with viticultural multifactor, having the climate the most prominent
4 among them. In this work, 38 samples from four different regions of Brazil were analyzed in
5 terms of color (colorimeter) and total anthocyanin content (spectrophotometric method and
6 HPLC). The results showed that the total concentration and the abundance of color
7 compounds can be related to climate conditions, since the mildest region, the “Vale dos
8 Vinhedos”, reached the highest ($38.66 \mu.L^{-1}$) content for malvidin-3-monoglucoside and also
9 the most elevated ($0.914 \mu.L^{-1}$) content for cyanidin-3-monoglucoside, although, in terms of
10 total identified pigments, “Serra Gaúcha” overcame all the studied regions, with seven
11 anthocyanins recognized. The hottest region, the “Vale do Rio São Francisco”, presented the
12 poor composition of anthocyanin and also the lowest amounts of the analyzed pigments for
13 the year in question.

14 **Keywords: phenolic compounds, wine pigments, color analysis, spectrophotometric**
15 **analysis, HPLC, Brazilian *terroir*.**

16 **Introduction**

17 Grape and wine qualities are defined by plenty of factors, including variety, environmental
18 conditions and enological practices that set the so-called “terroir-effect”¹. Generally, in a
19 given area, the soil type and the management adopted in the vines do not change significantly
20 from year to year, letting the climate being the most prominent variable in determining grape
21 quality^{2,3}.

22 The composition of the grape depends on the interactions between the genotypes of the
23 rootstock and of the variety with the global environment around the vine and the
24 microenvironment around the racemes and the fruits⁴. Phytochemicals, specially the
25 polyphenols have a huge component varietal-dependant and some enological treatments can
26 improve its content in berry skin extracts⁵. However, the process of synthesis and
27 accumulation in berries is full of complexity and actually defined by more than a single factor
28^{2,6}. Climatic issues, though, are mentioned as the most prominent reasons on the synthesis of
29 the color compounds in the vines. The temperature gap between day and night associated with
30 the insolation seems to be the most determinant aspects that settle on the kind of and on the
31 total amount of pigment generated in grapes^{2, 7, 8}. Exposure to the sunlight is also a
32 substantial issue in the phenol accumulation⁹, however when strong solar radiation occurs the
33 temperature of the berry raise and it is also a motive to decrease the level of phenolic
34 compounds, such as anthocyanins in the fruit^{7, 8}. But actually, the accumulation process
35 seems to be more dependent on soil type and fertility¹⁰, intrinsic soil water-holding capacity,
36 and the annual amount and distribution of the rainfall in a particular terroir¹¹. Water deficits
37 also enhance the expression of many genes responsible for the biosynthesis of anthocyanins
38 and accelerate its accumulation in berries¹². The water scarcity is confirmed¹³ as a stimulus
39 for the polyphenolic synthesis¹⁴ and its role as empowering the photosynthetic system is
40 proposed¹⁵ as having a positive effect in the quality of red grapes and wines, as mentioned. In

41 vineyards under artificial irrigation, the plant's vigor can be exhaustively stimulated, causing
42 the plant to divert energy to its own growth, instead of fruit production, which creates a
43 negative impact on berry pigmentation and sugar content, implying a robust drop in wine
44 quality ¹⁶.

45 From the six most abounding anthocyanidins found in food, five of them (malvidin, cyanidin,
46 delphinidin, petunidin, and peonidin) are reported in grape ¹⁷, and being the pelargonidin the
47 only one that is not reported ¹⁸.

48 It has been proved ¹⁹ that the anthocyanins differ among each other according to the number
49 and the position of the methyl and hydroxyl groups connected to the basic flavylium structure.

50 This situation, allied to the fact that glycosyl, acetyl and ferric groups associate to that
51 structure, define the variety of the pigments in terms of chroma and stability. With the
52 advance of the maturation process, the hydroxyl forms are gradually being substituted by the
53 methyl forms, which, for being resistant to the oxidation, confer more stability to the wine ²⁰.

54 The enological factors, as can be the duration of maceration step, the interval between pomace
55 punches, affect with distinction the extraction of polyphenols from grapes, not even in terms
56 of concentration, but also when relating to the kind of pigment extract. Due to their polarity,
57 yeasts can absorb anthocyanins through their hydrogen bounding ²¹ interfering in the color of
58 wines, since it affects the copolymerization process ²². It is also reported that the strain took
59 on fermentation process ²³ also as enzymatic pools elected ²⁴ interfere on the color of wine. In
60 the same direction, in sulfur dioxide concentration (SO₂) and in the amount of alcohol lies the
61 instability of anthocyanins, which compromise the color of wines ²¹.

62 Namely, free anthocyanins extracted from grapes are responsible for the bright red color of
63 young red wine and really low influence has the process of co-polymerization in this kind of
64 product ²³. However, the development of polymeric pigments results from the natural ageing
65 process of wines. They are derived from the reactions between anthocyanins and other

66 polyphenols, mainly proanthocyanidins, and they are extremely necessary for the color
67 stabilization of wines²⁵. They are also responsible for the color changes from a bright red of
68 young red wines to a reddish-brown hue in aged ones²⁶.

69 This work aims to characterize 38 red wine samples, from four dissimilar region of Brazil,
70 seeking to relate the total anthocyanin content, the characterization of specific anthocyanins
71 contained in wine, in its concentration and type, and the intensity of color assumed by the
72 final product, resulting of all chemical interactions between the red phenolic compounds.

73 **Materials and Methods**

74 **Samples** – Thirty eight (38) red wine samples, elaborated of *vinifera* cultivars merlot and
75 cabernet sauvignon only, and presented at the Brazilian Annual Wine Evaluation (ANAVI
76 2009), were obtained from the Brazilian Agricultural Research Center (EMBRAPA) and kept
77 under 4 °C degrees refrigeration until analysis. The samples were identified by numbers,
78 followed by lower case letters according to the region to which they belong, being 1a to 11a,
79 the samples from “Vale dos Vinhedos” (VVi), 1b to 17b the ones from “Serra Gaúcha” (SGa),
80 1c and 2c the only two representing the “Vale do Rio São Francisco” (VSF) and the 1d to 8d
81 the materials from “Campanha Gaúcha” (Cam).

82 **Analysis**

83 **Color analysis through Minolta colorimeter** – The samples were submitted to a color
84 analyzer (CR-410 Minolta, Osaka, Japan), adjusted with D65 illuminant. The average of three
85 times measurements for each sample were presented and the results were expressed in
86 Munsell Scale (Y, x, y), CIE, L* a*, b*, and L* C* h scales²⁷. The size of the total color
87 difference, ΔE^* , was obtained by the equation:

$$88 \quad \Delta E^* = \sqrt{[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]}^{\frac{1}{2}}$$

89 The position that color sample lies in the space is given by the L* (lightness difference), C*
90 (*chroma* difference) and h* (hue difference). To avoid the thermochromism, the manipulation
91 of the samples was done under dim light and room temperature (22 °C).

92 **Total monomeric anthocyanin by the pH-differential analysis** – Based on a established
93 protocol ²⁸, 200 µL of each wine sample were diluted in 1800 µL of 0.025 M potassium
94 chloride buffer, pH 1.0 in duplicate. Another 200 µL of each wine sample were diluted in
95 1800 µL of 0.4 M sodium acetate buffer, pH 4.5. The reads were taken in 700 nm and 520 nm
96 in a spectrophotometer (UV-Vis - 3000 PRO, Amersham, Biosciences). The parameters were
97 plotted into the Lambert-Beer equation in order to calculate the concentration of the diluted
98 sample, considering the dilution factor (D) and the molar extinction coefficient (F):

$$99 \quad C = \{[(A_{\lambda_{520}} - A_{\lambda_{700}})pH_{1.0}] - [(A_{\lambda_{520}} - A_{\lambda_{700}})pH_{4.5}]\} * D * F$$

100 When multiplying the result found in the above equation for the molecular mass of the
101 commercial standard of the monomeric malvidin, the total concentration of the anthocyanin in
102 the original sample was estimated on a malvidin-3-monoglucoside basis. The results were
103 expressed in mg.L⁻¹ of original wine sample. The manipulation of the samples was done under
104 dim light and room temperature (22 °C).

105 **HPLC Analysis**

106 **Sample preparation** - The samples were centrifuged at 3500 g over 15 min. The supernatant
107 was cleaned up using a C-18 Sep-Pak Cartridge (Waters Assoc., Milford, MA), previously
108 activated with 1.5 mL of methanol followed by 1.5 mL 0.01% aqueous HCL, according to a
109 protocol adaptation ²⁹. Then, 0.75 mL of each wine sample was slowly introduced to the
110 cartridge, followed by another 1.5 mL of 0.01% HCL, and 30 mL of deionized water. In order
111 to remove the less polar compounds that could still remaining, 1.5 mL of ethyl acetate was
112 used and then, another 30 mL of deionized water washed out any trace of undesirable
113 compound, as could be sugars, acids or any other compound of no interest for the analysis.

114 The anthocyanins were eluted with 1.5 mL of methanol. The described step was carried out 3
115 times for each sample. The 4.5 total volume eluted was evaporated under vacuum at 32 °C.
116 and the remaining humidity was completely removed under nitrogen flow. Each sample was
117 semi-purified in duplicate.

118 **Sample analysis** – The dried sample was redissolved in 0.9 mL of methanol, filtered in a 0.45
119 *micra* filter (Millipore, Waters), and injected on to the chromatograph (Agilent, Hewlett-
120 Packard, 1100 series), equipped with a vacuum degasser, quaternary bomb and automatic
121 injection to perform HPLC analysis. Chromatographic separation was carried out using a C18
122 Shim-pak CLC-ODS (5 µm, 250 mm x 4.6 mm) kept at 29 °C during all analyses. The mobile
123 phase was defined³⁰ as water/phosphoric acid (96/4, v/v) (solvent A), acetonitrile (solvent B),
124 at a flow rate of 0.9 mL.min⁻¹. The following gradient was used: 0 min, 85% A and 15% B;
125 30 min, 60% A and 40% B. The pigments were analyzed by UV-vis spectra detector (Agilent,
126 Hewlett-Packard, 1200 series) and the wavelength was fixed at 520 nm. The column was
127 equilibrated at 85% solvent A: 15% solvent B for 10 min before subsequent injection.

128 **Standard curves** – Analytical standards were purchased from commercial suppliers (Sigma-
129 Aldrich and Santa Cruz Biotechnologies): cyanidin chloride (CAS 528-58-5), malvidin
130 chloride (CAS 643-84-5), delphinidin chloride (CAS 528-53-0), peonidin chloride (CAS 134-
131 01-0), pelargonidin chloride (CAS 134-04-3), kuromanin chloride (CAS 7084-24-4), oenin
132 (CAS 7228-78-6), callistephin chloride (CAS 18466-51-8), cyanin chloride (CAS 2611-67-8),
133 malvin chloride (CAS 16727-30-3), pelargonin chloride (CAS 17334-58-6) and myrtillin
134 chloride (CAS 6906-38-3). Commercial standard were diluted in 2 mL of methanol and
135 homogenized in an ultrasound device (USC 1400, Unique). External calibration curves were
136 obtained from dilution series obtained from each standard and the concentration was
137 calculated based on the absorption obtained using optical spectroscopy. The coefficient of
138 determination (R^2) for the standard curves were established in a minimum of 98%.

139 **Identification and Quantification of Anthocyanins**

140 Qualification analysis was assured taking into consideration the retention time based on the
141 average of three different measurements of all the commercial standards and comparing those
142 with the retention time (Rt) of all the coincident peaks in the sample and in its duplicate.

143 Anthocyanins presented on each sample were quantified by the integrated areas of the peaks
144 recorded at 520 nm and plotted against the calibrations curves generated for each standard.

145 The Limits of Detection (LOD) and Limits of Quantification (LOQ) were calculated³¹ before
146 qualification and quantification the results for the 12 anthocyanins analyzed.

147 All chromatographic solvents were HPLC gradient grade. The deionized water (<18 MΩ cm
148 resistivity) was obtained from a Milli-Q element water purification system (Millipore,
149 Waters). The manipulation was done under dim light and room temperature was kept at 18 °C.

150 **Results and Discussion**

151 **Color Analysis**

152 All the wine samples are dispersed in the yellow-red zone (figure 1), with similar saturation,
153 although there is a cluster from SGa standing out for being completely apart from the others
154 samples, including those ones from the same producer region. This cluster is placed on the
155 yellow zone, getting yellowish and brownish hues in relation to the big group in study. The
156 VVi group is the most homogeneous group, since it has the lowest standard deviation in both
157 x and y coordinates. In VVi region, the distance between the yellowiest sample (2a: 0.3411x;
158 0.3242y) and the reddish one (1a: 0.3610x; 0.3191y) is the shortest. The larger standard
159 deviation is detected in the VSF region, but it is obviously related to the completely difference
160 existing in terms of color related to the only two samples that illustrate this region. More
161 samples would be necessary to place with accuracy the wines provided from that Brazilian
162 region. If it was not for sample 2d, all the others samples from Cam are clearly situated on the
163 reddish zone of the diagram, including the sample redder from all, the 7d.

164 (Insert figure 1)

165 It is also possible plotting a second two-dimensional diagram (figure 2), including light (L^*)
166 and *chroma* (C^*), considering that *chroma* is a parameter that incorporate a^* and b^*
167 parameters. The positive values found for C^* and for L^* classify all the wines evaluated in
168 “light” and “vibrant”, although they distribute themselves in strength of these two qualities.
169 The *chroma* is calculated based on how a sample varies between the green and the red – given
170 the a^* parameter – and between the blue and the yellow – considering the b^* parameter. All
171 these factors together comprise two of the most important existent systems of color space
172 measurements, the CIE LAB (L^* a^* b^*), based on rectangular coordinates, and the L^* C^* h ,
173 based on cylindrical coordinates.

174 (Insert figure 2)

175 In the L^* a^* b^* color space, the color difference can be expressed as a single value, the ΔE^* .
176 Applying the equation, the ΔE^* parameter was calculated for each region (table 1).

177 (Insert table 1)

178 The results show that there is no statistical variation between the analyzed groups ($p < 0.1$), but
179 the source of variation is set inside the group, assuming that maybe the viticultural and the
180 enological practices, adopted by each winery, plays a prominent role in the color
181 characteristics of wines than the ones printed by climatic and soil conditions. Despite the
182 differences observed in *chroma* (derived from a^* and b^*) and the hue, the low coefficient of
183 variation established between the regions in the single parameter ΔE^* , could possibly explain
184 the absence of differences among the regions analyzed in the year in study. Although, the
185 narrow differences existent can gain strength with time and begin to impress identity to
186 Brazilian wine producer regions in terms of color characteristics.

187 The color stability of wines is hugely credited to pH-variation. In order to make reasonably
188 considerations about this, the pH of all samples (figure 3) was taken in the beginning of the

189 analysis process and at the end of this. Maybe because of the youth of the wines and also
190 because samples had been kept under 4 °C temperature, tartaric acid and color components
191 precipitated in the flasks. In this fact may reside the differences observed in the pH of wines.
192 An associated fact that happened was that with the gradual withdrawal of volumes of wine
193 from samples, in order to allow the analytical procedures, the headspace became more
194 significant, letting the ageing process due to the oxygen effect be increased.

195 (Insert figure 3)

196 The biggest variation (0.61) occurred in the VVi region. Although the numbers of samples
197 were too low to allow deeper considerations, the hottest temperatures taking place in that area
198 tolerate the supposing idea of disequilibrium between the ideal point of harvesting,
199 considering technological and polyphenolic ripeness. The narrow discrepancy (0.37)
200 happened among the VVi, followed by SGa (0.44), while Cam had shown a considerable high
201 (0.54) oscillation too for pH studied interval.

202 It has been reported ²³ that at low pH, the individual contributions of anthocyanins to color is
203 greater than the polymer concentration. However, the same author describe that at wine pH,
204 the pigmented polymers are more important to wine color. This observation is easily
205 illustrated with the pH-differential analysis, where at really low pH (1.0) the anthocyanins are
206 full expressed, while up to 3.5 (common pH for wines) the contribution of pigmented
207 polymers to total color of wines becomes greater.

208 **pH-Differential Analysis**

209 The pH-differential analysis (table 2), through the spectrophotometric method, revealed that,
210 according to the region, the total content of the majority monomeric anthocyanin changes. It
211 seems that the hottest regions printed the lowest amounts and abundance of pigments.
212 Although the total content have been calculated based on two epsilon reported ^{32, 33}, the

213 anthocyanin content follows the same distribution pattern, being in average 52% higher for
214 the VVi region when compared with the VSF the lowest data presented.

215 (Insert table 2)

216 The source of variation cannot be explained by the region ($p < 0.1$), so it is statistically possible
217 to say that the samples from the same origin differ more among each other than samples from
218 different regions, dropping the idea that soil and climate and soil conditions could explain the
219 differences among the wines. It seems that the viticultural and enological practices are being
220 the prominent factors highlighting the distinction among wines.

221 **HPLC Analysis of Anthocyanins**

222 Cyanidin diglucoside (Cy-3,5DG) and the pelargonidin aglycone (Pg-AG) did not appear in
223 any of the analyzed samples. The cyanidin aglycone (Cn-AG) and the peonidin aglycone (Pn-
224 AG) signals were outlined in the chromatogram, however the amounts read were not enough
225 of quantification ($< \text{LOQ}$) nor even for properly identification ($< \text{LOD}$). The “malvidin-3,5-
226 diglucoside” (“Mv-3,5DG”) was not expected to be detected, because of the characteristics of
227 the analyzed wines, all of them being elaborated by varieties of *Vitis vinifera* (merlot or
228 cabernet cultivars), in which the cited pigment is not reported. The signal for the “Mv-3,5DG”
229 was outlined though in five samples (1b, 13b, 15b, 2c, 5d), from three of the four regions in
230 study, but none of them could be properly quantified ($< \text{LOQ}$) nor identified ($< \text{LOD}$). Two
231 samples (13b and 15b) from SGa also presented another non-reported pigment (Pg-3G), this
232 time being capable of quantification ($> \text{LOQ}$).

233 Other pigments, as can be the cyanidin monoglucoside (Cn-3G) and the delphinidin
234 monoglucoside (Dp-3 β D-G) in some samples were able of being identified ($> \text{LOD}$), but
235 unable of being quantified ($< \text{LOQ}$).

236 In general, the malvidin-3-monoglucoside (Mv-3G) was presented, as expected, in all 38
237 analyzed samples, and it was quantifiable in all of them. Only in two samples (16b and 17b) it

238 was not the major pigment, being overcome by another one, found more than two times fold.
239 It is supposed to be some acylated form. This proposal is supported by the fact that, when
240 aging the anthocyanins aglycone forms are converting in their correspondent phenolic acid ³⁴.
241 The pelargonidin, and all its sugar-linked variations, is the prominent pigment found in
242 strawberries. However, it has never been reported in grapes berries and its wine derived. Only
243 two samples (13b e 15b) apparently presented the monoglycosylated form of the pigment,
244 while the diglycosylated form has appeared in 73.68% of the analyzed samples, yet the
245 amounts found were really low. It is assumed that another form of one of the reported and
246 also presented pigments has coincidentally the same retention time presented to the standards of
247 the pelargonidin forms.

248 None of the VVi samples presented the Dp-3 β D-G and only the sample 3a and 8a did not
249 show the “Pg-3,5DG”.

250 Despite the absence of the Cn-3G, Mv-AG and Dp-3 β D-G in the samples 16b and 17b, in all
251 the other samples from the SGa those pigments were identified (>LOD). However, only the
252 Mv-AG could be quantified (>LOQ) in 100% of the samples. Only 80% of the samples could
253 not have the Cn-3G quantified (<LOQ) while 60% could not have the Dp-3 β D-G quantified
254 (<LOQ).

255 The only two samples from VSF showed both the presence of Mv-AG, Mv-3G and “Pg-
256 3,5DG”. The Dp-3 β D-G appeared only in the sample 1c, nevertheless, the level was too low
257 for quantification (<LOQ).

258 Apart from other pigments related to the Cam, the two aglycones, Cn-AG and the Pn-AG only
259 arose in the sample 3d, but the levels for both pigments were too low for quantification
260 (<LOQ). Moreover, considering the double glycosylated compounds, the “Pg-3,5DG” only
261 took place, considering the region, in the sample 4d, unfortunately, the amount was not enough
262 of being quantified (<LOQ). Meanwhile, in spite of the sample 7d, all the samples that

263 presented the Cn-3G also showed the presence of the two delphinidin allowed of being
264 detected (>LOD), the Dp-AG and the Dp-3 β D-G, although in concentration not enough of
265 being quantified (<LOQ).

266 In all the eight samples that cover the vast area Cam, came up the Mv-AG and the Mv-3G.
267 LOD and LOQ parameters (table 3) define only the limitations of the instrument. The matrix
268 interference must be taken into consideration in order to define the detection limits, and, as
269 much as would be desired that the extraction method could be able to remove the most part of
270 interfering components, this is not always a true³⁵. It happens because some row-materials, as
271 can be the wine, are made of hundreds or even thousands of compounds, and it will inevitably
272 interfere in several unidentified ways in the LOD and LOQ of the analyte of interest. Also one
273 or more of the matrix components may either elute at the same time as the analyte of interest
274 or absorb or emit in the same wavelength range as the desired compound in study,
275 complicating the analysis process³⁵. Retention times (Rt) of all twelve standards were also
276 presented (table 3), as the identified peaks (IP) (table 3).

277 (Insert table 3)

278 The quantification of the most prominent pigments, after applying the LOQ values can be
279 visualized in the figures 4 to 9. Repeatability of duplicate sample analysis, in average, were
280 set in 1.43% for Dp-AG; 2.51% for “Pg-3,5DG”; 2.82% for “Pg-3G”; 5.24% for Mv-3G;
281 7.34% for Mv-AG; 19.99% for Dp-3 β D-G; and 22.21% for Cn-3G of coefficient of variation.
282 The elevated number for the last two pigments may lie on a more susceptibility of losses
283 during the extraction procedure, the evaporating procedure, or both of them.

284 (Insert figures 4 to 9)

285 Because came up in only two samples (13b and 15b), the “Pg-3G” is not represented, but the
286 amounts found were in average 0.942 and 0.991 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 13b and 15b respectively.

287 The cyanidins and the delphinidins are compounds characterized by a hydroxyl group in a
288 lateral chain, a fact that gives to these compounds high susceptibility to oxidation processes.
289 In this reason may reside the low amounts found for then in all samples.

290 As can be visualized in the figures 5, 7 and 8, the Mv-AG, the “Pg-3,5” – or the pigment for
291 the retention time in question – and the Dp-AG could be named stabilized pigments, due to
292 the narrow interval the compounds are distributed, independently of the region in study. It
293 could also means that these pigments are non-dependents of viticultural and/or enological
294 practices, considering the fact that the samples were supplied for different wineries and
295 presented, despite this issue, almost the same amounts per volume of analyzed sample.

296 None of the VVi nor the VSF samples presented the Dp-AG. Perhaps this pigment could have
297 a synthesis/accumulation pattern more easily affected by the typicity of wine producer region,
298 and in this reason could reside its appearance in SGa and Cam, but it could be necessary
299 further studies to understand the requirements for its presence in some wines.

300 Another consideration could be remotely related to the vintage effect, since they are all from
301 year 2009. However, the terroir effect, would practically prevent this reflection as a possibly
302 explanation. The richest samples in terms of pigment diversity outlined the presence of seven
303 compounds, being five of them identifiable and quantifiable (>LOD and >LOQ) and two of
304 them with so little amounts that is was not possible (<LOQ and <LOD) (figure 10). The
305 poorest ones presented only the Mv-3G as identifiable (>LOD) pigment.

306 (Insert figure 10)

307 The degree of relationship among variables ³⁶ was measured using a correlation matrix (figure
308 11). As expected, most part of the pigments in study correlates positively among each other, a
309 fact that may lead to suppose that they are involved into the same metabolism of reservation
310 in plants, which can be represented even by the synthesis or the accumulation process,
311 including the distribution into the berries.

312 (Insert figure 11)

313 When completely different climatic years were taken into consideration ³⁸, the distribution of
314 the major pigment, the Mv-3G, was positively and hugely correlated with peonidins, which
315 here do not appear. All the compounds characterized by a hydroxyl group in a lateral chain
316 were reported ³⁷ as being negatively correlated with the Mv-3G in vintages agronomically
317 favored by the weather, which can corroborate that when the ideal conditions of precipitation,
318 insolation, temperature and nutrition occur, the methoxyl forms are preferentially
319 synthesized/accumulated/distributed into berries.

320 The really strong correlation (0.96) established between the major pigment, the Mv-3G, and
321 the “Pg-3,5DG”, may indicate a huge possibility of this last one being another form of the
322 first one, a fact that would explain its appearance in so many samples.

323 In the same direction, the correlation between the total anthocyanins by pH-differential
324 methods and HPLC was calculated. When comparing the r number found of 0.79 represent a
325 strong correlation between the data. Nevertheless, it is considerably necessary to make
326 reference to the accuracy of each analysis.

327 The HPLC analysis is a consolidated method with high accuracy response, fulfilling the
328 highest parameters of sensitivity and resolution. On the other hand, the pH-differential
329 method do not differ between the anthocyanin form, and its estimation is based on a range that
330 include do not distinguish between the kind of sugar linked to the basic anthocyanidin
331 structure, nor is capable of not discriminate the acetyl or ferric bindings.

332 As previously described ²⁸, highly acylated anthocyanins may not respond to pH changes the
333 same way as anthocyanins with no or few acylating groups. Besides that, they may not
334 decolorize as much as nonacylated or mono or diacylated anthocyanins do at pH 4.5.
335 Moreover, in many instances, despite the relative simplicity of the spectrophotometric
336 protocol, the method becomes inappropriate, because of interference from anthocyanin

337 degradation products, as can be melanoidins from browning reactions³⁸. For eliminating this
338 effect, subtractive methods should be taken in parallel.

339 Brazil is an incipient wine grower, and its expansion and development in this economic sector
340 need to be hugely linked with terroir characterization. The consolidation of representative
341 wines of distinct regions, through the controlled appellations of origin, regulated by formal
342 committees, needs to be part of a crucial strategy for opening out its, until now, almost
343 provincial wine market. However, even more important is the fact that this strategy of region
344 division be based on reliable scientific arguments, which take into account a complex
345 approach in terms of cultural-climate-ecophysiology-yield-quality interactions, between the
346 vine and its surroundings.

347 The performed research fulfilled its purpose in characterizing the 2009 vintage of the
348 principal Brazilian regions and the incipient ones. Further studies are essential for a global
349 comprehension of the mentioned areas, excluding the “vintage effect”. It is also necessary the
350 development of research that go deep in clarifying the appearance of non-reported pigments in
351 Brazilian wine.

352 **Acknowledgements**

353 The authors are grateful for the Brazilian Research Funding Agencies (CNPq and CAPES),
354 for the financial support that allowed this work.

355 **Literature Cited**

- 356 (1) Van Leeuwen, C.; Seguin, G. The concept of terroir in viticulture. *J. Wine Res.* **2006**, *17*,
357 1-10.
- 358 (2) Downey, M. O.; Dokoozlian, N. K.; Krstic, M. P. Cultural practice and environmental
359 impacts on the flavonoids composition of grapes and wine: a review of recent research. *Am. J.*
360 *Enol. Viticult.* **2006**, *57*, 257-267.
- 361 (3) Tonietto J.; Carbonneau, A. A multicriteria climatic classification system for grape-
362 growing regions worldwide. *Agric. Forest Meteorol.* **2004**, *124*, 81-97.
- 363 (4) Guillaumie, S.; Fouquet, R.; Kappel, C.; Camps, C.; Terrier, N.; Moncomble, D.;
364 Dunlevy, J. D.; Davies, C.; Boss, P. K.; Delrot, S. Transcriptional analysis of late ripening
365 stages of grapevine berry. *Plant Biology.* **2011**, *11*, 165 (1-27).
- 366 (5) Iriti, M.; Rossoni, M.; Faoro, F. Melatonin content in grape: myth or panacea? *J. Sci. Food*
367 *Agric.* **2006**, *86*, 1432-1438.
- 368 (6) Guidoni, S.; Ferrandino, A.; Novello, V. Effect of seasonal and agronomical practices on
369 skin anthocyanin profile of Nebbiolo grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **2008**, *59*, 22-29.
- 370 (7) Mori, K.; Goto-Yamamoto, N.; Kitayama, M.; Hashizume, K. Loss of anthocyanins in
371 red-wine grape under high temperature. *J. Exp. Bot.* **2007**, *58*, 1935-1945.
- 372 (8) Yamane, T.; Shibayama, K. Effect of changes in the sensitivity to temperature on skin
373 coloration in “Aki Queen” grape berries. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* **2006**, *75*, 458-462.
- 374 (9) Cortell, J. M.; Kennedy, J. A. Effect of shading on accumulation of flavonoids compounds
375 in *Vitis vinifera* L. Pinot Noir fruit and extraction in a model system. *J. Agric. Food Chem.*
376 **2006**, *54*, 8510-1520.
- 377 (10) Van Leeuwen, C.; Friant, P.; Choné, X.; Tregoat, O.; Koundouras, S.; Dubordieu, D.
378 Influence of climate, soil, and cultivar on terroir. *Am J. Enol. Vitic.* **2004**, *55*, 207-217.

- 379 (11) Choné, X.; Van Leeuwen, C.; Chéry, P.; Ribereau-Gayon, P. Terroir influence on water
380 status and nitrogen status of non-irrigated Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*): vegetative
381 development, must and wine composition (example of Mèdoc top Estate vineyard, Saint
382 Julien Area, Bordeaux). *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1997**, 22, 8-15.
- 383 (12) Castellarin, S. D.; Matthews, M. A.; Gaspero, G. D.; Gambetta, G. A. Water deficits
384 accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoids biosynthesis
385 in grape berries. *Planta.* **2007**, 227, 101-112.
- 386 (13) Chavez, M. M.; Zarrouk, O.; Francisco, R.; Costa, J. M.; Santos, T.; Regalado, A. P.;
387 Rodrigues, M.L. Grapevine under déficit irrigation: hints from physiological and molecular
388 data. *Ann Bot-London.* **2010**, 105, 661-676.
- 389 (14) Deluc, L. G.; Quilici, D. R.; Decendit, A.; Grimplet, J.; Wheatley, M. D.; Schlauch,
390 K.A.; Mérillon, J.M.; Cushman, J. C.; Cramer, G. R. Water deficit alters differentially
391 metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet
392 Sauvignon and Chardonnay. *Biomed. Genomics.* **2009**, 10, 212, 1471-2164.
- 393 (15) Roby, G.; Matthews, M. A. Relative proportions of seed, skin and flesh, in ripe berries
394 from Cabernet Sauvignon grapevines grown in a vineyard either well irrigated or under water
395 deficit. *Aus. J. Grape Wine Res.* **2004**, 10, 74-82.
- 396 (16) Bravdo, B.; Hepner, Y.; Loinger, C.; Tabacman, H. Effect of irrigation and crop level on
397 growth, yield and wine quality of Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* **1985**, 36, 132-139.
- 398 (17) Francis, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. *Cereal Food*
399 *World.* **2000**, 45, 208-213.
- 400 (18) Coultate, T. P. *Food: the chemistry of its components* (Portuguese version). Artmed
401 Editora, 3ed., **2004**, 368 pp.
- 402 (19) Tanaka, Y.; Sasaki, N.; Ohmiya, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins,
403 betalains, and carotenoids. *Plant J.* **2008**, 54, 733-749.

- 404 (20) Rankine, B. C. Making Good Wine. Macmillan, Sydney, Australia, **2004**.
- 405 (21) Vasserot, Y.; Caillet, S.; Maujean, A. Study of anthocyanin adsorption by yeast lees. *A.*
406 *J. Enol. Vitic.* **1997**, 48, 433-437.
- 407 (22) Cheynier, V.; Souquet, J.; Kontek, A.; Montounet, M. Anthocyanin degradation in
408 oxidizing grape musts. *J. Sci. Food Agric.* **1994**, 66, 283-288.
- 409 (23) Birse, M. J. The colour of red wine. PhD. Dissertation, The University of Adelaide,
410 **2007**.
- 411 (24) Oren-Shamir, M. Does anthocyanin degradation play a significant role in determining
412 pigment concentration in plants? *Plant Sci.* **2009**, 177, 310-316.
- 413 (25) Somers, T. C. The polymeric nature of wine pigments. *Phytochem.* **1971**, 10, 2175-2186.
- 414 (26) Somers, T.C. Pigment development during ripening of the grape. *Vitis.* **1976**, 14, 269-
415 277.
- 416 (27) Konika Minolta. Color Precisely Communication – Quality Control, from perception to
417 instrumental (Portuguese version). *Konika Minolta Sensing Inc.* Osaka, Japan, 1-59, **1998**.
- 418 (28) Giusti, M. M.; Wrolstad, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by
419 UV-Visible Spectroscopy. In: Current Protocols in Food Analytical Chemistry. *John Wiley*
420 *and Sons Inc.* Unit F-2-1-F-2-13, **2001**.
- 421 (29) Chaovanalikit, A.; Wrolstad, R. E. Anthocyanin and polyphenolic composition of fresh
422 and processed cherries. *J. Food Sci.* **2004**, 69, FCT73-FCT83.
- 423 (30) Zanatta, C. F.; Cuevas, E.; Bobbio, F. O.; Winterhalter, P.; Mercadante, A. Z.
424 Determination of Anthocyanins from Camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-
425 MS, and NMR. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 9531-9535.
- 426 (31) Shimadzu. *Determination of LOD and LOQ Values in AAS* (Portuguese version).
427 Shimadzu do Brasil, Centro de Suporte a Cliente, NT-003, **2009**.

- 428 (32) Niketic-Aleksic, G.; Hrazdina, G. Quantitative analysis of the anthocyanin content in
429 grape juices and wines. *Lebensm. Wiss. U. Technol.* **1972**, 5, 163-165.
- 430 (33) Heredia, F. J.; Francia-Aricha, E. M.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Vicario, I. M.; Santos-
431 Buelga, C. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes. 1. pH effect. *Food*
432 *Chem.* **1998**, 63, 491-498.
- 433 (34) Fleschhut, J.; Kratzer, F.; Rechkemmer, G.; Kulling, S. E. Stability and
434 biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur. J. Nutr.* **2006**, 45, 7-18.
- 435 (35) Corley, J. Best practices in establishing detection and quantification limits for pesticide
436 residues in foods – Handbook of residue analytical methods for agrochemicals. *John Wiley &*
437 *Sons Ltda.* 1-18, **2003**.
- 438 (36) Hair, J. F. Jr.; Babin, B.; Money, A.; Samouel, P. Essentials of Business Research
439 Methods (Portuguese version). Porto Alegre. *Bookman*, 471 pp., **2005**.
- 440 (37) Ferrandino, A.; Guidoni, S. Anthocyanins, flavonols and hydroxycinnamates: an attempt
441 to use them to discriminate *Vitis vinifera* L. cv. “Barbera” clones. *Eur. Food Res. Technol.*
442 **2010**, 230, 417-427.
- 443 (38) Fuleki, T.; Francis, F. J. Quantitative methods for anthocyanins. 2. Determination of total
444 anthocyanin and degradation index for cranberry juice. *J. Food Sci.* **1968**, 33, 78-82.

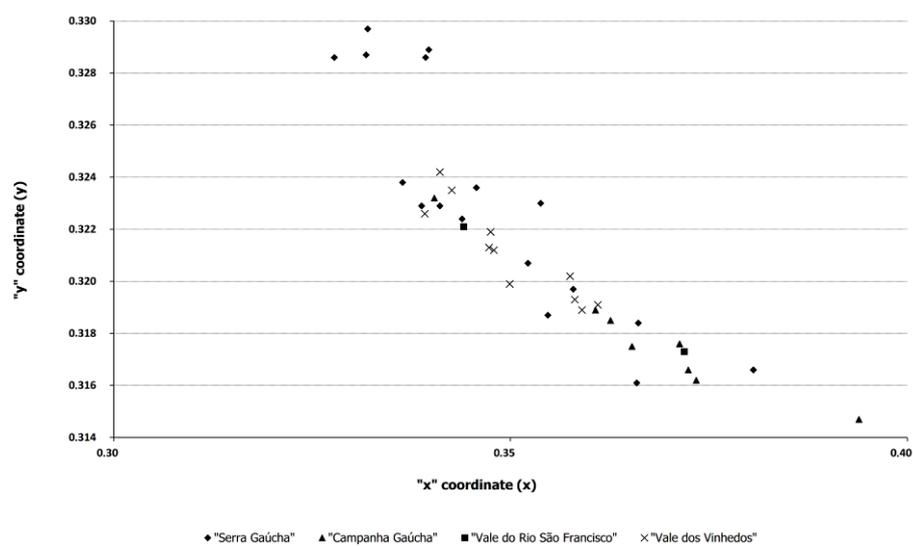


Figure 1. Two-dimensional representation of color ranging from yellowish (northwest position) to reddish (southeast position) samples.

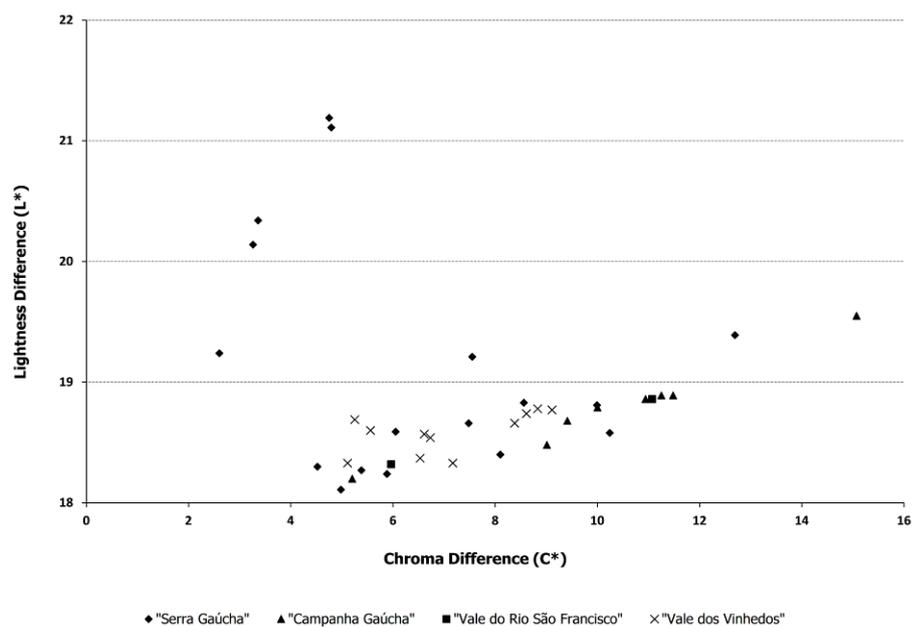


Figure 2. Color parameters comparison among samples from “Serra Gaúcha”, “Campanha Gaúcha”, “Vale do Rio São Francisco” and “Vale dos Vinhedos” Brazilian wine producer regions.

Table 1. Total color parameter variation ΔE^* of samples from “Vale dos Vinhedos”, Serra Gaúcha”, Vale do Rio São Francisco” and “Campanha Gaúcha” Brazilian wine producer regions.

Production Zones	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	$\Sigma \Delta^*{}^2$	ΔE^*	x	y	C*	h
Vvi	345.22	48.66	1.47	395.34	19.88	0.3501	0.3211	7.08	9.85
SGa	366.41	40.05	1.76	408.22	20.20	0.3474	0.3231	6.48	12.94
Cam	353.16	102.36	3.16	458.68	21.42	0.3675	0.3179	10.30	10.46
VSF	345.59	70.14	2.33	418.05	20.45	0.3580	0.3197	8.52	10.08
Average \pm Sd	352.59 \pm 9.91	65.3 \pm 27.76	2.18 \pm 0.74	420.08 \pm 27.37	20.49 \pm 0.66	0.3558 \pm 0.0090	0.3205 \pm 0.0022	8.09 \pm 1.70	10.83 \pm 1.43

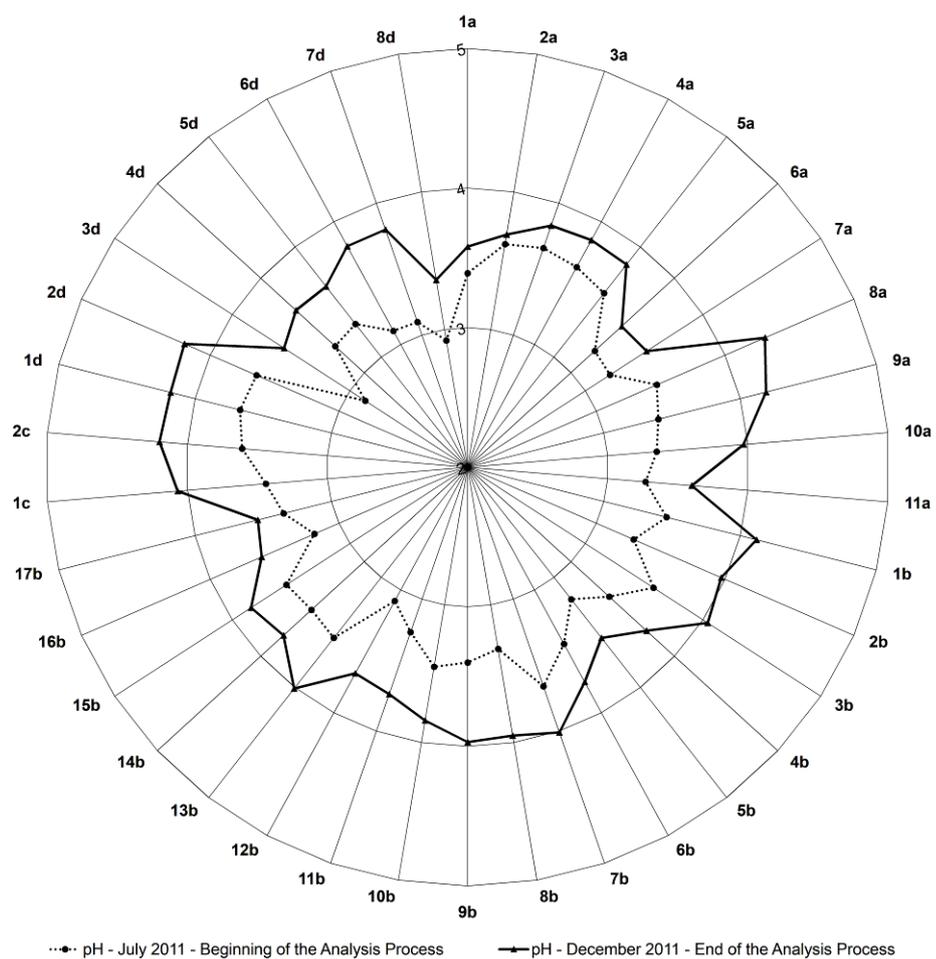


Figure 3. pH analysis in two different moments: the beginning of all analysis work and the end of all analysis work.

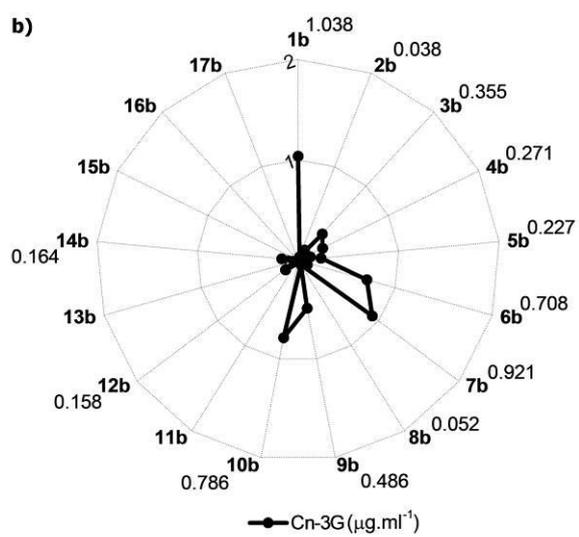
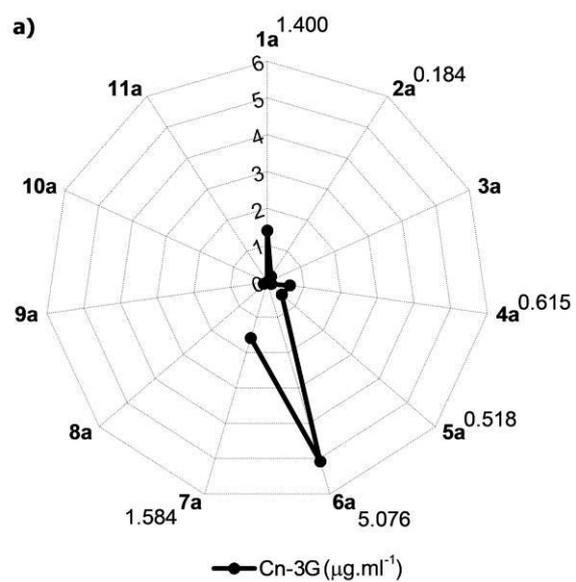
Table 2. Total monomeric anthocyanin malvidin-monoglucoside expressed (*32, **33).

	Mv-3G_{monomeric} (mg.l⁻¹)*	Mv-3G_{monomeric} (mg.l⁻¹)**
VVi	45.76	63.42
SGa	35.37	49.02
Cam	34.08	47.24
VSF	30.08	41.70
Average (mg.L⁻¹) ± Sd	36.32 ± 6.68	50.35 ± 9.26
Standard Deviation	6.68	9.26
Coefficient of Variation (%)	18.39	18.39

Table 3. Identified peaks (IP), retention time (Rt), limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) found for the twelve analyzed standards.

Standards	Cn-AG	Cn-3G	Cn-3,5DG	Dp-AG	Dp-3 β D-G	Mv-AG	Mv-3G	Mv-3,5DG	Pg-AG	Pg-3G	Pg-3,5DG	Pn-AG
IP	-	3	-	-	1	7	5	4	-	-	2	6
Rt (min)	11.3	6.1	4.1	8.4	4.8	15.3	8.8	6.2	14.2	7.5	5.2	15.0
LOD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.124	0.169	0.178	0.066	1.160	0.094	0.207	0.444	0.146	0.047	0.422	0.197
LOQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.466	0.565	0.594	0.220	3.867	0.283	0.512	1.480	0.487	0.157	1.408	0.656

* Standard concentration was calculated based on specific data protocols²⁹ for each pigment in question.



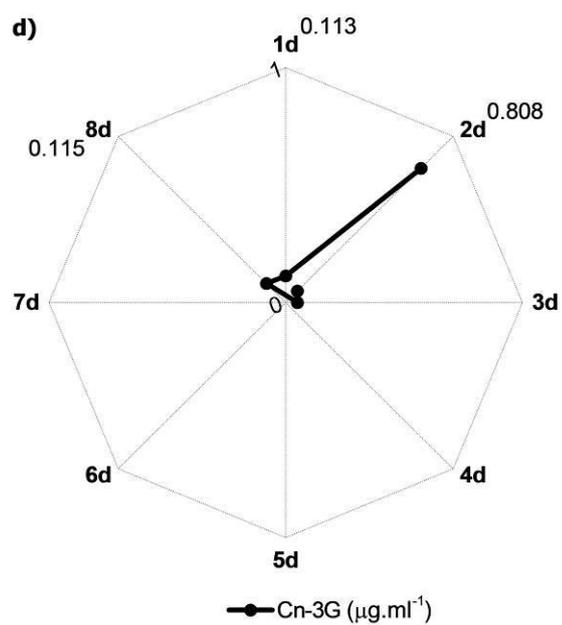
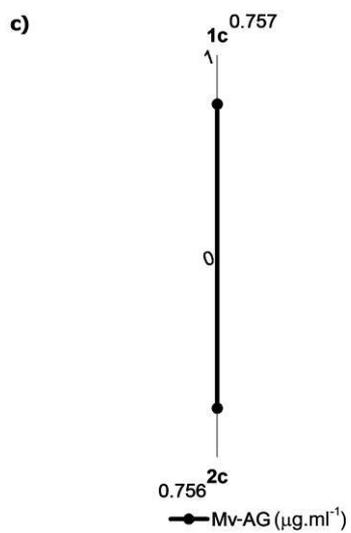
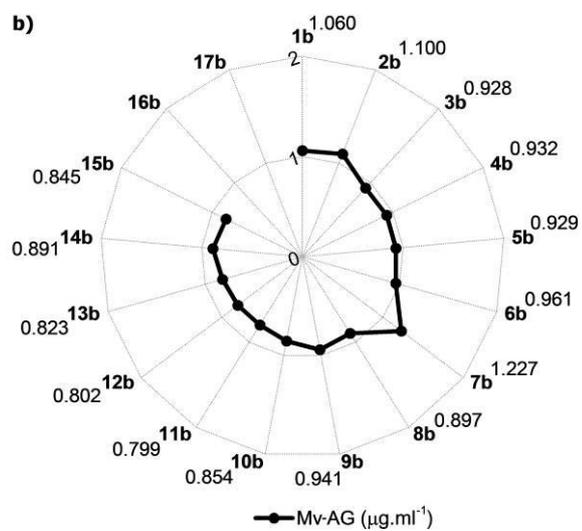
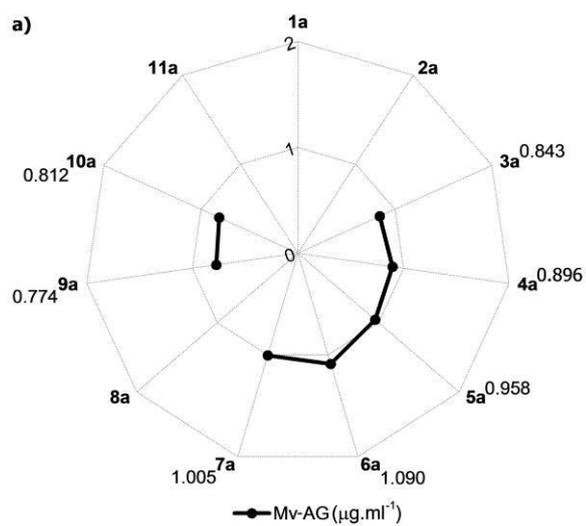


Figure 4. Distribution of the amounting ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of Cn-3G in the analyzed samples of each evaluated Brazilian region (a, b, and d). * The data refer to the average of the duplicate.



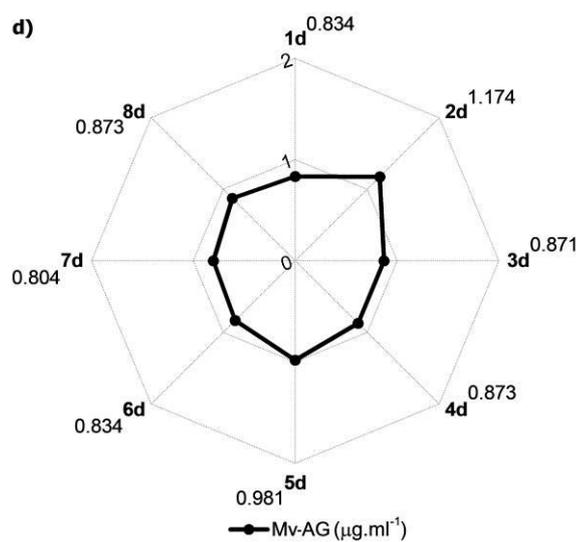
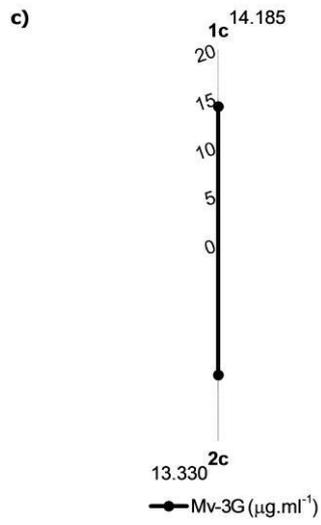
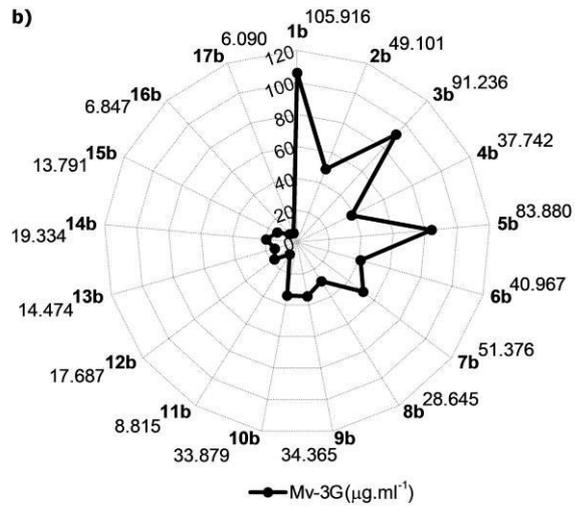
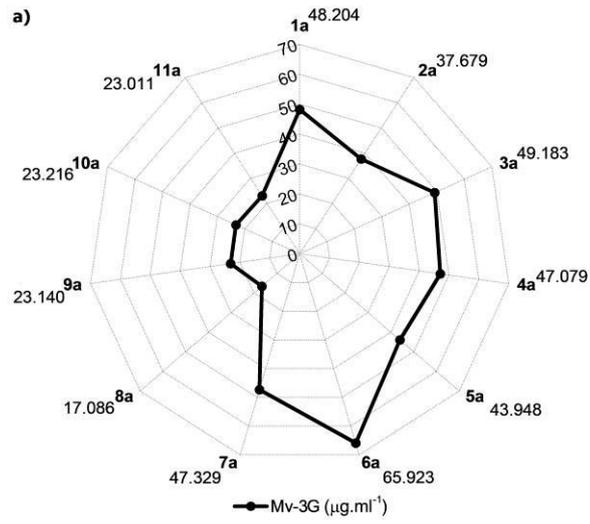


Figure 5. Distribution of the amounting ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of Mv-AG in the analyzed samples of each evaluated Brazilian region (a, b, c and d). * The data refer to the average of the duplicate.



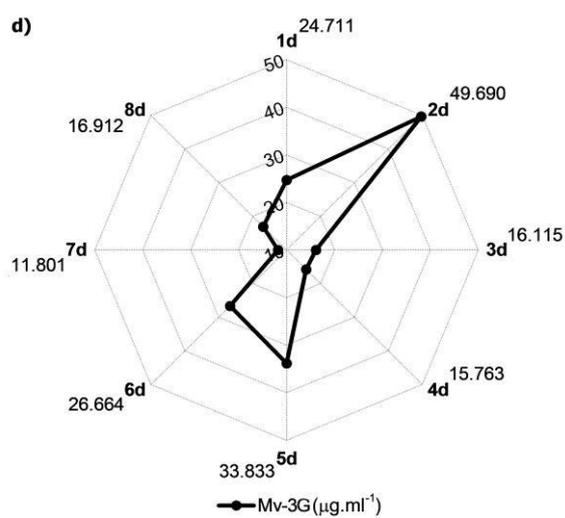
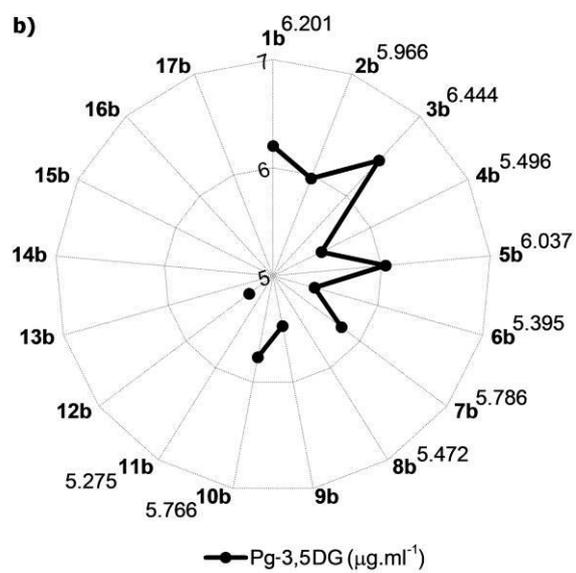
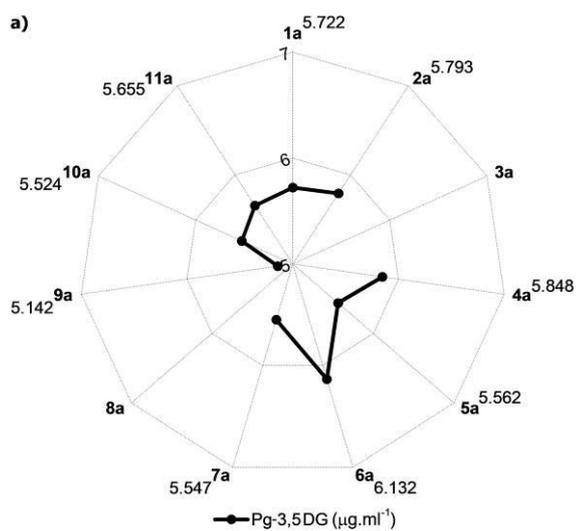


Figure 6. Distribution of the amounting ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of Mv-3G in the analyzed samples of each evaluated Brazilian region (a, b, c and d). * The data refer to the average of the duplicate.



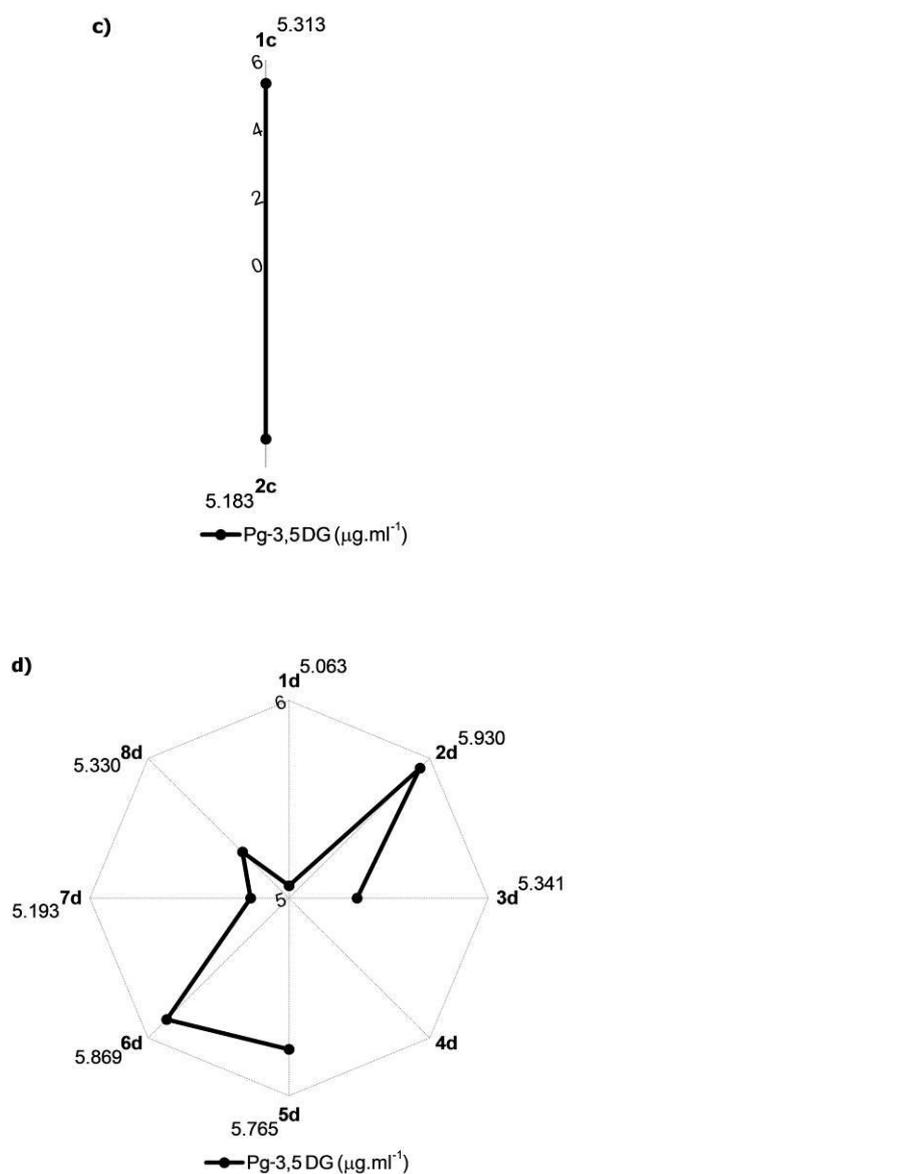


Figure 7. Distribution of the amounting ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of “Pg-3,5DG” in the analyzed samples of each evaluated Brazilian region (a, b, c and d). * The data refer to the average of the duplicate.

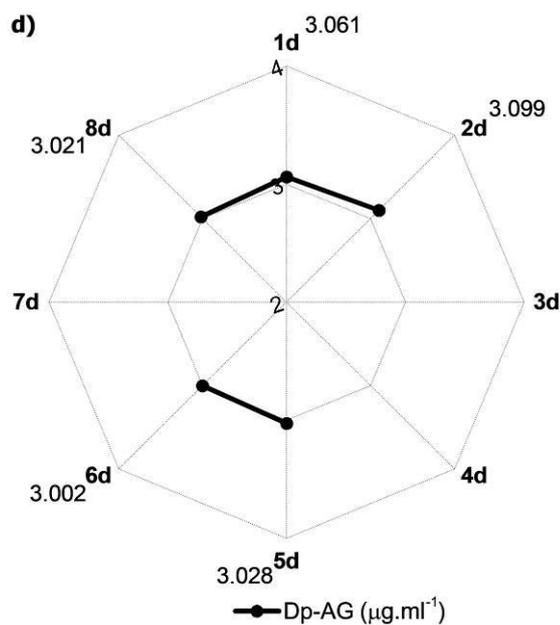
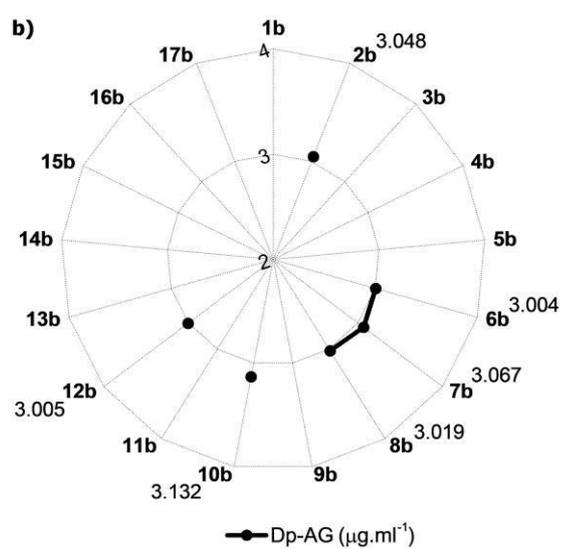


Figure 8. Distribution of the amounting ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of Dp-AG in the analyzed samples of each evaluated Brazilian region (b and d). * The data refer to the average of the duplicated.

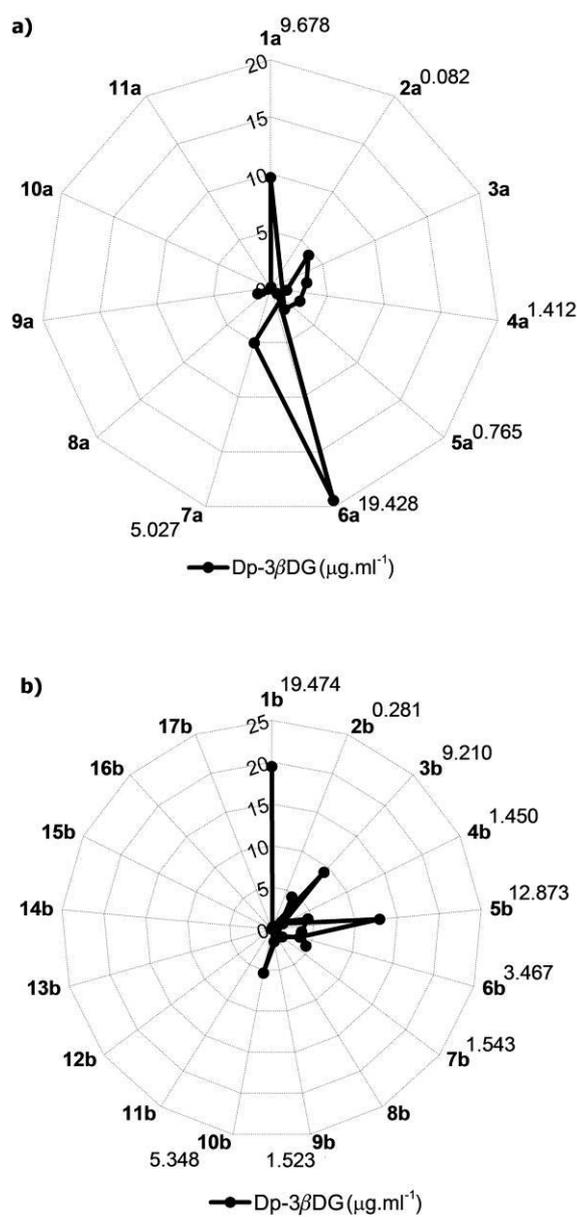


Figure 9. Distribution of the amounting ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of Dp-3G in the analyzed samples of each evaluated Brazilian region (a and b). * The data refer to the average of the duplicated.

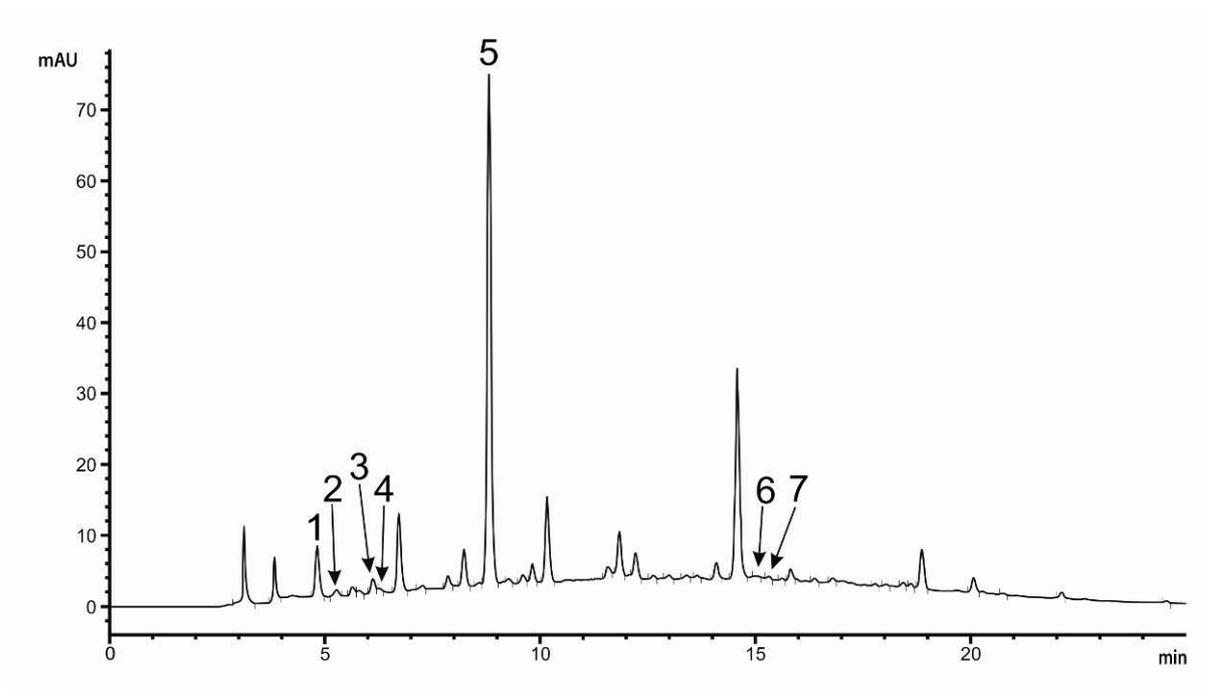


Figure 10. Example of a sample with five (1, 2, 3, 5 and 7) identified and quantified compounds ($>LOD$; $>LOQ$) and two (4 and 6) peaks under LOD and LOC values.

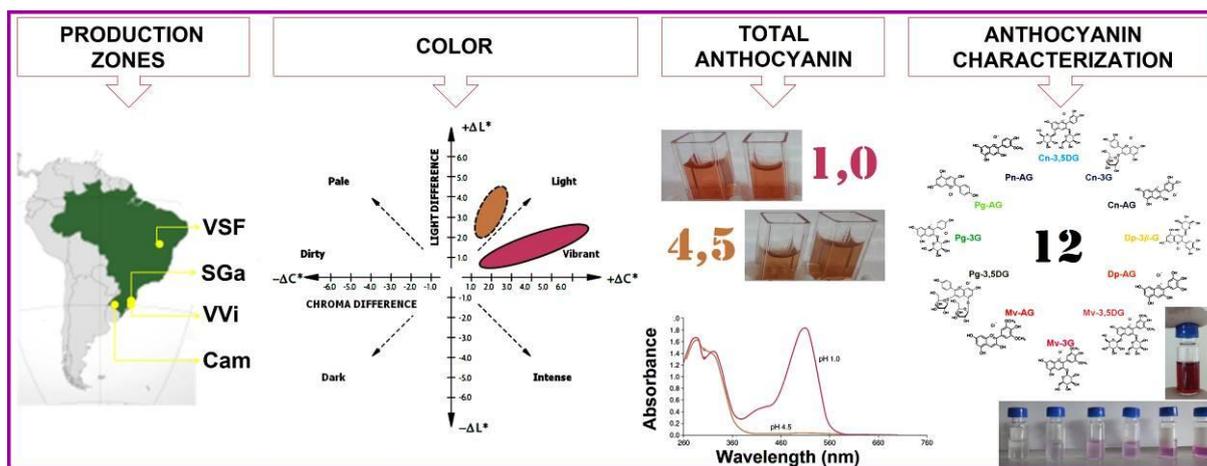
	Cn-3G	Dp-AG	Dp-3βG	Mv-AG	Mv-3G	"Pg-3G"	"Pg-3,5DG"
Cn-3G	1						
Dp-AG	-0.30	1					
Dp-3βG	0.69	0.09	1				
Mv-AG	0.58	0.61	0.66	1			
Mv-3G	0.80	0.24	0.92	0.88	1		
"Pg-3G"	-0.05	0.58	0.67	0.46	0.52	1	
"Pg-3,5DG"	0.62	0.47	0.89	0.92	0.96	0.68	1

Intensity Scale

Absolute	Very Strong	Strong	Moderate	Weak	Almost Null	Inexistent
-1	>-1 to -0.91	-0.90 to -0.71	-0.70 to -0.41	-0.40 to -0.21	-0.20 to <0	0
Inexistent	Almost Null	Weak	Moderate	Strong	Very Strong	Absolute
0	>0 to 0.20	0.21 to 0.40	0.41 to 0.70	0.71 to 0.90	0.91 to <1	1

Figure 11. Correlation established between anthocyanins resulting data analyzed by HPLC.

Table of Contents Graphics



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Em primeiro lugar, acredita-se ser relevante justificar o fato de que, ainda que tenham sido recebidas da EMBRAPA um total de 92 amostras, nem todos os trabalhos – como se pôde observar – foram realizados para todas elas.

Para os compostos fenólicos e a atividade antioxidante, dois vinhos foram intencionalmente excluídos do primeiro artigo, devido ao fato de haverem sido considerados órfãos, ou seja, provenientes de regiões absolutamente inéditas (Missões, no RS e Alto Feliz, também no RS), entretanto, para satisfazer a curiosidade do leitor, os resultados obtidos estão impressos anexos (ANEXO 8.1). Ainda em relação à atividade antioxidante, cabe fazer referência a uma segunda metodologia utilizada no aprendizado deste trabalho. Trata-se de uma reação feita a partir de um distinto método, o de captura do radical instável ABTS⁺, menos utilizado em vinhos, e que foi testado nas 92 amostras no primeiro tempo de análise (tempo zero) da atividade antioxidante. Devido ao enorme trabalho em se conduzir paralelamente as duas análises, e, devido ao fato de as metodologias estarem construídas em cima do mesmo princípio de captura de radicais orgânicos, evidenciou-se que, os resultados, ainda que difiram em razão absoluta, apresentam o mesmo perfil, quando analisados em escalas compatíveis. Dessa maneira, a partir do segundo tempo de análise (25 semanas), decidiu-se trabalhar com apenas uma das metodologias, sendo escolhida a do DPPH, descrita por Brandwilliams, Cuvelier e Berset (1995), tanto por permitir uma gestão melhor dos tempos de análise, quanto por facilidade comparativa, já que a maior parte dos trabalhos de análise antioxidante em vinhos é reportada sob esse formato. Contudo, outra vez para satisfazer a curiosidade do leitor, um gráfico com os dados para todas as amostras, representando as duas metodologias, foi construído, e é apresentado na sequência desse trabalho (ANEXO 8.2).

Já para a análise de cromatografia, devido à enorme dificuldade encontrada, não só para a realização de todos os exaustivos – e, muitas vezes, necessariamente lentos – procedimentos de purificação das amostras, mas, e especialmente para o ajuste das condições necessárias para que se obtivessem cromatogramas claros – com o mínimo possível de interferentes, e onde houvesse a possibilidade de resolução de, se presentes, todos os compostos para os quais obtivemos os padrões comerciais – não se fez razoável o esgotamento de todas as amostras

disponíveis, sendo estabelecida então, com a mistura de deduções lógicas e plausíveis – associadas a uma certa dose de curiosidade necessária – a decisão de se analisar apenas quatro regiões, que perfizeram um total de 38 amostras. Os critérios foram: Serra Gaúcha, pela expressividade e tradição da região; Vale dos Vinhedos, pela vanguarda no processo de identificação geográfica, com a conquista da primeira Indicação de Procedência do Brasil; Campanha Gaúcha, pela proporção com que vem ganhando força a vitivinicultura naquelas áreas, já consistindo na segunda maior zona de produção do Estado do Rio Grande do Sul; Vale do Rio São Francisco, pois, ainda que tenha sido representado por apenas duas amostras, ambas cabernet sauvignon, porém procedentes de estados diferentes geraram, certamente, a primeira componente para a tomada de decisão. Entretanto, foram as mais elevadas concentrações de compostos fenólicos, obtidas em todos os cinco tempos de análise, associada a mais alta atividade antioxidante para os quatro primeiros, dentre os cinco momentos de análise, que não puderam ser ignoradas. A escolha dessa região para os testes cromatográficos, portanto, teve por intuito buscar na associação dos trabalhos realizados, uma explicação mais completa, que pudesse justificar através das características e das concentrações das antocianinas, os desempenhos tão elevados dos parâmetros de IPT e de AOX. Não se justificou. Uma melhor representatividade da região e a inclusão de análises que contribuam para a complementação do perfil geral de polifenóis, tais como as medidas de flavan-3-óis, flavonas, estilbenos e ácidos fenólicos, enriqueceriam as conclusões a respeito do perfil evolutivo, não só do VSF, mas de todas as regiões consideradas.

Considerando a multiplicidade de fatores, sem dúvida alguma, fica claro o porquê de vinhos que estejam representando suas regiões com um único exemplar, não poderem ser usados para estabelecer um comportamento para a zona da qual procedem. Diante de tal exposto, fizeram-se necessárias as linhas acima, de modo a não deixar dúvidas acerca do motivo, pelo qual, as únicas duas amostras nordestinas tenham sido, dentre as demais selecionadas, para as análises por cromatografia líquida de alta eficiência.

Também fica claro que, pelo fato de não haver regulamentações estritas sobre a produção de uvas nem sobre o processamento enológico, os critérios adotados pelos viticultores e vinícolas acaba tornando complexa a identidade regional de vinhos, sendo que, muitas vezes, o desempenho individual do produto

acaba sendo um fator muito mais significativo para os parâmetros analisados. Exemplo disso é o fato de, como expressado no segundo artigo deste trabalho (5.2), para o perfil antociânico e para a concentração de compostos pigmentantes, os vinhos diferirem mais entre si dentro de uma mesma região, que entre regiões completamente distintas. Acredita-se que, nessa situação, o manejo adotado a campo – especialmente quando interfere diretamente no ciclo produtivo da planta, tais como as podas, a aplicação de fertilizantes e/ou de reguladores de crescimento, os sistemas de irrigação e a tomada de decisão da colheita, entre tantos outros, pouco ou nem sequer abordados neste trabalho (como a idade do vinhedo, a escolha do portaenxerto e da variedade-copa, os ajustes de carga na planta, etc. – associado às inúmeras possibilidades de tratamentos enológicos dados à uva – quais possam ser o tempo e a temperatura de maceração, o tipo de levedura e o complexo enzimático adotado, o manejo do oxigênio na fermentação, o número de remontagens do vinho, as condições de engarrafamento e armazenamento do produto, entre uma diversidade de outras condições – esteja definindo substancialmente o caráter de vinhos.

O “Estado da Arte” está aí para confirmar que as diferenças, sim, existem, inclusive em nível de clones das variedades – como possa estar exemplificado no trabalho de Ferrandino e Guidoni (2010) – e em nível de região, como pode ser citado o trabalho de Nixdorf e Hermosín-Gutiérrez (2010). Entretanto, trabalhos como este evidenciaram que as distinções dentro de um perímetro regional sobressaíram-se àquelas encontradas numa esfera brasileira – e ressalve-se que estamos falando de um país com dimensões continentais!

Conclui-se, com isso, que parâmetros de caracterização talvez venham sendo mascarados, negligenciados ou, ainda, nem sequer cabíveis de serem utilizados para rotular vinhos procedentes de uma mesma região. Tocaria ainda, uma observação a respeito desse fato: e, afinal, quer-se chegar a isso? O mundo inteiro tende, há anos, a rotular seus produtos, dando às regiões identidades, que imprimam em seus vinhos autenticidade e os preserve com a ilusão chamosa da irreprodutibilidade. Não seria vanguardista permitir aos produtores, como de fato, o vem sendo neste País, aplicar os seus próprios critérios? Dar identidade aos seus produtos conforme os seus próprios objetivos? Ainda que possa parecer uma ideia descabida, seria prudente tê-la em consideração, pelo menos na atual situação

brasileira, onde, qualquer decisão com base na criação de normas que resultem na padronização de produções enológicas esteja, talvez, restringindo a criatividade individual de vinícolas e, mais que isso, esteja limitando o potencial de cada região ao velho, ao já conhecido, ao que se repete em inúmeras regiões do mundo.

Ainda que se venha a seguir os passos de regiões tradicionais de produção e, nesse sentido, consolidar conceitos que apelam para a origem, como forma de identidade geográfica, não se conhece a fronteira das possibilidades vitivinícolas do território nacional, de modo que, quaisquer decisões de regulamentação, e, especialmente baseadas em parâmetros estrangeiros, seja, nesse momento, no mínimo precoce, para não dizer restritiva da genuína capacidade verde-amarela.

Devido ao fato de o Brasil estar inserido de forma relativamente recente no panorama da vitivinicultura, a “atividade exploratória”, por assim dizer, que incorpora a descoberta de novas regiões com potencial de cultivo para a videira vinífera, baseada em zoneamentos agroclimáticos consistentes, da mesma forma como trabalhos exaustivos de desenvolvimento de materiais genéticos vegetais, como portaenxertos e variedades-copa – por citar exemplos – entre tantos outros, permitirão não só a tomada de decisões com base em critérios mais sólidos como, e especialmente plantarão uma série de perspectivas a respeito dos rumos os quais se desejam ou se podem tomar na vitivinicultura desse país.

7. REFERÊNCIAS

AGRIFANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira – 2010**. Coord. Técnica SANT'ANNA, A.; FERAZ, J. V.; SILVA, M. L. M. Agra FNP Pesquisas Ltda., p. 505-514, 2009.

ALVES, A. O. **Presença de trans-resveratrol em geléias de uva e sua relação com a radiação UV**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos), Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria: UFSM, 2006.

ANVISA 2009. **Enxofre**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada: Resolução-RDC 41, de 10 de agosto de 2009.

APEL, K.; HIRT, H. **Reactive oxygen species: metabolism, oxidative, stress, and signal transduction**. Annual Review of Plant Biology, v. 55, p. 373-379, 2004.

BARON-MENGUY, C.; BOCQUET, A.; GUIHOT, A. L.; CHAPPARD, D.; AMIOT, M. J.; ANDRIANTSITOHAINA, R.; LOUFRANI, L.; HENRION, D. **Effects of red wine polyphenols on postischemic neovascularization model in rats: low doses are proangiogenic, high doses anti-angiogenic**. Federation of American Societies for Experimental Biology, Research Communication, 2007.

BAUEMER, L. The international protection of geographical indications. *In*: SYMPOSIUM ON THE INTERNATIONAL PROTECTION OF GEOGRAPHICAL INDICATIONS - WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION, 1991. Geneva. *Anais...* Geneva: SIPGI -WIPO, 1991.

BAVARESCO, L.; GATTI, M.; PEZZUTTO, S.; FREGONI, M.; MATTIVI, F. **Effect of leaf removal on grape yield, berry composition and stilbene concentration**. American Journal of Enology and Viticulture, v. 59, p. 292-298, 2008.

BERGAMASCHI, H.. **Fenologia**, 2009. Disponível em: www.ufrgs.br/agropfagrom/disciplinas/502/fenolog.doc. Acessado em: 10/12/2011.

BLASI, T.C. **Análise do consumo e constituintes químicos de vinhos produzidos na Quarta Colônia de Imigração Italiana do Rio Grande do Sul e sua relação com as frações lipídicas sanguíneas**. 2004. 91 f.. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos), Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria: UFSM, 2004.

BOGS, J.; EBADI, A.; MC'DAVID, D.; ROBINSON, S. P. **Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development.** *Plant Physiology*, v. 140, p. 279-291, 2006.

BOHN, R. **Avaliação do comportamento climático para o cultivo da videira na área monitorada pelo posto agrometeorológico do Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves/RS.** 2007. 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Viticultura e Enologia) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves, Bento Gonçalves.

BOSS, P. K.; DAVIES, C.; ROBINSON, S. P. **Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation.** *Plant Physiology*, v. 111, p. 1059-1066, 1996.

BÖHM, M.; ROSENKRANZ, S.; LAUFS, U. **Alcohol and red wine: impact on cardiovascular risk.** *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 19, p. 11-16, 2004.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of free radical method to evaluate antioxidant activity.** *Lebensmittel Wissenschaft Technology*, v. 22, p. 25-30, 1995.

BRAVDO, B.; HEPNER, Y.; LOINGER, C.; TABACMAN, H. **Effect of irrigation and crop level on growth, yield and wine quality of Cabernet Sauvignon.** *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 36, p. 132-139, 1985.

BROUILLARD, R. **The in vivo expression of anthocyanin colour in plants.** *Phytochemistry*, v. 22, n. 6, p. 1311-1323, 1983.

BROUILLARD, R.; CHASSAING, S.; FOUGEROUSSE, A. **Why are grape fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long?** *Phytochemistry*, v. 64, p. 1179-1183, 2003.

CABRITA, M. J.; SILVA, J. R. da; LAUREANO, O. **Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos.** *In: Seminário Internacional de Vitivinicultura, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Enseñada, México*, v. 3, p. 61-100, 2003.

CANO-LÓPEZ, M.; PARDO-MÍNGUEZ, F.; LÓPEZ-ROCA, J. M.; GÓMEZ-PLAZA, E. **Chromatic characteristics and anthocyanin profile of a micro-oxygenated red**

wine after oak or bottle maturation. European Food Research and Technology, v. 225, p. 127-132, 2007.

CARIDI, A.; CUFARIL, A.; LOVINO, R.; PALUMBO, R.; TEDESCO, I. **Influence of Yeast on Polyphenols in Wine.** Food, Technology and Biotechnology, v. 42, n. 1, p. 37-40, 2004.

CARVALHO, A. R. F.; OLIVEIRA, J.; FREITAS, V. de; MATEUS, N.; MELO, A. **A theoretical interpretation of the color of the two classes of pyranoanthocyanins.** Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, v. 948, p. 61-64, 2010.

CHADDAD, F. R. **Denominações de origem controlada** – um projeto de pesquisa. Caderno de Pesquisas em Administração – PPG/FEA/USP – Universidade de São Paulo, São Paulo, v. 1, n. 1, 1995.

CHALKER-SCOTT, L. **Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses.** Photochemistry Photobiology, v. 70, p. 1-9, 1999.

CHAOVANALIKIT, A.; WROLSTAD, R. E. **Anthocyanin and polyphenolic composition of fresh and processed cherries.** Journal of Food Science, v. 69, FCT73-FCT83, 2004.

CHATELET, D. S.; ROST, T. L.; MATTHEWS, M. A.; SHACKEL, K. A. Anatomy and Development. *In: The peripheral xylem of grapevine (Vitis vinifera) berries.* Journal of Experimental Botany, v. 59, p. 1997-2007, 2008.

CHAVES, M. M.; ZARROUK, O.; FRANCISCO, R.; COSTA, J. M.; SANTOS, T.; REGALADO, A. P.; RODRIGUES, M. L. **Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data.** Annals of Botany, v. 105, p. 661-176, 2010.

COOKE, D.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J.; MARCZYLO, T. **Anthocyanins from fruits and vegetables – Does bright colour signal cancer chemopreventive activity?** European Journal of Cancer, v. 41, p. 1931-1940, 2005.

COOMBE, B. G. **The development of fleshy fruits.** Annual Review of Plant Physiology, v. 27, p. 207-228, 1976.

COOMBE, B. G. **Research on the development and ripening of the grape berry.** American Journal of Enology and Viticulture, v.43, p.101-110, 1992.

CORREIA, R. C.; ARAUJO, J. L. P.; CAVALCANTI, E. de B. A fruticultura como vetor de desenvolvimento: o caso dos municípios de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA) *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL*, 39. 2001, Recife. *Anais...* Recife: CBESOR, 2001.

COULTATE, T. P. **Alimentos: a química de seus componentes**, 3ª Ed.. **Artmed Editora**, 368 p., 2004.

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

CRIQUI, M. H.; RINGEL, B. L. **Does diet or alcohol explain the French Paradox?** Lancet, v. 344, p. 1719-1723, 1994.

DAVIES, W. J.; ZHANG, J. **Root signals and the regulation of growth and development of plants in dryng soil.** Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v. 42, p. 55-76, 1991.

DE FINA, A. L.; RAVELO, A. C. **Climatología y fenología agrícolas.** Buenos Aires: EUDEBA, 1973, 281 p.

DELL'AGLI, M.; BUSCIALÀ, A.; BOSISIO, E. **Vascular effects of wine polyphenols.** Cardiovascular Research, v. 63, p. 593-602, 2004.

DELOIRE, A.; HUNTER, J. J. **Microclimat des grappes et maturation du raisin berry composition as affected by bunch exposure.** Progrès Agricole et Viticole, v.122, n. 7, p. 200-206, 2005.

DELUC, L. G.; QUILICI, D. R.; DECENDIT, A.; GRIMPLET, J.; WHEATLEY, M. D.; SCHLAUCH, K. A.; MÉRILLON, J. M.; CUSHMAN, J. C.; CRAMER, G. R. **Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavour and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay.** Biomedical Genomics, v. 10, n. 212, p. 1471-2164, 2009.

DIAS, H. P. **Origem, evolução e perspectivas da cadeia de produção vitivinícola no município de Caxias do Sul.** *In: Global manager.* Faculdade da Serra Gaúcha, n. 13, Caxias do Sul, RS: FSG, 2007.

DI STEFANO, R.; MAGGIOROTTO, G. **Rivista di Viticoltura e di Enologia**, v. 2, p. 51-65, 1995.

DUTT, S. K.; BAL, A. R.; BANDYOPADHYAY, A. K. **Salinity induced chemical changes in Casuarina equisetifolia Forst.** Egyptian Journal of Soil Science, v. 31, p. 57-63, 1991.

EMBRAPA. Cadastro Vitícola 2004-2009. EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2ª Ed., 2009. Disponível em www.ibravin.org.br; www.cnpuv.embrapa.br. Acesso em 16 de Julho de 2010.

EMBRAPA^a. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺.** In: Comunicado Técnico ISSN 1679-6535 de Julho de 2007, Fortaleza, Ceará, 2007.

EMBRAPA^b. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH.** In: Comunicado Técnico ISSN 1679-6535 de Julho de 2007, Fortaleza, Ceará, 2007.

ERYLMAZ, F. **The relationship between salt stress and anthocyanin content in higher plants.** Biotechnology and Biotechnological Equipment, v. 20, p. 47-52, 2006.

EUM, H. A.; LEE, S. M. **Effects of Trolox on the activity and gene expression of cytochrome P450 in hepatic ischemia/reperfusion.** British Journal of Pharmacology, v. 142, p.35-44, 2004.

FAMIANI, F.; WALKER, R. P.; TECSI, L.; CHEN, Z. H.; PROIETTI, P.; LEEGOOD, R. C. **An immunohistochemical study of the compartmentation of metabolism during the development of grape (*Vitis vinifera* L.) berries.** Journal of Experimental Botany, v. 51, p. 675-683, 2000.

FENNEMA, O. R. Colorantes. In: **Química de los Alimentos**. 2ª Ed. Editorial Acribia, Zaragoza, España, p. 773-854, 2000.

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

FLESCHHUT, J.; KRATZER, F.; RECHKEMMER, G.; KULLING, S. E. **Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro**. European Journal of Nutrition, v. 45, p. 7-18, 2006.

FLOREANI, M.; NAPOLI, E.; QUINTIERI, L.; PALATINI, P. **Oral administration of trans-resveratrol to guinea pigs increases cardiac DT-diaphorase and catalase activities, and protects isolated atria from menadione toxicity**. Life Sciences, v. 72, p. 2741–2750, 2003.

FRANCIS, F. J. **Anthocyanins and betalains: composition and applications**. Cereal Foods World, v. 45, p. 208-213, 2000.

FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; KINSELLA, J. E. **Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol (letter)**. Lancet, v. 341, p. 1103-1104, 1993.

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

GECHEV, T.; GADJEV, I.; VAN BREUSEGEM, F.; INZÉ, D.; DUKIANDJIEV, S.; TONEVA, V.; MINKOV, I. **Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes**. Cellular and Molecular Life Sciences, v. 59, p. 708-714, 2002.

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

GIOVANINNI, E.; MANFROI, V. **Viticultura e Enologia** – Elaboração de Grandes Vinhos nos Terroirs Brasileiros. IFRS – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, 344 p., 2009.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *In: Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley and Sons Inc. Unit F-2-1-F-2-13, 2001.

GOULD, K. S. **Nature's swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves**. Journal of Biomedicine and Biotechnology, v. 5, p. 314-320, 2004.

GROTEWOLD, E. **The genetics and biochemistry of floral pigments**. Annual Review of Plant Biology, v. 57, p. 761-780, 2006.

HAMMERSCHMIDT, R. **Phytoalexins: what have we learned after 60 years?** Annual Review of Phytopatology, v. 37, p. 285-306, 1999.

HARVAUX, M.; KLOPPSTECH, K. **The protective functions of carotenoid and flavonoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in Arabidopsis npq and tt mutants**. Planta, v. 213, p. 953-966, 2001.

HASHIZUME K.; SAMUTA T. **Grape maturity and light exposure affect berry methoxypyrazine concentration**. American Journal of Enology and Viticulture, v. 50, p. 194-198, 1999.

HINNES, L. M.; STAMPFER, M. J.; MA, J.; GAZIANO, J. M.; RIDKER, P. M.; HANKINSON, S. E.; SACKS, F.; RIMM, E. B.; HUNTER, D. J. **Genetic variation in alcohol dehydrogenase and the beneficial effect of moderate alcohol consumption on myocardial infarction**. The New England Journal of Medicine, v. 344, p. 549-555, 2001.

HORNSEY, I. **The Chemistry and biology of winemaking**. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2007.

IBGE. Produção Agrícola Municipal e Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. **IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2007. Disponível em www.agricultura.gov.br. Acessado em 16/07/2010.

IBRAVIN^a. Regiões Produtoras – Viticultura de Clima Temperado. **IBRAVIN – Instituto Brasileiro do Vinho**, 2010. Disponível em: www.ibravin.org.br/regioesprodutoras.php. Acessado em 16/07/2010.

IBRAVIN^b. Venda de vinhos cresce 1,3% de Janeiro a Maio deste ano. **IBRAVIN, - Instituto Brasileiro do Vinho**, Cinco de Julho de 2010. Disponível em www.ibravin.org.br/int_noticias.php. Acessado em 16/07/2010.

INPI. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Resolução 075/2000, de 28 de novembro de 2000 – Estabelece as condições para o registro das indicações geográficas. Rio de Janeiro: INPI, 2000. 7 p.

INPI. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Concessão: RPI nº 2009, de 07 de julho de 2009, disponível em: http://www.inpi.gov.br/images/stories/IG_Portal.pdf. Acessado em: 19/02/2012.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. *In: Fundamentos de Cromatografia*. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. (Orgs.). Unicamp: Campinas, São Paulo, 2006,

JEANDET, P.; BESSIS, R.; GAUTHERON, B. **The production of trans-resveratrol (3,5,4'-trihydroxyestilbene) by grape berries in different development stages**. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 42, n. 1, p. 41-46, 1991.

JUBILEU, SATO E ROBERTO. **Caracterização Fenológica**. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 451-462, Junho 2010

KEEVIL, J.G.; OSMAN, H.E.; REED, J.D.; FOLTS, J.D. Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 53-56, 2000.

KENNEDY, J. A.; MATTHEWS, M. A.; WATERHOUSE, A. L. **Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids**. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 53, p. 268-274, 2002.

KISHINO A. Y.; CARAMORI, P. H. Fatores climáticos e o desenvolvimento da videira. *In: KISHINO A. Y. et al. Viticultura tropical: o sistema de produção do Paraná*. Londrina: IAPAR, 2007. p. 59-86.

KISHINO, A. L.; ROBERTO, S.R. Tratos culturais. *In: KISHINO, A. Y.; CARVALHO, S.L. C.; ROBERTO, S. R. Viticultura tropical*. Londrina: IAPAR, 2007. p. 171-202.

KLATSKY, A. L.; ARMSTRONG, M. A.; FRIEDMAN, G. D. **Alcohol and mortality**. *Annals of Internal Medicine*, v. 117, p. 646–654, 1992.

KONG, J. M.; CHIA, L. S.; GOH, N. K.; CHIA, T. F.; BROUILLARD, R. **Analysis and biological activities of anthocyanins**. *Phytochemistry*. v. 64, p. 923-933, 2003.

KONIKA MINOLTA. **Comunicação Precisa da Cor: Controle de Qualidade da Percepção à Instrumentação**. Konika Minolta Sensing Inc. Osaka, Japão, p. 1-59, 1998.

KORZUCHOWSKA, A; WILSKA J. J. **Anthocyanins and chlorogenic acid copigmentation: influence on the colour of strawberry and chokeberry juices.** Lebensmittel-Untersuchung und- Forschung, v. 203. n. 1, p. 38-42, 1996.

KRAMER, M. Denominação e autenticidade. *In: Os sentidos do vinho.* Conrad editora do Brasil. p. 67-85, São Paulo, 2007.

LANDRAUT, N.; POUCHERET, P; RAVEL, P.; GASC, F.; CROS, G.; TEISSEDE, P. L. **Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages.** Journal of Agriculture and Food Chemistry, v. 49, p. 3341-3348, 2001.

LIN, J. K.; WENG, M. S. Flavonoids as nutraceuticals. *In: The science of flavonoids.* Springer, p. 213-238, 2006.

LONGNECKER, M. P. **Alcoholic beverage consumption in relation to risk of breast cancer: meta-analysis and review.** Cancer Causes Control, v. 5, p. 73-82, 1994.

LOVEYS, B. R.; DÜRING, H. **Diurnal changes in water relations and abscisic acid in field-grown *Vitis vinifera* cultivars – Abscisic acid changes under semi-arid conditions.** New Phytology, v. 97, p. 37-47, 1984.

LUCHSINGER, J. A.; TANG, M. X.; SIDDIQUI, M.; SHEA, S.; MAYEUX, R. **Alcohol intake and risk of dementia.** Journal of the American Geriatrics Society, v. 52, p. 540-546, 2004.

LUIS, A.J. **Atherosclerosis.** Nature, v. 407, p. 233-241, 2000.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. **Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante.** Boletim CEPPA, Curitiba, v. 22, p. 233-252, 2004.

MANDELLI, F. **Relações entre variáveis meteorológicas, fenologia e qualidade da uva na 'Serra Gaúcha'.** 2002, 196 f. Tese (Doutorado em Agroclimatologia), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MANDELLI, F.; BERLATTO, M. A.; TONIETTO, J.; BERGAMASCHI, H. **Fenologia da videira na Serra Gaúcha.** Pesquisa Agropecuária Gaúcha, v. 9, n. 1-2, p. 129-144, 2003.

MANDELLI, F.; TONIETTO, J.; CAMARGO, U. A.; CZERMAINSKI, A. B. C. **Fenologia e necessidades térmicas da videira na Serra Gaúcha.** CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18., 2004, Florianópolis, SC. Anais... CD-ROM.

MANFROI, V.; ZORZAN, C.; ZANUS, M. C.; GUERRA, C. C.; FIALHO, F. B.; DALL'AGNOL, I.; FERRI, V. C.; ROMBALDI, C. V. Capacidade antioxidante de vinhos tintos cabernet sauvignon tratados com taninos exógenos. *In: Congresso Latino- Americano de Viticultura e Enologia*, 11., 2007. *Anais...* Mendoza: Embrapa, 2007.

MATTIVI, F.; GUZZON, R.; VRHOVSEK, U.; STEFANINI, M.; VELASCO, R. **Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins.** *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 53, p. 7692-7702, 2006.

MAXWELL, S.; CRUICKSHANK, A.; THORPE, G. **Red wine and antioxidant activity in serum.** *Lancet*, v. 344, p. 193-194, 1994.

MAZZA, G.; MINIATI, E. Color stabilization and intensification. *In: Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains.* CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 1-20, 1993.

MC'ELDUFF, P.; DOBSON, A. J. **How alcohol and how often?** *In: Population based case-control study of alcohol consumption and risk of a major coronary event.* *British Medical Journal*, v. 314, p. 1159-1164, 1997.

MITTLER, R. **Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance.** *Trends in Plant Science*, v. 9, p. 405-410, 2002.

MORI, K.; GOTO-YAMAMOTO, N.; KITAYAMA, M.; HASHIZUME, K. **Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature.** *Journal of Experimental Botany*, v. 58, p. 1935-1945, 2007.

MOURA, S. B.; BRANDÃO, E. O.; SOARES, J. M.; DONOSO, C. D. S.; SILVA, T. G. F.; SOUZA, L. S. B. Exigência térmica e caracterização fenológica da videira cabernet sauvignon no Vale do São Francisco, Brasil. EMBRAPA, 2007. Disponível em: www.cpatsa.embrapa.br/public_eletronica/downloads/OPB1654.pdf. Acessado em 15/02/2012.

MURAKAMI, K. R. N.; CARVALHO A. J. C.; CEREJA, B. S.; BARROS, J. C. S. M.; MARINHO, C. S. **Caracterização fenológica da videira cv. Itália (*Vitis vinifera* L.) sob diferentes épocas de poda na região norte do Estado do Rio de Janeiro.** *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v. 24, n. 3, p. 615-617, 2002.

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

Analytica Chimica Acta, v. 659, p. 208-215, 2010.

OMETTO, J. C. **Bioclimatologia Vegetal**. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo, 425 p., 1981.

OREN-SHAMIR, M. Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants? *Plant Science*, v. 177, p. 310-316, 2009.

PACE-ASIAK, C. R.; HAHN, S.; DIAMANDIS, E. P.; SOLEAS, G.; GOLDBERG, D. M. **The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease**. *Clinica Chimica Acta*, v. 235, p. 207-219, 1995.

PEREIRA, G. E. ; CAMARGO, U. A.; GUERRA, C. C.; BASSOI, L. H.. Técnicas de manejo e vinificação em condições de clima tropical - I Simpósio Internacional de Vitivinicultura do Submédio São Francisco, 2010. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br/public_eletronica/downloads/OPB2078.pdf> Acesso em 26 de maio de 2011.

PEREIRA, G. E.; GUERRA, C. C.; MANFROI, L. Vitivinicultura e Enologia. *In*: SOARES, J. M.; LEÃO, P. C. S. **A vitivinicultura no Semiárido brasileiro**. Petrolina: EMBRAPA Semi-Árido, 2009. 756 p.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. *In*: BERGAMIN, A. F., KIMATI, H., AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**: princípios e conceitos, 3ª ed., v.1., Editora Agronômica Ceres, p. 415-451, 1995.

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

PETRI, J. L.; PALLADINI, L. A.; SCHUCK, E.; DUCROQUET J. H. J.; MATOS, C. S.; POLA, A. C. **Dormência e indução da brotação de fruteiras de clima temperado**. Florianópolis: Epagri, 1996, 110 p.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay**. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 2, p. 1231 – 1237, 1998.

RIAZ, S.; DOLIGEZ, A.; HENRY, J.R.; WALKER, M.A. Grape. Em: Genome mapping and molecular breeding in plants. **C. Kole**, v. 4, p. 63-101, 2007.

RIBÉREAU-GAYON, P.; STONESTREET, E. **Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge**. Bulletin de la Société Chimique de France, v. 9, p. 2649-2652, 1965.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J. **Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food**. Biochemistry Society Transactions, v.24, p. 790-795, 1996.

RIVERO-PÉREZ, M. D.; MUÑIZ, P.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ. **Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger capacity, and biomarkers of oxidative stress methodologies**. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v. 55, p. 5476-5483, 2007.

RIZZON, L. A.; MANFROI, V.; MENEGUZZO, J. **Planejamento e Instalação de uma Cantina para Elaboração de Vinho Tinto**. Documento nº 38. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2003.

RIZZON, L.A.; MIELE, A. **Efeito da safra vitícola na composição da uva, do mosto e do vinho Isabel da Serra Gaúcha, Brasil**. Ciência Rural, v. 36, n. 3, p. 959-964, 2006.

ROBY, G.; MATTHEWS, M. A. **Relative proportions of seed, skin and flesh, in ripe berries from Cabernet Sauvignon grapevines grown in a vineyard either well irrigated or under water deficit**. Australian Journal of Grape and Wine Research, v. 10, p. 74-82, 2004.

ROBY, G.; HARBERTSON, J. F.; ADAMS, D. A.; MATTHEWS, M. A. **Berry size and vine deficits as factors in winegrape composition: anthocyanins and tannins**. Australian Journal of Grape and Wine Research, v. 10, p. 100-107, 2004.

ROMERO-CASCALES, I.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J. I.; LÓPEZ-ROCA, J. M.; GÓMEZ-PLAZA, E. **The maceration process during winemaking extraction of anthocyanins from grape skins into wine**. European Food Research and Technology, v. 221, p. 163-167, 2005.

ROMERO-PÉREZ, A. I.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; WATERHOUSE, A. L.; DE LA TORRE-BORONAT, M. C. **Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape berry skins – Effect of powdery mildew**

on the stilbene content. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v. 44, p. 2124, 1996.

SALAMONI, A.; T. **As células e as plantas.** In: Apostila de aulas teóricas de fisiologia vegetal. Universidade Federal de Santa Maria: 2009.

SCANDALIOS, J. G. **Oxygen stress and superoxide dismutases.** Plant Physiology, v. 101, p. 7-12, 1993.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. **DPPH antioxidant assay revisited.** Food Chemistry, v. 113, p. 1202-1205, 2009.

SHERWIN, H. W.; FARRANT, J. M. **Protection mechanisms against excess light in the resurrection plants *Craterostigma wilmsii* and *Xerophyta viscosa*.** Plant Growth Regulation, v. 24, p. 203-210, 1998.

SEBRAE. Projeto Victur – Valorização do turismo integrado à identidade cultural dos territórios. Coordenador Técnico: Nestor Pistorello. **SEBRAE – RS**, 2006.

SINGLETON, V. L. Analytical fractionation of the phenolic substances of grapes and wine and some practical uses of such analyses. In **Chemistry of Winemaking**. A.D. Webb ed., 1974, pp. 184-211. American Chemical Society, Washington, D.C, 1974.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. **Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent.** Methods in Enzymology, v. 299, p. 152-178, 1999.

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

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. **Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent.** Methods in Enzymology, v. 299, p. 152-178, 1999.

SORENSEN, J. G.; KRISTENSEN, T. N.; LOESCHCKE, V. **The evolutionary and ecological role of heat shock proteins.** Ecology Letters, v. 6, p. 1025-1037, 2003.

SPYROPOULOS, C. G.; MAVROMMATIS, M. **Effect of water stress on pigment formation in *Quercus* species.** Journal of Experimental Botany, v. 29, p. 473-477, 1978.

STOJANOVIC, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. **Efficiency and Mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation.** Archives of Biophysics, v. 391, n. 1, p.79-89, 2001.

SUGAWARA, T.; IGARASHI, K. **Cultivar variation and anthocyanins and rutin content in sweet cherries (*Prunus avium* L.).** Journal of Japanese Society of Food Science and Technology, Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi, v. 55, p. 239-244, 2008.

SUZUKI, N.; MITTLER, R. **Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction.** Physiologia Plantarum, v. 126, p. 45-51, 2006.

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. **Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids.** Plant Journal, v. 54, p. 733-749, 2008.

TARARA, J. M.; LEE, J.; SPAYD, S. E.; SCAGEL, C. F. **Berry temperature and solar radiation alter acylation, proportion, and concentration of anthocyanin in merlot grapes.** American Journal of Enology and Viticulture, v. 59, p. 235-247, 2008.

TAVARES, S. C. C. de.; MENEZES, C. A. F de.; BARRETO, D. S. B.; GAVA, C. A. T.; Problemas fitossanitários na viticultura do Vale do São Francisco. *In: A produção de vinhos em regiões tropicais: Workshop Internacional de Pesquisa*, 1, 2004, p.121 -126.

TEMPLE, M.; PERRONE, G. G.; DAWES, I. W. **Complex cellular responses to reactive oxygen species.** Trends in Cell Biology, v. 15, p. 319-326, 2005.

THOMAS, T. R.; MATTHEWS, M. A., SHACKEL, K. A. **Direct *in situ* measurement of cell turgor in grape (*Vitis vinifera* L.) berries during development and in response to plant water deficits.** Plant, Cell and Environment, v. 29, p. 993-1001, 2006.

TONNIETO, J. CARBONNEAU, A. Análise mundial do clima das regiões vitícolas e de sua influência sobre a tipicidade dos vinhos: a posição da viticultura brasileira comparada a 100 regiões em 30 países. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA*, 9, 1999, Bento Gonçalves. *Anais...* Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1999, p. 75-90.

TONIETTO, J. Indicação geográfica Vale dos Vinhedos: sinal de qualidade inovador na produção de vinhos brasileiros. *In: V SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE INVESTIGAÇÃO E EXTENSÃO EM PESQUISA AGROPECUÁRIA/V ENCONTRO*

DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE SISTEMAS DE PRODUÇÃO, 5, 2002, Florianópolis, *Anais...* Florianópolis: IESA/SBSP, 2002, p. 1-16. (CD-ROM)

VALE, M. G. R. **Desenvolvimento de Métodos Analíticos para Criação de uma Base de Dados para a Caracterização de Vinhos Brasileiros**. Projeto de pesquisa do CNPq – Edital CNPq/MAPA/SDA N° 64/2008, p. 42, 2008.

VAN TUNEN, A. J.; MOL, J. N. M. **Control of flavonoids synthesis and manipulation of flower color**. *Plant Biotechnology*, v. 2, p. 94-125, 1991.

VERSARI, A.; PARPINELLO, G. P.; TOMIELLI, G. B.; FERRARINI, R.; GIULIVO, C. **Stilbene Compounds and Stilbene Synthase Expression during Ripening, Wilting, and UV Treatment in Grape cv. Corvina**. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v. 49, p. 5531-5536, 2001.

VIGUERA, C. G.; BRIDLE, P. Influence **of structure on colour stability of anthocyanins and flavylum salts with ascorbic acid**. *Food Chemistry*, v. 64, p. 21-26, 1999.

VULETA, A.; JOVANOVIC, S. M.; SESLIJA, D.; TUCIC, B. **Seasonal dynamics of foliar antioxidative enzymes and total anthocyanins in natural populations of *Iris pumila* L.** *Journal of Plant Ecology*, v. 3, n. 1, p. 59-69, 2010.

WALKER, A. R.; LEE, E.; BOGS, J.; MC DAVID, D. A. J.; THOMAS, M. R.; ROBINSON, S. P. **White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes**. *The Plant Journal*, v.49, p. 772-785, 2007.

WANG, H; COA, G.; PRIOR, R. L. Oxygen radicals absorbing capacity of anthocyanins. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 45, p. 304-309, 1997.

WATERHOUSE, A. Determination of Total Phenolic. *In: Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Wiley, 2002, I1.1.1-I1.1.8.

WESTPHALEN, S. L.; MALUF, J. R. T. **Caracterização das áreas bioclimáticas para o cultivo de *Vitis vinifera* L. nas regiões da Serra do Nordeste e Planalto do Estado do Rio Grande do Sul**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia; Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2000. 99 p.

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

XU, C.; ZHANG, Y.; ZHU, L.; HUANG, Y.; LU, J. **Influence of growing season on phenolic compounds and antioxidant properties of grape berries from vines grown in subtropical climate.** Journal of Agriculture and Food Chemistry, v. 59, p. 1078-1086, 2011.

YAMANE, T.; SHIBAYAMA, K. **Effect of changes in the sensitivity to temperature on skin coloration in 'Aki Queen' grape berries.** Journal of Japanese Society for Horticulture Science, v. 75, p. 458-462, 2006.

YANG, Z. M.; ZHENG, S. J.; HU, A. T.; ZHENG, Y. F.; YAN, J. F. **Response of cucumber plants increased UV-B radiation under water stress.** Journal of Environmental Sciences (China), v. 12, p. 236-240, 2000.

ZAFRA-STONE, S.; YASMIN, T., BAGCHI, M.; CHATTERJEE, A.; VINSON, J. A., BAGCHI, D. **Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention.** Molecular Nutrition and Food Research, v. 51, p. 675-683, 2007.

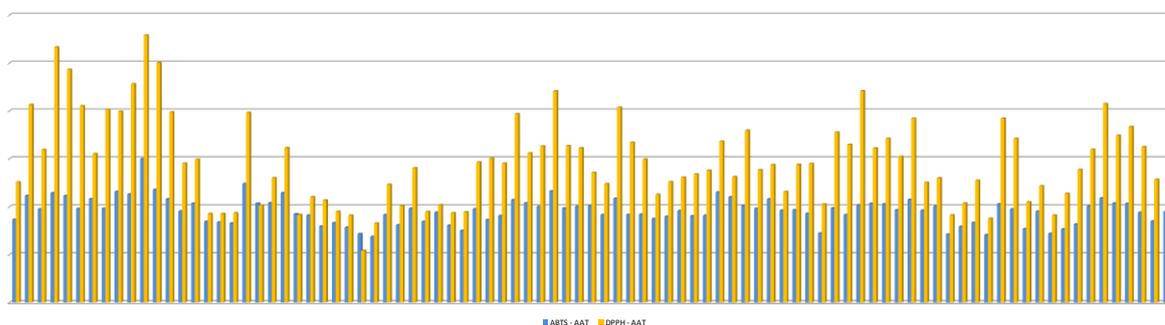
ZANUS, M. C.; GURAK, P. D.; ZORZAN, C. Capacidade antioxidante e concentração de compostos fenólicos em vinhos Ancellotta e Tannat. *In*: Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia, 10./ Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, 11./ Seminário Franco-Brasileiro de Viticultura e Enologia, 2., 2005, Bento Gonçalves. *Anais...* Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p. 357, 2005.

8. ANEXOS

8.1. Dados de IPT e AOX para Missões e Alto Feliz

Amostra procedente de Alto Feliz					
	Tempo Zero	Tempo 25 Semanas	Tempo 35 Semanas	Tempo 45 Semanas	Tempo 55 Semanas
IPT (GAE)	3201,00	3159,67	2113,78	1934,09	1664,55
AOX (TEAC)	13303,57	8792,86	7804,49	6560,90	6300,00
Amostra procedente de Três Palmeiras (Missões)					
	Tempo Zero	Tempo 25 Semanas	Tempo 35 Semanas	Tempo 45 Semanas	Tempo 55 Semanas
IPT (GAE)	3231,00	2379,67	1593,78	1547,73	1203,94
AOX (TEAC)	9321,43	9864,29	5419,87	5073,72	5300,00

8.2. Perfil comparativo entre metodologias – DPPH⁺ e ABTS⁺



8.2. Perfil gráfico representativo dos métodos utilizados para a medida da atividade antioxidante (AOX) para as 92 amostras de vinhos. Medida executada no tempo zero de análise. A fim de expressá-los numa mesma escala, os valores de DPPH foram divididos por 100.