



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



FÁBIO DE SOUZA DIAS

**“Determinação de compostos fenólicos em vinhos
e caracterização de vinhos elaborados na região
do Vale do São Francisco Pernambuco”**

**Salvador - Bahia
2010**

“Determinação de compostos fenólicos em vinhos e caracterização de vinhos elaborados na região do Vale do São Francisco Pernambuco”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências, área de concentração Química Analítica

Orientador: Jorge Maurício David
Co-orientador: Sérgio Luís Costa Ferreira

Salvador- Bahia

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela Lucidez nos momentos mais difíceis;

A minha Família: meus pais (Ana e Pedro) e minhas irmãs (Fabiana e Fernanda), pelo apoio;

Aos professores orientadores: Prof. Dr^o Jorge Maurício David e Prof. Dr^o Sérgio Luis Costa Ferreira pela brilhante orientação ao longo deste trabalho, incentivo amizade e confiança;

Ao Prof. Dr^o Antônio Celso Spinola Costa, pelos conselhos e sabedoria compartilhada;
Aos meus queridos alunos de Iniciação científica Lucylia Suzart (minha primeira IC), Josemario Bomsucesso, Zenilda Silva, Ana Claudia Lima, Lucas Carneiro, Rafael Sukermam, Daniele Caldas;

Aos amigos do laboratório 408: Prof. Dr^o Raildo Mota, Robson Mota, Laiana Bastos, Dannuza, Erik Galvão, Cleber, Juraci, profa Dr^a Neyla, Profa. Dr^a Ana Pinto, Fernanda Alves, Edmagnó, Pedro Sanches, Lindomar;

Aos amigos do Grupo de pesquisa em Produtos Naturais: Cleiton, Hugo, Larissa, Jerferson, Bruno;

Ao grande amigo Prof. Dr^o Alailson Falcão, pelo seu apoio, conselhos, sempre disposto a ajudar.

Aos amigos e Colegas da UFRB: Prof^o Dr^o Sivanildo Borges, Prof^a Dr^a Jacira Castro, Prof^o Dr^o Sérgio Rocha, Prof^o Dr^o Clarivaldo, Prof^o Msc Adson Mota, Prof^a Msc Lívia, Prof^a Msc Silvia Patricia, Prof^o Dr^o Celso Borges, Prof^a Dr^a Andréia Vita e Prof^o Dr^o Josivaldo;

A Amalia Costa, pelo seu carinho, companheirismo e apoio constante.

Aos amigos distantes: Danni Pereira, Ana Paula de Melo;

Ao amigo Prof. MSc. Rodrigo Veiga, pela sua valiosa e antiga amizade.

A Prof^a Dr^a M^a Fernanda Silva da Universidad de Lujan de Cuyo (Mi madrina científica), pelo apoio, amizade e por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse desenvolver parte deste trabalho;

Aos amigos de la Universidad de Lujan de Cuyo: Daniela Moreno, Federico, Leonardo Bolcato, Mariela (La flaca), Mariela, Mariana, prof. Drº Ruben Botini, ao amigo Germam Mesina;

Ao Profº Drº Luiz Dante;

Aos amigos de Floripa: Tati Maranhão, Eduardo, Luciano, Daniel Borges, Nane, Dilma Budziak, Gisele, Edsmar

Aos amigos: Rennan Geovanny, Euliane

Aos grandes Amigos: Prof. Drº Kassio Lima, Milene, Profª Drª Andrea Monteiro, pelo apoio e momentos de descontração durante os PROCADs e congressos da vida;

A profª Drª Marina Tavares da USP, por permitir que eu realizasse parte deste trabalho em seu laboratório e por ter compartilhado um pouco do seu conhecimento e experiência em eletroforese capilar.

A amiga Aline Klassen, por estar sempre disposta a ajudar, por toda a dedicação e paciência quando eu estive no lab da Profª Marina;

Aos colegas da USP: Edgar, Claudinei, Virginia, Tati;

Ao Profº Drº Carmelo Barroso da Universidad de Cádiz, por ter permitido realizar parte deste trabalho em seu laboratório;

Ao Profº Drº Miguel Palma da Universidad de Cádiz, pela amizade, apoio e pela sabedoria compartilhada sobre o universo dos vinhos;

Aos amigos de La Universidad de Cádiz: Mónica, Pepa, Profº Drº Juan Ramon, Profª Drª Maricarmen, Maria Jesus, Nacho, Drº Enrique, Najoua, Mohamed, Halit Carime, Antonio, Maria Remedios (Remi), por proporcionarem um ambiente de trabalho saudável e feliz;

Ao amigo Vicente Rosales, por todo apoio dado quando estive na Espanha.

Aos funcionários: Alice, Dona Ana, Titio (Wilson), Paulo, por facilitar a nossa vida acadêmica;

Durante a realização deste trabalho mais do que artigos ou resumos em congresso, os verdadeiros frutos colhidos foram às amizades conquistadas durante a minha caminhada, assim que peço desculpas se algum nome não foi citado, pois foram muitos que contribuíram de forma direta ou indireta na conclusão deste trabalho, então aqueles que não foram citados expresso minha gratidão.

Resumo

Os compostos fenólicos são responsáveis pela cor, sabor e aroma dos vinhos, além da presença dos mesmos estarem associados com alguns efeitos benéficos à saúde humana. Neste trabalho foram utilizados métodos cromatográficos por CG MS para a determinação de ácido gálico, (+)-catequina, resveratrol, quercetina, malvidina. As concentrações de quercetina variam de 2,4 a 3,0 mg L⁻¹, ácido gálico de 21,4 a 56,3 mg L⁻¹, resveratrol 1,5 a 5,9 mg L⁻¹, malvidina 15,3 a 32,2 mg L⁻¹, catequina 11,71 a 18,2 mg L⁻¹. Foi utilizado método eletroforético (CZE DAD) para a determinação de quercetina, caempferol, miricetina, ácidos siringico, gálico e cafeico. As concentrações de ácido gálico nas amostras de vinhos variaram de 16,00 a 42,00 mg L⁻¹, Caféico (3,16 a 5,18 mg L⁻¹), Siríngico (5,73 a 13,05 mg L⁻¹), kaempferol (2,32 a 4,33 mg L⁻¹), Quercetina (1,68 a 4,03 mg L⁻¹), Miricetina (7,52 a 25,13 mg L⁻¹). Outra gama de compostos foram determinados por HPLC-DAD-Fluorescência (ácido gálico, hidroximetil furfural, ácido vanílico, ácido caféico, ácido p-Cumárico, ácido ferúlico, caftárico, cis-cutárico, fertárico, trans-cutarico). A concentração de ácido caftárico variou de 13,28 a 46,83 mg L⁻¹, *cis*-cutárico de 1,01 a 2,13 mg L⁻¹, *trans*-cutárico de 2,13 a 17,56 mg L⁻¹, fertárico de 1,11 a 2,43 mg L⁻¹, ácido p-Cumárico de 0,26 a 12,46 mg L⁻¹, ácido ferulico de 0,31 a 3,97 mg L⁻¹, Hidroximetil furfural de 0,59 a 8,83 mg L⁻¹, ácido vanílico de 2,90 a 11,57 mg L⁻¹, ácido caféico de 4,20 a 14,20 mg L⁻¹, ácido p-Cumárico de 0,26 a 12,46 mg L⁻¹, ácido ferulico de 0,31 a 3,97 mg L⁻¹. Utilizou-se UPLC DAD para a identificação e determinação de antocianinas nos vinhos. A concentração para Delfinidina -3-O glicosídeo variou de 0,18 a 57,61 mg L⁻¹, Cianidina-3-O glicosídeo de 0,17 a 207,45 mg L⁻¹, Peonidina -3-O glicosídeo de 0,19 a 2,88 mg L⁻¹, malvidina -3-O glicosídeo de 1,05 a 11,97 mg L⁻¹, Cianidina-3-O-p-cumaroilglicosídeo de 0,25 a 3,83 mg L⁻¹, a Peonidina -3-O-acetilglicosídeo foi encontrada em uma única amostra e sua concentração foi de 11,10 mg L⁻¹, o teor de malvidina-3-O-acetilglicosídeo variou de 0,23 a 64,96 mg L⁻¹, malvidina-3-O-cafeoilglicosídeo variou de 0,35 a 2,82 mg L⁻¹. Foram também avaliados outros compostos fenólicos por HPLC DAD MS. Os métodos desenvolvidos apresentaram precisão, exatidão e uma boa linearidade.

Abstract

The phenolic compounds are responsible for the colour and flavour of the wines, besides the presence of the same ones they be associated with some beneficial effects to the human health. In this work chromatographic method were used by CG MS for the determination of gallic acid, catechin, resveratrol, quercetin, malvidin. The quercetin concentration vary from 2.4 to 3.0 mg L⁻¹, gallic acid from 21.4 to 56.3 mg L⁻¹, resveratrol 1.5 to 5.9 mg L⁻¹, malvidin 15.3 to 32.2 mg L⁻¹, catechin 11.71 to 18.2 mg L⁻¹. Eletrophoretic methods was used (CZE DAD) for the quercetin determination, kaempferol, myrecetin, siringic acid, gallic and cafeic acids. The concentrations of gallic acid in the samples of wines varied from 16,00 to 42,00 mg L⁻¹, cafeic acid (3.16 to 5.18 mg L⁻¹), siringic acid (5.73 to 13.05 mg L⁻¹), kaempferol (2.32 to 4.33 mg L⁻¹), quercetin (1.68 to 4.03 mg L⁻¹), myrecetin, (7.52 to 25.13 mg L⁻¹). Other range of compounds were certain for HPLC-DAD-fluorescence (gallic acid, hidroximetil furfural, vanillic acid, cafeic acid, p-Cumaric acid, ferulic acid, caftaric acid, cis-cutaric acid, fertaric acid, trans-cutaric acid). The concentration of caftaric acid varied from 13.28 to 46.83 mg L⁻¹, cis-cutaric acid from 1.01 to 2.13 mg L⁻¹, trans-cutaric acid from 2.13 to 17.56 mg L⁻¹, fertaric acid from 1.11 to 2.43 mg L⁻¹, acid p-Cumaric from 0.26 to 12.46 mg L⁻¹, ferulic acid from 0.31 to 3.97 mg L⁻¹, Hidroximetil furfural from 0.59 to 8.83 mg L⁻¹, vanillic acid from 2.90 to 11.57 mg L⁻¹, acid caféico from 4.20 to 14.20 mg L⁻¹, acid p-Cumárico from 0.26 to 12.46 mg L⁻¹, acid ferulico from 0.31 to 3.97 mg L⁻¹. UPLC DAD was used for the identification and anthocianins determination in the wines. The concentration for Delphinidin -3-glycoside varied from 0.18 to 57.61 mg L⁻¹, Cianidina-3-the glycoside from 0.17 to 207.45 mg L⁻¹, Peonidin-3-glycoside from 0.19 to 2.88 mg L⁻¹, malvidin -3-The glycoside from 1.05 to 11.97 mg L⁻¹, Cianidin-3-o-p-cumaroylglycoside from 0.25 to 3.83 mg L⁻¹, Peonidin-3-o-acetilglicosídeo it was found in a single sample and his/her concentration was of 11.10 mg L⁻¹, the tenor of malvidina-3-the-acetilglycoside it varied from 0.23 to 64.96 mg L⁻¹, malvidina-3-o-cafeoil glycoside it varied from 0.35 to 2.82 mg L⁻¹. They were appraised also others composed fenólicos for HPLC DAD MS. The developed methods presented precision, accuracy and a good linearidade.

Lista de abreviaturas

AA	Atividade antioxidante
ABTS	2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico)
CDH	Doença coronária
CE	Eletroforese capilar
CG	Cromatografia gasosa
CID	Dissociação induzida por colisão
CLUE	Cromatografia de ultra eficiência
CRM	materiais de referência certificados
CZE	Eletroforese capilar de Zona
DAD	Detector de arranjo de diodos
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
ED	Detecção eletroquímica
EDMA	Dimetracrilato de etileno glicol
ESI	Interfase de Eletrospray
FD	Fluorescência
FLD	Detector de fluorescência
GAE	Equivalente em ácido gálico
GPC	Cromatografia de permeação em Gel
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LC	Cromatografia líquida
LC/MS	Cromatografia líquida com espectrômetro de massas
LD	Limite de detecção
LLE	Extração líquido-líquido
LQ	Limite de Quantificação
m/z	Relação massa/carga
MEKC	Cromatografia micelar eletrocinética
MS	Espectrometria de massas
ORAC	Capacidade de Absorbância do Radical de Oxigênio
PA	Proanthocianidina
PDA	Arranjo de photo-diodos
RP HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência – Fase reversa
RSD	Desvio padrão relativo
SDS	Dodecil sulfato

SFE	Extração em fluido supercritico
SIC	Cromatograma íon individual
SPE	Extração em fase sólida
TBS	Tetraborato de Sódio
TBS	tetraborato de sódio
TIC	Cromatograma íon Total
TMS	Trimetilsilano
TR	Tempo de retenção
UPLC	Cromatografia de ultra eficiência
UV	Ultravioleta

Lista de Figuras

Figura 1: Mapa das Regiões vitivinícolas brasileira.....	5
Figura 2: Mapa da Região vitivinícola do Vale do São Francisco.....	5
Figura 3: Compostos fenólicos de natureza não flavonóidica encontrados em uvas e vinhos.....	8
Figura 4: Estrutura química de estilbenos of frequentemente encontrados em vinhos. 1 e 4 , <i>trans</i> - e <i>cis</i> -resveratrol; 2 e 5 , <i>trans</i> - e <i>cis</i> -piceid; 3 <i>trans</i> -astringina.....	11
Figura 5: flavonóis encontrados em vinhos.....	13
Figura 6: Estrutura química da (+)-catequina (1) ; (-)-epicatequina (2) ; Galato de (-)- epicatequina (3) ; (-)-Epigallocatequina galato (4)	14
Figura 7: Estrutura química da cianidina 3 – glicosídica.....	16
Figura 8 : Principais antocianinas.....	17
Figura 9. N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA).....	33
Esquema 10: Fluxograma utilizada na determinação de compostos fenolicos em vinhos por CG MS.....	34
Figura 11. Reação de derivatização do ácido gálico com BTSFA catalisada por piridina.....	36
Figura 12. Reação de derivatização do resveratrol com BTSFA catalisada por piridina.....	36
Figura 13. Reação de derivatização da catequina com BTSFA catalisada por piridina.....	37
Figura 14. Reação de derivatização da Malvidina com BTSFA catalisada por piridina.....	37
Figura 15. Reação de derivatização da quercetina com BTSFA catalisada por piridina.....	37
Figura 16. Cromatograma íon individual (SIC) do derivado TMS do ácido gálico na amostra de vinho do tipo Shiraz.....	38

Figura 17. Espectro de massa referente ao derivado TMS do ácido gálico na amostra de vinho do tipo Shiraz após derivatização.....	39
Figura 18. Esquema de Fragmentação do derivado TMS do ácido gálico....	39
Figura 20. Cromatograma ion individual (SIC) do derivado TMS da malvidina na amostra de vinho do tipo Shiraz.....	40
Figura 21. Cromatograma ion individual (SIC) do derivado TMS da catequina na amostra de vinho do tipo Shiraz.....	40
Figura 22. Espectro de massa referente ao derivado TMS da malvidina na amostra de vinho do tipo Shiraz após derivatização.....	40
Figura 23. Esquema de Fragmentação do derivado TMS da Malvidina.....	41
Figura 24. Espectro de massa referente ao derivado TMS da catequina na amostra de vinho do tipo Shiraz após derivatização.....	41
Figura 25. Esquema de Fragmentação do derivado TMS da Catequina.....	42
Figura 26. Cromatograma ion individual (SIC) do resveratrol na amostra de vinho do tipo Shiraz.....	42
Figura 27. Espectro de massa referente ao resveratrol na amostra de vinho do tipo Shiraz após derivatização.....	42
Figura 28. Cromatograma ion individual (SIC) do quercetina na amostra de vinho do tipo Shiraz.....	42
Figura 29. Espectro de massa referente à quercetina na amostra de vinho do tipo Shyrax após derivatização.....	43
Figura 30. Esquema de Fragmentação do derivado TMS do Quercetina.....	43
Figura 31. Cromatograma ion total (TIC) de uma amostra de vinho tinto do tipo Shyrax.....	43
Figura 31. Eletroferograma de compostos fenólicos presentes em uma mistura de padrões. Eletrólito de corrida: TBS 20 mmol L ⁻¹ , metanol 10 % (v/v); pH= 9.0 ; potencial aplicado, +25 kV; detecção, UV em 280 nm. Identificação dos picos: 1. Ácido siringico, 2. caempferol, 3. miricetina, 4. quercetina, 5. Ácido caféico acid, 6. Ácido gálico.....	54

Figura 32. Eletroferograma de compostos fenólicos presentes na amostra de vinhos. Eletrólito de corrida: TBS 20 mmol L ⁻¹ , metanol 10 % (v/v); pH= 9.0 ; potencial aplicado, +25 kV; detecção, UV em 280 nm. Identificação dos picos: 1. Ácido siringico, 2. caempferol, 3. miricetina, 4. quercetina, 5. Ácido caféico acid, 6. Ácido gálico.....	55
Figura 33. Cromatograma da mistura de padrões (Picos: 1.Catequina; 2. Epicatequina).....	61
Figura 34: cromatogramada de uma das amostra de vinho (Cabernet Sauvignon Shiraz). Picos: 1.Catequina; 2. Epicatequina).....	61
Figura 35. Cromatograma da mistura de padrões utilizando um comprimento de onda de 280nm (Picos: 1.ácido Gálico; 2. Hidroximetil furfural; 3. Ácido vanílico).....	71
Figura 36. Cromatograma da mistura da amostra de vinhos utilizando um comprimento de onda de 280nm (Picos: 1.ácido Gálico; 2. Hidroximetil furfural; 3. Ácido vanílico).....	72
Figura 37a. Cromatograma da amostra de vinhos utilizando um comprimento de onda de 320 nm (Picos: 1.ácido caféico; 2. Ácido p-cumárico; 3. Ácido ferulico).....	72
Figura 37b. Cromatograma da amostra de vinhos utilizando um comprimento de onda de 320 nm (Picos: 1.ácido caftárico; 2. Ácido cis-cutárico; 3. Ácido fertárico; 4. Ácido trans-cutárico).....	73
Figura 38. Cromatograma da mistura de padrões utilizando um comprimento de onda de 320 nm (Picos: 1.ácido caféico; 2. Ácido p-cumárico; 3. Ácido ferúlico).....	73
Figura 39. Ésteres hidroxicinâmicos.....	75
Figura 40. Estrutura das antocianinas glicosiladas (Delfinidina, Cianidina, Peonidina e malvidina).....	78
Figura 41. Cianidina-3-O-p-cumaroilglicosídeo.....	79
Figura 42. Estrutura as antocianinas acetil glicosiladas (peonidina e malvidina).....	79
Figura 43. malvidina-3-O-cafeoilglicosídeo.....	80
Figura 44. Sistema robótico, para SPE (Rapid Trace)	82

Esquema 45. Fluxograma para a extração em fase sólida.	82
Figura 46. Cromatograma do vinho Shiraz: 1. Delfinidina -3-O glicosídeo , 2. Cianidina-3-O glicosídeo , 3. Peonidina-3-O glicosídeo , 4. malvidina-3-O glicosídeo , 5.ND, 6. malvidina -3-O-acetilglicosídeo , 7. Cianidina-3-O-p-cumaroilglicosídeo , 8. ND, 9. malvidina-3-O-cafeoilglicosídeo.....	83
Figura 47. Cromatograma: 5. Delfinidina-3-O glicosídeo , 6. Cianidina-3-O-glicosídeo , 8. Peonidina-3-O glicosídeo , 10. malvidina-3-O glicosídeo , 14. Peonidina -3-O-acetilglicosídeo , 15. malvidina -3-O-acetilglicosídeo.....	83
Figura 48. Fluxograma da determinação de compostos fenólicos em vinhos por HPLC DAD MS.....	89
Figura 49. cromatogramada da mistura de padrões: Picos: 1. Ácido gálico; 2. Ácido caféico; 3. Ácido p-cumárico; 4. Quercetina).....	92
Figura 50. cromatogramada de uma das amostra de vinho (Cabernet Sauvignon). Picos: 1. Ácido gálico; 2. Ácido caféico; 3. Ácido p-cumárico; 4. Quercetina).....	92
Figura 51. Espectro de massas do ácido caféico.....	93
Figura 52. Espectro de massas do ácido cumárico.....	93
Figura 53. Espectro de massas do ácido gálico.....	94
Figura 54. Espectro de massas do quercetina.....	94
Figura 55. Cromatograma de uma das amostra de vinho (Cabernet Sauvignon Shiraz). Picos: 1.ácido cítrico; 2. ácido tartárico; 3. ácido málico; 4. ácido succínico; 5. ácido láctico; 6. ácido fórmico; 7. ácido acético).....	100

Lista de Tabelas

Tabela 1. Métodos Cromatográficos por HPLC para a análise de vinhos.....	22
Tabela 2. Gradiente da fase móvel utilizado no (HPLC).....	38
Tabela 3: Gradiente utilizado na análise de vinhos por HPLC DAD MS.....	47
Tabela 4. Gradiente da fase móvel utilizado no (HPLC DAD Fluorescência).....	49
Tabela 5. Pico base e fragmentos de (m/z) utilizados para identificar os compostos fenólicos nas amostras de vinho.....	50
Tabela 6. Figuras de mérito para o método utilizado na determinação de polifenóis em vinhos por CG MS.....	53
Tabela 7. Teste de adição/recuperação em amostras comerciais de vinho tinto cabernet sauvignon.....	56
Tabela 8. Concentração de Compostos fenólico encontrados em amostras de vinhos brasileiros.....	60
Tabela 9. Figuras analíticas do método.....	62
Tabela 10. Concentração dos compostos fenólicos determinados em vinhos brasileiros por eletroforese capilar.....	63
Tabela 11. Figuras analíticas do método.....	64
Tabela 12. Teste de adição/recuperação para concentrações de catequina e epicatequina (mg L^{-1}) em vinhos brasileiros produzidos na região do Vale do São Francisco , por HPLC.....	64
Tabela 13. Concentração de catequina e epicatequina (mg L^{-1}) em vinhos brasileiros produzidos no Vale do São Francisco por HPLC.....	68
Tabela 14. Dados sobre a concentração de catequina e epicatequina de vinhos de outros países e regiões.....	69
Tabela 15. Características analíticas do método proposto.....	69
Tabela 16. Características analíticas do método proposto.....	70
Tabela 17. Desvio padrão relativo.....	70

Tabela 18. Teste de adição/recuperação para concentrações de Gálico, Hmf, Vanílico, Caféico, p-Cumárico, (mg L^{-1}) em vinhos brasileiros HPLC PDA.....	74
Tabela 19. Concentração de ácido gálico, hidroximetil furfural, ácido vanílico (mg L^{-1}) em vinhos brasileiros produzidos no Vale do São Francisco por HPLC.....	76
Tabela 20. Concentração de ácido caféico, ácido caféico, ácido p-Cumarico e ácido ferulico (mg L^{-1}) em vinhos brasileiros produzidos no Vale do São Francisco por HPLC.	81
Tabela 21. Concentração do: ácido caftárico, ácido cis-cutárico, ácido fertárico,trans-cutárico (mg L^{-1}) em vinhos brasileiros produzidos no Vale do São Francisco por HPLC.....	84
Tabela 22. As etapas do método automático para extração em fase sólida	86
Tabela 23. Concentração de Delfinidina -3-O glicosídeo , Cianidina-3-O glicosídeo, Peonidina-3-O glicosídeo, Cianidina-3-O-p-cumaroilglicosídeo, Peonidina-3-O-acetilglicosídeo,malvidina-3-O-acetilglicosídeo, malvidina-3-O-cafeoilglicosídeo determinados em vinhos brasileiros produzidos no vale do São Francisco.....	91
Tabela 24. Fragmentos (m/z), tempo de retenção e massa molecular de: Ácido gálico; Ácido caféico; Ácido p-cumárico e Quercetina.....	93
Tabela 25. Figuras analíticas do método para determinação de gálico, ácido caféico, ácido cumárico e quercetina em vinhos brasileiros por HPLC DAD MS.....	95
Tabela 26. Teste de adição/recuperação para concentrações de ácido gálico, ácido caféico, ácido cumárico e quercetina encontrados nas amostras de vinhos brasileiros, (mg L^{-1}) em vinhos brasileiros por HPLC PDA MS.....	96
Tabela 27. Concentração de ácido gálico, ácido caféico, ácido cumárico e quercetina encontrados nas amostras de vinhos brasileiros.....	97
Tabela 28. Curvas analíticas utilizadas para a quantificação dos ácidos orgânicos em vinhos brasileiros produzidos na região do Vale do São Francisco , por HPLC, e seus respectivos coeficientes de correlação.....	100
Tabela 29. teores de ácidos láctico, málico, cítrico, ácido tartárico, acético, fórmico e succínico (mg L^{-1}).....	101
Tabela 30. teores de ácidos láctico, malico, cítrico, ácido tartárico, acético, fórmico e succínico (g L^{-1}).....	101

Índice

Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Lista de Abreviaturas.....	vii
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	x
Índice.....	xii
Capítulo I.....	1
1.0 Introdução.....	1
1.1 Vinhos no Brasil.....	4
1.2 Vinho e saúde.....	6
Capítulo II.....	8
2.0 Características da estrutura dos polifenóis.....	8
3.0 Composição de natureza não flavanóica.....	9
3.1 Ácidos benzóicos.....	9
3.2 Ácidos hidroxicinamil tartáricos.....	10
3.3 Estilbenos.....	10
4.0 Compostos flavonóides.....	12
4.1 Flavonols.....	12
4.2 Flavanóis.....	14
4.3 Antocianinas.....	15
Capítulo III.....	18
5.0 Análise de vinhos.....	18
5.1 Fenólicos totais e atividade antioxidante.....	18
5.2 Determinação de compostos fenólicos em vinhos.....	28
5.3 Eletroforese.....	30
5.4 Cromatografia líquida de Ultra Eficiência.....	32
6.0 Técnicas clean-up para a determinação de fenólicos em vinhos.....	33
Capítulo IV.....	33
7.0 Extração líquido-líquido assistida por ultrassom acoplada á cromatografia gasosa com espectrometria de massas para a determinação de compostos fenólicos em vinhos brasileiros elaborados no Vale do São Francisco – Bahia/Pernambuco.....	33
7.1 Parte experimental.....	33

7.1.1	Análise por GC MS.....	33
7.1.2	Derivatização.....	36
8.0	Resultados e discussão.....	38
8.2	Validação do método analítico.....	44
8.2.1	Linearidade.....	44
8.3	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	45
8.3.1	Método visual.....	45
8.3.2	Método relação sinal ruído.....	45
8.2.4	Método baseado nos parâmetros da curva analítica.....	46
8.4	Precisão.....	47
8.5	Exatidão.....	48
8.5.1	Ensaio de recuperação.....	48
9.0	Determinação de ácido gálico, resveratrol, catequina, quercetina e malvidina em vinhos brasileiros.....	49
Capítulo VI	51
10	Determinação de flavonóides e ácidos fenólicos em vinhos produzidos na Região do Vale do São Francisco – Bahia /Pernambuco por Eletroforese Capilar.	51
10.1	Parte Experimental.....	51
10.1.2	Análise por eletroforese.....	51
10.1.3	Instrumentação.....	51
10.2.1	Reagentes e solventes.....	52
10.3.1	Extração Líquido-líquido.....	52
11.0	Determinação de flavonóides e ácidos fenólicos em vinhos por CZE.....	53
11.1	Figuras de mérito.....	53
11.2	Aplicação do método.....	54
Capítulo VII	58
12.0	Determinação de catequina e epicatequina em vinhos produzidos na Região do Vale do São Francisco por HPLC com detecção por Fluorescência.....	58
12.1	Parte Experimental.....	58
12.1.1	Solventes.....	58
12.1.2	Padrões.....	59
12.1.3	Preparo da amostra.....	59
12.2	Análises de vinhos por HPLC/fluorescência.....	59
12.2.1	Validação do método analítico.....	62
13	Determinação de catequina e epicatequina em vinhos brasileiros.....	63
Capítulo VIII	66
14.0	Determinação direta de ácido fenólicos em vinhos produzidos na Região do Vale do São Francisco por HPLC PAD.....	66
14.1.1	Parte Experimental.....	66
14.1.2	Solventes.....	66

14.1.3 Padrões.....	67
14.1.4. Preparo da amostra.....	67
14.2 Análises de vinhos por HPLC PAD.....	67
14.3. Validação do método analítico.....	68
15.0 Aplicação.....	70
15.1. Determinação de compostos fenólicos em vinhos brasileiros.....	70
15.1.2 Determinação de ácido gálico, hidroximetil furfural, ácido vanílico, ácido caféico, ácido p-Cumárico e ácido ferúlico em vinhos brasileiros elaborados na região do Vale do São Francisco.....	71
15.2. Determinação de ésteres caftárico, cis-cutárico, fertárico, trans-cutárico em vinhos brasileiros.....	75
Capítulo IX.....	77
16. Desenvolvimento de um método de extração em fase sólida automatizado para a determinação de antocianinas por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) com detector de arranjo de diodos.....	77
16.1.1 Parte experimental.....	80
16.1.2 Solventes.....	80
16.3 Cromatografia dlíquida de ultra eficiência UPLC.....	80
16.3.1 Extração em fase sólida.....	81
16.4 Figuras analíticas de mérito.....	84
Capítulo X.....	88
17. Extração assistida por ultassom acoplada a HPLC-MS-DAD para a determinação de compostos fenólicos em vinhos produzidos no Vale do São Francisco.....	88
17.1.1 Parte Experimental.....	88
17.1.2 Solventes.....	88
16.2 HPLC DAD MS.....	89
17. Validação do método analítico.....	95
18. Aplicação.....	97
Capítulo XI.....	98
19. Avaliação do conteúdo de ácidos orgânicos em vinhos produzidos na Região do Vale do São Francisco - Bahia/Pernanbuco.....	98
19.1.1 Parte Experimental.....	98
19.2 HPLC com detector de condutividade.....	99
20. Determinação de ácidos orgânicos em vinhos.....	100
21. Conclusão.....	103
22. Referências.....	106

Capítulo I

1.0 Introdução

A uva é um dos frutos que possui alta concentração de açúcar, além de possuir sumo abundante e caracteriza-se pela facilidade em sofrer um processo de fermentação quando em contato com microorganismos, em especial as leveduras, produzindo uma das bebidas mais consumidas no mundo, desde a antiguidade até os tempos atuais: o vinho. A origem desta bebida é tão antiga que remota da pré-história e das antigas civilizações egípcias, babilônicas e Greco-romanas. Assim, a história do vinho está atrelada com a descoberta das primeiras reações químicas percebidas pelo homem: a fermentação e a oxidação.

Os vinhos, de maneira geral, são constituídos de água, álcoois, açúcares, ácidos orgânicos, proteínas, polifenóis, sais minerais e vitaminas. Cada grupo de constituintes do vinho é composto por dezenas, e às vezes centenas, de compostos químicos. Esta composição química está intimamente ligada com a origem das uvas; ou seja, o tipo de solo, clima, região onde são cultivadas estas uvas e o tipo de tratamento pelos quais estas são submetidas durante o processo de produção e conservação do vinho. A obtenção de um vinho de boa qualidade requer, principalmente, um grande conhecimento e constante monitoramento dos compostos químicos presentes na uva.

A conservação do vinho em barris de carvalho durante o seu amadurecimento é uma prática antiga, que promove uma mudança nas propriedades organolépticas, como cor e sabor, preparando a bebida para posterior envelhecimento nas garrafas. Este tipo de alteração pode ocorrer devido à modificação da estrutura de compostos fenólicos presentes na bebida, através do fenômeno de óxido-redução. É importante

destacar que os compostos fenólicos presentes no vinho tinto é muito mais complexo do que o presente na própria uva, que é constituída de antocianinas monoglicosídicas, encontradas em sua maioria no estado livre, e de taninos mais polimerizados formados a partir de procianidinas, conforme a sua origem (película, semente ou engaço). As combinações tanino-antocianina estão presentes no vinho desde a vinificação e sua formação depende das condições das operações executadas. Os fenômenos oxidativos ligados à conservação de vinho na madeira são particularmente complexos, pois eles conduzem à estabilização da cor vermelha do vinho e à modificação das estruturas de seus taninos, desde que a oxidação seja conduzida quando o teor dos compostos fenólicos do vinho for suficiente. O ácido gálico e os taninos gálicos, provenientes da madeira, são os elementos que favorecem essa oxidação. Todos estes compostos citados anteriormente são responsáveis pelas propriedades que conferirão ao vinho características que farão dele uma bebida de boa ou de má qualidade.

De um modo geral as ciências contribuem muito para a melhoria do controle de qualidade do vinho, desenvolvendo pesquisas sobre o cultivo, processos fermentativos e de envelhecimento. Vários estudos demonstram [1,2] que a presença de substâncias fenólicas e/ou flavonóides no vinho contribuíram para a melhoria da saúde humana, pois alguns destes compostos possuem ações anti-séptica, anti-virótica e protetora dos vasos sanguíneos, podendo prevenir as doenças vasculares e retardar o envelhecimento [3]. Dentre estes compostos encontrados nos vinhos pode-se destacar o resveratrol, catequina, epicatequina e quercetina. No contexto dos compostos fenólicos, os flavonóides, especialmente as proantocianidinas, são os principais responsáveis pelas sensações gustativas dos vinhos, nomeadamente ao nível da adstringência, assumindo ainda um importante papel no envelhecimento do vinho.

O resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxistilbeno), encontrado em maior concentração nas cascas da uva, é uma substância produzida pela videira que atua como uma resposta à invasão por fungos do tipo *Botrytis cinerea*, por isso o resveratrol é considerado uma fitoalexina. A concentração destas substâncias no vinho é utilizada como parâmetros para a determinação da qualidade da bebida [4]. Esta substância

possui comprovada ação biológica no organismo humano, prevenindo problemas cardíacos, pois reduz a susceptibilidade das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) a peroxidação lipídica, ou seja, efeito antioxidante.

Estudos mostram que a quercetina possui várias atividades biológicas. Assim como o resveratrol, esta substância protege a oxidação do LDL do colesterol [5]. Além disso, está evidenciado um efeito sinérgico entre etanol, quercetina e resveratrol na inibição da enzima óxido nítrico sintase envolvida nos danos das paredes vasculares e do DNA [6].

A presença de polifenóis em vinhos está relacionada com a cor e o sabor do produto, conferindo adstringência e corpo a bebida. O conhecimento da composição de polifenóis mostra-se muito importante para identificar a idade, a origem do produto e para colaborar na solução de problemas relacionados com a coloração e estabilidade dos vinhos [7].

No Brasil, as principais regiões produtoras de vinhos (Figura 1), são: Rio Grande do Sul, onde se concentra a maior parte da produção nacional, Vale do Rio Peixe, em Santa Catarina, e o vale do Rio São Francisco, na divisa entre Bahia e Pernambuco. É neste último, especialmente na cidade de Santa Maria da Boa Vista próxima a Petrolina e Juazeiro, na fronteira entre Pernambuco e Bahia, que a produção vinícola nacional tem se mostrado bastante promissora. Nesta região, técnicas de cultivo diferenciadas pela irrigação mecanizada permitem a produção de até 2,5 safras por ano, numa viticultura que desperta a curiosidade do mundo com seus bons vinhos de latitude impensável até então.

Este trabalho tem como objetivo desenvolver um conjunto de métodos que permitam avaliar a qualidade dos vinhos produzidos na região do vale do São Francisco, estabelecendo assim critérios que permitam a esta região vinícola melhorar as condições dos vinhos brasileiros, conferindo-lhes maior competitividade, em âmbito nacional e internacional, e fortalecendo a economia da região e também do país.

1.1 Vinhos no Brasil

No Rio Grande do Sul concentra-se mais de 90% da produção vinícola do país e lá estão as maiores vinícolas brasileiras. A maior parte destas vinícolas está localizada na Serra Gaúcha região de montanha ao norte do estado, destacando-se as cidades de Bento Gonçalves, Garibaldi e Caxias do Sul, seguidas de Flores da Cunha, Farroupilha e Canela, e o restante em Erechin, no noroeste do estado; Jaguari, no sudoeste; Viamão e São Jerônimo, no centro-leste; Bagé, Don Pedrito, Pinheiro Machado e Santana do Livramento, no extremo sul.

Uma pequena parte dos vinhos brasileiros é proveniente de diminutas regiões vitivinícolas (Figura 1), situadas nos estados de Minas Gerais (municípios de Andradas, Caldas, Poços de Caldas e Santa Rita de Caldas), Paraná, Pernambuco (Santa Maria da Boa Vista e Vitória de Santo Antão), Santa Catarina (Urussanga) e São Paulo (Jundiaí e São Roque).

No quadro vinícola descrito para as regiões fora do Rio Grande do Sul, existe uma região do semi-árido brasileiro situada no Nordeste brasileiro. É o promissor Vale do rio São Francisco (Figura 2), especialmente na cidade de Santa Maria da Boa Vista, próxima de Petrolina e Juazeiro, na fronteira de Pernambuco e Bahia. O vale do São Francisco vem tornando-se um dos importantes produtores vitivinícolas do país. Responsável por 99% da uva de mesa exportada pelo Brasil e pela produção de 5 milhões de litros de vinho por ano. A vinicultura pernambucana/baiana já detém 15% do mercado nacional é o Vale do São Francisco, única região do mundo que produz duas safras e meia por ano).

Na literatura tem sido descrito poucos trabalhos sobre vinhos brasileiros. Estes trabalhos descrevem vinhos elaborados principalmente na região sul do Brasil [8,9], sendo os dados disponíveis, ainda são bastante limitados.



Figura 1: Mapa das Regiões vitivinícolas brasileira [10].

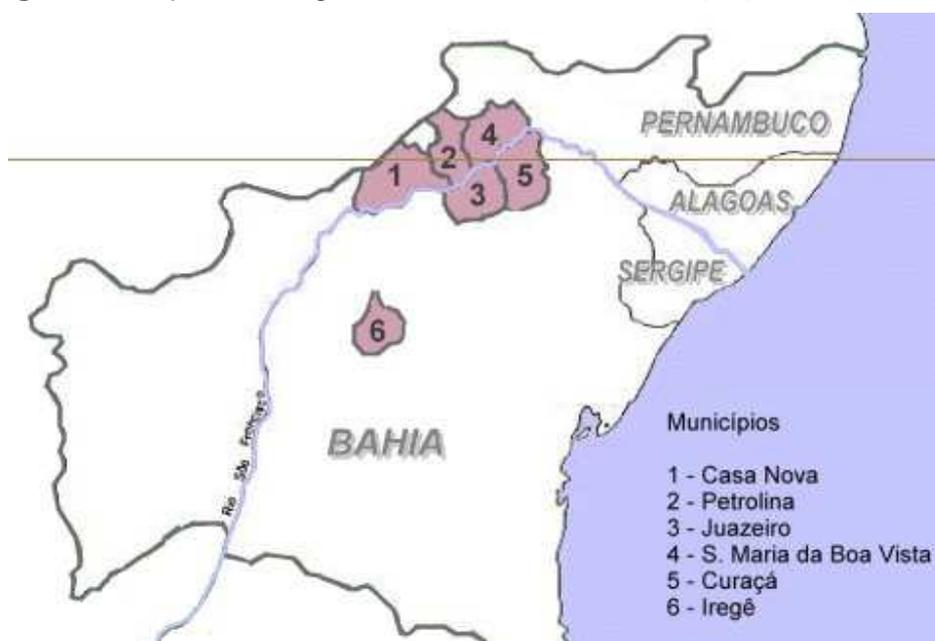


Figura 2: Mapa da Região vitivinícola do Vale do São Francisco [10]

1.2 Vinho e saúde

Muitos trabalhos já foram publicados descrevendo vários procedimentos para a determinação de polifenóis em vinhos e a relação dos mesmos com sua capacidade antioxidante [11], que é a habilidade em seqüestrar espécies de oxigênio ativo. Dentre os compostos que apresentam esta capacidade destacam-se os flavanóis [12,13], as antocianinas [14,15], e ácido tânico [16].

Além da capacidade antioxidante, foram investigadas outras propriedades que poderiam estar relacionadas com a presença deste e de outros compostos fenólicos, como ação anti-inflamatória, antiviral [1,2], antialérgicos [17], anticarcinogênicos [18] e a prevenção de doenças cardiovasculares [19,20]. Com todas estas propriedades o vinho passou a ser um aliado muito importante para a saúde humana, sendo inserido na lista dos alimentos funcionais, definidos como sendo alimentos que proporcionam efeitos fisiológicos benéficos à saúde, além de satisfazer as necessidades nutricionais clássicas. Para um alimento ser classificado como funcional, ele deve ter efeito relevante na saúde e no bem estar ou resultar na redução do risco de doenças. O componente funcional pode ser um macronutriente, um micronutriente ou um componente não nutritivo [21].

Quanto ao papel dos polifenóis como metabólitos em plantas é importante mencionar que os mesmos participam no metabolismo das plantas, sendo responsáveis pelo crescimento e interação com outros organismos vivos. Uvas e vinhos contêm altos teores de fenólicos, principalmente flavonóides com concentrações variando de 1000 a 1800 mg L⁻¹ [22].

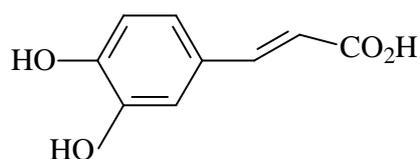
Após vários estudos foi sugerido que o consumo moderado de vinho auxiliava na proteção contra doenças coronárias. As investigações sobre este tema foram iniciadas com a divulgação do "Paradoxo Francês" relatado por Renaud & de Lorgeril [23], onde os autores constataram que apesar dos franceses possuírem hábitos alimentares pouco recomendáveis, como alta ingestão de gorduras saturadas e sedentarismo, a incidência de doenças cardiovasculares na população em geral era relativamente baixa. Este fato foi atribuído ao consumo regular de vinho pelos franceses [24].

Estudos *in vitro* indicam que o resveratrol pode atuar como cardioprotetor por uma série de mecanismos, como: inibição da agregação plaquetária (formação de trombos), da proliferação de células musculares lisas e da oxidação do mau colesterol (LDL); redução da síntese de certos lipídeos e eicosanóides que podem promover inflamação e aterosclerose; e supressão de certos tipo de arritmia [25]. Outro estudo *in vitro* mostrou ainda a atividade anticarcinogênica e quimiopreventiva do resveratrol, que pode atuar nas fases de iniciação, promoção e progressão de células tumorais [21].

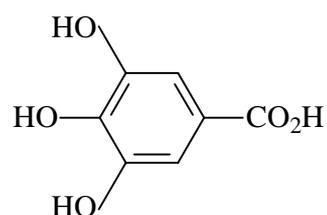
Capítulo II

2.0. Características da estrutura dos polifenóis

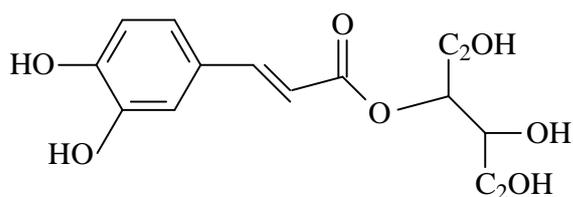
Uma das possíveis classificações dos polifenóis das uvas e dos vinhos é a sua divisão em compostos flavonóides e em não flavonóides (Figura 3). Ao primeiro grupo pertencem as flavanas, os flavonóis e as antocianinas, estas últimas apenas existentes nas uvas tintas. Ao segundo grupo pertencem os ácidos benzóicos e os ésteres tartáricos dos ácidos da série cinâmica. Existem ainda outros compostos fenólicos como os estilbenos (vide página 11).



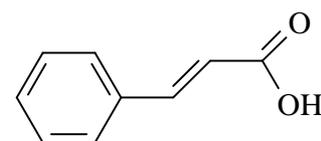
(a) Ácido caféico



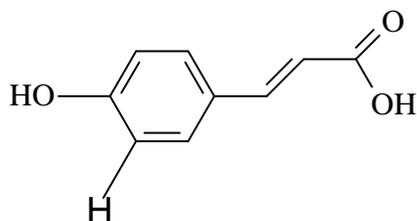
(b) Ácido gálico



(c) tartarato de cafeóila



(d) ácido cinâmico



(e) ácido p-cumárico

Figura 3. Compostos fenólicos de natureza não flavonóidica encontrados em uvas e vinhos.

3.0 Composição de natureza não flavanóidica

Os compostos não flavonóides compreendem os ácidos fenólicos, benzóicos e cinâmicos e outros derivados fenólicos como os estilbenos (Figura 4). Nas uvas, os ácidos fenólicos são principalmente os ácidos hidroxicinâmicos que se encontram nos vacúolos das células das películas e polpas. Os ácidos fenólicos são incolores quando se encontram em solução hidroalcoólicas, contudo podem adquirir uma coloração amarelada depois dos processos de oxidação, e são responsáveis pelo aparecimento de uma coloração acastanhada nos vinhos [26]. Embora não exerçam uma influência direta no gosto dos vinhos, estão implicados no aparecimento de fenóis voláteis depois da ação de certo microrganismos com conseqüentes alterações aromáticas.

3.1. Ácidos benzóicos

Dos ácidos derivados do ácido benzóico, destacando-se os ácidos vanílico, siríngico e salicílico, que aparecem ligados às paredes celulares e, principalmente, o ácido gálico, que se encontra esterificado aos flavanóis. Outros ácidos benzóicos existentes em menor quantidade são o protocatéquico, o gentísico, e o p-hidroxibenzóico. Estes ácidos encontram-se nas uvas na forma de ésteres e no decurso da elaboração e conservação do vinho vão sofrendo uma hidrólise lenta. Podem ser encontrados livres ou combinados.

3.2 Ácidos hidroxicinamil tartáricos

Os ácidos fenólicos da série cinâmica encontram-se na uva esterificados com o ácido tartárico, formando monoésteres. Na Figura 3 encontra-se representado o ácido

cinâmico, do qual derivam os ácidos fenólicos desta série, e os ácidos cinâmicos mais importantes, como o ácido ferrúlico, o ácido p-cumárico e o ácido caféico. Os ésteres ácidos hidroxicinamil tartáricos estão presentes no sumo de uva e tem um papel fundamental no fenômenos de acastanhamento oxidativo que os mostos ou vinhos brancos podem sofrer.

3.3 Estilbenos

Devido, principalmente, às suas propriedades antioxidantes, os compostos fenólicos dos vinhos tintos, particularmente os estilbenos, podem ser responsáveis pelos efeitos benéficos do vinho à saúde humana. Dentre os estilbenos conhecidos destacam-se o *trans* e *cis*-resveratrol, o *trans* e *cis*-piceid e o *trans*-astringina (Figura 4). Assim como o resveratrol, o *trans* e *cis*-piceid são fisiologicamente tão importantes quanto o mesmo. O *trans*-astringina é um estilbeno que apresenta um grupo hidroxila adicional na sua estrutura que aumenta suas propriedades antioxidativas, quando comparada com o piceid e com o resveratrol. A concentração de estilbenos, nas uvas e vinhos, pode variar de acordo com a variedade, a origem geográfica, o ataque de patógenos e o processo de fermentação.

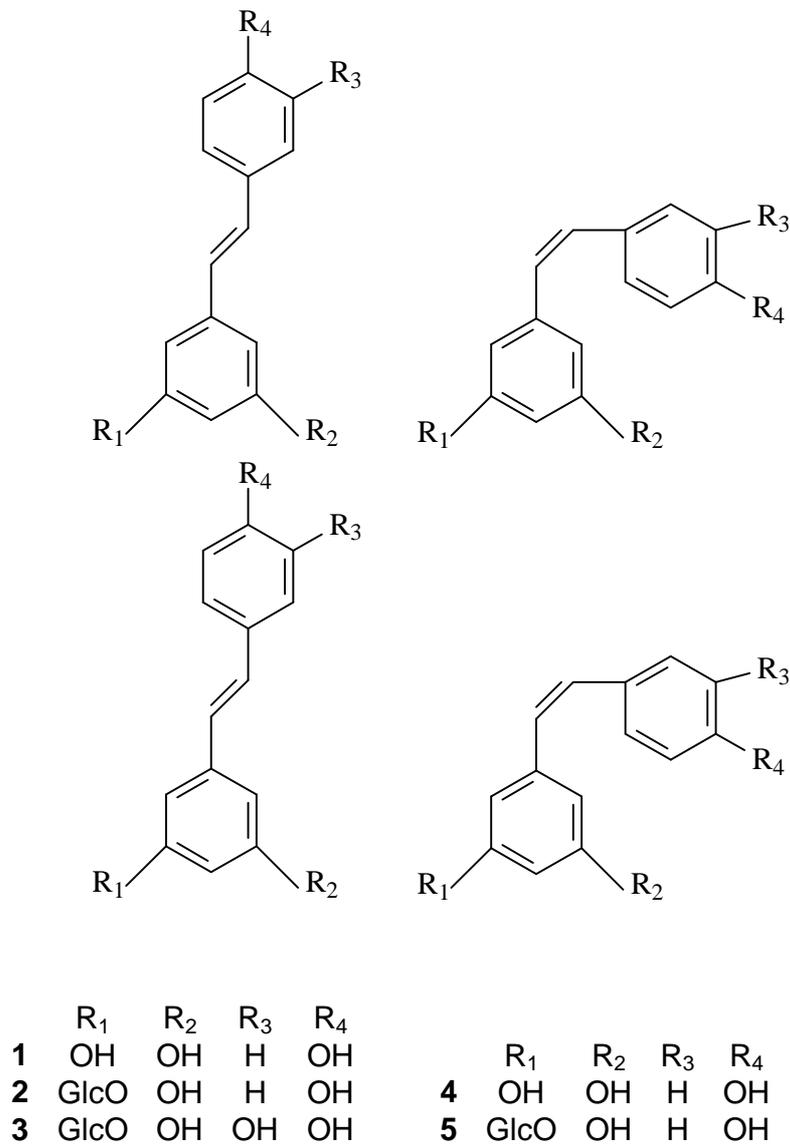


Figura. 4. Estrutura química de estilbenos frequentemente encontrados em vinhos. **1** e **4**, *trans*- e *cis*-resveratrol; **2** e **5**, *trans*- e *cis*-piceid; **3** *trans*-astringina.

Um estudo feito com vinhos de denominação de origem espanhóis demonstrou que a concentração de *trans*-resveratrol varia de 0,32 a 4,44 mg L⁻¹ em vinhos tintos, enquanto que nos rosés esta substância varia de 0,12 a 2,80 mg L⁻¹. O isômero *cis*-Resveratrol está presente em concentrações que variam de 0,20 a 5,84 mg L⁻¹ e de 0,02 a 3,17 mg.L⁻¹ em vinhos do tipo tinto e rosé respectivamente. Segundo os autores deste trabalho a variedade de uva influencia no conteúdo de resveratrol nos vinhos de

diferentes regiões. Porém, uma análise discriminante aplicada às concentrações não mostrou diferenças significantes entre vinhos tintos jovens nem entre vinhos rosé das quatro denominações de origem [27]. Jeandet e co-autores determinaram o conteúdo de trans-resveratrol em Champagne através de cromatografia líquida com detecção fluorométrica e UV, após uma extração líquido-líquido com acetado de etila. Foram encontrados níveis de resveratrol em Champagne que variaram de 20 a 77 $\mu\text{g L}^{-1}$. Segundo os autores o conteúdo de resveratrol em Champagne diminui com o envelhecimento do mosto [28].

4.0 Compostos flavonóidicos

Flavonóides (C6-C3-C6) podem ser classificados em várias famílias, de acordo com as mudanças na sua estrutura básica: flavonóis, flavanóis, flavonas e antocianidinas. Têm vários grupos hidroxila (OH-) ligado a estrutura do anel, os quais determinará em grande parte a capacidade antioxidante destes compostos.

4.1 Flavonóis

São compostos flavonóides caracterizados pela presença de uma insaturação no anel heterocíclico e um grupo hidroxila na posição 3. Nas uvas encontram-se apenas nas películas, como glucósidos. Estes heterosídios nas uvas são facilmente hidrolizados. Nos vinhos tintos são encontrados na forma de agliconas. Estes heterosídios presentes nas uvas são facilmente hidrolizados. Nos vinhos tintos são encontrados na forma de agliconas. Embora sejam compostos minoritários nas uvas, possuem um papel importante na evolução da cor dos vinhos tintos por processos de copigmentação com as antocianinas. Os principais flavonóis são, quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavonol), kaempferol (3,5,7,4'-tetrahydroxi-flavonol), miricetina (3,5,7,3',4',5'-hexahidroxi-flavonol) (Figura 5).

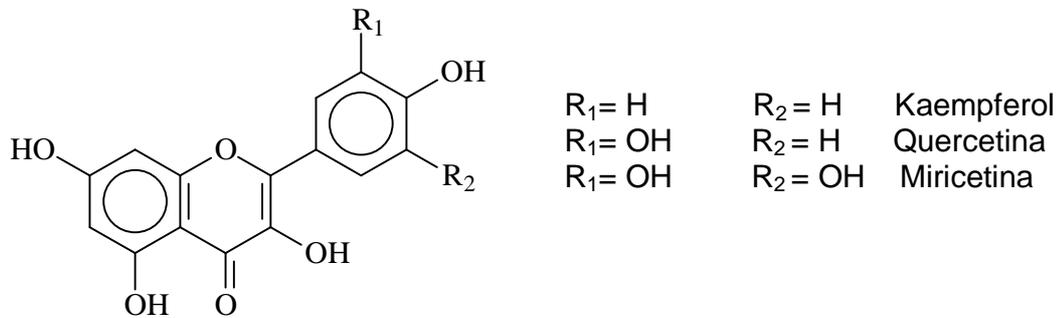


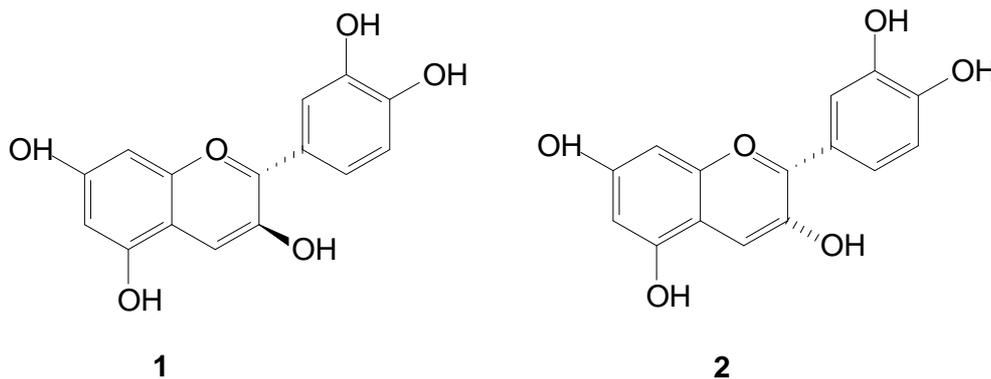
Figura 5: Flavonóis mais encontrados em vinhos.

O conteúdo dos flavonóis (miricetina e quercetina), em vinhos tintos variam 4,6 and 41,6 mg L⁻¹, e são encontrados nas formas livres ou conjugados. A proporção de flavonóis livres variam entre 20 a 50% do total [29]. Os glicosídios de quercetina acumulam na pele das uvas negras, então os vinhos que vêm de uvas negras com uma proporção de pele alta com relação ao volume, como a variedade Cabernet Sauvignon contém concentrações mais altas de flavonóis, que aumentam à medida que as uvas vão amadurecendo. Mattivi e colaboradores estudaram a presença de flavonóis na película de 91 diferentes variedades de uvas a fim de produzir uma classificação a partir do perfil de flavonóis, a presença de laricitrina 3-O-galactosídeo e siringetina 3-O-galactosídeo em uvas tintas é apresentado pela primeira vez neste trabalho. Segundo o trabalho de Mattivi e pesquisadores, em uvas tintas o principal flavonol é a quercetina (43,99%), seguido da miricetina (36,81%), kaempferol (6,43%), laricitrina (5,65%), isorhamnetina (3,89%), e siringetina (3,22%). Em uvas verdes, o principal flavonol é a quercetina (81,35%), seguido de kaempferol (16,91%) e isorhamnetina (1,74%) [30].

4.2. Flavanóis

De entre os flavanóis salientam-se os 3-flavanóis e as proantocianidinas. Os flavan-3-óis caracterizam-se por possuírem um anel heterocíclico saturado. Os carbonos 2 e 3 são os centros assimétricos da molécula. Os principais flavan-3-ol que se encontram nas uvas e nos vinhos são a (+)-catequina e a (-)-epicatequina, que são epímeros no carbono 3, e cuja estrutura se representa na Figura 6. Ao contrário de outros flavonóides encontram-se nas uvas no estado livre, encontrando-se pequenas quantidades de galato de epicatequina.

Dentre os constituintes fenólicos dos vinhos a catequina é mais abundante seguido do ácido gálico. O ácido gálico vem da hidrólise de ésteres de flavonóides que está ausente no vinho branco devido à falta da casca da uva na extração e preparação dos vinhos. Os níveis de epicatequina são menores em relação aos de catequina na maioria dos vinhos. As concentrações de ácido caféico são relativamente baixas tanto para tinto como para vinhos brancos. Ácido caféico é um produto da hidrólise do éster do ácido tartárico [31].



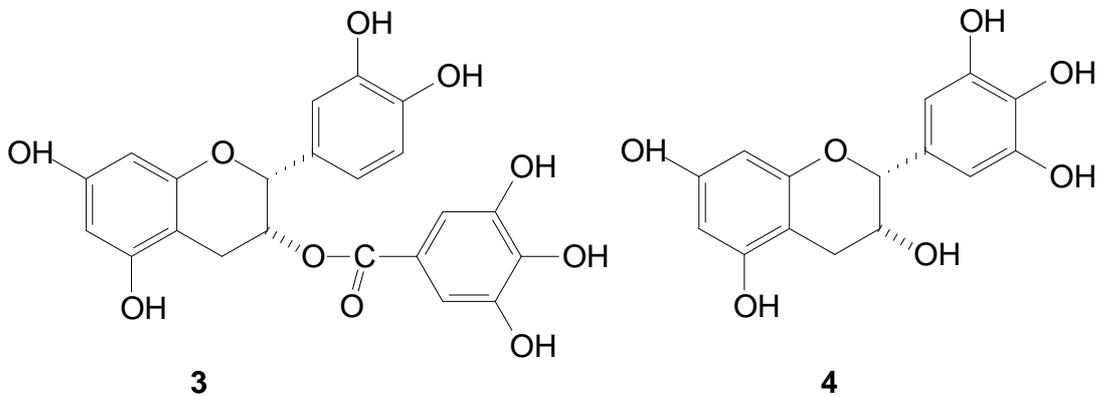


Figura 6: Estrutura química da (+)-catequina (1) ; (-)-epicatquina (2) ; Galato de (-)-epicatequina (3) ; (-)-Epigalocatequina galato (4)

4.3 Antocianinas

As antocianinas são formadas por anéis benzênicos unidos por uma molécula de três átomos de carbono. Sua forma habitual é combinado com açúcares e são conhecidas como antocianidinas, Figura 7, também se obtém uma grande diversidade destes compostos pela acilação dos açúcares com os ácidos acético, cumárico e caféico. A diversidade estrutural contribui favoravelmente com a existência natural de 300 antocianinas com diferentes substituições glicosídicas [32]. O grupo das antocianinas foi dividido em seis classes de compostos (Figura 8), responsáveis pelas diferentes pigmentações: cianidina (vermelho), peonidina (vermelho escuro), delphinidina (azul), malvidina (púrpura) e petunidina (vermelho escuro) [33]. Entre as características destes compostos, destacam-se a instabilidade a um meio ácido com pH superior a 5,0, á altas temperaturas em períodos de armazenamento, conduzindo a degradação e a mudanças de cor, sensibilidade a oxidação e a agentes redutores. No período de conservação e envelhecimento, as antocianina combinam-se entre si ou com as

proantocianinas (taninos dos vinhos), quer por polimerização direta quer por pontes de acetaldeído, originando moléculas de grande tamanho que tendem a precipitar ao longo do tempo. Os vinhos tornam-se menos corados, adquirindo uma tonalidade vermelho acastanhada, e menos adstringentes, já que, para além de haver uma quantidade menor de proantocianinas, as que permanecem no meio, por estarem polimerizadas, têm menor capacidade de reagir com as glicoproteínas da saliva, diminuindo, desta forma, a sensação de adstringência [34-36].

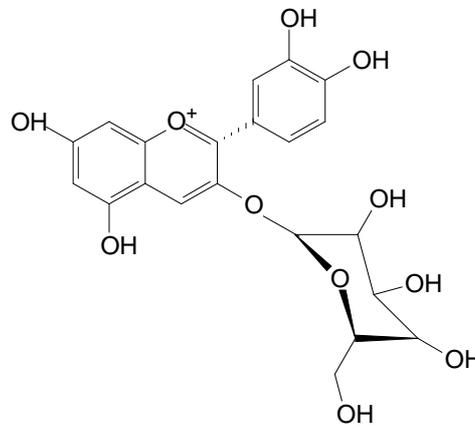
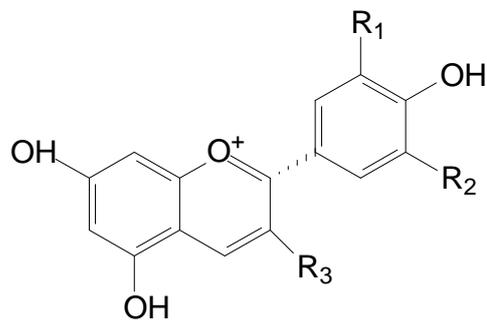


Figura 7. Estrutura química da cianidina-3 – glicosídica



Antocianinas	R₁	R₂	R₃
Cianidina	OH	H	OH
Peonidina	OCH ₃	H	OH
Delfinidina	OH	OH	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	OH
Luteolidina	OH	H	H
Pelargonidina	H	H	OH
Apigenidina	H	H	H
Petunidina	OH	OCH ₃	OH

Figura 8 : Principais antocianinas encontradas nos vinhos

Capítulo III

5.0 Análise de vinhos para a determinação da atividade antioxidante e compostos fenólicos

5.1 Fenólicos totais e atividade antioxidante

Existe uma relação da presença de polifenóis em vinhos e a capacidade antioxidante desta bebida, por exemplo, Fernández-Pachón e colaboradores propuseram um estudo sobre a possível relação entre a atividade antioxidante (AA) de treze vinhos brancos e nove vinhos tintos e suas composições fenólicas. Vinte compostos fenólicos foram determinados por cromatografia líquida (LC). AA tem sido determinada por diferentes métodos, incluindo 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico) (ABTS), 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e Capacidade de absorvância dos radicais de oxigênio (ORAC). Um estudo estatístico foi realizado usando análise por regressão múltipla e redes neurais para avaliar se uma composição específica de fenólicos confere uma maior atividade antioxidante. O estudo demonstrou que os compostos fenólicos: Aldeído vanílico, *p*-hidroxibenzoico, 5-hidroximethylfurfural, ácido protocatéico, 2-furaldeído, (-)-epigallocatequina, ácido vanílico, ácido siríngico, (-)-epigallocatequina, aldeído siríngico, triptofol, ácido ferulico, galato (-)-epicatequina, miricetina, *trans*-resveratrol, caempferol, ácido gálico, tirosol, 5-metilfurfural, ácido caféico, (-)-epicatequina, (+)-catequina, ácido *p*-coumárico, quercetina, procianidina B1, procianidina B2, ácido caftárico possuem uma alta correlação linear com o AA total dos vinhos [37].

A determinação de compostos fenólicos totais em vinhos nominalmente é feita empregando-se o método de Folin Ciocalteu. Este método consiste em utilizar uma mistura dos ácidos fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) como

agentes oxidantes. A cor azul obtida é medida em um espectrofotômetro utilizando um comprimento de onda de 765 nm. Usualmente, o valor é obtido em g.L^{-1} de fenólicos totais, expresso em equivalentes de ácido gálico (GAE).

Peri and Pompei desenvolveram um método para a separação e determinação de fenólicos em vinhos brancos. A concentração de fenólicos do tipo não-flavonoidicos e flavonóides não-tânicos e fenólicos taninos foi determinado e avaliado utilizando a reação de Folin-Ciocalteu [38]. Este método apresenta uma resposta rápida e apropriada às exigências de algumas vinícolas, porém não pode ser usado como uma ferramenta para identificar e quantificar compostos fenólicos individualmente, uma vez que, existem outros compostos presentes na matriz de vinho que podem interferir na determinação espectrofotométrica. Assim este método é caracterizado por possuir uma baixa especificidade.

A cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) são técnicas geralmente utilizadas para determinar qualitativamente e quantitativamente compostos fenólicos individualmente. O HPLC é mais comumente usado quando comparado com o CG, pois a depender da técnica utilizada para a detecção são suficientemente sensíveis e apresentam boa precisão. Muitos métodos com HPLC [39 - 45], utilizam detecção de UV e muitos fenóis mostram espectros de UV com comprimento de onda máximo em uma faixa estreita (280-320 nm).

Costin e colaboradores desenvolveram um método baseado em injeção em fluxo para estimar o teor de fenóis totais em vinhos utilizando permanganato de potássio com detecção de quimiluminescência, foram selecionados para a determinação alguns compostos fenólicos simples, quercetina, rutina, catequina, epicatequina, ácido ferulico, caféico, gálico e 4-hidroximetilcinâmico e vanilina, utilizando quimiluminescência. A comparação do método proposto com outros ensaios para a determinação da capacidade antioxidante e fenóis totais utilizada pelas indústrias de bebidas e alimento, apresentou boa correlação, a quimiluminescência se mostrou uma excelente alternativa para a determinação da capacidade antioxidante e conteúdo de fenóis totais, pois é seletiva e apresenta pouca interferência a compostos não fenólicos presentes na matriz de vinho, além do tempo reduzido para análise aumentando a frequência analítica [46].

A técnica analítica mais utilizada para a determinação de polifenóis em vinhos tem sido a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detectores de arranjo de diodos (DAD), fluorescência (FD) [41,47,48], eletroquímico (ED) [49,50] e espectrometria de massa (MS). Este último tem sido largamente utilizado devido a possibilidade de obter informações sobre a estrutura química do analito [51]. É importante salientar que existem outras técnicas, que são utilizadas como a eletroforese capilar (CE) [52-54], a cromatografia micelar eletrocínética (MEKC) [55]. Também é possível empregar a cromatografia gasosa (CG), porém há a necessidade de passar os analitos por um processo de derivatização, devido à baixa volatilidade dos mesmos. Recentemente tem sido reportado uma nova tecnologia em cromatografia líquida, que é a cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC). A maioria dos trabalhos publicados sobre esta técnica foram realizados nos últimos 5 anos [56-58] demonstrando assim que é uma técnica que surgiu recentemente.

A Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no modo fase reversa com fase estacionária C18 tem sido o mais usado para a separação dos compostos fenólicos. As fases móveis mais comumente empregadas consistem de acetonitrila ou metanol em uma mistura ácida diluída com ácido acético [59] ou ácido fórmico [60]. O detector mais usado é, sem dúvida, o arranjo de diodos (DAD), pois os flavonóides apresentam duas bandas características com máximos entre 300 a 550nm (banda I) e 240 a 285nm (banda II). O comprimento de onda utilizado para a detecção varia bastante, sendo que os comprimentos mais utilizados são 280 nm e 210 nm. Alguns autores justificam o uso de 210 nm pela relação sinal:ruído apresentada. Mais recentemente, o acoplamento a espectrometria de massas possibilitou a confirmação da identidade dos analitos, bem como a obtenção de dados que podem ajudar na elucidação de reações e mecanismos complexos envolvidos no envelhecimento de vinhos [61,62]. Na literatura têm sido reportados vários métodos cromatográficos [63,64] e eletroforeticos [65,66] para a separação e quantificação de compostos presentes nos vinhos.

Foi desenvolvido e validado um método cromatográfico simples e rápido com detecção de Uv-Vis com arranjo de diodos para a determinação simultânea de trans-resveratrol e quercetina em vinhos tintos sicilianos. Este método foi estendido para a determinação destes dois compostos na pele da uva e produtos de vinificação. Estas

amostras passaram por um processo prévio de extração com solvente orgânico e os extratos provenientes desta extração foram condicionados em cartuchos C18 e eluidos sob condições isocráticas. A determinação de trans-resveratrol e quercetina em vinhos tintos foram conduzidas sem qualquer prétratamento das amostras. As faixas lineares de concentração foram 0,39-12,50 e 0,45-57,6 mg L⁻¹ para trans-resveratrol e quercetina, respectivamente. Os limites de detecção nas amostras reais foram de (0,07 mg L⁻¹ para trans-resveratrol e 0,12 mg L⁻¹ para quercetina). Este método utilizando HPLC-UV/DAD foi aplicado para análises para avaliar o conteúdo de trans-resveratrol e quercetina foram aplicados para análises de rotina de vinhos tintos, extratos de produtos de vinificação e peles de uvas [67].

Delgado e colaboradores desenvolveram um método capaz de separar e determinar, flavonóides, ácidos e aldeídos fenólicos [48]. Ratola e co-autores desenvolveram e validaram um procedimento simples para a determinação de trans-resveratrol em vinhos da região do Alentejo (Portugal), foram analisados 47 amostras de vinhos tintos e 21 de vinhos brancos, utilizando injeção direta em CLAE com detecção em Uv-vis. Foi encontrado trans-resveratrol em todos os vinhos tintos e em 8 amostras de vinho branco, o método apresentou limites de detecção de 0,06 mg L⁻¹, o teor encontrado de trans.resveratrol em vinhos tintos era relativamente alto (acima de 2,64 mg L⁻¹), as de vinho branco não excediam 0,19 mg L⁻¹. Uma excelente estratégia é a combinação de detectores para proporcionar uma melhoria na seletividade e sensibilidade dos métodos analíticos, como a união de duas técnicas de detecção, por exemplo, cromatografia líquida com arranjo de fotodiodos e espectrômetro de massas [68]. Guadalupe e colaboradores desenvolveram um método analítico com multi-etapas para a determinação de fenólicos poliméricos em vinhos tintos. Neste trabalho foram utilizadas varias técnicas de separação e detecção:cromatografia liquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) e espectrômetro de massas (HPLC -MS), eletroforese capilar de zona (CZE) e espectofotometria. Foram analisadas diferentes famílias de compostos fenólicos [69]. Uma revisão sobre alguns compostos fenólicos presentes nos vinhos e os diferentes métodos cromatográficos para a determinação destes compostos é apresentado tabela 1.

Tabela 1. Métodos por HPLC para a análise de vinhos.

Compostos	Deteccção	Coluna	Fase móvel	Ref
trans-resveratrol, catequina e epicatequina	fluorescência	C18 Hypersil H5 ODS 250 x 4,6 mm, 5µm	Gradiente MeCN – água e ácido acético	[70]
Resveratrol	electroquímico e UV	C18 fase reversa Nucleosil (250 x 4 mm, 5 µm; Supelco)	25% acetonitrila, 0,1% H ₃ PO ₄ e NaCl (c=5 mmol/l) em água	[50]
Resveratrol	DAD–MS	Coluna C ₁₈ (150x2,1 mm I.D.), 5 µm tamanho de partícula	eluente A foi: água, pH ajustado para 2,5 com ácido sulfúrico; eluente B acetonitrila; eluição por gradiente	[71]
Resveratrol	UV – vis	LiChrospher 100 CN 250X4 mm, 5 µm	água-MeCN-MeOH (90:5:5)	[72]
<i>trans</i> -resveratrol e outros compostos polifenólicos	UV	Coluna, Nova-Pak C18 150 mmx3,9 mm i.d. da Waters, 4 µm tamanho de partícula.	(A) metanol–ácido acético –água (10:2:88, v/v) (B) metanol–ácido acético–água (90:2:8, v/v) foi usado como solvente B	[59]
flavan-3-ols, antocianinas, derivados do ácido cinâmico, derivados dos flavonóis <i>trans</i> -resveratrol	PDA	Nova-Pak C ₁₈ , 250 mmx3,9 mm, 5 µm de tamanho de partícula.	Gradiente: água–acetonitrila (50:50) pH ajustado para 1,8 com ácido perclórico (solvente B) água–acetonitrila (95:5) pH ajustado para 1,8 com ácido perclórico (solvente A),	[73]
Fenólicos	DAD	Chromolith RP-C ₁₈ coluna, 100 mm x 34,6 mm com temperatura controlada em 30±1 °C	Gradiente A: Metanol–bidestilado - água (2.5:97.5, v/v) at pH 3 with H ₃ PO ₄ B Metanol–bidestilado–água (50:50, v/v) pH ajustado para 3,0 com H ₃ PO ₄	[42]

Compostos	Deteção	Coluna	Fase móvel	Ref
Trans e cis-resveratrol, trans e cis-piceid	UV-vis	Chromolith Performance RP-18e (100 mm x 4,6 mm, I.D.)	O sistema de solvente usado foi um Gradiente de (A) água-ácido acético (94:6) (v/v) e (B) água/acetonitrila-ácido acético (65:30:5) (v/v/v).	[74]
Fenólicos	condutividade e fluorimetria	RP Amid C ₁₆ (250 mm x 3,0 mm i.d., 5 µm) com uma pré-coluna RP Amid C ₁₆ (2,0 mm x 2,0 mm i.d., 5,0 µm).	Gradiente com três solventes: (A) metanol, (B) acetonitrila, (C) 0,085% ácido ortofosfórico (13:7:80),	[75]
Vinilpiranoantocaninas - vinilfenol	DAD-MS	250 mm x 4,6 mm, 5,0 µm i.d. fase-reversa C ₁₈	Os solventes A: H ₂ O/HCOOH (9:1), e B: CH ₃ CN/H ₂ O/CH ₃ COOH (8:1.95:0.05). gradiente linear	[76]
Fenólicos	PAD-MS	coluna Nova-Pak C ₁₈ (300 mm x 3,9 mm, 4,0 µm)	Gradiente, (A) água/ácido acético (98:2, v/v) e (B) água/acetonitrila/ácido acético (78:20:2, v/v/v).	[77]
Polifenólicos	DAD-MS	Fase reversa Atlantis d C ₁₈ (250mmx2,1 mm, 5 µm) com uma coluna guarda (20mmx2,1 mm, 3,0 µm	O sistema de solvents foi um Gradiente: solvente A (água/ácido fórmico , 95:5, v/v) e solvente B (acetonitrila/água/ácido fórmico, 80:15:5, v/v/v)	[60]
Compostos derivados de antocianinas	DAD	Hypersil ODS column (200 mm x 4.6mm i.d., particle size 5 µm)	eluyente (A) foi metanol; eluyente (B) foi metanol:água:ácido fórmico (45:45:10); eluyente (C) foi ácido fórmico: água (15:85).	[78]

Compostos	Deteccão	Coluna	Fase móvel	Ref
Piceid e Resveratrol	DAD	LiChrospher coluna 100 RP-18 (250 mm x 4 mm, 5 μ m) coluna guarda do mesmo material	Gradiente, (A) H ₂ O + 0,05% Ácido Trifluoroacético e (B) 60:40 MeOH- ACN + 0,05% Ácido trifluoroacético	[79]
Polifenolicos	UV	LiChrospher	Gradient, A (10% metanol–2% ácido acético em água) e B (90% metanol– 2% ácido acético em água).	[80]
Trans-resveratrol	Fluorescência	Nova-Pak C18 150_3,9 mm i.d., 4 mm diâmetro de particula. Precoluna Nova- Pak C-18	metanol–ácido acético - água (10:2:88) como solvente A, e metanol– ácido acético - água (90:2:8) como solvent B.	[81]
Polifenóis	DAD –MS/MS	Coluna C ₁₈ (250 x 4,6 mm i.d.; 5 μ m diâmetro de particula), com coluna guarda C ₁₈ ODS (4.0 x 3.0 mm i.d.),	<i>Sistema I (Antocianinas)</i> . Fase móvel Água/ácido fórmico/acetonitrila (87:10:3, v/v/v; eluente A) e Água/ácido fórmico/acetonitrila (40:10:50, v/v/v; eluente B) <i>Sistema II (Ácidos fenólicos)</i> . Fase móvel 2% (v/v) ácido acético em água (eluente A) e 0,5% ácido acético em água e acetonitrila (50:50, v/v; eluente B)	[82]
Compostos febolicos de baixo peso molecular	DAD	C ₁₈ (5 μ m packing, 250 mm x 4.6 mm i.d.)	Gradiente, Solvente A: Água:ácido ácético (98:2, v/v), solvente B: Água : ácido acético (68:30:2, v/v) e solvente C: metanol	[83]
Fenólicos	MS/PDA	Supelco C18, 150 mm x 2.1 mm, 5 μ m	Gradiente, ácido fórmico em água (pH 3, solvente A) e ácido fórmico em acetonitrila (pH 3, solvente B)	[84]

Compostos	Deteção	Coluna	Fase móvel	Ref
(vanillina, siringialdeído)	DAD	Lichrospher RP-18, 240 × 4.5 µm with precolumn 4 × 4.5 µm	A fase móvel: A (0.5% (v/v) ácido formic em água) e B (metanol). Gradiente de eluição: 0 min 100% A, 20 min 90% A, 75 min 80% A, 80 min 20% A, 95 min 20% A, 100 min 100% A e 115 min 100% A.	[85]
Taninos	DAD	Fase reversa C18 (4 µm, 3.9 mm ID 300 mm)	Gradiente, Solvente, água/acetonitrila, A: 98:2, (v/v) e água/acetonitrila/ácido acético B 78:20:2, (v/v/v). 0–55 min, 100–20% A; 55–57 min, 20–10% A; 57–90 min, 10–0% A.	[86]
Compostos fenólicos	MS	phenomenex (5 µm, 250 × 4.6 mm i.d.) coluna guarda : ODS C18	0,1% (v/v) ácido formic em água (solvente A), metanol (solvent B), gradiente	[87]
(+)-catequina, (–)-epicatequina, <i>trans</i> -resveratrol, caempferol, miricetina, rutina, apigenina	UV – vis/ fluorescência	ODS2 (25 × 0,4 cm, i.d. 5 µm) temperatura 28 °C	A (água/acetonitrila/ácido acético , 67:32:1 v/v/v) e B (água/ácido acético , 99:1 v/v). Gradiente	[88]

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a eletroforese capilar de zona foi empregado na determinação de nove flavonoides mais frequentemente encontrados em vinhos tais como: apigenina, baicaleina, naringenina, luteolina, hesperetina, galangina, caempferol, quercetina e miricetina. O sucesso da separação cromatográfica foi obtido utilizando tetrahidrofurano, um aditivo pouco usual em fase móvel para HPLC e tampão borato para CZE. O método apresentou excelentes limites de detecção e quantificação [89].

Tzu-Yun Chu e pesquisadores propuseram um método rápido para a derivatização de compostos fenólicos antioxidantes usando radiação microondas. Seis compostos fenólicos encontrados em vinhos e frutas. (ácidos: gálico, gentísico, vanílico, caféico, ferulico e *p*-cumárico) foram usados no estudo do modelo. A solução com a mistura dos ácidos fenólicos foi evaporada em um rotavaporizador seguido de secagem por radiação microondas a uma potência de 600 W por 30 s. O resíduo foi redissolvido em piridina e tratado com bis(trimetilsilil)acetamida sob radiação microondas por 30 s, para avaliar a eficiência do procedimento, o mesmo foi comparado utilizando aquecimento convencional. Os trimetilsilano derivados foram identificados e quantificados por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas. Os espectros de massas dos compostos obtidos por derivatização assistida por microondas foram idênticos aos dos compostos obtidos por aquecimento convencional. O RSD foi menor que de 8% para seis replicatas. Este método mostrou-se uma boa alternativa para avaliar o conteúdo de compostos fenólicos em vinhos e produtos agrícolas. Os compostos foram identificados a partir de uma base de espectros que contém o espectro de massas dos TMS derivados dos padrões dos ácidos orgânicos [90].

Foi desenvolvido um método para a determinação de compostos bioativos em vinhos tintos utilizando colunas de fase reversa em cromatografia líquida, este método apresentou uma eficiência de separação aumentada e seletividade melhorada, sensibilidade e velocidade foram estabelecidos para determinação de flavonoides quercetina, miricetina and caempferol e os estilbenos *cis*- e *trans*-resveratrol, em uma única corrida. Neste trabalho foram avaliados detectores Uv-vis,

fluorescência (FLD), e espectrômetro de massas (MS). A detecção espectrofotométrica dos estilbenos foi em 320 nm e 377 nm para flavonóides, pode ser detectadas quantidades de analito acima da faixa de nanograma com uma boa linearidade $R^2 > 0.9999$ (faixa linear 50 ng mL^{-1} – $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). Para resveratrol, a detecção por fluorescência apresentou maior seletividade e sensibilidade quando comparado a detecção espectrofotométrica. O método então foi validado utilizando HPLC acoplado a um espectrômetro de massas com interface via electrospray (ESI). A detecção por MS mostrou-se linear de 50 ng mL^{-1} a $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ com $R^2 > 0,9878$, para todos os analitos investigados e com limites de detecção abaixo da faixa de nanograma. Comparando detecção de UV com MS, esta apresentou um aumento na intensidade do sinal de 200% para mirecetina 400% para quercetina e caempferol, para o resveratrol foi obtida uma intensidade similar. Os valores de recuperação foram de 102% para miricetina e 79% para piceid. A dissociação induzida por colisão (CID) foi também usado para obter fragmentação característica facilitando a análise qualitativa e quantitativa até mesmo em matrizes complexas. [91].

5.3 Eletroforese

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica que vem despertando grande interesse na química analítica moderna, pois oferece baixo custo e volume reduzido de reagentes, rapidez nas análises, entre outras vantagens. Entre as técnicas eletroforéticas, a eletroforese capilar de zona (CZE) e a cromatografia micelar eletrocinética (MEKC) tem sido as mais empregadas, para análise de vinhos e uvas [92-94]. A eletroforese é uma técnica de separação de alta eficiência baseada na migração diferencial de espécies iônicas ou ionizáveis quando submetidas a um campo elétrico [95]. Na CE, a separação é conduzida em tubos de sílica fundida de dimensões capilares de 15 a 100 μm de diâmetro interno, e 50 a 100 cm de comprimento, preenchidos com um eletrólito condutor, e submetidos à ação de um campo elétrico. Devido a fatores geométricos (a relação entre a área superficial

interna e volume é apreciavelmente grande), um capilar possibilita a dissipação eficiente do calor gerado pela passagem da corrente elétrica (efeito Joule). Além disso, a alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados (100 a 1000 V/cm), resultando em separações de alta eficiência (geralmente excede 10^5 pratos teóricos), excelente resolução e tempos de análise bastante curtos.

A utilização de capilares de sílica fundida introduziu a técnica uma importante peculiaridade: a geração do chamado fluxo eletrosmótico. Este fluxo é consequência de uma interação entre a solução e as paredes do capilar. Quimicamente, a sílica é caracterizada pela presença de vários grupos silanóis, os quais, em média apresentam um caráter ácido. Em contato com o meio aquoso, alguns destes grupos são ionizados e, com a ionização, a superfície do capilar torna-se negativamente carregada, gerando um saldo positivo de espécies carregadas positivamente na solução. Quando um campo elétrico é imposto tangencialmente à superfície, forças elétricas causam um movimento unilateral de íons em direção ao eletrodo de carga oposta. Durante a migração, os íons transportam moléculas de água, induzindo a um fluxo de solução como um todo, na direção do cátodo, conhecido como fluxo eletrosmótico normal [95,96]. Para promover a inversão do fluxo, são adicionados ao eletrólito condutor, surfactantes catiônicos, principalmente os derivados de sais quaternários de amônio de cadeia longa. Desta forma, uma camada de semi-micelas é adsorvida na superfície do capilar, promovendo a organização de uma camada de ânions na solução, que sob a ação do campo elétrico, migra na direção do ânodo, definindo o chamado fluxo eletrosmótico invertido [97].

O volume de injeção é crítico em CE. Por exemplo, um capilar de 1m x 75 μ m (diâmetro interno) contém cerca de 5 μ L de tampão e o volume da amostra deverá ser menor que 50 nL (para evitar carregamento excessivo). Os métodos permitem a análise simultânea de uma faixa ampla de moléculas. Como os polifenóis são moléculas geralmente carregadas em meio alcalino, são separados pelas técnicas eletroforéticas. A eletroforese capilar propriamente dita não é aplicável a moléculas sem carga. Entretanto, a técnica desenvolvida por Terabe et al. [98] chamada de cromatografia eletrocinética micelar (MECK), a qual é híbrida da eletroforese e

cromatografia e envolve a introdução de um surfactante na solução tampão (por exemplo, SDS), é apropriada às moléculas sem carga. O uso de MEKC em análise de flavonóides tem recebido atenção [99] e os fatores como resolução, seletividade, voltagem aplicada, temperatura do capilar, concentração e natureza do eletrólito tem sido estudados. A introdução de solventes orgânicos modifica a interação entre as micelas e solutos, alterando a retenção e resolução [100]. A separação dos flavonóides foi melhorada com a adição de SDS a pH 8,3, sendo que o aumento do pH para 10,5, teve efeito nulo ou apenas pequena influência. A separação procede pela ionização dos grupos hidroxilas [101].

Na literatura encontram-se reportados alguns trabalhos que exemplificam a aplicação da eletroforese capilar na determinação de compostos fenólicos em matrizes complexas tais como vinhos [52,102]. Em vinhos portugueses, dez compostos fenólicos foram quantificados, comparando HPLC e CZE. Pequenas diferenças nos teores foram encontradas como no caso do ácido caféico, com valores superiores encontrados no método por CE, no entanto, flavonóis como a miricetina, caempferol e quercetina foram detectados por HPLC e não por CE. O método por CE foi aplicado em vinhos do porto, estudando o envelhecimento relacionado aos compostos fenólicos [103]. Em outro trabalho, cis e trans resveratrol, juntamente com ácido gálico, catequinas, quercetina e outros fenólicos foram primeiramente determinados em uvas e, posteriormente, em vinhos por eletroforese capilar [104]. Foi utilizado o tampão fosfato-borato a pH 9,1, o tempo de análise sendo 11 minutos. Amostras e padrões foram injetadas sem preparação prévia. Geralmente estes compostos requerem métodos de pré-concentração ou extração, pois apresentam-se em baixas concentrações.

5.4 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

A cromatografia líquida ultra de eficiência (CLUE) é o avanço mais recente das técnicas de separação baseia-se nos mesmos princípios da cromatografia líquida de

alta eficiência e utiliza fases estacionárias com partículas menores que 2 µm. O uso destas partículas juntamente com as altas velocidades lineares da FM aumentam a resolução e a detectabilidade e diminuem o tempo das análises.

Como forma de melhorar a qualidade das análises, tem sido observado recentemente o uso da cromatografia líquida ultra de eficiência (CLUE), acoplado principalmente a espectrometria de massas, como uma alternativa às técnicas tradicionais de cromatografia líquida de alta eficiência. As vantagens do uso da UPLC para a determinação de várias substâncias [105,106], nas mais diversas matrizes [107-109], é a capacidade de separar e identificar uma gama de analitos [107-109], com boa resolução, incrível redução no tempo de análise. Para atingir tal desempenho é necessário trabalhar a altas pressões. Então, no ano de 2004 surgiu um novo equipamento que pode operar em pressões acima de 100 MPa, o qual foi denominado de *ultra performance liquid chromatography system* (UPLC).

Um exemplo da aplicação da cromatografia de ultra eficiência, pode ser visto no trabalho de Gruz e colaboradores [110]. Os autores determinaram dezessete ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido 3,5-dihidroxibenzoico, ácido protocateico, ácido clorogênico, ácido gentísico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido caféico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido 3-hydroxybenzoico, ácido 4-cumárico, ácido sinápico, ácido ferulico, ácido 3-cumárico, ácido 2-cumárico, ácido salicílico e *trans*-cinâmico) em diferentes bebidas, utilizando cromatografia de ultra eficiência acoplado a um espectrômetro de massas (MS/MS). O método apresentou limites de detecção (LDs) na faixa de 0,15 a 15 pmol e a precisão calculada como desvio padrão relativo foi de 4.4 %. O método foi aplicado com sucesso para a análise de amostras de vinho branco, sucos de uva e chá verde. A corrida cromatográfica foi realizada em dez minutos [110].

6.0 Técnicas clean-up para a determinação de fenólicos em vinhos.

A cromatografia e eletroforese acopladas as mais diversas técnicas de detecção tem um lugar importante no campo da determinação de analitos nas mais variadas matrizes, porém pode haver dificuldade na determinação direta de analitos que estão em concentrações em níveis muito baixos ou cuja a matriz apresente muitos interferentes, então nestes casos faz-se necessário o uso de técnicas para separar e preconcentrar o analito presente na amostra. Tradicionalmente técnicas de separação incluem uma etapa de extração (e.x. extrator Soxhlet) seguida por extração líquido-líquido (LLE), por exemplo, extração com éter dietílico [111]. A extração líquido-líquido é um processo que envolve a transferência de massa entre dois líquidos imiscíveis ou pouco miscíveis, tendo a capacidade de realizar separações que são inviáveis por outros métodos. Este processo de separação é baseado na distribuição do soluto entre as duas fases e a miscibilidade parcial dos líquidos. O processo de extração líquido-líquido ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, promove-se o contato do solvente e a solução. Na segunda etapa, as duas fases em equilíbrio, ou próxima a ele separam-se.

Nas últimas décadas tem crescido a demanda de novas técnicas de extração, que apresente redução no tempo de análise, consumo e manipulação de solventes orgânicos. Estudos na área de preparo de amostras conduziram a utilização de técnicas alternativas á extração com solvente orgânico (LLE), como a extração com fluido supercrítico (SFE) [112], ou extração em fase sólida (SPE), estas técnicas apresentam várias vantagens em relação á extração líquido-líquido, entre elas estão, melhor seletividade, redução no tempo de análise e facilidade em automação do sistema. [113]. Nesta técnica, os analitos contidos numa matriz aquosa são extraídos, juntamente com os compostos interferentes, após passarem por um cartucho contendo sorvente. Um solvente orgânico seletivo é geralmente utilizado para remover os interferentes e então, outro solvente é usado para lavar os analitos de interesse.

Chilla e colaboradores desenvolveram um método para preconcentração de compostos fenólicos e análise de vinhos sherry, utilizando um sistema *online* para extração em fase sólida, acoplado a HPLC DAD. As amostras de vinho foram injetadas e adsorvida em cartuchos de poliestireno divinilbenzeno; através de um sistema robótico semiflexível, tornando está etapa automática. Separação cromatográfica foi levada a cabo em uma coluna C-18, utilizando um gradiente em duas etapas para eluição dos analitos [114].

Na literatura são reportadas numerosas técnicas de preparo de amostras para a determinação de espécies fenólicas em uvas [115] e vinhos [116-117]. Samanidou e colaboradores desenvolveram um método cromatográfico automático em cromatografia líquida em fase reversa, utilizando, um gradiente binário em multietapas para eluição este método foi aplicado para determinação de cinco ácidos fenólicos, caféico, ferulico, vanílico, salicílico e p-hidroxi-benzoico. A coluna utilizada foi Inertsil C₈, 250 × 4 mm, 5 μm, a temperatura ambiente. Os solventes utilizados na eluição foram A: 5–95 (v/v) CH₃OH-H₂O e B: 90–10 (v/v) CH₃OH - H₂O, com A e B acidificados com ácido acético glacial até pH 3–4. As amostras foram eluidas com um gradiente que iniciava com 10% de B e finalizava com 100% de B. Os picos foram monitorados através de um detector UV com arranjo de diodos [118]. Em outro trabalho Dominguez e colaboradores desenvolveram um método analítico para a determinação de fenóis voláteis (etil- e vinilfenóis) em vinhos sherry. A técnica empregada para o tratamento da amostra foi à extração em fase sólida, posteriormente os extratos eluidos foram analisados utilizando cromatografia a gás (GC) com detector de ionização em chama. O método proposto foi aplicado ao estudo de vinhos sherry finos, contaminados com *Brettanomyces* genus, e a relação entre a concentração de fenóis voláteis e a quantidade destes microorganismos [119].

Capítulo IV

7.0 Extração líquido-líquido assistida por ultrassom acoplada à cromatografia gasosa com espectrometria de massas para a determinação de compostos fenólicos em vinhos brasileiros elaborados no Vale do São Francisco – Bahia/Pernambuco.

Neste trabalho foi utilizado uma extração líquido-líquido assistida por ultrassom empregando-se acetato de etila e posterior derivatização com N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) em piridina (Figura 9). Em seguida foram determinados ácido gálico, resveratrol, catequina, quercetina e malvidina em vinhos utilizando GC MS.

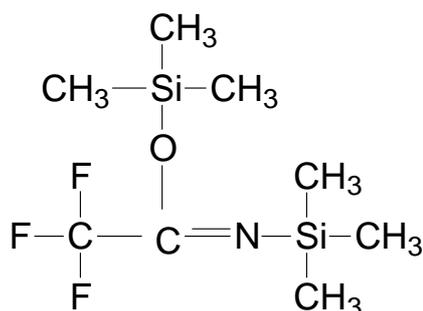


Figura 9. N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA)

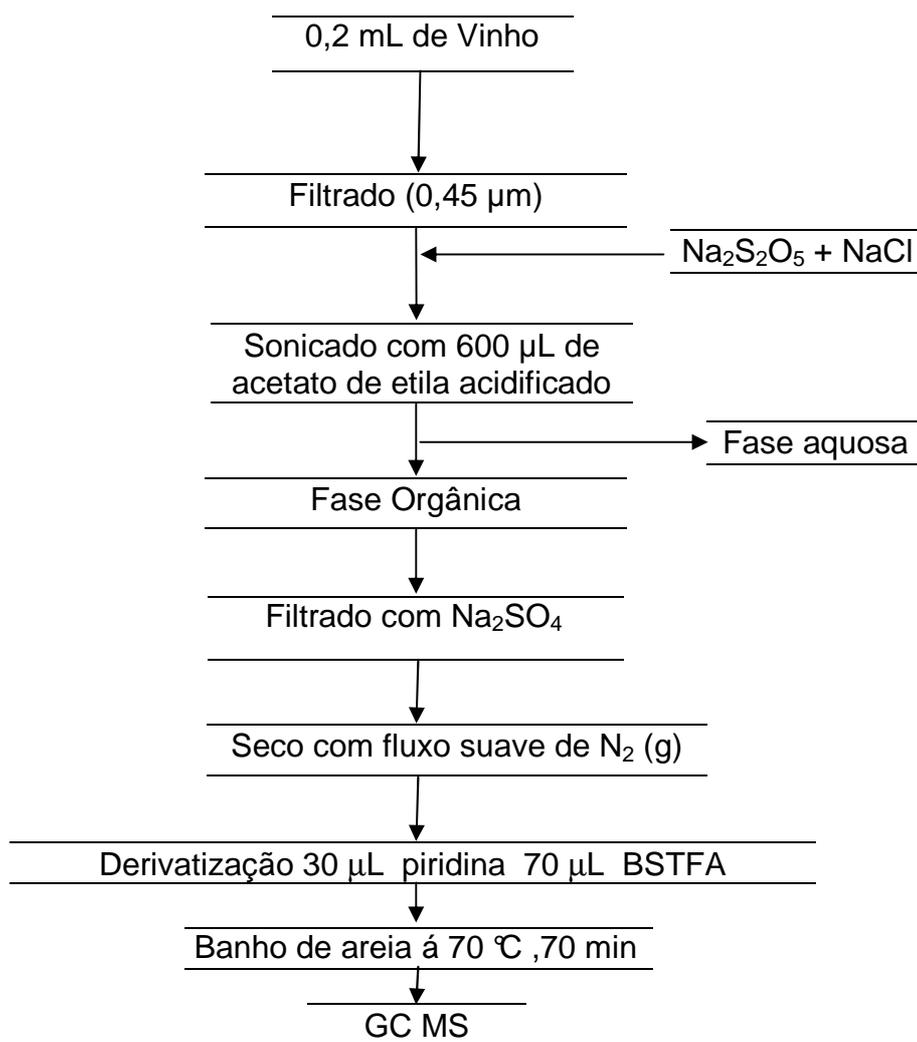
7.1 Parte experimental

Os procedimentos descritos neste capítulo foram realizados no laboratório de química orgânica da “Universidad de Lujan de Cuyo” em Mendoza – Argentina sob a supervisão da professora Dr^a M^a Fernanda Silva.

7.1.1 Análise por GC MS

O procedimento empregado inclui uma etapa de extração líquido-líquido da amostra assistida por ultrassom e uma derivatização posterior com N,O-

bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) 1% TCMSi de procedência (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA) e com piridina (Flucka, Steinheim, Germany). No esquema 10 é apresentado o fluxograma do procedimento de extração e derivatização pelo qual passaram as soluções das amostras e padrões. Os extratos foram armazenados em vials com de vidro e tampa de rosca.



Esquema 10. Fluxograma da determinação de compostos fenólicos em vinhos por GC MS.

Condições cromatográficas: Coluna capilar de 30 metros e diâmetro interno de 0,25 µm, Temperatura do injetor: 300°C, volume da amostra: 2 µL (split less), Temperatura da interface: 280 °C, Temperatura da fonte: 260°C, Programa de

Temperatura da coluna: Temperatura inicial: 80°C (1 min), 250°C a 20°C /min (hold 1 min), 300 °C a 6 °C/min (hold 2 min), 320°C a 20°C /min (hold 24 min).

7.1.2 Derivatização

A etapa de derivatização consiste em promover uma reação de silanização dos grupos fenólicos com trimetil silício o que converte os compostos fenólicos mencionados anteriormente em substâncias mais voláteis. Nas Figuras 11 a 15 são apresentados os derivados TMS dos compostos fenólicos determinados nos vinhos. A partir de 2 μL do extrato da amostra e dos padrões que foram injetados no CG MS, foi possível o monitoramento dos íons e fragmentos observados na faixa de m/z de 50 a 800 u a.

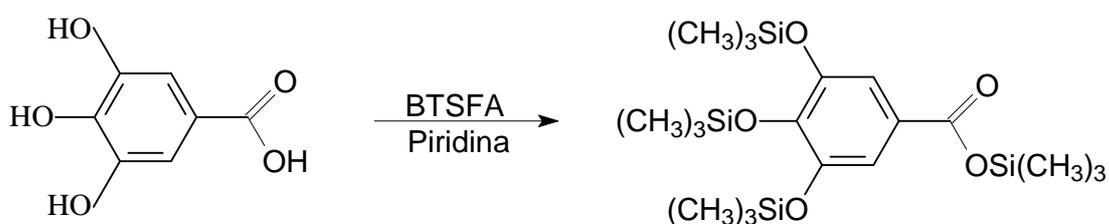


Figura 11. Reação de derivatização do ácido gálico com BTSFA catalisada por piridina.

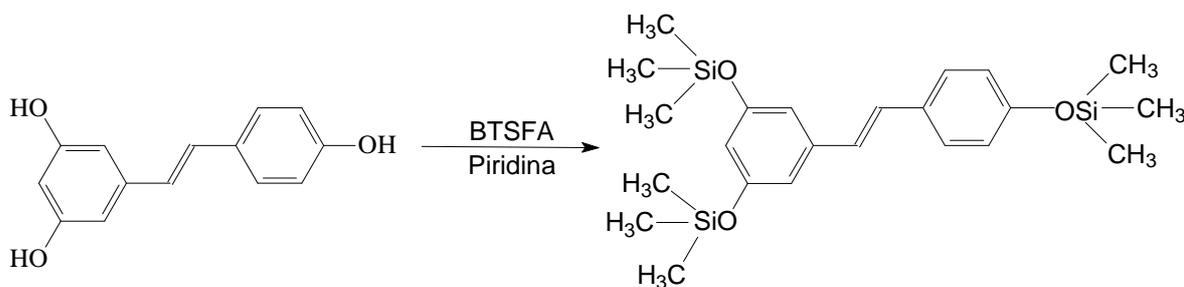


Figura 12. Reação de derivatização do resveratrol com BTSFA catalisada por piridina.

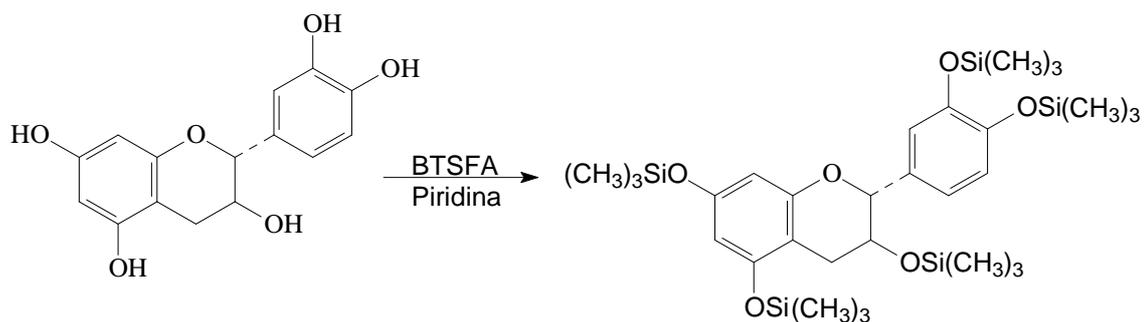


Figura 13. Reação de derivatização da catequina com BTSFA catalisada por piridina.

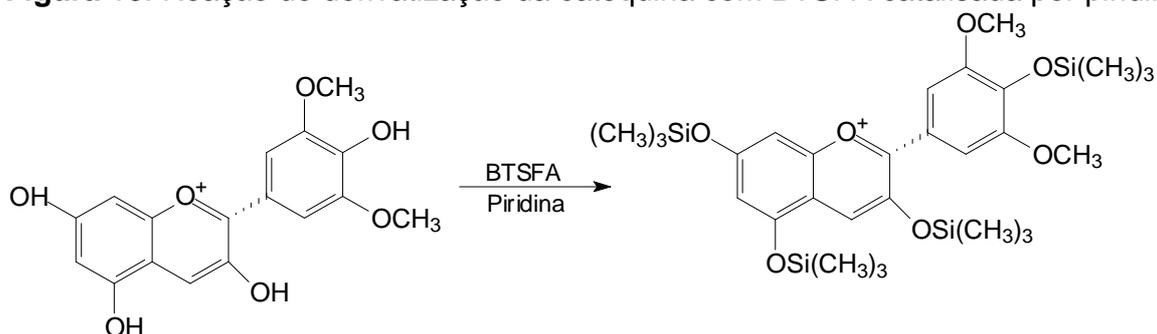


Figura 14. Reação de derivatização da Malvidina com BTSFA catalisada por piridina.

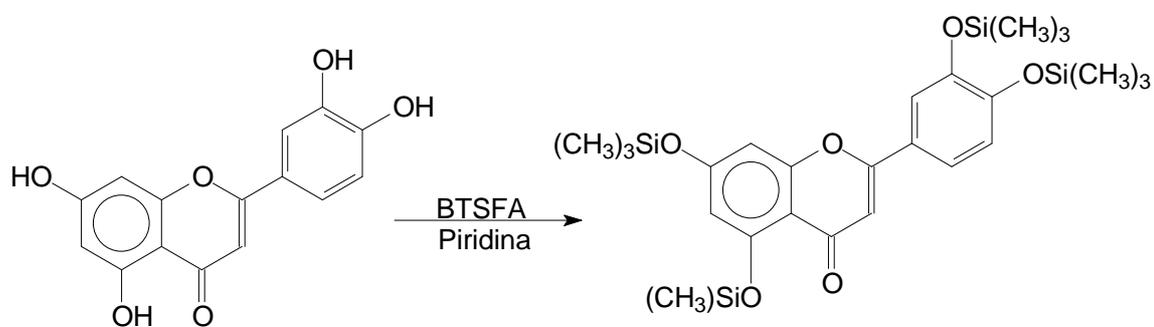


Figura 15. Reação de derivatização da quercetina com BTSFA catalisada por piridina.

8.0 Resultados e discussão

8.1 Determinação de compostos fenólicos em vinhos por CG MS

A partir do pico base dos fragmentos de massas e do tempo de retenção (Tabela 2) dos padrões derivatizados, utilizando o modo SIC (single ion chromatograms), foi possível identificar, os compostos: ácido gálico, (Figuras 16 e 17), malvidina (Figuras 18 e 19), catequina (Figuras 20 e 21), resveratrol (Figuras 22 e 23) e quercetina (Figuras 24 e 25), nos vinhos produzidos no Vale do São Francisco. Na Figura 23 é apresentado um cromatograma de íons totais TIC, de uma amostra de vinho tinto do tipo Shiraz contendo os picos e os respectivos tempo de retenções dos analitos determinados.

Tabela 2. Pico base e fragmentos de (m/z) utilizados para identificar os compostos fenólicos nas amostras de vinho.

Composto	Tempo de retenção (min)	Pico Base (m/z)	Fragmentos (Q1) (m/z)
Ácido gálico	9,49	281	458,443
Resveratrol	15,1	444	428, 147
Catequina	16,65	650	368,355,267
Quercetina	19,68	647	645,556,392
Malvidina	21,21	619	589,295

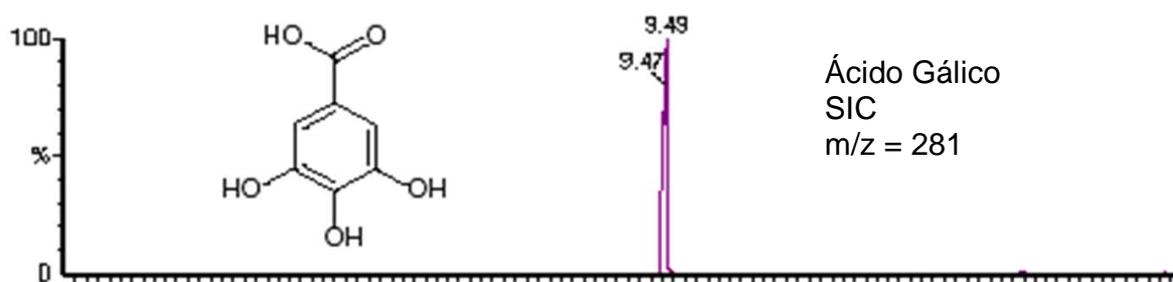


Figura 16. Cromatograma íon individual (SIC) do derivado TMS do ácido gálico na amostra de vinho do tipo Shiraz.



Figura 20. Cromatograma ion individual (SIC) do derivado TMS da catequina na amostra de vinho do tipo Shiraz.

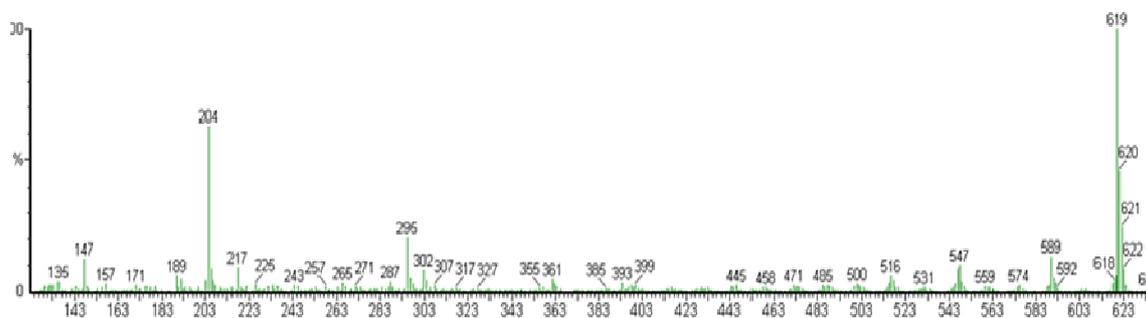


Figura 21. Espectro de massa referente ao derivado TMS da malvidina na amostra de vinho do tipo Shiraz após derivatização.

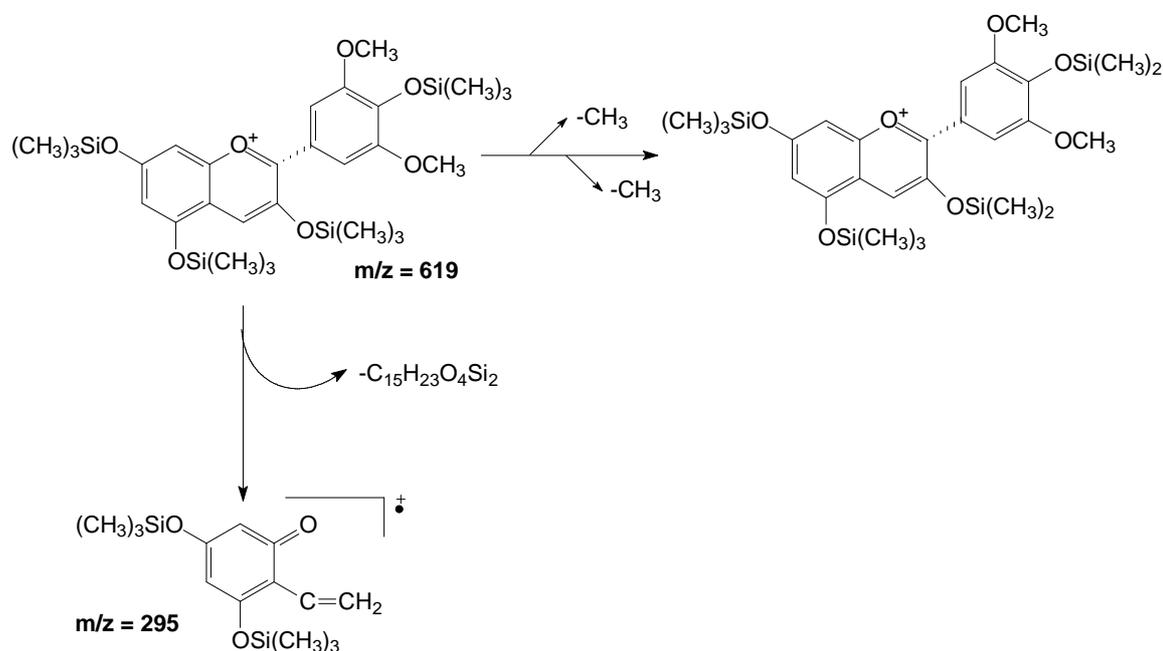


Figura 22. Esquema de Fragmentação do derivado TMS da Malvidina

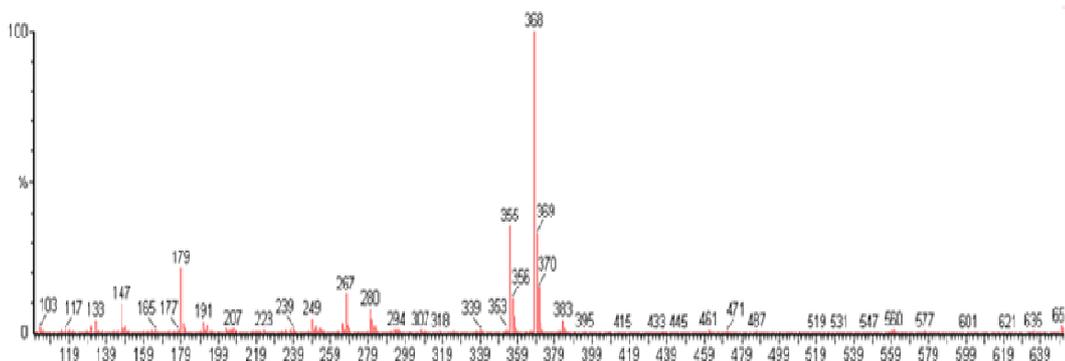


Figura 23. Espectro de massa referente ao derivado TMS da catequina na amostra de vinho do tipo Shiraz após derivatização.

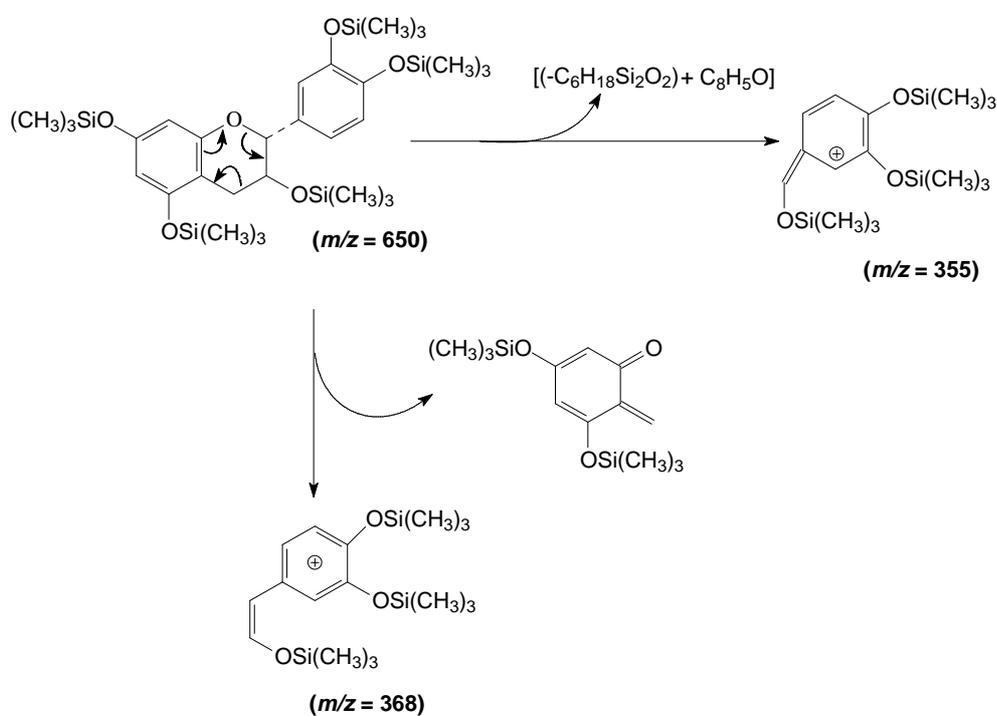


Figura 24. Esquema de Fragmentação do derivado TMS da Catequina

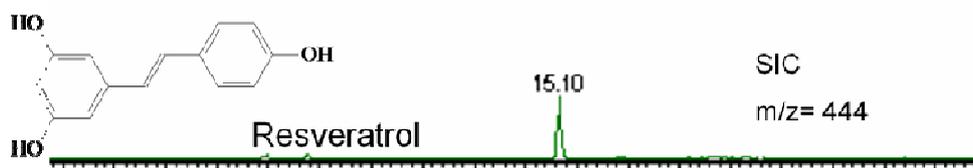


Figura 25. Cromatograma íon individual (SIC) do resveratrol na amostra de vinho do tipo Shiraz.

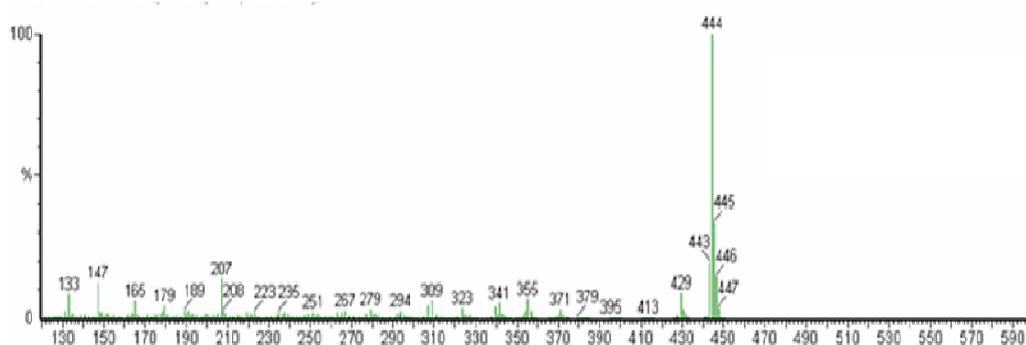


Figura 26. Espectro de massa referente ao resveratrol na amostra de vinho do tipo Shiraz após derivatização.

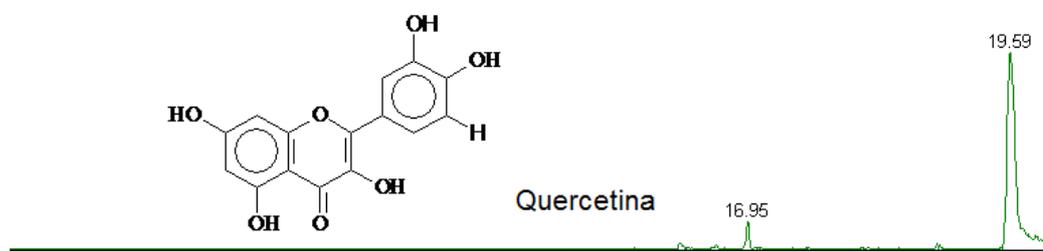


Figura 27. Cromatograma ion individual (SIC) do quercetina na amostra de vinho do tipo Shiraz.

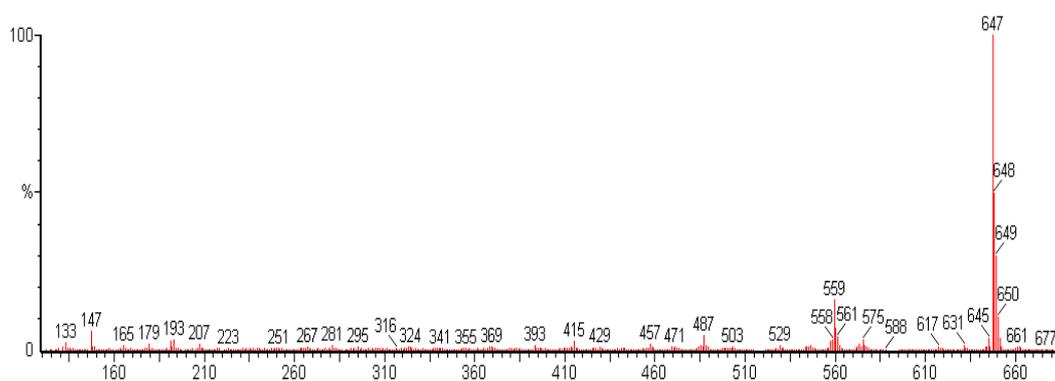


Figura 28. Espectro de massa referente à quercetina na amostra de vinho do tipo Shiraz após derivatização.

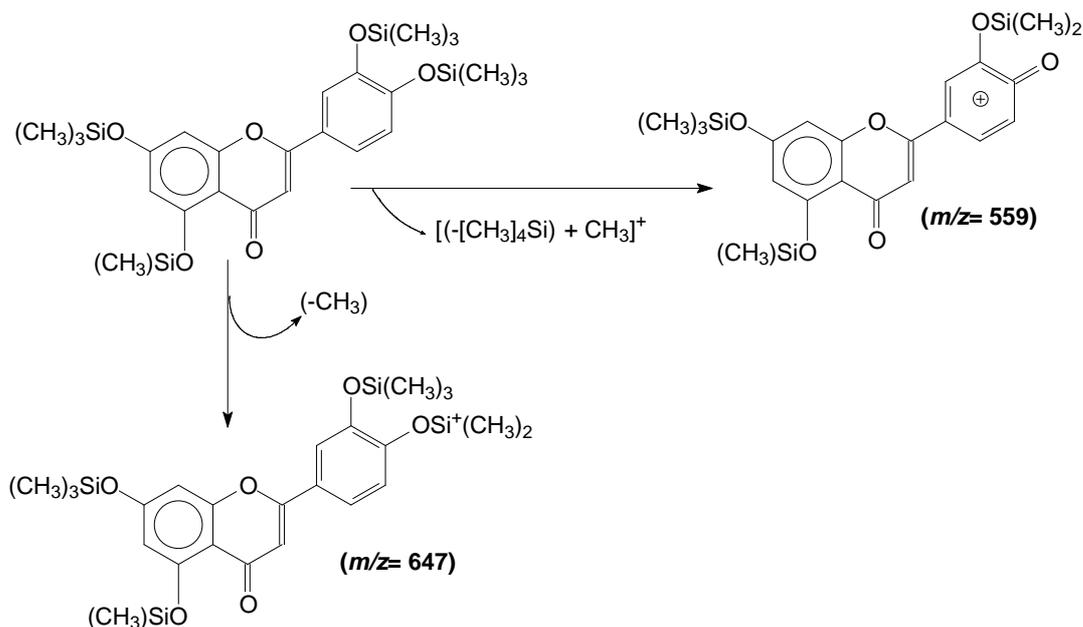


Figura 29. Esquema de Fragmentação do derivado TMS-Quercetina

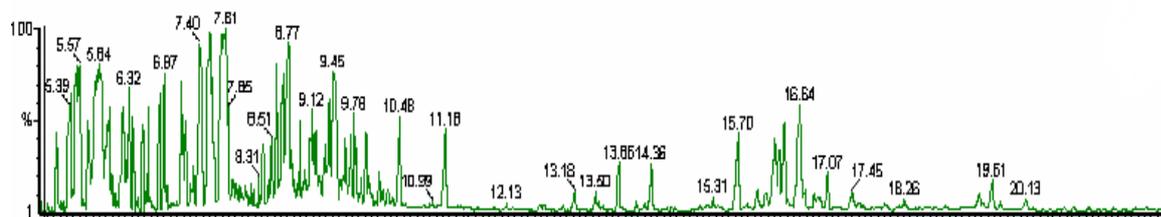


Figura 30. Cromatograma ion total (TIC) de uma amostra de vinho tinto do tipo Shiraz.

Analisando o espectro de massas da Figura 17 pode observar a presença do $m/z = 458$ correspondente ao derivado TMS-ácido gálico, o $m/z = 281$ (pico base) correspondente as perdas dos fragmentos TMSiOH e TMSiO^+ , $[\text{M}-(\text{CH}_3)_3\text{SiOH} + (\text{CH}_3)_3\text{SiO}^+]$, (Figura 18) o fragmento $m/z = 443$, corresponde a perda de uma metila proveniente do $(\text{CH}_3)_3\text{SiO}$, $[\text{M} - \text{CH}_3]$ (Figura 18). O espectro de massas apresentado na Figura 26 indica a presença do fragmento $m/z = 368$, que é o pico base, corresponde a perda do fragmento $m/z = 282$, $[\text{M} - 282]$, e o fragmento $m/z = 355$ que originaram do rearranjo de retro Diels-Alder. As fragmentações do derivado TMS-

catequina são apresentadas na Figura 24. O espectro de massas apresentado na Figura 26, apresenta o íon molecular $m/z = 444$, que corresponde ao derivado TMS-resveratrol, os fragmentos $m/z = 445$ e $m/z = 446$ correspondem respectivamente aos íons $[M + 1]$ e $[M + 2]$. O espectro de massas do derivado TMS-quercetina (Figura 26) apresenta como pico base o fragmento $m/z = 647$, que corresponde a perda de uma metila ($[M - CH_3]$) e como resultado da fragmentação do TMS-derivado o fragmento $m/z = 559$, que corresponde a perda de $(-[CH_3]_4Si + CH_3)^+$. As fragmentações do derivado TMS-quercetina são apresentados no esquema da Figura 29.

8.2 Validação do método analítico

A validação é um conjunto de procedimentos que confirmam se o método sob investigação tem capacidade de desempenhar com confiabilidade o que a aplicação requer [120]. No processo de validação de procedimentos de pré-concentração são utilizados parâmetros analíticos como: linearidade e faixa dinâmica, limite de detecção e quantificação, exatidão, precisão, robustez, entre outros [121]. A seguir serão abordados os parâmetros que utilizados para validar este trabalho

8.2.1. Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método em produzir resultados diretamente proporcionais às concentrações das espécies em estudo dentro de uma determinada faixa analítica.

A linearidade é freqüentemente avaliada pelo coeficiente de correlação (R). Para se obter R é necessário criar uma relação matemática que possa fazer a correlação entre os sinais analíticos e soluções do analito de concentrações conhecidas. Estas relações matemáticas muitas vezes são expressas como uma equação de reta ($y = a x + b$), chamada de curva de calibração.

8.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Limite de detecção é o fator mais crítico na seleção de um método para análise de traços [122]. O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental.

O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica.

8.3.1 Método visual

É utilizado para determinar o limite de detecção utilizando como meio a matriz da amostra com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que ao medir o sinal seja possível distinguir entre ruído e sinal analítico. Visualmente, a menor concentração detectável é determinado como LD.

8.3.2 Método relação sinal ruído

Este pode ser aplicado somente em procedimentos analíticos que apresentem o ruído da linha de base. Para determinar a relação sinal-ruído, é feita a comparação entre a medida dos sinais analíticos referentes à amostra contendo concentração conhecida do analito e um branco da mesma amostra. Assim, é estabelecido uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectável. O limite de detecção vai ser 3 vezes o valor da razão sinal:ruído.

8.3.3 Método baseado nos parâmetros da curva analítica

O método baseado em parâmetros da curva analítica é o mais usado para técnicas analíticas em geral, adotando este método o limite de detecção pode ser expresso como na equação 1:

Equação 1 $LD = 3 \times SD/b$

Onde, SD é a estimativa o desvio padrão da resposta que, pode ser expresso como: o desvio padrão do branco analítico ou do coeficiente linear da equação; e b é o coeficiente angular da curva de calibração.

O limite de quantificação representa a menor concentração do analito que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental. Os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, alterando-se e utilizando-se a relação 10:1(sinal: ruído), sendo a sua equação expressa pela seguinte equação:

Equação 2 $LQ = 10 \times SD/b$

No presente trabalho os valores de LD e LQ foram calculados utilizando as equações 1 e 2. Porém, como nas técnicas de separação cromatográficas e eletroforéticas, é muito difícil obter um branco analítico, para o cálculo foi então utilizado o desvio padrão do coeficiente linear [123,124]. Os limites de detecção e da quantificação para o método analítico desenvolvido neste trabalho, assim como outras figuras de méritos são apresentados na Tabela 3

Tabela 3. Figuras de mérito para o método utilizado na determinação de polifenóis em vinhos por GC MS.

Analito	TR ^a	LD ^b	LQ ^c	Curva analítica	R ²
Ácido gálico	9,49	1,18	3,90	$S = 1,25 \times 10^7 C + 2,03 \times 10^7$	0,999
Resveratrol	15,1	0,41	1,36	$S = 4,86 \times 10^6 C + 1,28 \times 10^5$	0,997
Catequina	16,65	1,30	4,30	$S = 8,49 \times 10^7 C - 1,00 \times 10^8$	0,998
Quercetina	19,68	0,61	2,00	$S = 7,60 \times 10^7 C - 9,6 \times 10^6$	0,991
Malvidina	21,21	0,75	2,50	$S = 1,22 \times 10^5 C - 5,1 \times 10^5$	0,998

^a Tempo de retenção em minutos , ^bLimite de detecção em (mg L⁻¹), ^cLimite de quantificação em (mg L⁻¹).

8.4 Precisão

Precisão é um termo geral usado para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma solução de amostra, soluções de amostras semelhantes ou soluções padrões, em condições definidas. As duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio padrão relativo (RSD). Como é dependente da concentração do analito deve ser determinada para diferentes concentrações deste. Neste trabalho a precisão expressa como desvio padrão relativo (RSD) foi determinada para as concentrações de 8,0 e 20 mg L⁻¹ de cada analito. Os valores de RSD obtidos foram de 1,90 e 0,82 % para ácido gálico, 3,08 e 1,22 % para catequina, 1,30 e 0,44 % para malvidina, 1,50 e 0,53 % para resveratrol, 1,41 e 0,61% para quercetina, para as concentrações de 8,0 e 20 mg L⁻¹ respectivamente. Estes valores demonstram boa precisão do método para a determinação dos compostos fenólicos nos vinhos.

8.5 Exatidão

A exatidão expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro ou como referência. A exatidão representa o grau de concordância

entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como mais provável [125]. A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaios, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação.

Uma das dificuldades no processo de validação de um método analítico para a determinação de compostos orgânicos em geral é a inexistência de materiais de referência certificados (CRM), o que impossibilita a determinação da exatidão do método. Existem materiais de referência certificado disponíveis no mercado, porém para um número limitado de analitos.

8.5.1 Ensaio de recuperação

A recuperação ou o fator de recuperação do método (R) é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. A recuperação mede a eficiência do procedimento analítico dentro de um limite de variação. As porcentagens de recuperação do analito próximos a 100% são desejáveis, porém admitem-se valores menores, desde que a recuperação apresente uma boa precisão. A porcentagem de recuperação pode ser calculada de acordo a equação 3.

Equação 3 :

$$\% R = 100 \times \left[\frac{(C_f - C_b)}{C_a} \right]$$

Onde C_f representa a concentração encontrada, C_b o valor da concentração original do analito na amostra, C_a a concentração adicionada. Neste trabalho foram

encontrados valores de recuperação que variaram de 93,5 a 107 % para ácido gálico, (+)-catequina, resveratrol, quercetina, malvidina (Tabela 4), o que evidencia a exatidão do método.

Tabela 4. Teste de adição/recuperação de compostos fenólicos em amostras comerciais de vinhos tinto (cabernet sauvignon).

	Concentração (mg L⁻¹)	Valor adicionado (mg L⁻¹)	Valor encontrado (mg L⁻¹)	Rec. (%)
Ácido gálico	6,20	2,0	8,16	98,0
(+)catequina	12,4	5,0	17,10	94,0
resveratrol	1,65	2,0	3,79	107
quercetina	2,63	2,0	4,50	93,5
malvidina	11,7	5,0	16,90	104

9.0. Determinação de ácido gálico, resveratrol, catequina, quercetina e malvidina em vinhos brasileiros.

Na Tabela 5 são apresentados os valores das concentrações dos analitos determinados em sete amostras de vinhos brasileiros. As concentrações de quercetina variam de 2,4 a 3,0 mg L⁻¹, ácido gálico de 21,4 a 56,3 mg L⁻¹, resveratrol 1,5 a 5,9 mg L⁻¹, malvidina 15,3 a 32,2 mg L⁻¹, catequina 11,71 a 18,2 mg L⁻¹.

Tabela 5. Concentração de Compostos fenólico encontrados em amostras de vinhos brasileiros da região do Vale do São Francisco.

Amostra	Quercetina (mg L ⁻¹)	Ác. Gálico (mg L ⁻¹)	Resveratrol (mg L ⁻¹)	Malvidiva (mg L ⁻¹)	Catequina (mg L ⁻¹)
Rosé (Shiraz 2005)	< LQ	21,4 ± 1,7	< LQ	< LQ	< LQ
Tinto Cabernet Sauvignon (2004)	2,4 ± 1,1	27,1 ± 4,0	1,5 ± 0,4	-----	< LQ
Tinto Cabernet Sauvignon/ Shyras (2003)	2,7 ± 0,9	47,2 ± 5,7	4,0 ± 0,8	15,3 ± 1,2	11,7 ± 1,0
Tinto Cabernet Sauvignon/ Shyras (2004) 1	< LQ	49,4 ± 6,0	5,9 ± 0,3	11,3 ± 3,0	16,7 ± 2,3
Shiraz(2004) 2	2,5 ± 0,4	46,4 ± 6,3	3,4 ± 0,5	12,4 ± 2,4	15,6 ± 1,6
Shiraz (2004) 3	2,7 ± 1,0	56,3 ± 5,6	3,9 ± 0,6	32,2 ± 3,6	18,2 ± 2,3
Cabernet Sauvignon/ Shiraz (2004) 5	3,0 ± 0,8	54,1 ± 3,7	5,5 ± 0,1	20,8 ± 4,0	17,8 ± 2,7

N = 3 repetições

Na literatura são reportados alguns dados referentes às concentrações dos cinco compostos fenólicos determinados neste trabalho em vinhos elaborados em varias regiões, para ácido gálico (39,00 a 61,00 mg L⁻¹) [42], Quercetina (3,54 a 12,65 mg L⁻¹), catequina (17,72 a 41,87 mg L⁻¹), Resveratrol (0,61 a 2,44 mg L⁻¹) [126], o teor de malvidina -3-O glicosídeo encontrado foi de 55,10 mg L⁻¹; [129] para vinhos tintos. A variação nos valores na concentração de ácido gálico, quercetina e resveratrol, malvidina, catequina pode ser explicada devido à variabilidade natural do perfil de compostos fenólicos das uvas, que está relacionado com o clima, solo, zona geográfica e tipo de uva e práticas enológicas.

Capítulo VI

10. Determinação de flavonóides e ácidos fenólicos em vinhos produzidos na Região do Vale do São Francisco – Bahia /Pernambuco por Eletroforese Capilar

Neste trabalho foi desenvolvido um método eletroforético para a determinação de quercetina, caempferol, miricetina, ácidos siringico, gálico e cafeico (Figuras 3 e 5) em seis amostras de vinhos do Vale do São Francisco. As amostras foram filtradas e depois submetidas à extração líquido-líquido usando éter etílico como solvente. O extrato foi analisado por eletroforese capilar em zona com detecção espectrofotométrica com arranjo de diodos.

10.1 Parte Experimental

10.1.2. Análise por eletroforese

10.1.3. Instrumentação

Nas análises das amostras por eletroforese capilar (CE) foi empregado equipamento da “Backman” modelo P/ACE MDQ (Fullerton, CA), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), utilizou-se comprimento de onda de 280 nm para a análise das soluções padrões e amostra, os quais foram injetados hidrodinamicamente (0,5 psi – 5 sec) utilizando voltagem constante de +25 Kv. O eletrólito de corrida empregado foi Tetraborato de sódio (TBS) a uma concentração de 20 mM com 10% de metanol. Foi utilizado um capilar de sílica-fundida (Polymicro Technologies, 141 Phoenix, AZ, U.S.A.) com as seguintes dimensões (50 µm x 50 cm), o mesmo foi condicionado a partir da lavagem com 1 mol L⁻¹ NaOH por 5 min, seguido da solução do eletrólito por 30 min.

10.2.1. Reagentes e solventes

Todos os reagentes utilizados são de grau analítico e os solventes, que foram previamente filtrados, de grau HPLC. O metanol utilizado foi de procedência (Fairfield, OH, USA), enquanto que o ácido clorídrico foi de procedência Merck (Darmstad, Germany), tetraborato de sódio (TBS) Riedel-de Haen (Sweelze, Germany). A água foi desionizada por um sistema (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, USA) até atingir um valor de resistividade igual a 18 m Ω . Os padrões de quercetina, ácido gálico, campferol, ácido caféico miricetina foram da Aldrich (St. Louis, MO, USA). A solução estoque de 1000 mg L⁻¹ foi preparada dissolvendo os 5 compostos fenólicos em 60:40 v/v água/metanol. As soluções de trabalho foram preparadas diluindo a solução de partida com volumes apropriados de uma solução 60:40 v/v água/metanol.

10.3.1 Extração Líquido-líquido

Foram adicionados 100 μ L de ácido clorídrico a 5 mL de vinho e manteve-se a mistura sob com agitação magnética por 15 min. Em seguida, realizou-se uma extração dos analitos com 8 mL de éter etílico na proporção de 8:5 solvente/vinho. A fase orgânica foi separada da fase aquosa e evaporada utilizando um fluxo suave de nitrogênio. Posteriormente, foi redissolvida com uma mistura de 2,5 mL de etanol:água 60:40 v/v. As amostras foram então filtradas com uma membrana de 0,45 μ m (Millex LCR PTFE) (Millipore, São Paulo, Brasil).

11.0 Determinação de flavonóides e ácidos fenólicos em vinhos por CZE

Os polifenóis foram identificados a partir dos eletroferogramas comparando o tempo de migração e espectros obtidos através da análise dos picos dos padrões e das amostras de vinho. Também foi utilizada a fortificação de algumas amostras, com diferentes níveis de concentração, permitindo assim uma melhor identificação dos analitos presentes nas amostras. A quantificação foi efetuada através das medidas de área dos picos. As condições de separação foram otimizadas a partir do método modificado de Perez *et al.*[127].

11.1 Figuras de mérito

As curvas analíticas foram traçadas a partir dos resultados das áreas dos picos das soluções padrões de: caempferol, miricetina, ácidos siringico, gálico e caféico na faixa de concentração de 5 a 80 mg L⁻¹. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estabelecidos por análise da curva de calibração. Para o cálculo dos valores de LD e LQ, foram utilizadas as equações 1 e 2: As curvas analíticas assim como outros parâmetros avaliados para a determinação de compostos fenólicos são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Figuras de mérito do método para a determinação de compostos fenólicos usando eletroforese capilar

Analito	Limite de detecção ^a	Limite de quantificação ^a	Curvas analíticas	R ²
Ácido Siringico	0,14	0,45	S = 447,29C – 2214,90	0,999
Caempferol	0,19	0,58	S = 684,70C – 1324,20	0,999
Miricetina	0,25	0,84	S = 398,01C – 1878,80	0,999
Quercetina	0,31	1,03	S = 945,13C – 1079,70	0,999
Ácido caféico	0,33	0,96	S = 1045,10C – 3116,40	0,999
Ácido gálico	0,22	0,72	S = 1081,10C – 4881,30	0,998

S: sinal analítico, a : Concentração em mg L⁻¹

As curvas analíticas exibiram um comportamento linear dentro da faixa de trabalho, com coeficientes de correlação linear acima de 0,998. Os limites de detecção variaram de 0,14 a 0,33 mg L⁻¹ e os limites de quantificação variaram de 0,45 a 1,03 mg L⁻¹ para os analitos determinados. O desvio padrão relativo (RSD) foi de 1,05 e 0,74 % correspondente as concentrações de 5,20 e 32,5 mg L⁻¹ para ácido gálico, 3,08 e 1,37 % correspondentes as concentrações de 3,30 e 10,60 mg L⁻¹ para quercetina, 1,05 e 0,74 % correspondente as concentrações de 15,50 e 32,50 mg L⁻¹ para ácido caféico, 2,67 e 0,28 % correspondente as concentrações de 7,50 e 15,30 mg L⁻¹ para mirecetina, 2,81 e 0,96 % correspondente as concentrações de 2,30 e 14,20 mg L⁻¹ para caempferol, 1,01 e 3,50 % correspondente as concentrações de 5,20 e 32,5 mg L⁻¹ para ácido siríngico, respectivamente.

11.2 Aplicação do método.

Nas Figuras 31 e 32 são apresentados eletroferogramas dos compostos fenólicos em uma solução contendo padrões dos mesmos e determinado por eletroforese capilar em vinhos tintos, na Tabela 7 estão os valores de concentração destes compostos determinados em seis diferentes amostras de vinhos analisadas.

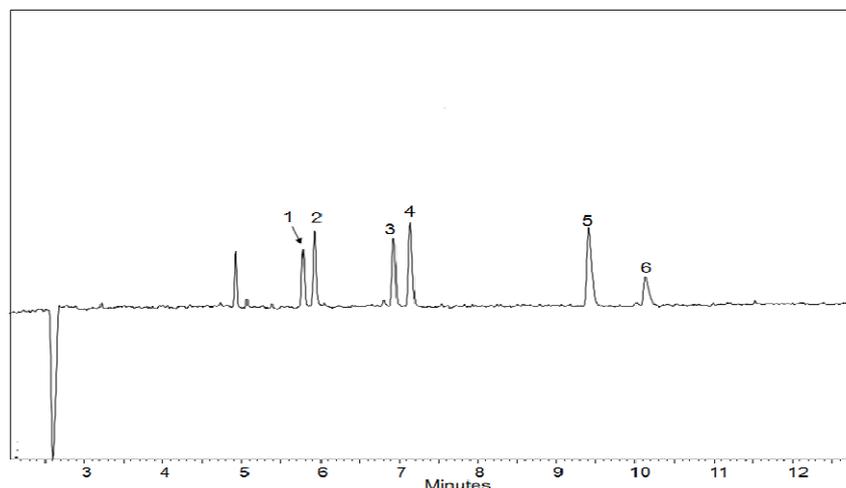


Figura 31: Eletroferograma de compostos fenólicos presentes em uma mistura de padrões. Eletrólito de corrida: TBS 20 mmol L⁻¹, metanol 10 % (v/v); pH= 9,0 ; potencial aplicado, +25 kV; detecção UV em 280 nm. Identificação dos picos: 1. Ácido siríngico, 2. caempferol, 3. miricetina, 4. quercetina, 5. Ácido caféico, 6. Ácido gálico

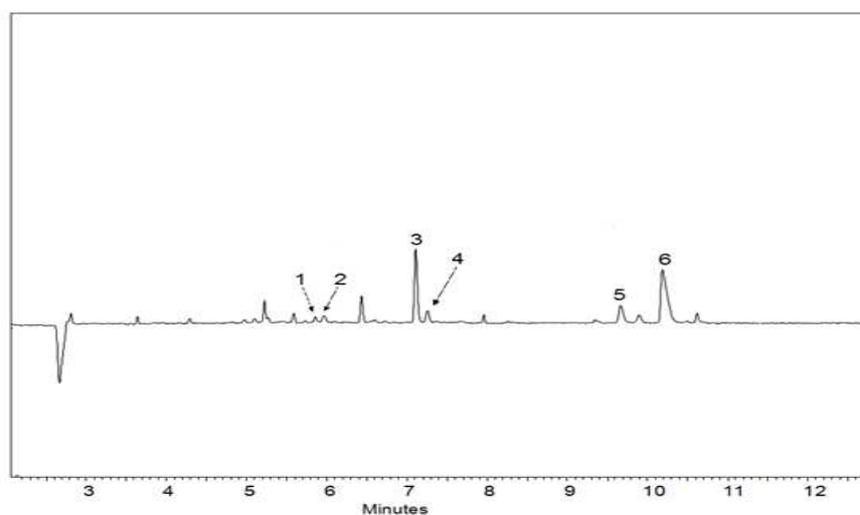


Figura 32 . Eletroferograma de compostos fenólicos presentes na amostra de vinho. Eletrólito de corrida: TBS 20 mmol L⁻¹, metanol 10 % (v/v); pH= 9,0 ; potencial aplicado, +25 kV; detecção, UV em 280 nm. Identificação dos picos: 1. Ácido siríngico, 2. kaempferol, 3. miricetina, 4. quercetina, 5. Ácido cafeico, 6. Ácido gálico.

Tabela 7. Concentração em mg L⁻¹ dos compostos fenólicos determinados em vinhos brasileiros elaborados no Vale do São Francisco por eletroforese capilar.

Amostras	Quercetina (mg L⁻¹)	Caempferol (mg L⁻¹)	Miricetina (mg L⁻¹)	Ác Siríngico (mg L⁻¹)	Ác. Caféico (mg L⁻¹)	Ác. Gálico (mg L⁻¹)
1- Cabernet Sauvignon Shiraz	1,68 ± 0,59	4,33 ± 0,21	15,34 ± 0,31	5,73± 0,07	5,18 ± 0,30	15,77 ± 0,58
2- Cabernet Sauvignon	3,58 ± 0,49	2,91 ± 0,23	25,13 ± 4,82	8,13±0,80	8,04 ± 0,25	22,45 ± 1,00
3 - Ruby Cabernet	2,97 ± 0,47	3,03 ± 0,13	7,52 ± 0,26	13,05±1,62	7,78 ± 0,35	22,35 ± 1,07
4 - Tanat 2002	4,03 ± 0,67	3,11 ± 0,21	16,31 ± 1,56	10,67±1,16	13,16 ± 1,09	15,47 ± 1,54
5 - Cabernet Sauvignon	3,76 ± 0,23	2,32 ± 0,15	23,95 ± 0,43	10,43±0,13	7,83 ± 0,07	41,74 ± 0,98
6 - Shiraz	3,79 ± 0,31	2,48 ± 0,10	22,24 ± 1,90	11,01±0,42	8,49 ± 0,19	28,09 ± 1,04

As concentrações de ácido gálico nas amostras de vinhos brasileiros variaram de 16,00 a 42,00 mg L⁻¹, Caféico (3,16 a 5,18 mg L⁻¹), Siríngico (5,73 a 13,05 mg L⁻¹), kaempferol (2,32 a 4,33 mg L⁻¹), Quercetina (1,68 a 4,03 mg L⁻¹), Miricetina (7,52 a 25,13 mg L⁻¹). Na literatura são reportados alguns dados referentes às concentrações dos seis compostos fenólicos determinados neste trabalho, em vinhos produzidos em varias regiões, para ácido gálico (39,00 a 61,00 mg L⁻¹), ácido caféico (2,20-8,70 mg L⁻¹) [42], Siríngico (3,62 a 7,46 mg L⁻¹), kaempferol (0,14 a 0,57 mg L⁻¹), Quercetina (3,54 a 12,65 mg L⁻¹), Miricetina (2,86 a 24,37 mg L⁻¹) [126] para vinhos tintos.

Pode-se verificar pelos resultados obtidos que as concentrações de ácido gálico e quercetina apresentam uma faixa um pouco menor que a reportada na literatura, já as concentrações de kaempferol e ácido siríngico, estão em uma faixa de concentração superior a encontrada na literatura e a concentração de miricetina está concordante com a literatura. A variação nos valores na concentração de ácido gálico, quercetina e ácido siríngico, pode ser explicada devido à variabilidade natural do perfil de compostos fenólicos das uvas, que está relacionado com o clima, solo entre outras práticas agronômicas.

Capítulo VII

12.0 Determinação de catequina e epicatequina em vinhos produzidos na Região do Vale do São Francisco por HPLC com detecção por Fluorescência.

O presente trabalho descreve a determinação de catequina e epicatequina em vinhos brasileiros elaborados na região do Vale do São Francisco empregando HPLC com detecção por fluorescência. O método permitiu a identificação e quantificação em diferentes tipos de vinho, através de injeção direta.

Através da detecção por fluorescência foi possível determinar os compostos do grupo flavan-3-ols com menos interferência e maior sensibilidade, quando comparado detecção espectrofotométrica. A catequina e a epicatequina (Figura 6) foram identificadas por comparação do tempo de retenção obtidos através das amostras de vinho e dos padrões (Figuras 36 e 37) e também através da adição de diferentes níveis de concentrações dos padrões à amostra (Tabela 12). O sinal de fluorescência foi utilizado para determinar os analitos no vinho, foi utilizado (comprimento de onda de excitação 280 nm, comprimento de onda de emissão 310 nm [128]).

12.1 Parte Experimental

12.1.1 Solventes

Os solventes utilizados no preparo das amostras, solução padrão e fase móvel (metanol e ácido acético, ácido fórmico), foram de grau cromatográfico HPLC de

procedência J. T. Baker. A água desionizada, foi obtida a partir de um sistema de ultra-purificação Milipore (Bedford, MA, USA).

Após o preparo dos solventes para as fases móveis, os mesmos foram filtrados a vácuo através de filtros milipore para solventes orgânicos (0,45 μm) e sonicados por 10 minutos a fim de remover oxigênio.

12.1.2 Padrões

Os padrões usados: (Quercetina, ácido gálico, kampferol, ácido caféico e mirecetina) foram de procedência Aldrich (St. Louis, MO, USA); (+)-catequina, (-)-epicatequina, ácidos siríngico, p-cumárico, vanílico, ferulico, hidroximetilfurfural, malvidina-3-O-glicosídeo da Sigma (St. Louis, MO, USA), todos com grau de pureza superior a 95%.

12.1.3. Preparo da amostra

Várias amostras de diferentes de vinhos (tinto, branco e rose), das marcas Rio Sol, Rendeiras, Adega do vale, Botticelli, Terra Nova e Garziera, foram adquiridas em supermercados na cidade de Salvador (Bahia, Brasil). Estas amostras foram escolhidas como representantes dos vinhos produzidos na região do Vale do São Francisco. As amostras foram filtradas com uma membrana de 0,45 μm (Millipore) para as análises por HPLC. Todos os vinhos foram armazenados em um ambiente refrigerado a 4°C até análise.

12.2 Análises de vinhos por HPLC/fluorescência

Nas análises das amostras de vinho foi utilizado um HPLC, Dionex, equipado com detectores de fluorescência (RF 2000) e arranjo de fotodiodos (PAD 100) equipado com um auto-amostrador (ASI-100) e bombas (P-680). O sinal analítico foi

monitorado e a área dos picos presentes nos cromatogramas foi integrada utilizando o software Chromeleon 6.60. A Fase móvel foi composta por dois tipos de solvente (A e B), sendo o solvente A composto por uma mistura de metanol:ácido acético:água na proporção de (5:2:93), e o solvente B composto por uma mistura de água:ácido acético:metanol na proporção de (10:2:88), utilizando um fluxo de 1,0 mL min⁻¹. O gradiente empregado encontra-se descrito na Tabela 8.

Tabela 8. Gradiente da fase móvel utilizado no (HPLC).

Tempo (min)	% B ^a
0	5
10	5
15	15
30	30
35	30
45	50
50	5
60	5

^a água-ácido acético-metanol (10:2:88)

As amostras foram filtradas com uma membrana de 0,45 µm. Foi utilizada uma coluna monolítica da marca Chromolith Performace RP-18e (100 mm x 4,6 mm). A detecção por fluorescência em $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 310$ nm.

As soluções estoque de catequina (100 mg L⁻¹) e epicatequina (100 mg L⁻¹) foram preparadas em uma mistura de metanol-água na proporção de (1:1). A solução estoque foi posteriormente diluída em soluções padrões com diferentes valores de concentração.

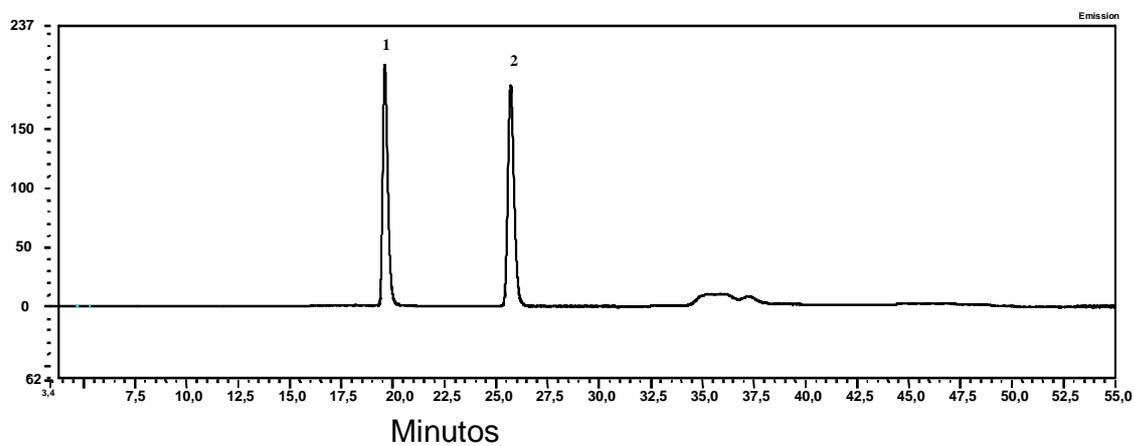


Figura 33: Cromatograma da mistura de padrões (Picos: 1.Catequina; 2. Epicatequina).

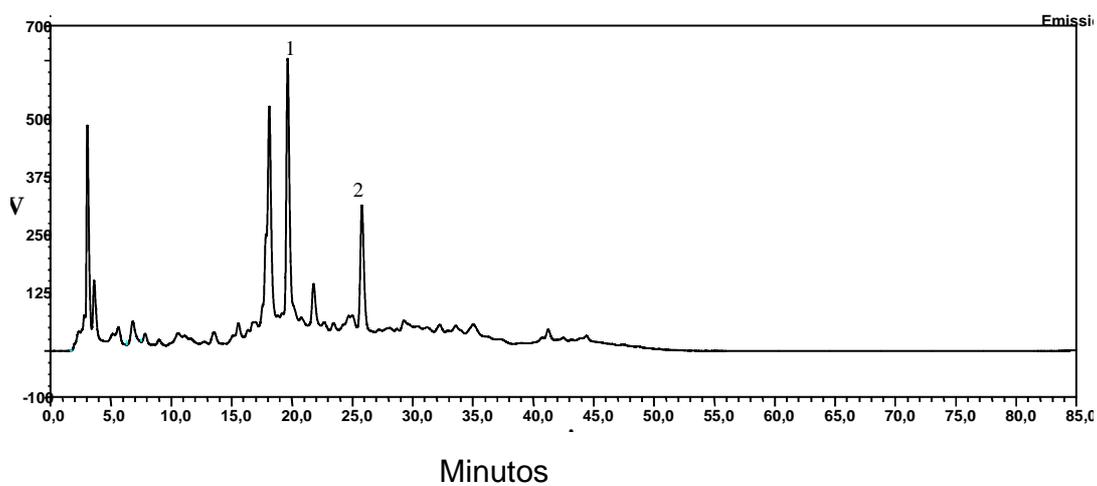


Figura 34: cromatograma da amostra de vinho Cabernet Sauvignon Shiraz. (Picos: 1.Catequina; 2. Epicatequina).

12.2.1 Validação do método analítico

As curvas analíticas foram traçadas utilizando soluções padrões na faixa de 1 a 30 mg L⁻¹. A equação de regressão correspondente e outros parâmetros característicos para a determinação catequina e epicatequina são mostrados na Tabela 9. As curvas analíticas exibiram excelente linearidade ($R > 0,99$) na faixa de concentração estudada.

Tabela 9. Figuras de mérito do método

Analito	Tempo de Ret. (min)	LD ^a (mg L ⁻¹)	LQ ^b (mg L ⁻¹)	Equação da Reta	R ²
Catequina	19,64	0,27	0,91	S = 5,91C - 0,75	0,999
Epicatequina	25,75	0,33	1,09	S = 6,30C - 0,39	0,998

^a Limite de detecção, ^b Limite de quantificação, S = sinal analítico, C = concentração em mg L⁻¹

Os limites de detecção e de quantificação foram estabelecidos através da equação das curvas analíticas. Os limites de detecção e de quantificação foram de 0,27 e 0,91 mg L⁻¹, para catequina e 0,33 e 1,09 mg L⁻¹ para epicatequina, respectivamente. A precisão estimada como desvio padrão relativo foi de 3,34 e 1,09 % para as concentrações de catequina de 0,50 e 20,0 mg.L⁻¹ e, 2,82 e 0,49 % para as mesmas concentrações de epicatequina respectivamente. Para avaliar a exatidão do método foi realizado um teste de adição/recuperação, Às soluções padrões foram adicionados as amostra na faixa de 40 a 90% da concentração original presentes nos vinhos. As amostras fortificadas com os padrões de catequina e epicatequina, foram analisados em triplicata de acordo o método proposto, e as recuperações foram calculadas de acordo com equação 3 . Foram obtidos valores que variaram de 105 e

108 % de recuperação para catequina e de 97,3 a 119 % para epicatequina (Tabela 10).

Tabela 10. Teste de adição/recuperação para concentrações de catequina e epicatequina (mg L^{-1}) em vinhos brasileiros elaborados na região do Vale do São Francisco, por HPLC.

Amostras de vinho	Epicatequina Adic. (mg L^{-1})	Epicatequina encontrada (mg L^{-1})	Rec (%)	Catequina Adic. (mg L^{-1})	Catequina Encontrada (mg L^{-1})	Rec (%)
Petit Shiraz	0,0	$5,08 \pm 0,21$	119	0,0	$7,51 \pm 0,17$	-
	6,0	$12,21 \pm 0,60$		15,0	$23,68 \pm 0,07$	108
Shiraz 1	0,0	$12,43 \pm 0,38$	97,3	0,0	$21,72 \pm 0,09$	105
	10,0	$22,16 \pm 0,10$		10,0	$32,25 \pm 0,05$	
Shiraz 2	0,0	$16,06 \pm 0,29$	102	-	$27,07 \pm 0,40$	-
	6,0	$22,20 \pm 0,32$		-	-	-
Cabernet Sauvignon Shiraz	0,0	$9,99 \pm 0,67$	97,5	-	$16,73 \pm 0,16$	-
	4,0	$13,89 \pm 0,14$		-	-	-

N = 3 replicatas

13. Determinação de catequina e epicatequina em vinhos brasileiros.

Na Figura 23 é mostrado o cromatograma da catequina e da epicatequina nas amostras de vinhos e na Tabela 11 é apresentada a concentração dos analitos determinados em nove amostras de vinhos brasileiros, a concentração para catequina variou de 7,51 a 73,20 mg L^{-1} e de 5,08 a 43,32 mg L^{-1} para a epicatequina.

Tabela 11. Valores de concentração de catequina e epicatequina (mg L^{-1}) obtidos em vinhos brasileiros elaborados no Vale do São Francisco por HPLC com detecção por fluorescência.

Amostra de vinhos	Epicatequina (mg L^{-1})	Catequina (mg L^{-1})
Petite Shiraz	$5,08 \pm 0,21$	$7,51 \pm 0,17$
Shiraz 1	$12,43 \pm 0,38$	$21,72 \pm 0,09$
Cabernet Sauvignon 1	$26,87 \pm 0,50$	-----
Cabernet Sauvignon 2	$16,86 \pm 0,10$	$28,60 \pm 0,51$
Cabernet Sauvignon Shiraz 1	$43,32 \pm 0,22$	$73,20 \pm 1,45$
Shiraz 2	$16,04 \pm 0,04$	$30,40 \pm 0,14$
Shiraz 3	$18,31 \pm 0,04$	$31,63 \pm 0,03$
Cabernet Sauvignon Shiraz 2	$16,06 \pm 0,29$	$27,07 \pm 0,40$
Cabernet Sauvignon Shiraz 3	$9,99 \pm 0,67$	$16,73 \pm 0,16$

N = 3 replicatas

Na literatura são reportados alguns dados referentes à concentração de catequina e epicatequina encontrada em vinhos produzidos em várias regiões, podendo então comparar com os dados encontrados no presente trabalho (Tabela 12). Alonso e co-autores encontraram uma concentração de $31,01 \text{ mg L}^{-1}$ para catequina e $12,78 \text{ mg L}^{-1}$ para epicatequina em vinhos tintos. [129].

Tabela 12. Concentração de catequina e epicatequina de vinhos de outros países

Amostras	Catequina (mg L^{-1})	Epicatequina (mg L^{-1})	ref
Vinhos da Hungria	21,30-89,10	11,70-126,0	[130]
Vinhos da Itália (tintos)	33,66-86,54	9,94-25,47	[131]
Vinhos da França	32,80-209,80	22,10-130,7	[132]
Vinhos da China	1,44-3,83	3,59-13,10	[133]
Vinhos da Turquia	17,82-33,59	5,62-12,65	[134]
Vinhos da Espanha (brancos)	7,20-15,60	2,60-28,40	[135]
Vinhos do Brasil	7,51-73,20	5,08-43,32	Este trabalho

Os teores de catequina e epicatequina relatados na literatura para vinhos de outros países são concordantes com os encontrados para vinhos brasileiros elaborados no vale do São Francisco. Os elevados teores de catequina e epicatequina encontrados nos vinhos foram devido a inserção de sementes durante o processo de maceração e fermentação, pois na uva os flavan-3-ols, se encontram em maior concentração nas sementes.

Capítulo VIII

14.0 Determinação direta de ácido fenólicos em vinhos produzidos na Região do Vale do São Francisco por HPLC PAD.

Alguns compostos fenólicos encontrados nos vinhos apresentam absorvância característica na região do UV-vis e podem ser facilmente separados e detectados por HPLC com detector de arranjo de fotodiodos. As antocianinas apresentam absorvância máxima por volta de 520 nm. Os flavonóis têm absorvância máxima em 360 nm, os ácidos hidroxicinâmicos podem ser detectados em 320 nm, outros grupos de polifenóis podem apresentar absorvância máxima em 280 nm.

Neste trabalho foram determinados, ácido gálico, hidroximetil furfural, ácido vanílico, ácido caféico, ácido p-Cumárico, ácido ferúlico, caftárico, cis-cutárico, fertárico, trans-cutárico. O método permitiu a identificação e quantificação destes compostos em diferentes tipos de vinhos, através de injeção direta, por HPLC PDA. Os compostos polifenólicos foram identificados por comparação do tempo de retenção e dados do espectro de UV obtidos através das amostras de vinho e dos padrões puros (Figuras 38,39, 40a e 41) e também através da adição de diferentes níveis de concentrações dos padrões à amostra.

14.1.1 Parte Experimental

14.1.2 Solventes

Os solventes utilizados no preparo das amostras, solução padrão e fase móvel (metanol e ácido acético, ácido fórmico), foram de grau cromatográfico HPLC de procedência J. T. Baker. A água desionizada, foi obtida a partir de um sistema de ultra-purificação Milipore (Bedford, MA, USA).

Após o preparo dos solventes para as fases móveis, os mesmos foram filtrados a vácuo através de filtros milipore para solventes orgânicos (0,45 µm) e sonicados por 10 minutos a fim de remover oxigênio.

14.1.3 Padrões

Os padrões usados: (ácido gálico, ácido caféico foram de procedência Aldrich (St. Louis, MO, USA); ácidos siríngico, p-cumárico, vanílico, ferúlico, hidroximetilfurfural, Sigma (St. Louis, MO, USA), todos com grau de pureza superior a 95%.

14.1.4. Preparo da amostra

Várias amostras de diferentes de vinhos (tinto, branco e rose), das marcas Rio Sol, Rendeiras, Adega do vale, Botticelli, Terra Nova e Garziera, foram adquiridas em supermercados na cidade de Salvador (Bahia, Brasil). Estas amostras foram escolhidas como representantes dos vinhos produzidos na região do Vale do São Francisco. As amostras foram filtradas com uma membrana de 0,45 µm (Millipore) para as análises por HPLC. Todos os vinhos foram armazenados em um ambiente refrigerado a 4°C até análise.

14.2 Análises de vinhos por HPLC PAD

Nas análises das amostras de vinho foi utilizado um HPLC, Dionex, equipado com detectores de fluorescência (RF 2000) e arranjo de fotodiodos (PAD 100) equipado com um auto-amostrador (ASI-100) e bombas (P-680). O sinal analítico foi monitorado e a área dos picos presentes nos cromatogramas foi integrada utilizando o software Chromeleon 6.60. A Fase móvel foi composta por dois tipos de solvente (A e B), sendo o solvente A composto por uma mistura de metanol:ácido acético:água na proporção de (5:2:93), e o solvente B composto por uma mistura de

água:ácido acético:metanol na proporção de (10:2:88), utilizando um fluxo de 1,0 mL min⁻¹. O gradiente empregado encontra-se descrito na Tabela 13.

Tabela 13. Gradiente da fase móvel utilizado no (HPLC).

Tempo (min)	% B ^a
0	5
10	5
15	15
30	30
35	30
45	50
50	5
60	5

^a água-ácido acético-metanol (10:2:88)

As amostras foram filtradas com uma membrana de 0,45 µm. Foi utilizada uma coluna monolítica da marca Chromolith Performace RP-18e (100 mm x 4,6 mm). A absorvância do analito na região do UV foi monitorado de 200 a 400 nm .

As soluções estoque dos analitos foram preparadas em uma mistura de metanol-água na proporção de (1:1). A solução estoque foi posteriormente diluída em soluções padrões com diferentes valores de concentração.

14.3 Validação do método analítico

As curvas analíticas foram construídas utilizando soluções padrões na faixa de 0,38 a 52 mg L⁻¹. As equações das curvas analíticas correspondentes aos analitos (ácido gálico, hidroximetil furfural (HMF), ácido vanílico, ácido cafeico, ácido p-Cumárico, ácido ferúlico) e os valores de coeficiente de correlação estão na Tabela 15. Demais parâmetros característicos do método para a determinação dos polifenóis nos vinhos são mostrados nas Tabelas 15 e 16. As curvas analíticas exibiram excelente linearidade ($r > 0,99$) na faixa de concentração de trabalho.

Tabela 14. Equação e coeficientes de correlação das curvas analíticas do método proposto.

Analito	Curva analítica	Coefficiente de correlação
Ácido Gálico	Abs = 0,29C - 0,03	0,9985
HMF	Abs = 1,43C - 0,38	0,9996
Ácido Vanílico	Abs = 0,30C - 0,02	0,9984
Ácido Cafeico	Abs = 0,81C - 0,06	0,9998
Ácido p-Cumárico	Abs = 0,95C - 0,08	0,9999
Ácido Ferúlico	Abs = 0,94C - 0,03	0,9988

Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos através das curvas analíticas. Os cálculos dos valores para LDs e LQs, foram obtidos a partir das equações 1 e 2. Os limites de detecção e quantificação e estão apresentados na Tabela 15. A precisão estimada como desvio padrão relativo é mostrado na Tabela 15.

Tabela 15. Características analíticas do método proposto

Analito	Tempo de retenção (min)	LD^a	LQ^b
Ácido Gálico	5,77	0,24	0,79
HMF	8,77	0,02	0,07
Ácido Vanílico	22,77	0,24	0,79
Ácido Cafeico	23,70	0,13	0,44
Ácido p-Cumárico	30,78	0,34	1,13
Ácido Ferúlico	33,58	0,03	0,09

^a Limite de detecção, ^b Limite de quantificação

Para avaliar a exatidão do método foi realizado um teste de adição/recuperação, Os padrões foram adicionados amostra na faixa de 40-90% da concentração original presentes nos vinhos, para isso foram adicionados uma mistura de padrões de ácido gálico, hidroximetilfurfural, ácidos vanílico, cafeico, p-cumárico e ferúlico a fim de obter concentrações nominais de 2,0; 3,0; 5,0; 7,0 e 15,0

mg L⁻¹ e o volume foi completado com amostras de vinho. As amostras contaminadas com padrões dos compostos fenólicos, foram analisados em triplicata de acordo o método proposto, e as recuperações foram calculadas de acordo com equação 3 . Foram obtidos valores que variaram de 90 a 101,2 % de recuperação para os analitos determinados nas amostras de vinhos brasileiros (Tabela 17).

Tabela 16. Valores de desvio padrão relativo para diferentes concentrações dos compostos analisados

Analito	Conc. (mg L ⁻¹)	RSD ^a	Conc. (mg L ⁻¹)	RSD ^a
Ácido Gálico	11,95	1,77	0,51	4,60
HMF	7,65	3,11	1,41	4,78
Ácido Vanílico	8,76	3,40	0,89	5,01
Ácido Cafeico	6,26	4,52	0,90	5,43
Ácido p-Cumárico	5,69	2,99	0,71	4,48
Ácido Ferúlico	6,45	3,83	1,53	4,99

^a desvio padrão relativo

15.0 Aplicação

15.1. Determinação de compostos fenólicos em vinhos brasileiros.

Tabela 17. Teste de adição/recuperação para concentrações de Gálico, Hmf, Vanílico, Caféico, p-Cumárico, (mg L⁻¹) em vinhos brasileiros HPLC PDA.

	Concentração (mg L ⁻¹)	Valor adicionado (mg L ⁻¹)	Valor encontrado (mg L ⁻¹)	Rec. (%)
Shiraz				
Gálico	28,87	3,0	31,74	96,0
Hmf	1,01	15,0	16,20	101,2
Vanílico	3,31	5,0	8,76	109
Caféico	16,14	3,0	18,91	92
p-Cumárico	12,46	3,0	15,22	92
Ferulico	1,81	5,0	6,45	93
Petite Shiraz				
Gálico	18,25	3,0	20,21	98
Hmf	0,59	7,0	7,65	101
Vanílico	2,10	2,0	3,91	90
Caféico	4,20	0,0	4,30	-
p-Cumárico	2,54	4,0	6,37	96
Ferulico	0,41	2,0	2,35	97

15.1.2 Determinação de ácido gálico, hidroximetil furfural, ácido vanílico, ácido caféico, ácido p-Cumárico e ácido ferúlico em vinhos brasileiros elaborados na região do Vale do São Francisco.

Nas Figuras 36, 37a, 37b e 38 são apresentados os cromatogramas dos compostos determinados nas amostras de vinho e dos padrões em dois comprimentos de onda distintos (280 e 320 nm). Pode-se perceber que houve uma boa separação dos compostos. Na Tabela 18 é apresentado a concentração dos analitos determinados em nove amostras de vinhos brasileiros, a concentração de ácido gálico variou de 3,73 a 103,50 mg L⁻¹, Hidroximetil furfural de 0,59 a 8,83 mg L⁻¹, ácido vanílico de 2,90 a 11,57 mg L⁻¹, ácido caféico de 4,20 a 14,20 mg L⁻¹, ácido p-Cumárico de 0,26 a 12,46 mg L⁻¹, ácido ferulico de 0,31 a 3,97 mg L⁻¹. Para a determinação dos ésteres fenólicos

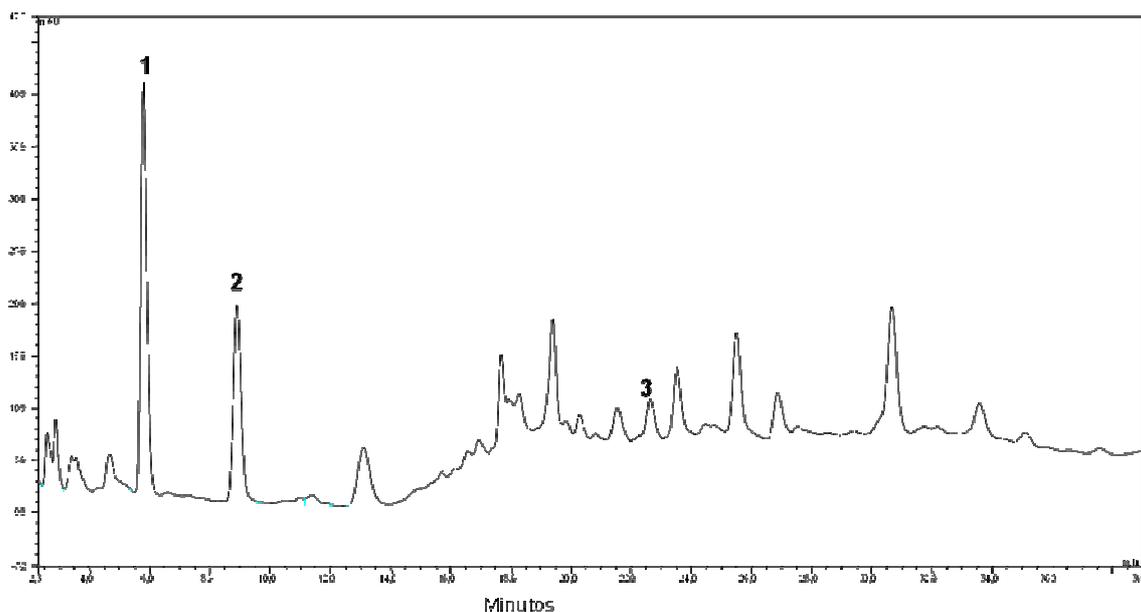


Figura 35: Cromatograma da amostra de vinhos utilizando comprimento de onda de 280nm (Picos: 1. ácido Gálico; 2. Hidroximetil furfural; 3. Ácido vanílico).

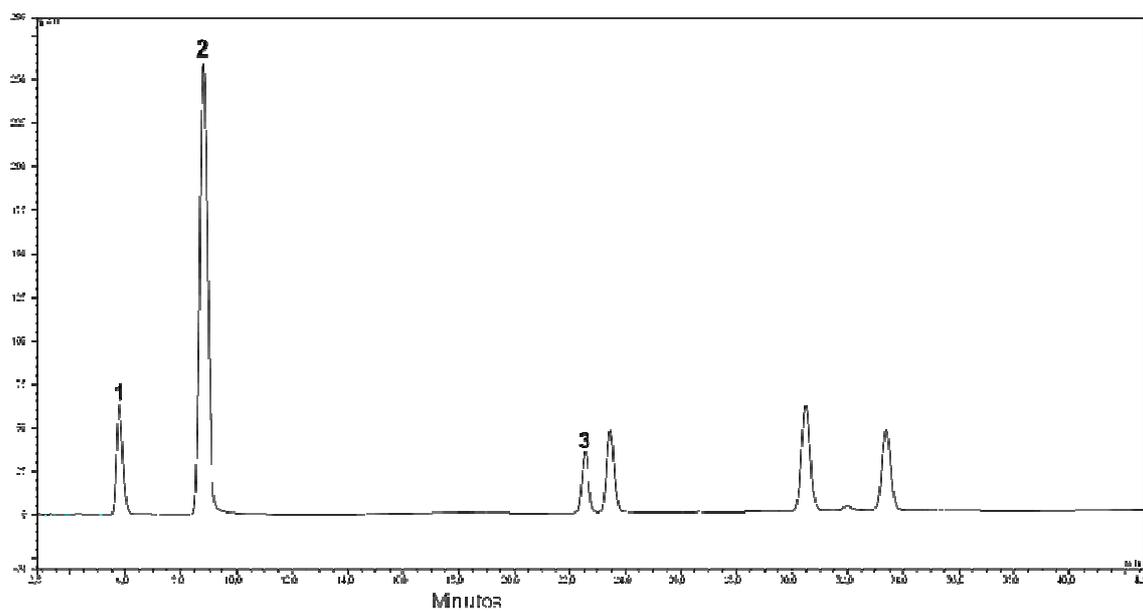


Figura 36: Cromatograma da mistura de padrões utilizando um comprimento de onda de 280nm (Picos: 1. ácido Gálico; 2. Hidroximetil furfural; 3. Ácido vanílico).

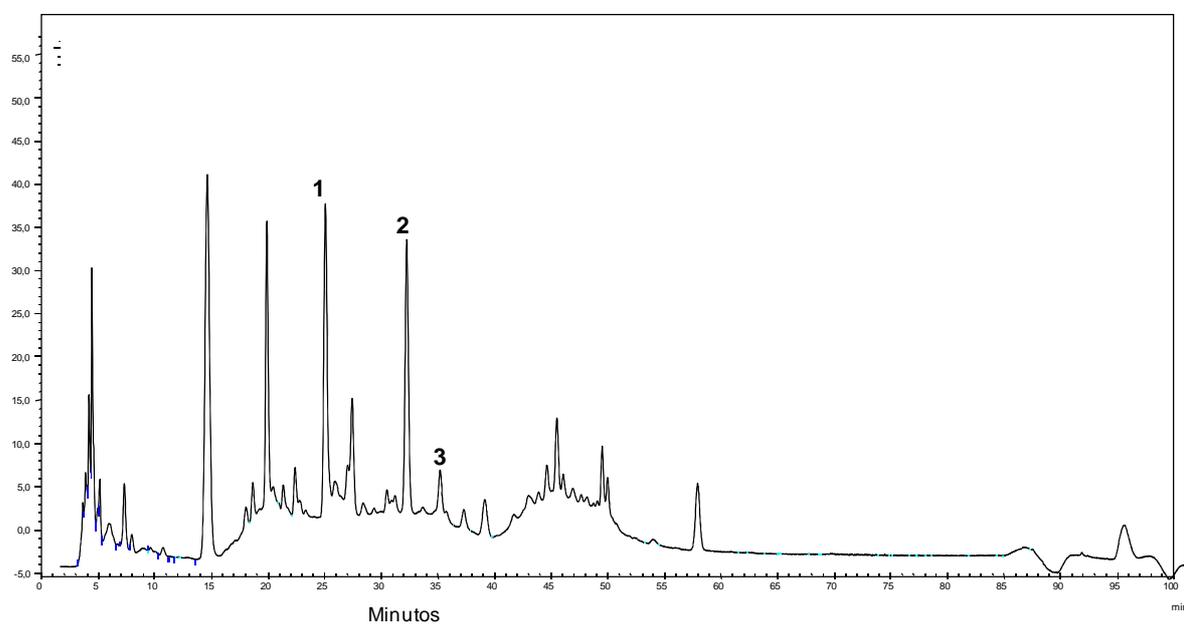


Figura 37a. Cromatograma da amostra de vinhos utilizando comprimento de onda de 320 nm (Picos: 1. ácido caféico; 2. Ácido p-cumárico; 3. Ácido ferulico).

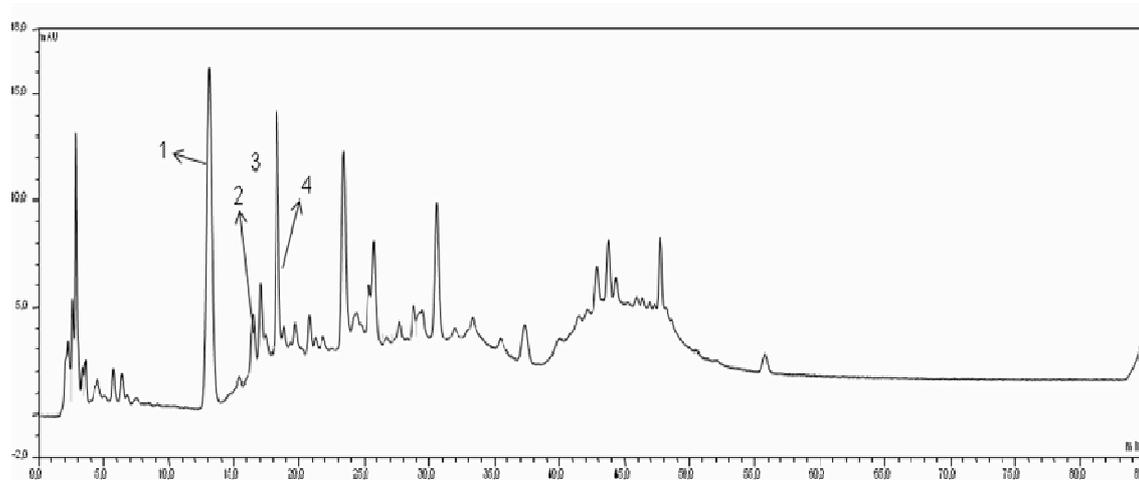


Figura 37b. Cromatograma da amostra de vinhos utilizando comprimento de onda de 320 nm (Picos: 1. ácido caftárico; 2. Ácido cis-cutárico; 3. Ácido fertárico; 4. Ácido trans-cutárico).

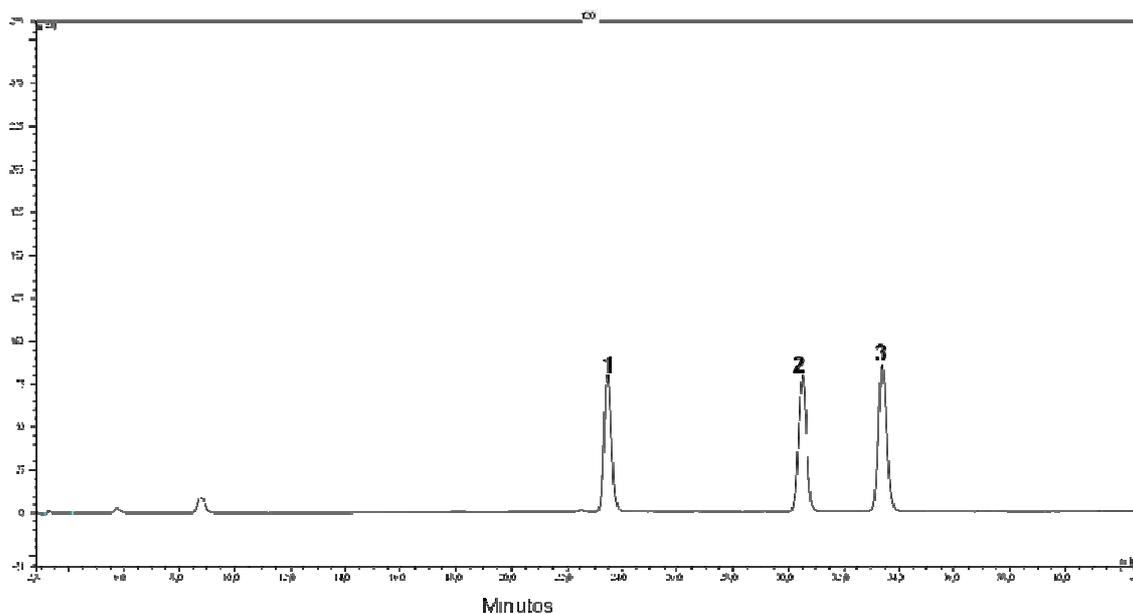


Figura 38. Cromatograma da mistura de padrões utilizando um comprimento de onda de 320 nm (Picos: 1. ácido caféico; 2. Ácido p-cumárico; 3. Ácido ferúlico)

Tabela 18 Concentração de ácido gálico, hidroximetil furfural, ácido vanílico, ácido caféico, ácido p-Cumarico e ácido ferulico (mg L^{-1}) em vinhos brasileiros elaborados no Vale do São Francisco por HPLC -UV.

Amostras	Ácido Gálico	HMF	Ácido Vanílico	Ácido Cafeico	Ácido p-Cumárico	Ácido Ferúlico
Tinto Petit Shiraz	18,56 ± 0,71	0,59 ± 0,02	2,16 ± 0,03	4,20 ± 0,15	2,54 ± 0,07	0,41 ± 0,01
Tinto Shiraz 1	28,87 ± 0,03	1,01 ± 0,12	3,31 ± 0,17	16,14 ± 0,61	12,46 ± 0,08	1,81 ± 0,14
Tinto Cabernet Sauvignon	50,35 ± 0,15	0,86 ± 0,04	2,90 ± 0,17	7,26 ± 0,07	11,96 ± 0,01	< LQ
Tinto Cabernet Sauvignon	95,28 ± 3,70	1,17 ± 0,16	< LQ	11,83 ± 1,23	7,57 ± 1,04	1,11 ± 0,13
Tinto Cabernet Sauvignon Shiraz 1	52,65 ± 1,51	< LQ	11,57 ± 0,01	6,26 ± 0,09	5,69 ± 0,20	3,97 ± 0,21
Tinto Cabernet Sauvignon Shiraz 2	81,79 ± 2,52	1,25 ± 0,06	4,26 ± 0,21	12,86 ± 0,23	12,41 ± 0,21	1,54 ± 0,06
Rosé Shiraz	3,73 ± 0,12	8,83 ± 0,18	< LQ	0,56 ± 0,02	< LQ	< LQ
Tinto Shiraz 3	103,50 ± 4,12	1,19 ± 0,17	< LQ	14,20 ± 0,22	9,07 ± 0,18	1,47 ± 0,07
Tinto Shiraz 4	89,24 ± 0,14	1,46 ± 0,03	< LQ	11,45 ± 0,22	16,61 ± 0,50	1,53 ± 0,07
Chenin Blanc moscato Canelli	11,95 ± 0,36	2,43 ± 0,44	< LQ	6,65 ± 0,55	1,95 ± 0,15	0,31 ± 0,01

15.2. Determinação de ésteres caftárico, *cis*-cutárico, fertárico, *trans*-cutárico em vinhos brasileiros.

Nas uvas, os ácidos fenólicos, são principalmente os derivados do ácido cinâmico, que se encontram nos vacúolos das células do fruto, principalmente na forma de ésteres tartáricos. Estes são os ácidos cafeoil tartárico (caftárico), p-cumaroil tartárico (cutárico) e feruloil tartárico (fertárico), Figura 39. A forma isomérica encontrada em maior quantidade nas uvas é o *trans*, porém pode ser encontrado o composto *cis*, em menor quantidade.

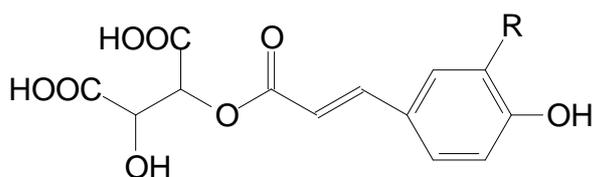


Figura 39: Ésteres hidroxicinâmicos

Ésteres	R ₁
Ácido cafeoil tartárico	OH
Ácido p-cumaroil tartárico	H
Ácido feruloil tartárico	OCH ₃

Neste trabalho, a quantificação do ácido caftárico, foi realizada mediante a utilização da curva de calibração do ácido caféico e a quantificação do cutárico foi realizado através da curva de calibração do p-cumárico e o ácido fertárico a partir da curva de calibração do ácido ferúlico, aplicando a todos um fator de correção molar, tendo em vista que não existem padrões disponíveis comercialmente. Os compostos foram identificados através da comparação dos espectros de absorção das amostras de vinhos com os encontrados na literatura.

Tabela 19. Concentração do: ácido caftárico, ácido cis-cutárico, ácido fertárico,trans-cutárico (mg L^{-1}) em vinhos brasileiros produzidos no Vale do São Francisco por HPLC.

Amostra	caftárico (mg L^{-1})	cis-cutárico (mg L^{-1})	fertárico (mg L^{-1})	trans-cutárico (mg L^{-1})
Tinto Petite Shiraz	16,92 \pm 0,75	1,61 \pm 0,06	1,44 \pm 0,27	5,70 \pm 0,21
Tinto Shiraz 1	13,28 \pm 1,59	1,01 \pm 0,17	2,43 \pm 0,45	2,18 \pm 0,35
Tinto Cabernet Sauvignon	33,55 \pm 0,76	2,13 \pm 0,52	1,11 \pm 0,22	9,68 \pm 0,01
Tinto Cabernet Sauvignon	46,83 \pm 2,67	1,25 \pm 0,30	1,87 \pm 0,40	17,56 \pm 3,03
Tinto Cabernet Sauvignon Shiraz	34,27 \pm 0,69	1,10 \pm 0,09	1,96 \pm 0,02	11,09 \pm 0,19
Rosé Shiraz	16,29 \pm 0,35		2,05 \pm 0,08	2,18 \pm 0,03
Tinto Shiraz 2	43,98 \pm 0,73	1,49 \pm 0,11	2,03 \pm 0,12	
Tinto Shiraz 3	29,91 \pm 1,20	1,54 \pm 0,09	2,42 \pm 0,15	6,99 \pm 0,26
Chenin Blanc moscato Canelli	29,36 \pm 0,41		1,18 \pm 0,24	2,13 \pm 0,17

Nas Figura 40b é apresentado o cromatograma dos ácidos caftárico, cis-cutárico, fertarico, trans-cutárico determinados nas amostras de vinho em dois comprimentos de onda distintos (280 e 320 nm). Na Tabela 19 são apresentados os valores de concentração dos analitos determinados em nove amostras de vinhos brasileiros, a concentração de acido caftárico variou de 13,28 a 46,83 mg L^{-1} , cis-cutárico de 1,01 a 2,13 mg L^{-1} , trans-cutárico de 2,13 a 17,56 mg L^{-1} , fertárico de 1,11 a 2,43 mg L^{-1} , ácido p-Cumárico de 0,26 a 12,46 mg L^{-1} , ácido ferulico de 0,31 a 3,97 mgL^{-1} .

Capítulo IX

16. Desenvolvimento de um método de extração em fase sólida automatizado para a determinação de antocianinas por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) com detector de arranjo de diodos

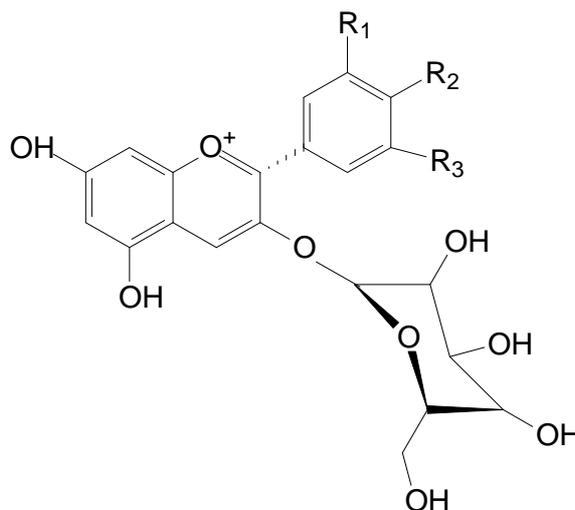
Como versado anteriormente as antocianinas são as substâncias presentes nos vinhos responsáveis pela coloração dos mesmos. Assim estes compostos são de grande interesse para a indústria alimentícia, além disso, apresentam propriedades antioxidantes [136], antivirais [137], antibacterianas [138] e anticarginogênicas [139]. Quanto à relação das antocianinas e a cor dos vinhos, é importante ressaltar que a concentração destas substâncias varia muito devido à variedade da uva empregada e das práticas vinícolas adotadas. Por exemplo, vinhos que passam por um período de envelhecimento em barris de carvalho, estão sujeitos à numerosas reações de oxidação e polimerização, principalmente entre as antocianinas e os flavanoles.

Em vinhos jovens as principais antocianinas responsáveis pela cor são as monoméricas, porém com o passar do tempo mais de 50% da cor dos vinhos são devido às antocianinas poliméricas. Estes compostos são menos afetados pelo pH, temperatura e presença de SO₂, o que atribui a cor dos vinhos uma maior estabilidade. Estes fenômenos aqui mencionados interverem muito na concentração das antocianinas nos vinhos, tornando então a determinação destes compostos uma tarefa difícil, requerendo uma escolha criteriosa do procedimento analítico que será adotado para a análise dos vinhos.

Na literatura têm sido propostas várias técnicas de extração de antocianinas empregando metanol, etanol, acetona, água, puros ou em misturas [140]. As técnicas de extração de amostras semi-sólidas ou viscosas (como o mosto de uva),

tem se concentrado na extração por maceração com solventes orgânicos seguido de extração líquido-líquido ou em fase sólida, como estratégia para preconcentrar o extrato [141]. Na literatura são reportados vários procedimentos para a extração e determinação de antocianinas em uvas e vinhos por HPLC [142 - 145].

Neste trabalho foi utilizada extração em fase sólida, utilizando um sistema automatizado (Figura 44 e Esquema 45). A separação das antocianinas foi realizada utilizando um UPLC. Este método possibilitou a separação e quantificação de oito antocianinas em vinhos (Delfinidina -3-O glicosídeo, Cianidina-3-O glicosídeo, Peonidina-3-O-glicosídeo, malvidina-3-O-glicosídeo, Cianidina-3-O-p-cumaroilglicosídeo, Peonidina-3-O-acetilglicosídeo, malvidina-3-O-acetilglicosídeo, malvidina-3-O-cafeoilglicosídeo). A estrutura referente a estes compostos estão apresentados nas Figuras 40, 41, 42, 43. Para a quantificação dos antocianinas foi utilizado o comprimento de onda de 500 nm.



Antocianinas	R ₁	R ₂	R ₃
Delfinidina -3-O glicosídeo	OH	OH	OH
Cianidina-3-O glicosídeo	OH	OH	H
Peonidina -3-O glicosídeo	OCH ₃	OH	H
malvidina -3-O glicosídeo	OCH ₃	OH	OCH ₃

Figura 40. Estrutura das antocianinas glicosiladas (Delfinidina, Cianidina, Peonidina e malvidina)

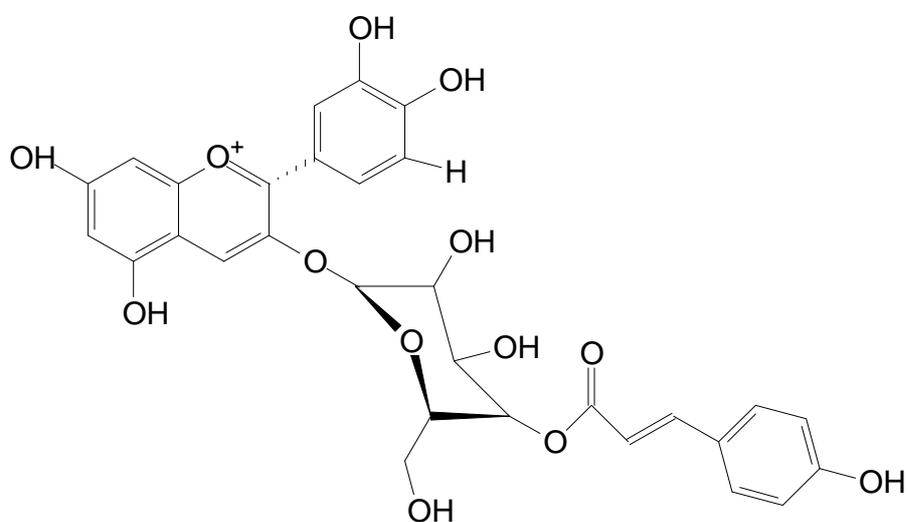
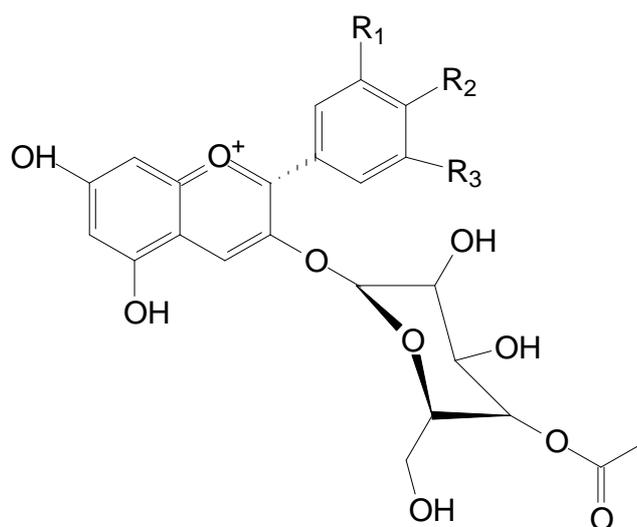


Figura 41. Cianidina-3-O-p-cumaroilglicosídeo



Antocianinas	R₁	R₂	R₃
Peonidina -3-O-acetilglicosídeo	OCH ₃	OH	H
malvidina -3-O-acetilglicosídeo	OCH ₃	OH	OCH ₃

Figura 42. Estrutura as antocianinas acetil glicosiladas (peonidina e malvidina)

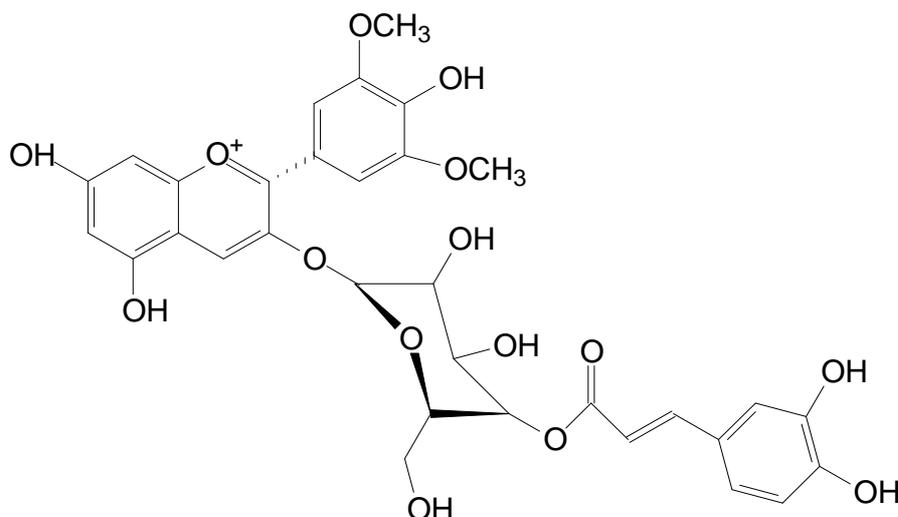


Figura 43. malvidina-3-O-cafeoilglicosídeo

16.1.1 Parte experimental

16.1.2 Solventes

Os solventes utilizados no preparo das amostras, solução padrão e fase móvel (metanol e ácido acético, ácido fórmico), foram de grau cromatográfico HPLC de procedência J. T. Baker. A água desionizada, foi obtida a partir de um sistema de ultra-purificação Milipore (Bedford, MA, USA).

Após o preparo dos solventes para as fases móveis, os mesmos foram filtrados a vácuo através de filtros milipore para solventes orgânicos (0,45 μm) e sonicados por 10 minutos a fim de remover oxigênio.

16.3 Cromatografia líquida de ultra eficiência UPLC.

Para a determinação de antocianinas em vinhos produzidos no vale do São Francisco, foi empregado um cromatógrafo de ultra eficiência da Waters Acquity, com detector de arranjo de fotodiodos (PDA) modelo 2996. Faixa de 190 a 500 nm. Com sistema de gestão de eluente binário, bomba binária de alta pressão, sistema de degaseificação a vácuo, injetor automático e compartimento de coluna

termostatizado (permite trabalhar a temperaturas entre 5°C a 65°C. Coluna ACQUITY UPLC, BEH C18 (2,1 x 100 mm) e 1,7 µm de tamanho de partícula. A Fase Móvel foi composta por dois tipos de solvente (A e B), o solvente A composto por uma mistura de água:ácido fórmico na proporção de (95:5), o solvente B foi composto por metanol, utilizando um fluxo de 0,5 mL min⁻¹. O gradiente empregado encontra-se descrito na Tabela 20.

Tabela 20. Gradiente da fase móvel utilizado no (UPLC DAD).

Tempo (min)	%A	%B	Curve
0,10	80	20	6
1,30	75	25	6
1,86	70	30	6
4,35	60	40	6
4,80	50	50	6
4,84	50	50	6
5,80	50	50	6
7,60	0	100	6
7,94	0	100	6
9,00	80	20	6
11,00	80	20	6

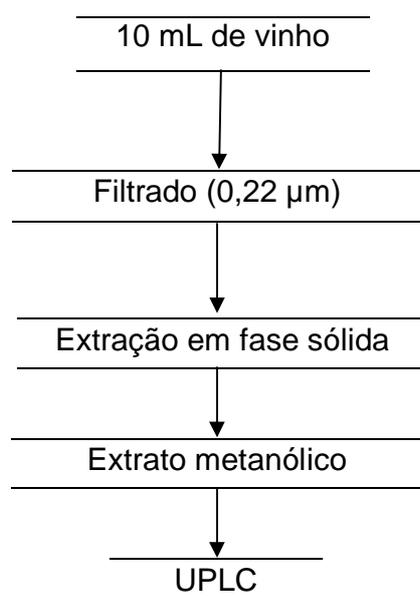
16.3.1 Extração em fase sólida

Na extração em fase sólida das antocianinas nos vinhos foi utilizado um sistema robótico, Benchmate Workstation (Zymark, Hopkinton, MA, USA) mostrado na Figura 44. Foram utilizados cartuchos para SPE strata™-X (Phenomenex California, USA). No esquema 45 estão listadas em forma de fluxograma as etapas em que as amostras foram submetidas à extração em fase sólida.



Figura 44. Sistema robótico, para SPE (Rapid Trace)

Foto: <http://www.caliperls.com/products/rapidtrace-spe-work-station.htm#nogo>



Esquema 45. Fluxograma para a extração em fase sólida.

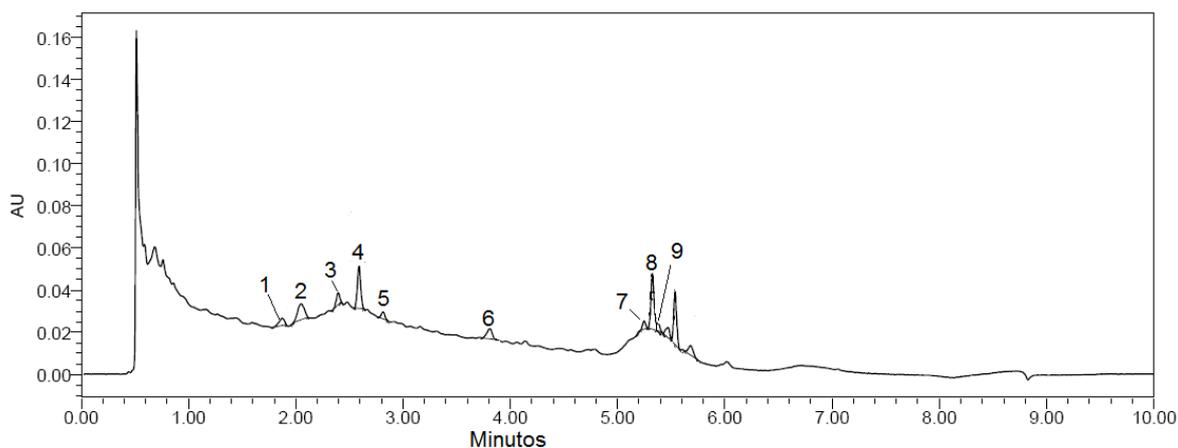


Figura 46. Cromatograma do vinho Shiraz: **1.** Delfinidina -3-O glicosídeo , **2.** Cianidina-3-O glicosídeo , **3.** Peonidina-3-O glicosídeo , **4.** malvidina-3-O glicosídeo , **5.** ND, **6.** malvidina -3-O-acetilglicosídeo , **7.** Cianidina-3-O-p-cumaroilglicosídeo , **8.** ND, **9.** malvidina-3-O-cafeoilglicosídeo

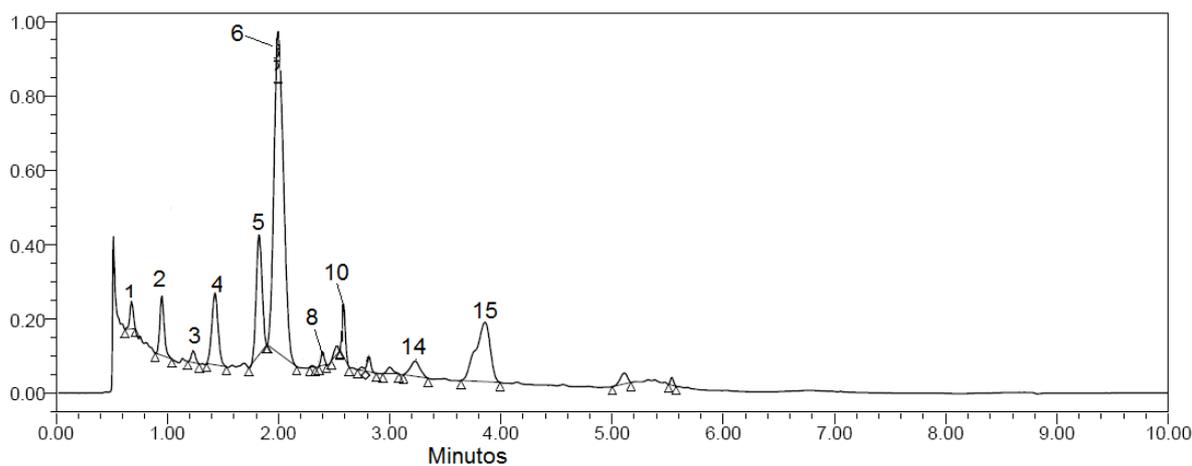


Figura 47. Cromatograma dos padrões: **5.** Delfinidina-3-O glicosídeo , **6.** Cianidina-3-O-glicosídeo , **8.** Peonidina-3-O glicosídeo , **10.** malvidina-3-O glicosídeo , **14.** Peonidina -3-O-acetilglicosídeo , **15.** malvidina -3-O-acetilglicosídeo.

O método consiste em fazer uma extração dos vinhos utilizando cartuchos strata-X (Esquema 45), com o auxílio de um aparelho automático, capaz de fazer várias extrações em seqüência, a fim de deixar o processo mais rápido. As etapas da extração foram realizadas de acordo com a Tabela 21. Nas primeiras etapas o

cartucho foi condicionado com água e metanol, depois foi passada a amostra a um fluxo menor, a mesma antes da eluição foi lavada com água para remoção dos açúcares e a eluição seguiu com metanol.

Tabela 21. As etapas do método automático para extração em fase sólida

Etapa	Reagentes	Volume (mL)	Fluxo (mL.min⁻¹)
Condicionar	Água	5	2,000
Condicionar	Metanol	5	2,000
Carregar	Amostra	5	1,002
Limpeza	Água	2	1,002
Eluir	Metanol	1	1,002
Condicionar	Água	5	2,000
Condicionar	Metanol	5	2,000

Posteriormente, os extratos foram analisados por Cromatografia de ultra alta eficiência, utilizando o gradiente exposto na Tabela 20.

Nas Figuras 47 e 48 são apresentados os cromatogramas a 500 nm dos extratos das amostras de vinhos que foram coletados após passarem pela etapa de separação e préconcentração. Foram identificados os picos referentes às seguintes antocianinas: Delfinidina -3-O glicosídeo, Cianidina-3-O glicosídeo, Peonidina -3-O glicosídeo, Malvidina -3-O glicosídeo, Cianidina-3-O-p-cumaroilglicosídeo, Peonidina -3-O-acetilglicosídeo, Malvidina-3-O-acetilglicosídeo, Malvidina-3-O-cafeoilglicosídeo. Estes compostos foram identificados pela ordem de eluição e pelas características espectroscópicas (espectros de absorção). Foram identificados quatro grupos de antocianinas, os compostos monoglicosilados, as antocianinas acetilglicosiladas, as p-cumaroilglicosiladas e cafeoilglicosiladas.

16.4 Figuras analíticas de mérito

As curvas analíticas foram traçadas utilizando soluções padrões de malvidina-3-O-glicosídeo, pois não há padrões comerciais de delfinidina -3-O glicosídeo,

cianidina-3-O-glicosídeo, peonidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-p-cumaroilglicosídeo, peonidina-3-O-acetilglicosídeo, malvidina-3-O-acetilglicosídeo, malvidina-3-O-cafeoilglicosídeo. Neste trabalho os limites de detecção e quantificação, foram de 0,01 e 0,04 mg L⁻¹, respectivamente.

Tabela 22. Concentração* em mg L⁻¹ de Delfinidina-3-O-glicosídeo , Cianidina-3-O-glicosídeo, Peonidina-3-O-glicosídeo, Cianidina-3-O-p-cumaroilglicosídeo, Peonidina-3-O-acetilglicosídeo, malvidina-3-O-acetilglicosídeo, malvidina-3-O-cafeoilglicosídeo determinados em vinhos brasileiros elaborados no vale do São Francisco.

	Cabernet Sauvignon Shiraz 1	Cabernet Sauvignon Shiraz 2	Shiraz 1	Shiraz 2	Cabernet Sauvignon Shiraz 3	Cabernet Sauvignon
Delfinidina-3-O-glicosídeo	0,26 ± 0,04	ND	0,18 ± 0,05	0,33±0,03	57,61±0,11	6,24±0,12
Cianidina-3-O-glicosídeo	0,67 ± 0,04	ND	0,17 ± 0,04	1,21±0,01	207,45±0,23	38,25±0,54
Peonidina-3-O-glicosídeo	0,47 ± 0,04	ND	0,19 ± 0,06	0,58±0,02	2,88±0,10	0,36± 0,03
malvidina-3-O-glicosídeo	1,05 ± 0,02	ND	1,20 ± 0,03	1,88±0,01	11,97±0,01	1,38± 0,09
malvidina-3-O-acetilglicosídeo	0,43 ± 0,05	ND	0,23 ± 0,06	0,24±0,05	64,96±0,33	14,46±0,01
Cianidina-3-O-p-cumaroilglicosídeo	0,46 ± 0,06	3,83 ± 0,02	0,26 ± 0,08	0,36±0,02	ND	0,25±0,07
malvidina-3-O-cafeoilglicosídeo	2,82 ± 0,03	ND	0,35 ± 0,03	ND	ND	0,42±0,03
Peonidina-3-O-acetilglicosídeo	ND	ND	ND	ND	11,10±0,31	ND

* Valores de concentração expressos em equivalentes de malvidina-3-O-glicosídeo , ND : Não Detectado

Na Tabela 22 são apresentados os valores de concentração dos analitos determinados em nove amostras de vinhos brasileiros, a concentração para Delfinidina -3-O glicosídeo variou de 0,18 a 57,61 mg L⁻¹, Cianidina-3-O glicosídeo de 0,17 a 207,45 mg L⁻¹, Peonidina -3-O glicosídeo de 0,19 a 2,88 mg L⁻¹, malvidina -3-O glicosídeo de 1,05 a 11,97 mg L⁻¹, Cianidina-3-O-p-cumaroilglicosídeo de 0,25 a 3,83 mg L⁻¹, a Peonidina -3-O-acetilglicosídeo foi encontrada em uma única amostra e sua concentração foi de 11,10 mg L⁻¹, o teor de malvidina-3-O-acetilglicosídeo variou de 0,23 a 64,96 mg L⁻¹, malvidina-3-O-cafeoilglicosídeo variou de 0,35 a 2,82 mg L⁻¹. Na literatura são reportados alguns dados referentes às concentrações das antocianinas, permitindo então uma comparação com os dados encontrados no presente trabalho. Alonso e co-autores encontraram concentrações antocianinas como (equivalente em malvidina-3-O glicosídeo) que foram de 10,87 mg L⁻¹ para delfinidina -3-O glicosídeo; 0,48 mg L⁻¹ para Cianidina-3-O glicosídeo; 4,07 mg L⁻¹ para Peonidina -3-O glicosídeo; 55,10 mg L⁻¹ malvidina -3-O glicosídeo; 0,40 mg L⁻¹ para Cianidina-3-O-p-cumaroilglicosídeo; 0,51 mg L⁻¹ para Peonidina -3-O-acetilglicosídeo; 3,99 mg L⁻¹ para malvidina-3-O-acetilglicosídeo [129]. As diferenças encontradas entre os teores das antocianinas determinadas nos vinhos brasileiros e com os dados da literatura, podem ser explicados devido a fatores agronômicos, climáticos e os diferentes parâmetros tecnológicos da vinificação de vinhos tintos.

Capítulo X

17. Extração assistida por ultrassom acoplada a HPLC-MS-DAD para a determinação de compostos fenólicos em vinhos produzidos no Vale do São Francisco.

Neste trabalho foi desenvolvido um método de extração líquido-líquido assistida por ultrassom para a preconcentração de compostos fenólicos em vinhos elaborados no Vale do São Francisco, Bahia/Pernambuco por cromatografia de alta eficiência com detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas. Foram analisadas 13 amostras de vinho de diferentes variedades de uvas (Shiraz-2005, Cabernet Sauvignon-2004, Cabernet Sauvignon / Shiraz-2003, Shiraz – 2004, Cabernet Sauvignon/ Shiraz-2004, Shiraz – 2004, Cabernet Sauvignon / Shiraz -2004, Tanat - 2002, Petit Shiraz – 2005, Ruby Cabernet – 2005).

17.1.1 Parte Experimental

7.1.2 Solventes

Os solventes utilizados no preparo das amostras, solução padrão e fase móvel (metanol e ácido acético, ácido fórmico), foram de grau cromatográfico HPLC de procedência J. T. Baker. A água desionizada, foi obtida a partir de um sistema de ultra-purificação Milipore (Bedford, MA, USA).

Após o preparo dos solventes para as fases móveis, os mesmos foram filtrados a vácuo através de filtros milipore para solventes orgânicos (0,45 µm) e sonificados por 10 minutos a fim de remover oxigênio.

16.2 HPLC DAD MS

Foram analisadas 10 amostras de vinhos produzidos no Vale do São Francisco de diferentes variedades de uvas: Shyraz, Cabernet Sauvignon, Cabernet Sauvignon/Shyraz; Shyraz; Tanat; Petty Shyraz.

Na Figura 48 é apresentado um fluxograma referente às etapas utilizadas na análise dos vinhos do vale do São Francisco por HPLC DAD MS.

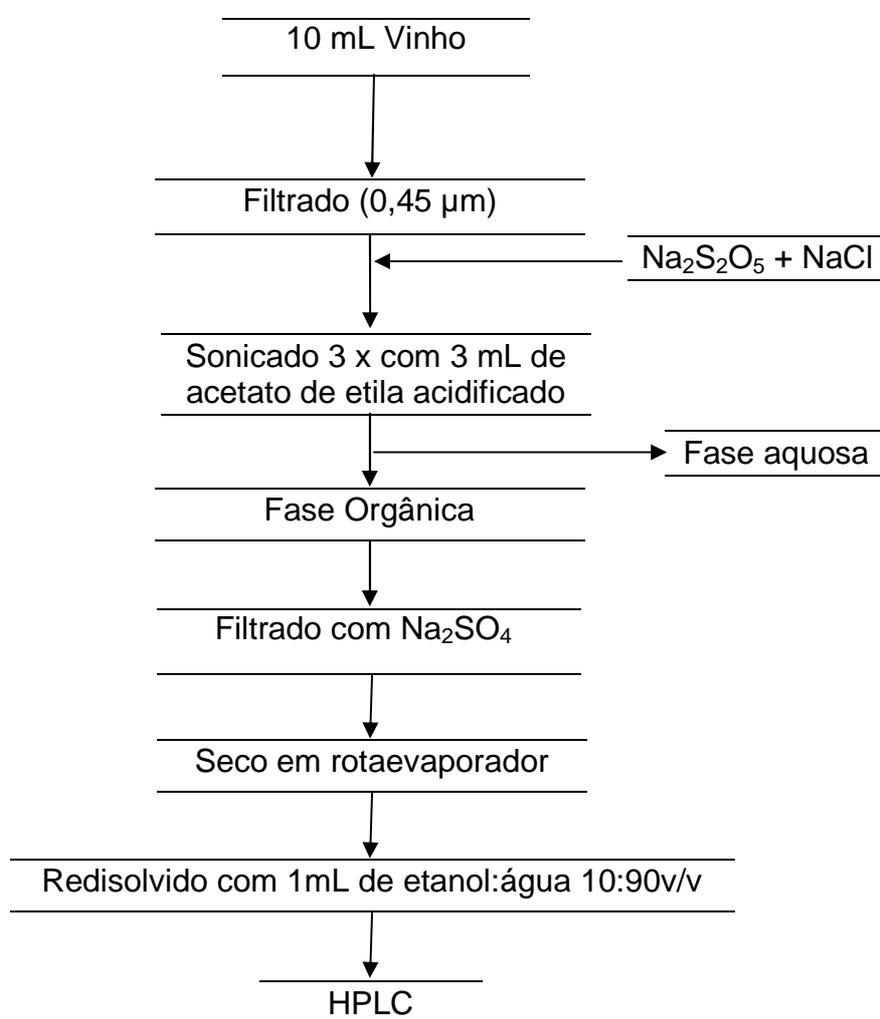


Figura 48. Fluxograma da determinação de compostos fenólicos em vinhos por HPLC DAD MS.

Nas análises das amostras por HPLC-DAD-MS modelo 2010 A, de procedência Shimadzu com auto injetor LC SIL 10 AD, Realizou-se as medidas no comprimento de onda de 280 nm para a quantificação das soluções padrões e amostra. Foi utilizado coluna C18 com as seguintes dimensões, 2,1 x 75 mm (DI 3,5 μ m) e coluna guarda de 4,6 mm DI x 12,5 mm, a fase móvel utilizada foi: solvente A: (água, acidificada com ácido fórmico) pH 3,0 e solvente B: Metanol. Na Tabela 23 é apresentado o gradiente utilizado na separação dos compostos fenólicos por HPLC DAD MS.

Tabela 23: Gradiente utilizado na análise de vinhos por HPLC DAD MS

Tempo (min)	Solvente B Metanol (%)
0	15
2	15
7	30
11	30
13	80
15	80
18	15
20	15

Solvente A: água acidificada com ácido fórmico

A extração foi levada a cabo adicionando a 1 mL da amostra de vinho, 3 mL de acetato de etila acidificado com ácido clorídrico e levado ao banho ultrasônico por 10 min. A fase orgânica foi separada da fase aquosa e evaporada utilizando um rotaevaporador, posteriormente foi redissolvida com 1 mL de uma mistura de etanol:água 10:90 v/v. As análises foram feitas utilizando um HPLC DAD MS, a interface utilizada no massas foi a APCI (ionização química a pressão atmosférica) no modo negativo. Esta técnica de detecção foi utilizada para confirmar a identificação dos analitos, nos padrões e nas amostras, pois para quantificar os compostos fenólicos utilizou-se o sinal de absorção na região do Uv-Vis , no comprimento de onda 280 nm.

A partir dos fragmentos $[M - H]^-$ (Tabela 23) identificados nos espectros de massas (Figuras 51,52,53 e 54), do tempo de retenção (Tabela 24 e espectros de absorção na região do Uv-Vis dos padrões e das amostras após terem passado pelos processos de extração, foi possível identificar, os polifenóis nas amostras de vinho.

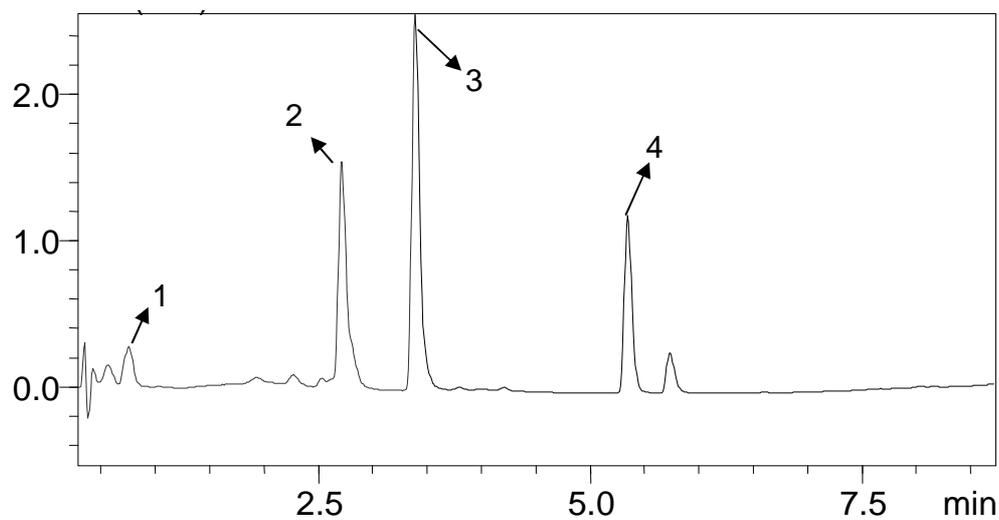


Figura 49. cromatogramada da mistura de padrões: Picos: 1. Ácido gálico; 2. Ácido caféico; 3. Ácido p-cumárico; 4. Quercetina).

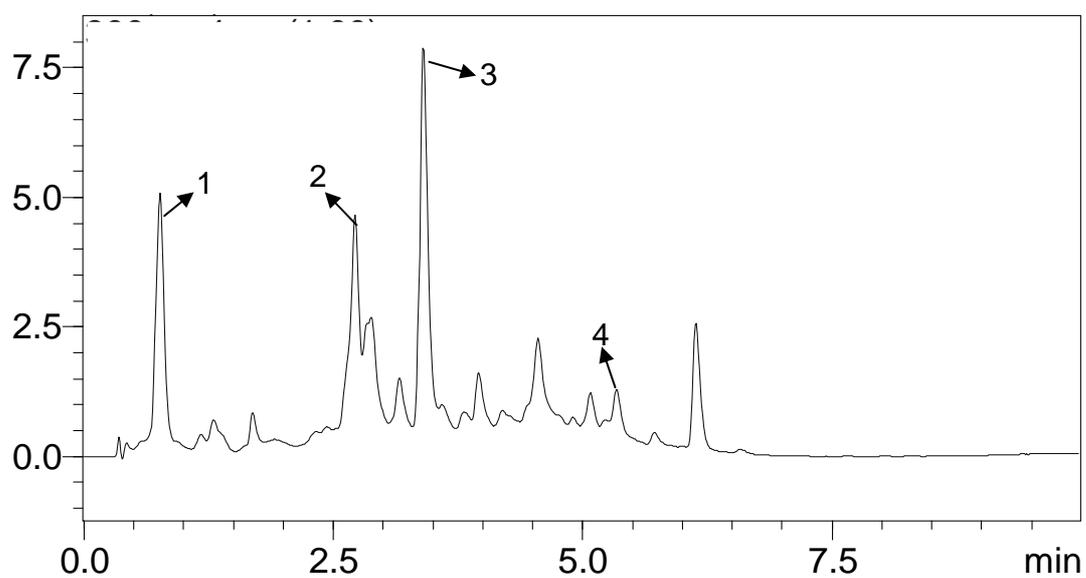


Figura 50. Cromatograma da de uma das amostra de vinho (Cabernet Sauvignon). Picos: 1. Ácido gálico; 2. Ácido caféico; 3. Ácido p-cumárico; 4. Quercetina).

Tabela 24. Fragmentos (m/z), tempo de retenção e massa molecular de: Ácido gálico; Ácido caféico; Ácido p-cumárico e Quercetina.

Composto	Tempo de retenção ^a	MM	[M-H] ⁻ (m/z)
Ácido gálico	0,753	170	169
Ácido caféico	2,707	180	179
Ácido p-cumárico	3,382	164	163
Quercetina	5,730	302	301

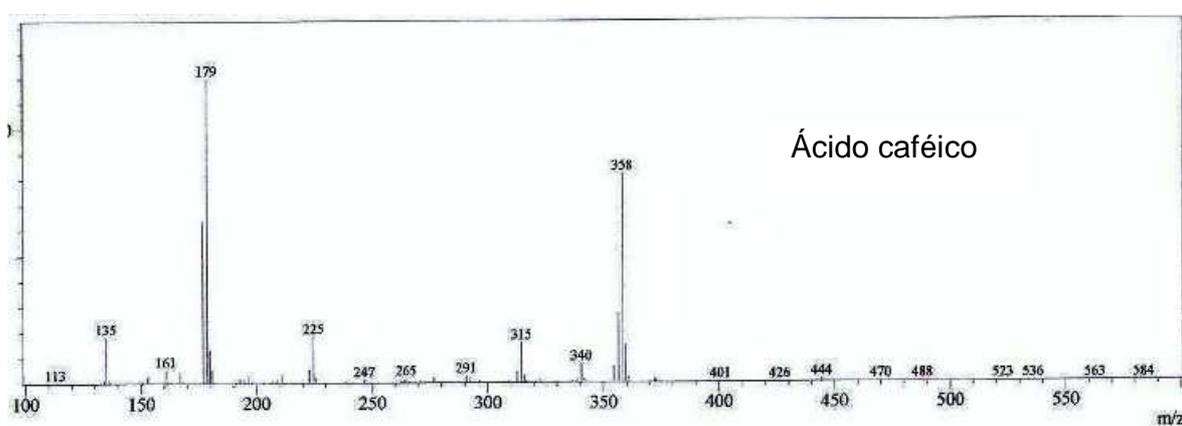


Figura 51. Espectro de massas do ácido caféico

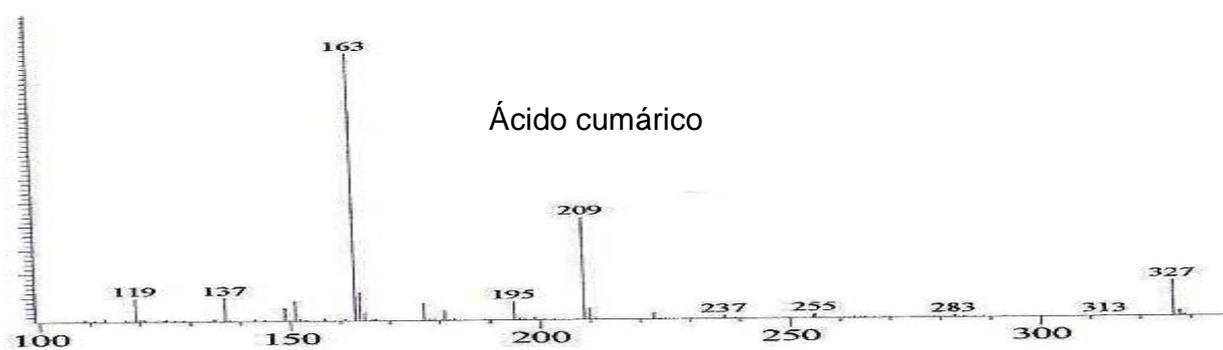


Figura 52. Espectro de massas do ácido cumárico

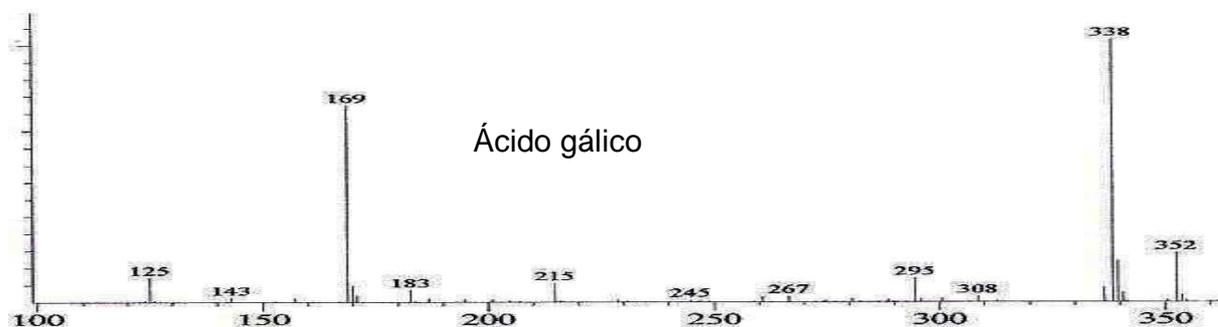


Figura 53. Espectro de massas do ácido gálico

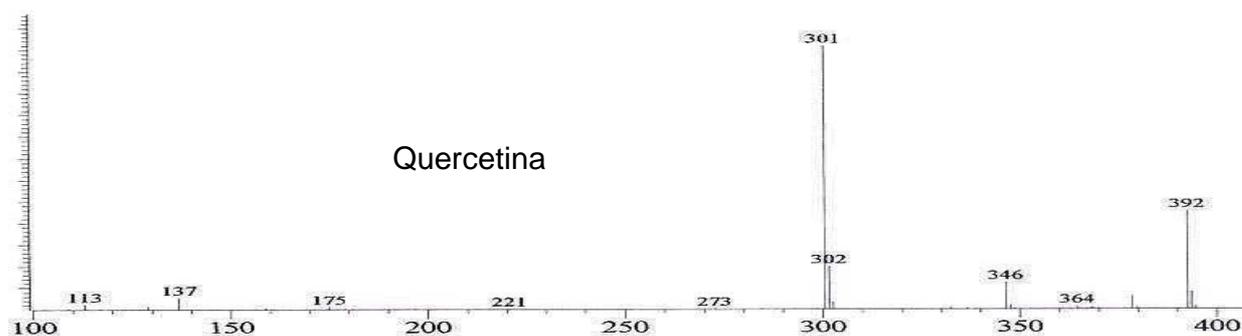


Figura 54. Espectro de massas do quercetina

Analisando os cromatogramas da solução das misturas dos padrões e da amostra (Figura 39), cruzando as informações dos tempos de retenção com os espectros de massas foi possível identificar os seguintes compostos: ácido gálico (pico 1), no modo negativo apresenta o fragmento (m/z) 169 que corresponde ao íon desprotonado $[M - H]^-$, o fragmento (m/z) 338 (Figura 53) corresponde a um aducto formado pela soma de mais um fragmento (m/z) 169, formando então um dímero ($[M - H]^- + [M - H]^-$); o ácido cafeico (pico 2), apresenta o fragmento (m/z) 179 (Figura 51) correspondente ao íon desprotonado $[M - H]^-$, o fragmento (m/z) 358 corresponde a

um aducto formado pela soma de mais um fragmento (m/z) 179; cumárico (pico 3) apresenta o fragmento (m/z) 163 que corresponde ao ion desprotonado $[M - H]^-$, o fragmento (m/z) 209 (Figura 52) corresponde a formação de um aducto $[M + HCOO]^-$ devido a presença de ácido fórmico na fase móvel; quercetina (pico 4) apresenta o fragmento (m/z) 301 correspondente ao ion desprotonado $[M - H]^-$, o fragmento (m/z) 392 (Figura 54) corresponde a formação de um aducto $[M + HCOOH + HCOO]^-$ devido a presença de ácido fórmico na fase móvel.

17. Validação do método analítico

As curvas analíticas foram elaborados a partir dos resultados das áreas dos picos das soluções padrões de: ácido gálico, ácido caféico, ácido cumárico e quercetina em faixas de concentrações variando de 2 a 100 $mg L^{-1}$, que passaram pela etapa de extração líquido-líquido. As curvas exibiram excelente linearidade ($r > 0,99$) na faixa de concentração de trabalho. As curvas analíticas assim como outros parâmetros avaliados para a determinação de compostos fenólicos são apresentados na Tabela 25. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,36 e 1,19 $mg L^{-1}$, para ácido gálico ; 0,27 e 0,90 $mg L^{-1}$ para ácido caféico; de 0,33 e 1,10 $mg L^{-1}$; para ácido cumárico; de 0,59 e 1,96 $mg L^{-1}$ para quercetina, respectivamente.

Tabela 25. Figuras analíticas mérito do método para determinação de gálico, ácido caféico, ácido cumárico e quercetina em vinhos brasileiros por HPLC DAD MS.

Analito	LD ^a	LQ ^b	Curva analítica	R ²
Ac. Gálico	0,36	1,19	Abs = 34330C - 14743	0,997
Caféico	0,27	0,90	Abs =150669C - 350791	0,998
Cumárico	0,33	1,10	Abs =243971C - 5435	0,998
Quercetina	0,59	1,96	Abs =37745C - 179854	0,999

^aLimite de detecção ($mg L^{-1}$), ^bLimite de quantificação ($mg L^{-1}$)

A precisão estimada como desvio padrão relativo para dois valores de concentração 10 e 30 mg L⁻¹ foi de 1,40 e 1,20 % para as concentrações de ácido gálico; 1,63 e 1,08 % para ácido caféico; 1,73 e 1,07 % para ácido cumárico; 1,72 e 1,28 % para quercetina.

Para avaliar a exatidão do método foi realizado um teste de adição/recuperação, Os padrões foram adicionados amostra em diferentes concentrações (5,0; 6,0; 10,0 mg L⁻¹). As amostras fortificadas com os padrões dos polifenóis foram analisados em triplicata. As recuperações foram calculadas de acordo com equação 3 . Foram obtidos valores que variaram de 92 e 117,2 % de recuperação (Tabela 26).

	Concentração (mg L ⁻¹)	Valor add. (mg L ⁻¹)	Valor encontrado (mg L ⁻¹)	Rec. (%)
Petit Shiraz				
Ac. Gálico	13,76	10,00	24,05	102,9
Caféico	4,26	5,00	9,83	111,4
Cumárico	4,35	5,00	9,60	92,0
Quercetina	5,97	6,00	11,78	96,3
Cabernet Sauvignon Shiraz				
Ac. Gálico	33,33	10,00	44,00	106,7
Caféico	10,45	6,00	16,00	92,5
Cumárico	7,47	6,00	14,50	117,2
Quercetina	9,99	10,00	20,00	100,1

Tabela 26. Teste de adição/recuperação para concentrações de ácido gálico, ácido caféico, ácido cumárico e quercetina encontrados nas amostras de vinhos brasileiros, (mg L⁻¹) por HPLC PDA MS.

Tabela 27. Concentração de ácido gálico, ácido caféico, ácido cumárico e quercetina encontrados nas amostras de vinhos brasileiros.

	Ac. Gálico (mg L⁻¹)	Caféico (mg L⁻¹)	Cumárico (mg L⁻¹)	Quercetina (mg L⁻¹)
Petit Shiraz	13,76±0,19	4,26±0,04	4,35±0,31	5,97±0,08
Cabernet Sauvignon 1	12,94±0,56	4,94±0,08	4,33±0,09	6,27±0,07
Ruby Cabernet	11,29±0,36	4,69±0,13	5,06±0,13	6,39±0,09
Tannat	9,03±0,35	3,59±0,09	3,58±0,08	6,95±0,61
Cabernet Sauvignon 2	6,65±0,36	4,13±0,46	2,88±0,17	5,26±0,18
Shiraz	11,29±0,71	5,10±0,22	4,40±0,16	6,02±0,12
Cabernet Sauvignon Shiraz 1	43,92±0,51	10,00±0,21	6,87±0,18	9,56 ±0,76
Cabernet Sauvignon 3	38,31±0,41	8,79±0,11	5,63±0,81	9,13±0,75
Cabernet Sauvignon 4	30,98±0,84	8,52±0,59	7,83±0,12	10,22±0,81
Cabernet Sauvignon Shiraz 2	33,33±1,05	10,45±0,54	7,47±0,15	9,99±0,32

18. Aplicação

As amostras de vinhos elaborados no vale do São Francisco, apresentaram concentrações de ácido gálico de 6,65 a 43,92 mg L⁻¹, p-cumárico de 3,58 a 7,83 mg L⁻¹, ácido caféico de 3,59 a 10,45 mg L⁻¹, quercetina de 5,26 a 10,22 mg L⁻¹ (Tabela 27). Na literatura são reportados alguns dados referentes à concentração de ácido gálico, ácido caféico, ácido cumárico e quercetina encontrados em vinhos elaborados em varias regiões.

Minuti e Pellegrino encontraram concentrações de ácido gálico na faixa de 33,78 a 104,82 mg L⁻¹; de 0,24 a 4,10 mg L⁻¹ para ácido caféico; 0,30 a 3,39 mg L⁻¹ para ácido p-cumárico e quercetina variando de 0,03 a 0,98 mg L⁻¹ em vinhos tintos [146]. Para vinhos produzidos na Hungria os valores de concentração variaram de 29,7 a 79,2 mg L⁻¹ para ácido gálico; de 23,3 a 30,8 mg L⁻¹ para ácido caféico; de 0,4 a 8,9 mg L⁻¹ para p-ácido cumárico e variando de 5,80 a 13,40 mg L⁻¹ [130].

Capítulo XI

19. Avaliação do conteúdo de ácidos orgânicos em vinhos produzidos na Região do Vale do São Francisco - Bahia/Pernambuco.

Os ácidos orgânicos influem na estabilidade físico-química e microbiológica do vinho e também nas propriedades sensoriais como cor e sabor. A determinação destes ácidos é, portanto, importante no monitoramento dos processos de fermentação e no controle de qualidade de vinhos.

Freqüentemente os vinhos são produzidos em duas etapas ou duas fermentações sucessivas. A primeira, a fermentação alcoólica, é realizada com leveduras, e a segunda, a fermentação malolática, que envolve a conversão do ácido málico em láctico e dióxido de carbono (CO₂), por bactérias lácticas.

Em vinhos, existe uma diferenciação entre os ácidos provenientes da uva (tartárico, málico, cítrico) e ácidos que se originam no processo de fermentação (succínico, acético e láctico). O controle dos ácidos orgânicos, portanto, possibilita um acompanhamento de etapas importantes na produção de vinho, como processos de fermentação alcoólica e malolática e processos ligados ao envelhecimento de vinhos. O teor de ácidos orgânicos ainda podem ser considerados decisivos no controle de adulteração dos vinhos. A presença ou a ausência de alguns destes ácidos orgânicos estão ligados, como foi comentado anteriormente, as propriedades organolépticas do vinho.

O ácido málico é responsável pelo sabor de bebida verde, e pela aspereza. Concentra-se principalmente na maturação das uvas e durante a vinificação. Deve ocorrer em teores médios nos vinhos brancos e menos perceptíveis nos tintos. O ácido cítrico atua diretamente na fermentação alcoólica e na reação malolática, quando o ácido málico é convertido em ácido láctico. Pode atrair bactérias lácticas de alteração indesejada e bactérias acéticas. Os ácidos são determinados para definir, com os açúcares, o momento preciso da vendimia. Apontam a evolução do líquido ao longo de sua vida útil. Os tipos de acidez são vinculados aos ácidos da uva e volatilidade, proveniente da fermentação. Neste trabalho foram analisadas 10 amostras de vinhos produzidos no Vale do São Francisco – Bahia/Pernambuco de diferentes variedades de uvas: Shyraz, Cabernet Sauvignon, Cabernet Sauvignon/Shyraz Shyraz, Tanat, Petty Shyraz, utilizando o método cromatográfico com detecção por condutividade, desenvolvido por Guillén [147].

19.1.1 Parte Experimental

19.2 HPLC com detector de condutividade

Para a determinação dos ácidos orgânicos utilizou-se um HPLC com duas bombas modelo LKB 2150 e injetor automático (Waters, Milford, MA, USA), detector de condutividade modelo Conductomonitor III de procedência (Milton Roy, LDC, Florida, USA) e um forno para colunas modelo 2155 columns da Pharmacia. A coluna utilizada foi ION-300 de exclusão de íon, cujas dimensões são 300 mm x 4,6 mm (San José, CA, USA). A temperatura do forno foi fixada em 60°C. A Fase Móvel foi composta por dois tipos de solvente (A e B), o solvente A composto por ácido trifluoroacético (TFA) $2,5 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$, o solvente B composto por uma mistura de TFA ($2,5 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$), tampão bis-tris ($0,1 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$) e EDTA, com um fluxo de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$.

20. Determinação de ácidos orgânicos em vinhos

Na tabela 28 estão indicadas as equações das curvas analíticas utilizadas para a determinação dos ácidos orgânicos em vinhos e os respectivos coeficientes de correlação linear e na Figura 54 é apresentado o cromatograma das amostras.

Tabela 28. Curvas analíticas utilizadas para a quantificação dos ácidos orgânicos em vinhos brasileiros produzidos na região do Vale do São Francisco, por HPLC, e seus respectivos coeficientes de correlação

Analito	Curvas analíticas	Coefficiente de correlação
Ácido cítrico	$S = 4,57C + 36,88$	0,999
Ácido tartárico	$S = 210,13C - 1083,60$	0,999
Ácido málico	$S = 199,33C + 1634,30$	0,999
Ácido succínico	$S = 223,64C - 122,33$	0,999
Ácido láctico	$S = 68,401C + 491,90$	0,997
Ácido fórmico	$S = 289,44C + 562,86$	0,999
Ácido acético	$S = 175,11C + 2991,40$	0,999

S: sinal C: concentração em (g L⁻¹)

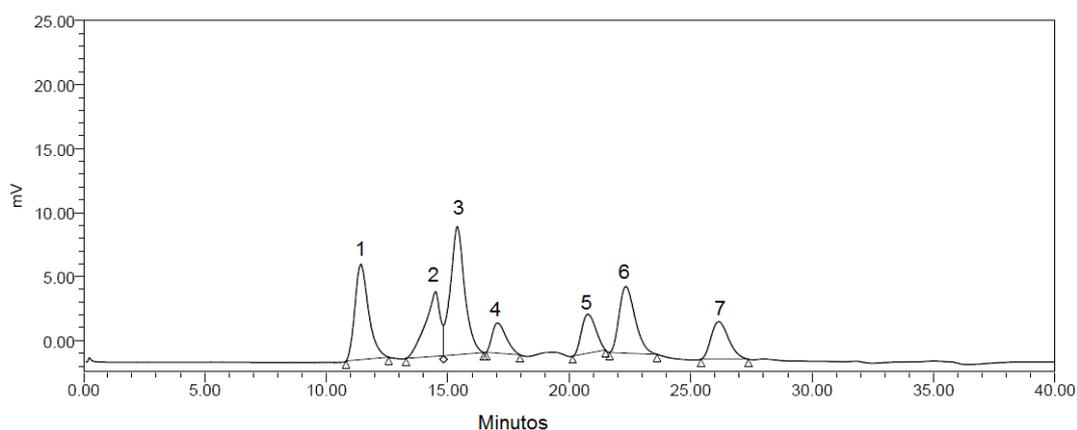


Figura 54. Cromatograma de uma amostra de vinho Cabernet Sauvignon Shiraz. Picos: 1. ácido cítrico; 2. ácido tartárico; 3. ácido málico; 4. ácido succínico; 5. ácido láctico; 6. ácido fórmico; 7. ácido acético.

Tabela 29. teores de ácidos láctico, málico, cítrico, ácido tartárico, acético, fórmico e succínico (g L^{-1}) encontrados em vinhos elaborados no Vale do São Francisco.

	Cabernet Sauvignon	Petit Shiraz	Shiraz
cítrico	65,38±1,90	29,71±2,07	53,22±0,56
tartárico	0,78±0,01	0,78±0,21	0,53±0,03
málico	1,82±0,04	1,83±0,60	1,77±0,13
succínico	0,12±0,02	0,41±0,30	0,12±0,01
láctico	1,94±0,02	5,73±0,84	2,28±0,14
fórmico	0,86±0,013	0,27±0,06	1,05±0,07
acético	0,57±0,09	0,12±0,01	0,64±0,06

Tabela 30. teores de ácidos láctico, málico, cítrico, ácido tartárico, acético, fórmico e succínico (g L^{-1})

	Shiraz	Cabernet Sauvignon Shiraz 1	Cabernet Sauvignon Shiraz 2	Chenin Blanc moscato Canelli
cítrico	40,33±0,03	49,60±0,06	56,67 ± 0,14	30,72 ± 0,30
tartárico	0,67±0,05	0,58±0,65	0,76 ± 0,02	0,48 ± 0,01
málico	2,08±0,05	2,13±0,03	1,80 ± 0,04	1,52 ± 0,04
succínico	1,80±0,02	0,18±0,01	0,28 ± 0,02	2,02 ± 0,02
láctico	1,07±0,02	2,00±0,05	1,51 ± 0,02	1,57 ± 0,03
fórmico	0,26±0,01	0,62±0,01	0,73 ± 0,01	0,28 ± 0,01
acético	0,36±0,02	0,45±0,01	0,62 ± 0,01	0,36 ± 0,01

O ácido tartárico é o principal da uva e do vinho. É o mais forte, define o pH e dá maior resistência ao ataque bacteriano. A partir da análise das Tabelas 29 e 30, pode-se perceber que o ácido cítrico está em alta concentração seguido dos ácidos málico e tartárico. As concentrações destes três compostos tem uma influência muito grande no pH do vinho e no sabor ácido do mesmo. Porém além do sabor ácido irritante e corrosivo “vinho agressivo”, o vinho apresentará um sabor levemente metálico se o teor de ácido tartárico for dominante, um sabor de vegetais verdes e

certa adstringência, se o vinho apresentar uma maior concentração de ácido málico, porém de acordo com os valores de concentração encontrados nos vinhos analisados, os mesmos devem apresentar um sabor mais acidulado, pois o teor de ácido cítrico supera os teores de tartárico e málico. O ácido cítrico por sua vez aporta ao vinho sensações agradáveis, frutais aromáticas e muito vivas, porém junto ao ácido láctico ambos em alta concentração pode favorecer a atividade microbológica conferindo ao vinho aroma e sabor acetilado.

A presença do ácido acético e do ácido láctico é proveniente das fermentações alcoólicas e maloláticas e confere ao vinho um sabor agrio, é importante ressaltar que concentrações muito altas destes dois compostos podem indicar alterações na qualidade do vinho, principalmente devido ao ataque de bactérias lácticas. As altas concentrações de ácido succínico nos vinhos rose e branco, atribui aos mesmos um sabor mais amargo e salgado.

O perfil de ácidos orgânicos é uma importante informação no combate a fraude dos vinhos, além de possibilitar um controle no processo fermentativo conferindo uma boa qualidade ao produto final. Os vinhos do vale do São Francisco apresentam altos teores de ácido cítrico e tartárico.

21. Conclusão

O método de extração líquido-líquido assistido por ultrassom, desenvolvido e a determinação por GC MS, para a determinação de: quercetina, ácido gálico, resveratrol, malvidina, catequina, apresentou elevada sensibilidade, seletividade e pode portanto ser utilizado para monitorar compostos fenólicos em vinhos. As amostras de vinhos produzidos no vale do São Francisco, apresentaram concentração de Quercetina variando de 2,40 a 3,00 mg L⁻¹, ácido gálico de 21,40 a 56,30 mg L⁻¹, resveratrol 1,50 a 5,90 mg L⁻¹, malvidina 15,30 a 32,20 mg L⁻¹, catequina 0,40 a 18,20 mg L⁻¹.

O método de HPLC com detector de fluorescência, desenvolvido para a determinação direta de: catequina e epicatequinas apresentaram excelente seletividade, sensibilidade e pôde ser aplicada as amostras de vinho tintos. As concentrações variaram de 7,51 a 73,20 mg L⁻¹ para catequina e epicatequina, respectivamente. Este mesmo método foi utilizado para a determinação direta de ácido gálico, Hidroximetil furfural, ácido vanílico, ácido caféico, ácido p-Cumárico, ácido ferulico, ácidos cafeoil tartárico (cafárico), p-cumaroil tartárico (cutárico) e feruloil tartárico (fertárico) e apresentou bons limites de detecção e quantificação. Além de possibilitar de forma simples e rápida a determinação de vários compostos fenólicos em uma única corrida cromatográfica. A concentração de ácido gálico variou de 3,73 a 103,50 mg L⁻¹, Hidroximetil furfural de 0,59 a 8,83 mg L⁻¹, ácido vanílico de 2,90 a 11,57 mg L⁻¹, ácido cafeico de 4,20 a 14,20 mg L⁻¹, ácido p-Cumárico de 0,26 a 12,46 mg L⁻¹, ácido ferúlico de 0,31 a 3,97 mg L⁻¹, ácido caftárico variou de 13,28 a 46,83 mg L⁻¹, *cis*-cutárico de 1,01 a 2,13 mg L⁻¹, *trans*-cutárico de 2,13 a 17,56 mg L⁻¹, fertárico de 1,11 a 2,43 mg L⁻¹, ácido p-Cumárico de 0,26 a 12,46 mg L⁻¹.

Foi desenvolvido um método por eletroforese capilar e extração líquido-líquido, para a determinação de compostos fenólicos em vinhos tintos, que é simples,

versátil, de baixo custo e apresenta baixos limites de detecção e quantificação. As amostras de vinhos, apresentaram concentração de quercetina variando de 1,68 a 4,03 mg L⁻¹, caempferol de 2,48 a 4,33 mg L⁻¹, ácido gálico de 15,77 a 41,74 mg L⁻¹, siríngico de 5,73 a 13,05 mg L⁻¹, cafeico de 5,18 a 13,16 mg L⁻¹, mirecetina de 7,52 a 25,13 mg L⁻¹.

O método desenvolvido utilizando extração em fase sólida, acoplada a um sistema automático e robotizado e separação por cromatografia líquida de ultra eficiência e detecção por arranjo de diodos, possibilitou a separação de oito antocianinas em vinhos tintos. A concentração para Delfinidina -3-O glicosídeo variou de 0,26 a 57,61 mg L⁻¹, Cianidina-3-O glicosídeo de 0,17a 207,45 mg L⁻¹, Peonidina-3-O glicosídeo de 0,19 a 2,88 mg L⁻¹, malvidina-3-O-glicosídeo de 1,05 a 11,97 mg L⁻¹, Cianidina-3-O-p-cumaroilglicosídeo de 0,26 a 3,83 mg L⁻¹, a Peonidina-3-O-acetilglicosídeo foi encontrada em uma única amostra e sua concentração foi de 11,10 mg L⁻¹, o teor de malvidina-3-O-acetilglicosídeo variou de 0,23 a 64,96 mg L⁻¹, malvidina-3-O-cafeoilglicosídeo variou de 0,35 a 2,82 mg L⁻¹.

O método desenvolvido utilizando extração líquido-líquido assistida por ultrassom e determinação por HPLC DAD MS de: ácido gálico, cumárico, cafeico e quercetina, apresentou, elevada sensibilidade, seletividade, pode ser utilizado para a identificação e quantificação dos analitos anteriormente citados, em vinhos. As amostras de vinhos produzidos no vale do São Francisco apresentaram concentrações variando (ácido gálico) de 6,65 a 43,92 mg L⁻¹, (cumárico) de 3,58 a 7,83 mg L⁻¹, (caféico) de 3,59 a 10,45 mg L⁻¹, quercetina de 5,26 a 10,22 mg L⁻¹.

O perfil de ácidos orgânicos é uma importante informação no combate a fraude dos vinhos, além de possibilitar um controle no processo fermentativo conferindo uma boa qualidade ao produto final. As amostras de vinhos do vale do São Francisco analisadas, apresentaram altos teores de ácido cítrico e tartarico.

A grande variação dos dados analíticos referente aos compostos fenólicos encontrados nos vinho brasileiros produzidos no Vale do São Francisco, pode ser explicada, em partes, devida a variação que é natural, no que se diz respeito à composição de polifenóis presentes em uvas e vinhos, que é muito complexa, além

do fato desta composição química estar intimamente ligada com a origem das uvas, tipo de solo, clima, região onde são cultivadas estas uvas e o tipo de tratamento pelos quais estas são submetidas durante o processo de produção e conservação do vinho.

Referências

-
- [1] GAULEJAC, N SAINT-C., GLORIES, YVES., VIVAS N. **Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines**, Food Research International,32, p.327-333 ,1999.
- [2] TSAO, R., YANG, R., XIE, S., SOCKOVIE, E., KHANIZADEH, S. **Which Polyphenolic Compounds Contribute to the Total Antioxidant Activities of Apple?** , Journal Agriculture Food Chemistry, 53, p.4989-4995, 2005.
- [3] http://www.sban.com.br/educacao/nutrire/28/nut28_8.htm, acessado em 11/12/2005 as 13:15
- [4] FRANKEL, E. N., WATERHOUSE, A. L., TEISSEDRE, P. L., **Principal phenolic phytochemicals in selected california wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins**, Journal Agriculture Food Chemistry, 43, p. 890-894, 1995.
- [5] MAYER, A. S., HEINOMEN, M., FRANKEL, E. N., **Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin and ellagic acid on human DLD oxidation**, Food Chemistry, 61, p. 71-75, 1998.
- [6] CHAN, M. M-Y., MATTIACCI, J. A.; HWAGANG, H. S., SHAH, A., **Fong, D., Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway**, Biochemistry Pharmacology, 60, p. 1539-1548, 2000.
- [7] FAUSTINO, R. S., SOBRATTEE, S., EDEL, A. L., PIERCE, G. N., **Comparative analysis of the phenolic content of selected Chilean, Canadian and American Merlot red wines**, Molecular and Cellular Biochemistry, 249, p. 11-19, 2003.
- [8] SOUTO, A. A., CARNEIRO, M. C., SEFERIN, M., SENNA, M. J. H., CONZ, A., GOBBI, K.,. **Determination of *trans*-resveratrol concentrations in Brazilian red wines by HPLC**. Journal of Food Composition and Analysis, 14, p.441-445, 2001
- [9] MINUSSI, R. C., ROSSI, M., BOLOGNA, L., CORDI, L., ROTILIO, D., PASTORE, G.M., DURÁN, N., **Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines**. Food Chemistry, 82, p.409-416, 2003.
- [10]...(http://www.sitedovinhobrasileiro.com.br/folha.php?pag=mostra_regiao.php&numero=VSF)

-
- [11] MAXWELL, S., CRUICKSHANK, THORPE, A., G., **Red wine and antioxidant activity in serum.** Lancet 344 p.193-194, 1994.
- [12] TEISSEDRE P.L., FRANKEL E.N., WATERHOUSE A.L., PELEG H., GERMAN J.B., **Inhibition in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines,** Journal of the Science of Food and Agriculture,70, p. 55-61,1996.
- [13] SIMONETTI, P.; PIETTA, P.; TESTOLIN, G., **Polyphenol Content and Total Antioxidant Potential of Selected Italian Wines,** Journal Agriculture Food Chemistry, 45, p.1152–1155, 1997.
- [14] GHISELLI A, NARDINI M, BALDI A, SCACCINI C. **Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated from an Italian Red Wine,** Journal Agriculture Food Chemistry, 46, p.361-367,1998.
- [15] PELLEGRINI N., SIMONETTI P., GARDANA C., BRENNA O., BRIGHENTI F. AND PIETTA P., **Polyphenol content and total antioxidant activity of vini novelli(young red wines)** . Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, p. 732–735, 2000.
- [16] SÁNCHEZ-MORENO C., LARRAURI J.A. AND SAURA-CALIXTO F. **Free radical scavenging capacity of selected red, rosé and white wines** . Journal of the Science of Food and Agriculture, 79, p.1301–1304, 1999.
- [17] AKIYAMA, H., SAKUSHIMA, J., TANIUCHI, S., KANDA, T., YANAGIDA, A., KOJIMA, T., TESHIMA, R., KOBAYASHI, Y., GODA, Y., TOYODA, M. **“Antiallergic effect of apple polyphenols on the allegric model mouse”.** Biological and Pharmaceutical Bulletin, 23, p. 1370-73, 2000.
- [18] MORRÉ, D.M., MORRE, J.D., **“Anticancer activity of grape and grape skin extracts alone and combined with green tea infusion”.** Cancer Letters, 238, p. 202-9, 2006.
- [19] STOCLET, J.C. CHATAIGNEAU, T., NDIAYE, M., OAK, M. H., EL BEDOUI, J.; CHATAIGNEAU, M., SCHINIKERTH, V.B., **Vascular protection by dietary polyphenols,** European Journal Of Pharmacology, 299, p.1-3, 2004.
- [20] ROCHA, A. P. M.; CARVALHO, L. C. R. M.; SOUSA, M. A. V.; MADEIRA, S. V. F.; SOUSA, P. J. C.; TANO, T.; SCHINI-KERTH, V. B.; RESENDE, A. C.; SOARES DE MOURA, R. **Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açai) extracts in mesenteric vascular bed of the rat.** Vascular Pharmacology, 46 (2), p.97-104, 2007

-
- [21] ROBERFROID M.B., **Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose**, *Journal of Nutrition* ,129, p.1398S-401S, 1999.
- [22] KANNER J., FRANKEL, E., GRANIT, R., GERMAN, B., KINSELLA, J.E., **Natural Antioxidants in Grapes and Wines**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, p.64–69,1994.
- [23] RENAUD, S., LORGERIL, M., **Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease**. *Lancet* ,339, p.1523-1526,1992.
- [24] Frankel E., KANNER J., GERMAN J.B., PARKS E., KINSELLA J. E., **Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine**, *Lancet*, 341, p. 454-45, 1993.
- [25] SOMOZA V. (2005), **MAGIC-OL Resveratrol**, *Molecular Nutritional Food Research*, 2005, 49, 373 (**trocar**)
- [26] SINGLETON, V.L., **Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines, and Model Systems: Observations and Practical Implications** , *American Journal of Enology and Viticulture*,38, p. 69 -77,1987.
- [27] ABRIL, M., NEGUERUELA, A.I., PÉREZ, C., JUAN, T., ESTOPAÑÁN, G., **Preliminary study of resveratrol content in Aragon red and rose wines**, *Food Chemistry*, 92, p.729–736, 2005.
- [28] P. Jeandet , D. Chaudruc,B. Robillard, F.Peters, D. Tusseau, A. Conreux, B. Duteurte, *J. Inter. Des Sci. De La Vigne Et Du Vin.*, 40 (2006) 117. (**trocar**)
- [29] MCDONALD, M.S., HUGHES, M., BURNS, J., LEAN, M.E.J., MATTHEWS, D., CROZIER, A., CROZIER. **Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, p.368-375,1998.
- [30] PRINCE, S. F., BREEN, P. J., VALLADO, M., WATSON, B.T., **Cluster SunExposure and Quercetin in Pinot noir Grapes and Wine** , *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, p.187-194, 1995.
- [31] FRANKEL, E.N., WATERHOUSE, A.L., TEISSEDRE, P.L., **Principal phenolic phytochemical in selected California Wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins.**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, p. 890-894, 1995.
- [32] HARBORNE, J. B., WILLIAMS, C. A., **“advances in flavonoid research since 1992”**. *Phytochemistry*, 55, p.481-504, 2000.

-
- [33] JACKSON, R., Chemical Constituents of grapes. In: WINE science: principles and applications. London: Academic Press, 1994.
- [34] RIVAS-GONZALO, J.C., BRAVO-HARO, S. E., SANTOS-BUELGA, C., **Detection of compounds formed through the reaction of malvidin 3-monoglucoside and catechin in presence of acetaldehyde**, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, p.1444-1449, 1995.
- [35] TIMBERLAKE, C.F., BRIDLE, P., **Interactions between anthocyanins phenolic compounds and acetaldehyde and their significance in red wines. He efect of processing and other factors on the colour characteristics of some red wines**. American Journal of Enology and Viticulture ,27, p. 97-105, 1976a
- [36] TIMBERLAKE, C.F., BRIDLE, P., **The efect of processing and other factors on the colour characteristics of some red wines.***Vitis*, American Journal of Enology and Viticulture,15, p.37-49,1976b.
- [37] FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S., VILLAÑO, D., TRONCOSO, A.M., GARCÍA-PARRILLA, M.C., **Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity**, Analytica Chimica Acta, 563, pp. 101–108, 2006.
- [38] PERI, C., POMPEI, G., **An assay of different phenolic fractions in wines**, American Journal of Enology and Viticulture, 22, p.55–57, 1971.
- [39] GIL-MUÑOZ R., GÓMEZ-PLAZA E., MARTÍNEZ A., LÓPEZ-ROCA J.M., **Evolution of phenolic compounds during wine fermentation and post-fermentation: influence of grape temperature**. Journal of Food Composition and Analysis, 12, p. 259-272, 1999.
- [41] VITRAC, X., MONTI, J.P., VERCAUTEREN, J., DEFFIEUX, G., MERILLON, J.M., **Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection**, Analytica Chimica Acta, 458, p.103-110, 2002.
- [42] CASTELLARI, M., SARTINI, E., FAGIANI, A., ARFELLI, G., ARMATI, A., **Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column**, Journal of Chromatography A , 973, p. 221-227, 2002.
- [43] ARNOUS, A., MAKRIS, D.P., KEFALAS, P., **Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant Characteristics of Aged Red Wines**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, p.5736-5742, 2001.

-
- [44] BRENNA, O.V., PAGLIARINI, E., **Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, p. 4841-4844, 2001
- [45] CZYZOWSKA, A., POGORZELSKI, E., **Changes to polyphenols in the process of production of must and wines from blackcurrants and cherries. Part II. Anthocyanins and flavanols**, *European Food Research and Technology*, 218, p.355–359, 2004.
- [46] COSTIN, J. W., BARNETT, N. W., LEWIS, S. W., MCGILLIVERY, D. J., **Monitoring the total phenolic/antioxidant levels in wine using flow injection analysis with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection.** *Analytica Chimica Acta*, 499, 47–56, 2003.
- [47] VIÑAS, P., LÓPEZ-ERROZ, C. J., MARÍN-HERNÁNDEZ, J., HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M., **Determination of phenols in wine by liquid chromatography with photodiode and fluorescence detection**, *Journal of Chromatography A*, 871, p.85-93, 2000.
- [48] RODRIGUEZ-DELGADO, M. A., MALOVANA, S., PEREZ, J. P., BORGES, T., MONTELONGO, F. J. G., **Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection.** *Journal of Chromatography A*, 912, p.249–257, 2001.
- [49] BOCCHI C., CARERI M., GROPPI F., MANGIA A.; MANINI P., MORI G., **Comparative investigation of UV, electrochemical and particle beam mass spectrometric detection for the high-performance liquid chromatographic determination of benzoic and cinnamic acids and of their corresponding phenolic acids**, *Journal of Chromatography A* 753 (14), p.157-170, 1996.
- [50] KOLOUCHOVÁ-HONZLÍKOVÁ, I., MELZUCH, K., FILIP, V., SMIDRKAL, J., **Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines**, *Food Chemistry*, 87 151-158, 2004.
- [51] FLAMINI, R., **Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: polyphenols.** *Mass Spectrometry Reviews*, 22, p.218-250, 2003.
- [52] ARCE, L., RÍOS A., TENA, M. T., VALCÁRCEL, M., J., **Determination of trans-resveratrol and other polyphenols in wines by a continuous flow sample clean-**

up system followed by a capillary electrophoresis separation, *Analytica Chimica Acta*, 359, (1-2), p.27-38, 1998.

[53] SÁENZ-LÓPEZ, R., FERNÁNDEZ-ZURBANO, P., TENA, M.T., *J Chromatography A*; **Analysis of aged red wine pigments by capillary zone electrophoresis**, 1052, p.191-197, 2004.

[54] P. Vendar, B. Papouskova, L. Müller, P. Bartak, J. Stavek, P. Pavloušek, K. Lemr, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1291.

[55] WATANABE, A.T., YAMAMOTO, A., NAGAI, S., TERABE, S., **Micellar electrokinetic chromatography as an alternative to high-performance liquid chromatography for separation and determination of phenolic compounds in Japanese spirituous liquor**, *Journal of Chromatography A*, 793, p. 409-413, 1998.

[56] LEANDRO CRISTIANA C; HANCOCK PETER; FUSSELL RICHARD J; KEELY BRENDAN J **Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole mass spectrometry**. *Journal of chromatography. A*, 1103 (1), p.94-101, 2006.

[57] HURCHWELL MONA I; TWADDLE NATHAN C; MEEKER LARRY R; DOERGE DANIEL R **Improving LC-MS sensitivity through increases in chromatographic performance: comparisons of UPLC -ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS**. *Journal of chromatography. B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 825(2), p.134-43, 2005.

[58] De Brouwer, Veerle; Storozhenko, Sergei; Stove, Christophe P.; Van Daele, Jeroen; Van Der Straeten, Dominique; Lambert, Willy E. **Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC -MS/MS) for the sensitive determination of folates in rice**. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* (2010), 878(3-4), 509-513.

[59] MALOVANA, S., MONTELONGO, F.J.G., PEREZ, J.P., RODRIGUEZ-DELGADO, M.A., **Optimisation of sample preparation for the determination of trans-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography**, *Analytica Chimica Acta*, 428, p.245–253, 2001.

[60] Preys, S., Mazerolles, G., Courcoux, P., Samson, A., Fischer, U., Hanafi, M., Bertrand, D., Cheynier, V., **Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses**, *Analytica Chimica Acta*, 563, p.126–136, 2006.

[61] ALCALDE-EON C., ESCRIBANO-BAILÓN M.T., SANTOS-BUELGA C., RIVAS-GONZALO J.C., **Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing. A comprehensive study**. *Analytica Chimica Acta*, 563, p.238-54, 2006.

[62] DOMINGUEZ D., GUINLLÉN DA, BARROSO C G. **Automated solid-phase extraction for sample preparation followed by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for analysis of resveratrol derivatives in wine.**, *Journal of Chromatography A*, 918, p.303-310, 2000.

[63] Rudnitskaya, A.; Rocha, S. M.; Legin, A.; Pereira, V.; Marques, J. C. **Evaluation of the feasibility of the electronic tongue as a rapid analytical tool for wine age prediction and quantification of the organic acids and phenolic compounds. The case-study of Madeira wine.** *Analytica Chimica Acta* (2010), 662(1), 82-89.

[64] Bonerz, Daniel P. M.; Nikfardjam, Martin S. Pour; Creasy, Glen L. **A new RP-HPLC method for analysis of polyphenols, anthocyanins, and indole-3-acetic acid in wine.** *American Journal of Enology and Viticulture* (2008), 59(1), 106-109

[65] Hamoudova, Rafifa; Urbanek, Marek; Pospisilova, Marie; Polasek, Miroslav. **Assay of phenolic compounds in red wine by on-line combination of capillary isotachopheresis with capillary zone electrophoresis.** *Journal of Chromatography, A* (2004), 1032(1-2), 281-287.

[66] Garcia-Viguera, Cristina; Bridle, Peter. **Analysis of non-colored phenolic compounds in red wines. A comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis.** *Food Chemistry* (1995), 54(4), 349-52.

[67] CARERI, M., CORRADINI, C., ELVIRI, L., NICOLETTI, I., ZAGNONI, I., **Evaluation of a RP-HPLC method using isocratic elution and diode array detection for analyzing quercetin and trans-resveratrol in red wine, grape and**

winemaking byproducts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, p.5226–523, 2003.

[68] RATOLA; N., FARIA; J. L., ALVES, A., “**Analysis and Quantification of trans-resveratrol in wines from Alentejo Region (Portugal)**”, Food Technology & Biotechnology, 42 (2), p.125-130, 2004.

[69] GUADALUPE, Z., SOLDEVILLA, A., SÁENZ-NAVAJAS, M.P., AYESTARÁN, B., J., **Analysis of polymeric phenolics in red wines using different techniques combined with gel permeation chromatography fractionation.** Journal of Chromatography A, 1112 (1-2), 112-120, 2006.

[70] GÜRBÜZ, O., GÖÇMEN, D., DAGDELEN, F., GÜRSOY, M., AYDIN, S., ŞAHİN, İ., BÜYÜKUYSAL, L., USTA, M., **Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection,** Food Chemistry, 100, p.518-525, 2007.

[71] DOMÍNGUEZ, C., GUILLÉN, D. A., BARROSO, C. G., **Automated solid-phase extraction for sample preparation followed by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for the analysis of resveratrol derivatives in wine,** Journal of Chromatography A, 918, p.303-310,2001.

[72] GOLDBERG, D. M., NG, E., KARUMANCHIRI, A., YAN, J., DIAMANDIS, E. P., SOLEAS, G. J., **Assay of resveratrol glucosides and isomers in wine by direct-injection high-performance liquid chromatography,** Journal of Chromatography A, 708,p.89-98,1995.

[73] REVILLA, E., RYAN,. J.M., **Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation.** Journal of Chromatography A, 881,461-469, 2000.

[74] VIAN M. A., TOMAO, V., GALLET, S., COULOMB, P.O., LACOMBE, J.M., **Simple and rapid method for cis- and trans-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns ,** Journal of Chromatography A, 1085, p.224-229, 2005.

[75] SLADKOVSKÝ, R., SOLICH, P., URBÁNEK, M., **High-performance liquid chromatography determination of phenolic components in wine using off-line isotachophoretic pretreatment,** Journal of Chromatography A, 1040, p.179-184, 2004.

-
- [76] MATEUS, N., OLIVEIRA, J., PISSARRA, J., GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M., RIVAS-GONZALO, J. C., SANTOS-BUELGA, C., SILVA, A.M.S., de Freitas, V., **A new vinylpyranoanthocyanin pigment occurring in aged red wine**, Food Chemistry, 97, p.689-695, 2006.
- [77] HERNÁNDEZ, T., ESTRELLA, I., CARLAVILLA, D., MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J., MORENO-ARRIBAS, M. V., **Phenolic compounds in red wine subjected to industrial malolactic fermentation and ageing on lees**, Analytica Chimica Acta, 563, p.116–125, 2006.
- [78] SANZA, M. DEL A., NEVARES D. I., **Wine aging in bottle from artificial systems (staves and chips) and oak woods: Anthocyanin composition**, Analytica Chimica Acta, 563, p.255-263, 2006.
- [79] MORENO-LABANDA, J. F., MALLAVIA, R., PEÑA REZ-FONS, L., LIZAMA, V., SAURA, D., MICOL, V., **Determination of piceid and resveratrol in Spanish wines deriving from *Monastrell (Vitis vinifera L.)* grape variety**, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, p. 5396-5403, 2004.
- [80] PALMA, M., BARROSO, C. G., PÉREZ-BUSTAMANTE J. A., **Evaluation of similarities between natural and accelerated browning of fino sherry wines by chemometric techniques**, Analyst, 125, p.1151–1154, 2000.
- [81] RODRÍGUEZ-DELGADO, M.A., GONZÁLEZ, G., PÉREZ-TRUJILLO, J.P., GARCÍA-MONTELONGO F.J., ***Trans*-resveratrol in wines from the Canary Islands (Spain). Analysis by high performance liquid chromatography**, Food Chemistry 76, p.371-375, 2002.
- [82] Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., Schieber, A., **Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera L.*) by HPLC-DAD-MS/MS**, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, p.4360-4367, 2004.
- [83] CABRITA, M.J., TORRES, M., PALMA, V., ALVES, E., PATÃO, R., COSTA FREITAS, A.M., **Impact of Malolactic Fermentation on Low Molecular Weight Phenolic Compounds**, Talanta, 74, p.1281–1286, 2008.
- [84] LA TORRE, G. L., SAIITA, M., VILASI, F., PELLICANÓ, T., DUGO, G., **Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection**, Food Chemistry, 94, p.640-650, 2006.

[85] KOZLOVIC, G., JEROMEL, A., MASLOV, L., POLLNITZ, A. ORLIC, S., **Use of acacia barrique barrels - Influence on the quality of Malvazija from Istria wines.** Food Chemistry ,120 (3), p.698-702, 2010.

[86] OBREQUE-SLIER, E., PENA-NEIRA, A., LOPEZ-SOLIS, R., RAMIREZ-ESCUADERO, C., ZAMORA-MARIN, F., **Phenolic characterization of commercial enological tannins.** European Food Research and Technology, 229 (6), p.859-866, 2009.

[87] NUENGCHAMNONG, N., INGKANINAN, K., **On-line HPLC-MS-DPPH assay for the analysis of phenolic antioxidant compounds in fruit wine : Antidesma thwaitesianum Muell.** Food Chemistry, 2010, 118 (1), p.147-152 (2009).

[88] Rodriguez-BERNALDO, Q., A., LAGE-YUSTY, M. A., LOPEZ-HERNANDEZ, J., **HPLC- analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay,** Food Research International 42 (8), p.1018-1022, 2009.

[89] WANG, S.P., HUANG, K.J., **Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis,** Journal of Chromatography A, 1032, p. 273-279, 2004.

[90] CHU, T.,Y., CHANG, C.H., LIAO, Y.C., CHEN, Y.C., **Microwave-accelerated derivatization processes for the determination of phenolic acids by gas chromatography–mass spectrometry,** Talanta, 54, p.1163 -1171, 2001.

[91] STECHER, G., HUCK, C. W., POPP, M., - BONN, G. K., **Determination of flavonoids and stilbenes in red wine and related biological products by HPLC and HPLC–ESI–MS–MS,** Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 371, p.73-80, 2001.

[92] Berli, Federico; D'Angelo, Jose; Cavagnaro, Bruno; Bottini, Ruben; Wuilloud, Rodolfo; Silva, M. Fernanda. **Phenolic Composition in Grape (Vitis vinifera L. cv. Malbec) Ripened with Different Solar UV-B Radiation Levels by Capillary Zone Electrophoresis.** Journal of Agricultural and Food Chemistry (2008), 56(9), 2892-2898.

[93] Rodriguez-Delgado, M. A.; Perez, M. L.; Corbella, R.; Gonzalez, G.; Montelongo, F. J. Garcia. **Optimization of the separation of phenolic compounds by micellar electrokinetic capillary chromatography.** Journal of Chromatography, A (2000), 871(1+2), 427-438.

[94] Huang, Hsi-Ya; Lien, Wei-Chih; Chiu, Chen-Wen. **Comparison of microemulsion electrokinetic chromatography and micellar electrokinetic chromatography methods for the analysis of phenolic compounds.** Journal of Separation Science (2005), 28(9-10), 973-981.

[95] Bier M, Ed. Electrophoresis, Theory, Methods and Applications. New York: Academic Press, Inc., 1959. p.225.

[96] Baker DR. Capillary Electrophoresis, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995.

[97] Grossman PD, Colburn JC. Capillary Electrophoresis Theory and Practice, Academic Press Inc., San Diego, CA, 1992.

[98] TERABE, S., OTSUKA, K., ICHIKAWA, K., TSUCHIYA, A., ANDO, T., **Eletrokinetic separations with micellar solutions and open tubular.** Analytical Chemistry, 56, p.111-3,1984.

[99] Rijke, E., OUT, P., NIESSEN, W. M.A, ARIESE, F., GOOIJER C., BRINKMAN, U ATH., **Analytical, separation and detection methods for flavonoids.** Journal of Chromatography A,1112, p.31-63, 2006.

[100] PIETTA, P.G., MAURI, P.L., ZINI, L., GARDANA, C., **Optimization of separation selectivity incapillary electrophoresis of flavonoids,** Journal of Chromatography A, 680, p.175-179,1994.

[101] ROBARDS, K., ANTOLOVICH, M., **Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids,** Analyst, 122, p.11R-34R, p.1997.

[102] Sáenz-López, R., Fernández-Zurbano, P., Tena, M.T., **Analysis of aged red wine pigments by capillary zone electrophoresis,** Journal of Chromatography A,1052, p.191-197 , 2004.

[103] ANDRADE, P., SEABRA, R., FERREIRA, M., FERRERES, F., GARCIA-VIGUERA, C., **Analysis of non-coloured phenolics in port wines by capillary zone electrophoresis.** Lebensm Z Unters Forsch A, 206, p.161-164, 1998.

[104] PRASONGSIDH B.C., SKURRAY G.,R., **Capillary electrophoresis analysis of trans- and cis cisresveratrol,quercetin, catechin and gallic acid in wine.** Food Chemistry ,62, p.355-358,1998.

[105] Nielsen, M. K. K., Johansen, S. S., Dalsgaard, P. W., Linnet, K., **Simultaneous screening and quantification of 52 common pharmaceuticals and drugs of abuse in hair using UPLC -TOF-MS.** Forensic Science International (2010), 196(1-3), 85-92.

[106] GRATACOS-CUBARSI, M.; RIBAS-AGUSTI, A.; GARCIA-REGUEIRO, J. A.; CASTELLARI, M. **Simultaneous evaluation of intact glucosinolates and phenolic compounds by UPLC -DAD-MS/MS in Brassica oleracea L. var. botrytis.** Food Chemistry, 121(1), p.257-263, 2010.

[107] BRATAN, A., MINCEA, M., LUPSA, I., OSTAFE, V., **An UPLC method for the assessment of nicotine and cotinine in urine.** Annals of West University of Timisoara, Series of Chemistry 18 (1), p. 93-102, 2009.

[108] De Brouwer, Veerle; Storozhenko, Sergei; Stove, Christophe P.; Van Daele, Jeroen; Van Der Straeten, Dominique; Lambert, Willy E. **Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC -MS/MS) for the sensitive determination of folates in rice.** Journal of Chromatography B, 878 (3-4), p.509-513, 2010.

[109] Huang, B., Han, Z., Cai, Z., Wu, Y., Ren, Y., **Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in peanuts and their derivative products by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Analytica Chimica Acta, 662 (1), p.62-68, 2010.

[110] GRUZ J., NOVÁK, O., STRNAD M., **Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC–MS/MS,** Food Chemistry, 111(3), p.789-794, 2008.

[111] BRU , E.R., BARROSO, C. G., CELA, R., PÉREZ-BUSTAMANTE, J.A., **Development of a rotatory and continuous liquid–liquid extraction technique for phenolic compounds in wine,** Analyst ,121, p. 297 – 302, 1996.

[112] ŽIAKOVÁ, A., BRANŠTETEROVÁ, E., **Application of different preparation techniques for extraction of phenolic antioxidants from lemon balm (Melissa**

officinalis) before HPLC analysis, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 25, p.3017-3032, 2002.

[113] GUILLEN, D.A., BARROSO, C.G., PÉREZ-BUSTAMANTE, J.A., **Automation of sample preparation as a preliminary stage in the high-performance liquid chromatographic determination of polyphenolic compounds in sherry wines**, Journal of Chromatography A,730, p.39-46, 1996.

[114] Chilla, C., GUILLEN, D.A., BARROSO, C.G., PEREZBUSTAMANTE, J.A., **Automated on-line-solid-phase extraction—high-performance liquid chromatography-diode array detection of phenolic compounds in sherry wine**, Journal of Chromatography A,750, 209-214, 1996.

[115] JAWORSKI, A.W., LEE, C.Y., **Fractionation and HPLC determination of grape phenolics**, Journal of Agricultural and Food Chemistry ,35, p.257–259,1987.

[116] OSZMIANSKI, J., RAMOS, T., BOURZEIX , M., **Fractionation of Phenolic Compounds in Red Wines**. American Journal of Enology and Viticulture, 39, p. 259-262,1988.

[117] GUILLEN, D.A., BARROSO, C.G., PEREZBUSTAMANTE, J.A., **High-performance liquid chromatographic analysis of polyphenolic compounds predominating in sherry musts**, Journal of Chromatography A, 655,p. 227–232, 1993.

[118] SAMANIDOU, V. F., ANTONIOU, C. V., PAPADOYANNIS, I. N., **Gradient RP-HPLC determination of the phenolic acids in wine vinegar samples after solid phase extraction with photodiode array detector identification**, Journal of Liquid Chromatography RT 24, p. 2161–2176, 2001.

[119] DOMINGUEZ, C., GUILLEN, D.A., BARROSO, C. G., **Determination of volatile phenols in fino sherry wines**, Analytica Chimica Acta, 458, p. 95-102, 2002.

[120] European Commission; Guidance document on residue Analytical methods, SANCO/825/00, 2000.

[121] RIBANI, M, BOTTOLI, C.B.G., COLLINS C.H., JARDIM, I.C.S.F., MELO, L.F.C., **Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos**, Química Nova, 27, 771-780, 2004.

[122] PRICHARD, E., MACKAY, G.M, **Points J.T race analysis: a structured approach to obtaining reliable results**.The Royal Society of Chemistry, p.38, 1996.

[123] NUMANOĞLU, E., HAKKI BOYACI, İ., TOPCU, A., **Simple Determination of Histamine in Cheese by Capillary Electrophoresis with Diode Array Detection**, *Journal of Food and Drug Analysis*, 16 (6), p.74-80, 2008.

[124] Maria José do Canto Machado ; M. A. Alves Ferreira (1997). *Números ou Resultados Analíticos: Qual a Fronteira* -. Estudos, Notas e Trabalhos, Tomo 39. Instituto Geológico e Mineiro. Versão **Online** no site do IGM (http://www.igm.pt/edicoes_online/estudos/tomo39/artigo8.htm).

[125] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

[126] La TORRE, G. L., SAITTA, M., VILASI, F., PELLICANÓ, T., DUGO, G., **Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection**, *Food Chemistry*,94, p.640–650, 2006.

[127] PERES, R. G., MICKE, G. A., TAVARES, M. F. M., Rodrigues-Amaya, D.B. , **Multivariate optimization, validation, and application of capillary electrophoresis for simultaneous determination of polyphenols and phenolic acids in wines**. *Journal of Separation Science*, 32, p. 3822-3828, 2009.

[128] PIÑEIRO, Z., PALMA, M., BARROSO, C. G., **Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids**, *Journal of Chromatography A*, 1026, p.19-23. ,2004.

[129] ALONSO, S. G., ROMERO, E. G., GUTIÉRREZ., I. H., **HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence**, *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, p. 618–626, 2007.

[130] NIKFARDJAM, M. S. P., MÁRK, L., AVAR, P., FIGLER, M., OHMACHT, R., **Polyphenols, anthocyanins, and trans-resveratrol in red wines from the Hungarian Villány region**, *Food Chemistry* ,98, p.453–462, 2006.

[131] TAROLA, A. M., GIANNETTI, V., **Determination by LC of Polyphenols in Italian Red Wine**, *Chromatographia*,65, p.367–371, 2007.

-
- [132] CARANDO, S., TEISSEDE, P.L., MARTINEZ, L. P., CABANIS, J.C., **Levels of Flavan-3-ols in French Wines**, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, p.4161–4166, 1999.
- [133] WORARATPHOKA, J., INTARAPICHETA, K. O., INDRAPICHATE., K., **Phenolic compounds and antioxidative properties of selected wines from the northeast of Thailand**, Food Chemistry, 104, p-1485-1490, 2007.
- [134] ÖZKAN, G. N., BAYDAR, G., **A direct RP-HPLC determination of phenolic compounds in Turkish red wines**, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 19(2), p.229-234, 2006.
- [135] DE QUIRÓS, A. R. B., YUSTY, M. A. L., HERNÁNDEZ, J. L., **HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay**, Food Research International, 42, p.1018–1022, 2009.
- [136] WANG, H., NAIR, M.G., STRASBURG, G.M., CHANG, Y-C., BOOREM A.M, GRAY, J.L., DEWITT, D.L., **“antioxidante and anti-inflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyaniding, from Tart Cherries”**. Journal of Natural Products, 62 (2), p.294-296,1999.
- [137] KAPADIA G. J., BALASUBRAMANIAN V., TOKUDA H., IWASHIMA, A., NISHINO, H., **Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced Epstein-Barr virus early antigen activation by natural colorants**. Cancer letters, 115 (2), p.173-178. 1997.
- [138] Goektuerk B. N., Ozkan, G., Sagdic, O., **Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (Vitis vinifera L.) extracts**. Food Control 15 (5), p.335-339, 2004.
- [139] Kang, Soo-Young; Seeram, Navindra P.; Nair, Muraleedharan G.; Bourquin, Leslie D. **Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in ApcMin mice and reduce proliferation of human colon cancer cells**. Cancer Letters, 194 (1), p.13-19, 2003.
- [140] CARBONE, V., MONTORO, P., DE TOMMASI, N., PIZZA, C., **Analysis of flavonoids from Cyclanthera pedata fruits by liquid chromatography**

/electrospray mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 34 (2), p.295-304, 2004.

[141] MORAIS, H., RAMOS, C., FORGACS, E., CSERHATI, T., MATOS, N., ALMEIDA, V., OLIVEIRA, J., **Stability of anthocyanins extracted from grape skins.** Chromatographia, 56, p. S173-S175, 2002.

[142] BAKKER, J., TIMBERLAKE, C. F., **The distribution of anthocyanins in grape skin extracts of port wine cultivars as determined by high performance liquid chromatography.** Journal of the Science of Food and Agriculture, 36, p.1315-1324, 1985.

[143] CASTIA, T., FRANCO, M. A., MATTIVI, F., MUGGLIOLU, G., SFERLAZZO, G., VERSINI, G., **Characterization of grapes cultivated in Sardinia: Chemometric methods applied to the anthocyanic fraction.** Sciences des Aliments, 12, p.239-255, 1992.

[144] REVILLA, E., GARCÍA-BENEYTEZ, E., CABELLO, F., MARTÍN-ORTEGA, G., RYAN, J. M., **Value of high-performance liquid chromatography analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them.** Journal of Chromatography A, 915, p.53-60, 2001.

[145] REVILLA, E., RYAN, J. M., MARTÍN-ORTEGA, G., **Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, p.4592-4597, 1998.

[146] MINUTI, L., PELLEGRINO, R., **Determination of phenolic compounds in wines by novel matrix solid-phase dispersion extraction and gas chromatography/mass spectrometry,** Journal of Chromatography A, 1185, p.23-30, 2008.

[147] GUILLÉN, D. A., BARROSO, C. G., ZORRO, L., CARRASCAL, V., PÉREZ-BUSTAMANTE, J. A., **Organic acids analysis in “Brandy de Jerez” ion-exclusion chromatography, “post-column” buffering, and conductometric detection.** Analisis, 26, p.186-189, 1998.