



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TAILÂNDIA MARACAJÁ CANUTO BELMIRO

**COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHOS TINTOS DA AMÉRICA DO SUL  
E DISTINÇÃO QUIMIOMÉTRICA**

RECIFE

2017

TAILÂNDIA MARACAJÁ CANUTO BELMIRO

**COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHOS TINTOS DA AMÉRICA DO SUL E  
DISTINÇÃO QUIMIOMÉTRICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Silveira Paim

RECIFE

2017

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Elaine Cristina de Freitas CRB4-1790

B451c Belmiro, Tailândia Maracajá Canuto  
Compostos fenólicos em vinhos tintos da América do Sul e distinção  
quimiométrica / Tailândia Maracajá Canuto Belmiro. – 2017.  
104 f.

Orientadora: Ana Paula Silveira Paim  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN.  
Química Fundamental. Recife, 2017.  
Inclui referências

1. Química Analítica 2. Polifenóis 3. Vinhos I. Paim, Ana Paula Silveira  
(Orientadora) II. Título.

543 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2018-22

**TAILÂNDIA MARACAJÁ CANUTO BELMIRO**

***COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHOS TINTOS DA AMÉRICA DO SUL  
E DISTINÇÃO QUIMIOMÉTRICA***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovado em: 29/05/2017

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa<sup>o</sup> Ana Paula Silveira Paim**

Departamento de Química Fundamental  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Profa<sup>o</sup> Fernanda de Araújo Honorato**

Departamento de Engenharia Química  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Profa<sup>o</sup> Maria José de Filgueiras Gomes**

Departamento de Química  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

**Prof<sup>o</sup> Ricardo Oliveira da Silva**

Departamento de Química Fundamental  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Prof<sup>o</sup> Giuliano Elias Pereira**

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

## AGRADECIMENTOS

*Por entender que vivemos em sociedade e precisamos uns dos outros em todas as fases da nossa vida. Essa dependência promove a unidade e permite que reconheçamos a importância de cada pessoa que Deus põe em nossos caminhos ao longo da vida, por isso agradeço...*

*A Deus, primeiramente, que me deu condições e permitiu que eu chegasse até aqui, proporcionando-me saúde, paz e segurança em todas as etapas da minha vida. Mesmo nos momentos mais difíceis, Ele esteve comigo; me consolou, me abraçou, renovou as minhas forças e sonhos, para que eu pudesse continuar a jornada da vida.*

*A meus pais, pelo incentivo e apoio durante toda a minha vida pessoal e profissional.*

*Aos meus irmãos e familiares, pela torcida do sucesso da minha vida profissional.*

*A meu esposo, Sebastião Belmiro, que sempre me deu força, me incentivou e sempre se dispôs a me ajudar, tanto na vida pessoal como na vida profissional.*

*À orientadora Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Silveira Paim, pela ajuda, apoio e orientação na realização deste e de outros trabalhos, e em diversos momentos da minha vida pessoal.*

*A Daniel Lopez Mallo pela disposição a me ensinar a operar o equipamento de cromatografia líquida.*

*A Jadson de Lira Oliveira pelo apoio para realizar a varredura dos analitos, no espectrômetro de absorção molecular.*

*Ao Prof. Dr. Severino Alves Júnior, por disponibilizar o espaço do BSTR para a realização das análises cromatográficas.*

*Ao prof. Dr. Ricardo Oliveira, por me orientar no estágio supervisionado II e pela presença frequente nos momentos de dúvidas sobre a cromatografia.*

*À Flávia, do departamento de Engenharia Química (DEQ), por me orientar no estágio supervisionado I em quimiometria.*

*À prof<sup>a</sup>. Dra. Claudete Fernandes, pela ajuda para escrever o artigo publicado no Microchemical Journal.*

*Ao prof. Dr. Fernando Hallwass, por me orientar no estágio à docência na disciplina de experimentos em cinética e eletroquímica.*

*A todos os professores, que ministraram as disciplinas que cursei durante o período do doutorado.*

*Aos alunos do BSTR, pela força, apoio e acolhimento.*

*Aos alunos do LIAAQ, pela ajuda, força e apoio e pelos momentos de confraternização que estivemos juntos.*

*Aos colegas dos demais laboratórios do DQF e da Central Analítica, pelo apoio pessoal e profissional no dia a dia.*

*Aos colegas aprovados na seleção 2011.2, pela força, união, apoio e boa convivência.*

*Aos secretários Maurílio Souza e Patrícia Santa Rosa, pelo apoio na secretaria e em alguns momentos da minha vida pessoal.*

*À capes pelo apoio financeiro para a execução deste e de outros trabalhos.*

*A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.*

*Sei estar abatido, e sei também ter abundância; em toda a maneira, e em todas as coisas estou instruído, tanto a ter fartura, como a ter fome; tanto a ter abundância, como a padecer necessidade. Posso todas as coisas em Cristo que me fortalece. Filipenses 4:12,13*

## RESUMO

Inicialmente, um método cromatográfico simples foi desenvolvido e validado por não se ter um método oficial para quantificar os polifenóis em geral. Os compostos fenólicos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção na região UV-Vis (HPLC/UV-Vis), empregando a eluição em gradiente. O método apresentou linearidade nas faixas de concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ): 0,4 - 22,0 (catequina e quercetina-3-glucosídeo); 0,2 - 9,0 (ácido gálico e epicatequina); 0,05 - 1,5 (miricetina, quercetina e resveratrol) e 0,025 - 0,3 (quempferol), com valores de coeficiente de correlação ( $r$ ) a partir de 0,9958. Os resultados de recuperação testados em dois níveis de concentração variaram de 82 a 110% para ácido gálico, catequina, epicatequina, quercetina-3-glucosídeo, miricetina, quercetina e resveratrol; e de 72 a 115% para quempferol. Os valores do desvio padrão relativo (DPR) variaram de 0,24 a 3,34% ( $n = 15$ ), os limites de detecção de 0,75 a 1,38  $\mu\text{g L}^{-1}$  e os limites de quantificação de 0,34 a 6,52  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A análise de agrupamentos (AA) foi empregada para encontrar grupos de vinhos com as mesmas características e verificaram-se três grupos homogêneos distintos. A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada de forma exploratória para investigar as diferenças entre os vinhos brasileiros e argentinos de acordo com o teor dos polifenóis individuais. Os vinhos tintos da Argentina apresentaram maior concentração de ácido gálico do que os do Brasil, provavelmente por dois motivos: pelo fato dos vinhos argentinos serem envelhecidos em barril de carvalho liberando ácido gálico durante o envelhecimento e por seguirem, preferencialmente, a rota biossintética fenilalanina  $\rightarrow$  ácido cinâmico  $\rightarrow$  ácido benzóico  $\rightarrow$  derivados de ácidos benzóicos (por exemplo, ácido gálico). Por outro lado, as amostras de vinho da variedade Syrah do Vale do São Francisco, apresentaram maiores concentrações de (+)-catequina, quercetina-3-glicosídeo e resveratrol do que os vinhos da Argentina, sugerindo uma adaptação satisfatória desta variedade no “terroir” do Nordeste do Brasil.

**Palavras chave:** Vinho. Polifenóis. Ácido gálico. HPLC. Vale do São Francisco.

## ABSTRACT

Initially a simple chromatographic method was developed and validated because there is no official method to quantify phenolic compounds in general. The phenolic compounds were analyzed by HPLC-UV/Vis using gradient elution. The method was linear in the ranges ( $\text{mg L}^{-1}$ ): 0.4 to 22.0 (catechin and quercetin-3-glucoside); 0.2 to 9.0 (gallic acid and epicatechin); 0.05 to 1.5 (myricetin, quercetin and resveratrol) and from 0.025 to 0.3 (kaempferol), with values of correlation coefficient ( $r$ ) above 0.9958. The results recovery test on two levels ranged from 81.89 to 110.36%, for gallic acid, epicatechin, catechin, quercetin-3-glucoside, myricetin, quercetin and resveratrol; and from 71.98 to 114.63% for kaempferol. The values of relative standard deviation (RSD) ranged from 0.24 to 3.34% ( $n = 15$ ), the detection limits of 0.75 to  $1.38 \mu\text{g L}^{-1}$  and the limits of quantification from 0.34 to  $6.52 \mu\text{g L}^{-1}$ . Cluster analysis (AA) was used to find groups of wines with the same characteristics and three different homogeneous groups were found. A principal component analysis (PCA) was used to investigate the differences of Brazilian and Argentine wines according to their phenolic composition. The wines from Argentina showed higher levels of gallic acid than the Brazilian wines probably for two reasons: because Argentine wines are aged in oak barrels, releasing gallic acid during aging and for preferentially follow the biosynthetic route phenylalanine  $\rightarrow$  cinnamic acid  $\rightarrow$  benzoic acid  $\rightarrow$  benzoic acids derivatives (e.g. gallic acid). On the other hand, samples of the Syrah variety from the San Francisco Valley in the Northeastern of Brazil had higher individual concentrations of catechin, quercetin-3-glucoside and resveratrol than those from Argentina, suggesting a satisfactory adaptation of this variety on the natural environment of the Northeast of Brazil the "terroir".

**Keywords:** Wine. Phenolics. Galic acid. HPLC. San Francisco Valley.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1	ESTATÍSTICA PARA VITIVINICULTURA .....	16
2.2	CULTIVARES DE UVA.....	16
2.3	CONDIÇÕES CLIMÁTICAS NAS REGIÕES DE ESTUDO .....	18
2.4	VINHO .....	20
2.5	COMPOSTOS FENÓLICOS.....	21
2.5.1	<b>Não-flavonóides</b> .....	22
2.5.1.1	Fenóis simples .....	22
2.5.1.1.1	<i>Estilbenóides</i> .....	23
2.5.3	<b>Flavonóides</b> .....	24
2.6	EFEITOS BENÉFICOS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS À SAÚDE .....	29
2.7	COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHOS.....	32
2.8	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS .....	37
<b>2.8.1</b>	<b>Parâmetro seletividade</b> .....	<b>37</b>
<b>2.8.2</b>	<b>Parâmetros linearidade</b> .....	<b>38</b>
<b>2.8.3</b>	<b>Parâmetros limite de detecção e de quantificação</b> .....	<b>38</b>
<b>2.8.4</b>	<b>Parâmetro recuperação</b> .....	<b>39</b>
<b>2.8.5</b>	<b>Parâmetro precisão</b> .....	<b>40</b>
2.9	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.....	40
2.9.1	<b>Técnica de Pré-processamento: autoescalonamento</b> .....	<b>43</b>
2.10	ANÁLISE DE AGRUPAMENTOS.....	44
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47

<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
4.1	EQUIPAMENTOS, COLUNA CROMATOGRÁFICA E SOFTWARE.....	48
4.2	REAGENTES E SOLVENTES .....	48
4.3	SOLUÇÕES ESTOQUE DE REFERÊNCIA.....	49
<b>4.3.1</b>	<b>Preparo das soluções para seleção do comprimento de onda dos analitos .....</b>	<b>49</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Preparo da solução com os oito analitos .....</b>	<b>50</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Preparo da solução da amostra .....</b>	<b>51</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Preparo das soluções contendo cada analito individualmente .....</b>	<b>51</b>
4.4	AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS .....	52
<b>4.4.1</b>	<b>Seleção da fase móvel .....</b>	<b>52</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Testes com eluição isocrática .....</b>	<b>52</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Testes com a eluição em gradiente .....</b>	<b>53</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Identificação dos analitos nos cromatogramas.....</b>	<b>55</b>
4.4.4.1	Corridas cromatográficas realizadas.....	55
4.5	AMOSTRAS DE VINHO.....	56
4.6	PREPARO DAS AMOSTRAS DE VINHO .....	58
<b>4.6.1</b>	<b>Amostra com adição de analitos no nível de concentração 1 (adição 1) .....</b>	<b>58</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Amostra com adição de analitos no nível de concentração 2 (adição 2) .....</b>	<b>58</b>
<b>4.6.3</b>	<b>Preparo das soluções das amostras de vinho .....</b>	<b>58</b>
4.7	DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NOS VINHOS .....	59
4.8	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	59
<b>4.8.1</b>	<b>Linearidade.....</b>	<b>59</b>
<b>4.8.2</b>	<b>Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) .....</b>	<b>60</b>
<b>4.8.3</b>	<b>Precisão .....</b>	<b>60</b>
<b>4.8.4</b>	<b>Exatidão .....</b>	<b>60</b>
4.9	PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS.....	61

<b>4.9.1</b>	<b>Resolução .....</b>	<b>61</b>
<b>4.9.2</b>	<b>Fator de separação ou seletividade .....</b>	<b>61</b>
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	62
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
5.1	SELEÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA DOS ANALITOS .....	63
5.2	AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS .....	64
<b>5.2.1</b>	<b>Seleção da fase móvel .....</b>	<b>64</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Testes com eluição isocrática .....</b>	<b>64</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Testes com eluição em gradiente .....</b>	<b>65</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Seleção da temperatura do forno para a coluna cromatográfica .....</b>	<b>68</b>
<b>5.2.5</b>	<b>Condições cromatográficas estabelecidas .....</b>	<b>68</b>
5.3	IDENTIFICAÇÃO DOS ANALITOS NOS CROMATOGRAMAS .....	68
5.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO .....	70
<b>5.4.1</b>	<b>Linearidade .....</b>	<b>71</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Precisão .....</b>	<b>71</b>
<b>5.4.3</b>	<b>Limites de detecção e de quantificação .....</b>	<b>71</b>
<b>5.4.4</b>	<b>Recuperação .....</b>	<b>71</b>
5.5	INTERVALOS DE CONCENTRAÇÃO PARA AS AMOSTRAS .....	74
5.6	ANÁLISE DE AGRUPAMENTOS .....	76
5.7	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS .....	78
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>83</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os consumidores estão cada vez mais interessados em ter um estilo de vida saudável, com isso surge o interesse em conhecer determinadas substâncias presentes em bebidas como o vinho. No caso do vinho tinto, destaca-se os compostos fenólicos presentes em concentrações variadas. Estes compostos possuem atividades biológicas importantes, que promovem diversos benefícios à saúde do organismo humano.

Os compostos fenólicos têm sido amplamente estudados, por ter propriedades antioxidantes (GRIS et al., 2013), antibacterianas (BORGES et al., 2013), antiinflamatórias e cardiovasculares, e ainda promovem saúde intestinal, quando associado ao consumo moderado e regular do vinho (QUEIPO-ORTUNÕ, 2012). Além disso, esses compostos desempenham um papel importante na qualidade do vinho, e contribuem com propriedades como cor e sabor (DIAS, SILVA e DAVID, 2013), especialmente em vinhos tintos.

Os polifenóis são metabólitos secundários, com diversas funções químicas/estruturais, produzidos durante o processo de crescimento fisiológico da planta e/ou como resposta a certas formas de *stress* ambiental (NACZK e SHAHIDI, 2004). Pode-se dizer que esses compostos são produzidos pelas videiras como uma forma de defesa contra o ataque de microorganismos, como os fungos, por exemplo. Este grupo grande e complexo de metabólitos secundários contribui com as características das uvas e, conseqüentemente, dos vinhos produzidos a partir destas uvas (ALI et al., 2010). Estas moléculas são extraídas durante o processo de vinificação, e são provenientes dos caules da videira e das cascas e sementes da uva (RIBÉREAU-GAYÓN, 2006).

Os compostos fenólicos encontrados no vinho tinto podem ser divididos em dois grupos principais, flavonóides e não-flavonóides. Os flavonóides incluem os flavanóis (catequina, epicatequina, e galocatequina), os flavonóis (quercetina, miricetina, rutina, e campferol), as antocianidinas (malvidina, petunidina, e peonidina), flavonas (luteolina e apigenina) e flavanonas (como naringenina). Os compostos fenólicos não-flavonóides incluem os ácidos cinâmicos (caféico, p-cumárico e ácidos ferúlico), os ácidos benzóicos (ácido gálico e siríngico) e estilbenos como o resveratrol (ANDERSEN e MARKHAM, 2006).

A concentração de constituintes químicos, como os compostos fenólicos, nas uvas e, conseqüentemente, nos vinhos pode ser influenciada por fatores, incluindo variedade de uva, condições ambientais, tecnologia de produção e maceração (CVEJIC et al., 2016). Assim, a composição fenólica dos vinhos depende das práticas aplicadas a viticultura (cultivo de uva) e a enologia (vinificação).

Os compostos fenólicos podem ser empregados para avaliar a autenticidade química das origens geográficas do vinho. O "terroir" é a influência de um conjunto de fatores geológicos, climáticos e de atividade humana no tratamento da videira que reflete a qualidade do vinho elaborado. Cada uva produzida em um "terroir" específico reflete a localização em sua composição química (LAMPÍŘ e PAVLOUŠEK, 2013).

O Vale do São Francisco, no Nordeste do Brasil, é caracterizado por um clima tropical semi-árido. A videira pode produzir duas ou três safras por ano, devido à adaptação e comportamento diferenciado da videira sob estas condições climáticas e com o manejo da irrigação e poda, além de outras intervenções mais específicas, que estimulam variações na composição fenólica das uvas e, conseqüentemente, nos vinhos (ANDRADE et al., 2013). Esta região, que iniciou a plantação de uvas para a elaboração de vinhos, aproximadamente, em 1980, é uma das áreas produtoras de vinho considerada como emergente, e agora está experimentando um período de expansão na produção de vinhos finos com uma tipicidade distinta das regiões de produção tradicionais do mundo da viticultura (ALMEIDA et al., 2016).

No Brasil, a produção de uvas e vinho ocorre principalmente no estado do Rio Grande do Sul, onde a Serra Gaúcha e a Campanha são as regiões vinícolas mais conhecidas. A região da Serra é a maior região vitícola do país, com 30.373 ha de vinhas (ALMEIDA et al., 2016). A região da Campanha apresenta grande variação de solo, altitude e topografia e o clima regional é mais seco do que o da Serra Gaúcha (POTTER et al., 2010). Devido a isso, os vinhos tintos da região de Campanha tem baixa acidez, pouca intensidade da cor, e são vinhos para beber enquanto são jovens (DAUDT e FOGAÇA, 2013). No entanto, a prática de desfolha em vinhedos na região da Campanha, pode promover a qualidade geral dos vinhos, especialmente porque esta técnica aumenta a produção de polifenóis e cor em vinhos tintos (POTTER et al., 2010).

Na Argentina, Mendoza e San Juan são as regiões com maior produção e exportação de vinhos argentinos, tanto em volume como em valor agregado, e ambos

compartilham “terroir” semelhante, embora a província de Mendoza tenha maior destaque na indústria do vinho argentino (LIBERMAN, 2013). A localização de Mendoza na Cordilheira dos Andes lhe confere um clima árido, recebendo anualmente cerca de 60-80 mm de chuva. A irrigação da região só é possível por causa do achatamento relativo da terra, e a pronta disponibilidade da água é de irrigação por gravidade e degelo da região dos Andes. O céu claro e a altitude (cerca de 500-750 m) da região geram amplitudes térmicas, durante o dia e à noite, de até 25 °C (JACKSON, 2008).

Os compostos fenólicos têm sido quantificados nos vinhos por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) (DENISCO et al., 2013; GARAGUSO e NARDINI, 2015) e com detecção no ultravioleta-visível (UV/Vis) (HUANG et al., 2015; TAUCHEN et al., 2015) e também por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (HPLC-MS) (XIAO et al., 2015; RAGONE et al., 2015; DELGADO DE LA TORRE, PRIEGO-CAPOTE e LUQUE DE CASTRO, 2015). Além disso, a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) (DIAS et al., 2013) e eletroforese capilar (ARRIBAS et al., 2014) também têm sido empregadas.

Existem alguns artigos na literatura, tal como o de Ballus et al. (2012), que determinaram as concentrações de compostos fenólicos em vinhos elaborados na América do Sul. No entanto, o trabalho proposto, descreve uma diferenciação entre os vinhos tintos sul-americanos, de acordo com o teor de polifenóis individuais e inclui os vinhos do Vale do São Francisco (Pernambuco-Brasil), que são pouco estudados. Dessa forma, empregou-se a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção na região UV-Vis (HPLC-UV/Vis) para quantificar oito compostos fenólicos: ácido gálico, catequina, epicatequina, quercetina-3-glicosídeo, miricetina, *trans*-resveratrol, quercetina e quempferol, em 32 amostras de vinhos tintos comerciais do Brasil (Vale São Francisco e Rio Grande do Sul) e da Argentina. Por conseguinte, utilizou-se a análise de componentes principais (PCA) para avaliar a tipicidade dos vinhos em função composição fenólica.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ESTATÍSTICA PARA VITIVINICULTURA

De acordo com a Organização Internacional da Uva e do Vinho (OIV 2016), no período de 2012 a 2015, a área total de videiras no Brasil, que foi utilizada para a produção de uvas destinadas para a elaboração de vinho, uvas de mesa ou passas foi, em média, 89 mil hectares (mha), enquanto na Argentina a área empregada para os mesmos objetivos foi de 224 mha.

Os maiores produtores de vinho do mundo, entre os anos de 2011 e 2015, foram Itália, França e Espanha. A Argentina encontra-se em 5º lugar, enquanto o Brasil está na 15ª posição. Em relação ao consumo de vinho, Estados Unidos, França e Itália estão em 1º, 2º e 3º lugares, respectivamente, enquanto que a Argentina se encontra na 7ª colocação e o Brasil acima da 20ª posição (OIV, 2016).

### 2.2 CULTIVARES DE UVA

A videira pertence ao gênero *Vitis*, família *Vitaceae*. O gênero *Vitis* é composto por mais de 60 espécies. A espécie mais cultivada no mundo é a *Vitis vinífera*, apresentando grande número de cultivares, tanto de uvas para vinho como também de uvas de mesa e de uvas para a produção de passas, porém a elaboração de vinho é o principal destino das uvas *Vitis vinífera* no mundo. Existe, aproximadamente 70 cultivares que compõe o elenco varietal brasileiro de uvas finas da família *Vitis vinífera* para processamento. As principais cultivares tintas, pelo volume processado, são Cabernet Sauvignon, Merlot, Cabernet Franc, Tannat, mais expressivas no sul do país, e as cultivares Syrah e Tempranillo, que são mais importantes na Região Nordeste. Novas alternativas de uvas tintas, como Alicante e Touriga Nacional, entre outras, apresentam recente aumento de área plantada, tanto no Sul como no Nordeste do Brasil (CAMARGO, 2016).

Cabernet Sauvignon é uma antiga cultivar da região de Bordeaux, França. A partir do final da década de 1980, esta cultivar ganhou destaque no Rio Grande do Sul.

Atualmente é a vinífera tinta mais importante do Estado. É uma cultivar muito vigorosa e medianamente produtiva. Em vinhedos bem conduzidos obtêm-se uvas aptas à elaboração de vinhos típicos, que podem evoluir em qualidade com alguns anos de envelhecimento. É bastante susceptível às doenças de lenho que, se não forem controladas convenientemente, reduzem a produtividade e causam morte precoce das plantas (CAMARGO, 2003).

A variedade Syrah é também uma das mais antigas castas cultivadas. Algumas referências sugerem que seria originária de Schiraz, na Pérsia, outras, que seria nativa da Vila de Siracusa, na Sicília. Independentemente de sua origem, 'Syrah' é cultivada na França há muito tempo. Da França, expandiu-se por muitos países, sendo hoje uma das cultivares tintas mais plantadas no mundo. Chegou ao Rio Grande do Sul em 1921, e até 1970 não havia conseguido espaço nos vinhedos comerciais do Estado. Desde então, entretanto, começou a ser plantada comercialmente em Santana do Livramento e na Serra Gaúcha. É uma casta muito vigorosa e produtiva, características que, aliadas à sua alta sensibilidade a podridões do cacho a tornam de difícil cultivo nas condições ambientais da Serra Gaúcha. Todavia, nas condições semi-áridas do Nordeste, mais especificamente, na região do submédio São Francisco, esta variedade tem mostrado ótima performance (CAMARGO, 2003). A duração do ciclo, da poda à colheita, da variedade Syrah no Vale do Rio São Francisco é, em média, de 4 meses (MOURA et al., 2007).

As cultivares Syrah e Tempranillo são as mais utilizadas para a elaboração de vinhos tintos finos na região do Vale do São Francisco; e é possível colher entre 2 e 3 safras por ano (MOURA et al., 2007), devido às altas temperaturas, altos índices de insolação e água disponível em abundância para a irrigação, proveniente do rio São Francisco (PEREIRA, 2016). Enquanto, nas regiões sul brasileiras colhe-se apenas uma safra por ano, como na clássica viticultura mundial.

As diferentes regiões, com distintas características de clima, solo, variedades de uvas, sistemas de produção e de vinificação e envelhecimento possibilitam a produção de vinhos com ampla diversidade de características de sabor e aroma, peculiares, o que constitui uma das qualidades da vitivinicultura brasileira atual (GUERRA et al., 2009).

Na Argentina, a variedade de uva mais plantada é a Malbec. Essa uva, de origem francesa, era plantada na região de Cahors e Bordeaux, chegou à Argentina por volta de

1860 e tornou-se a uva emblemática do país. Sua produção vem aumentando principalmente na região de Mendoza. Um inverno muito rigoroso em 1956, eliminou uma grande parte das vinhas Malbec de Bordeaux, fazendo com que atualmente ela apareça em pequenas quantidades nos vinhos da região. No entanto em Cahors, após intensas geadas a variedade foi replantada e ainda continua a ser a cepa principal (ALBERT, 2009).

A América do Sul possui uma grande área produtora de vinho, cada uma com seu *terroir* em particular, o que facilita a adaptação de diversas espécies tanto da *Vitis vinífera*, para a elaboração de vinhos finos, como das *Vitis labrusca*, videiras americanas, mais resistentes, utilizadas principalmente na elaboração de vinhos de mesa, popularmente conhecidos como vinhos de garrafão (HUGH e JANCIS, 2008), e também como vinhos comuns ou de mesa.

### 2.3 CONDIÇÕES CLIMÁTICAS NAS REGIÕES DE ESTUDO

A viticultura do Brasil está concentrada em regiões de clima temperado e subtropical, que é o caso do Rio Grande do Sul, e de clima tropical (semi-árido), típico da Região do Vale do São Francisco nos estados de Pernambuco/Bahia (TONIETTO e CARBONNEAU, 2003). Enquanto a região de Mendoza, na Argentina, outra região produtora de vinhos na América do Sul, possui clima árido (JACKSON, 2008).

A Região do Vale do São Francisco é situada no trópico semi-árido brasileiro, em latitude 9°S, altitude, ao redor de 350 m e apresenta indicadores climáticos médios de 500 mm de precipitação, temperatura de 26°C e 50% de umidade relativa do ar. A precipitação pluviométrica está concentrada entre dezembro e março (PROTAS, CAMARGO e MELO, 2016).

No Estado do Rio Grande do Sul, a principal região produtora é a Serra Gaúcha, cujas coordenadas geográficas e indicadores climáticos médios são: latitude 29°S, altitude 600-800 m, precipitação 1700 mm distribuídos ao longo do ano, temperatura 17,2°C e umidade relativa do ar 76% (PROTAS, CAMARGO e MELO, 2016).

A maior parte da Argentina está situada entre os paralelos 31° e 38°, considerados como as melhores áreas para a vitivinicultura (BERG e LUBERT, 2008). A altitude da região de Mendoza de 500-750 m, gera flutuações de temperatura, dia à noite, de até

25°C (JACKSON, 2008). O clima dessa região proporciona uma grande amplitude térmica, o que é muito bom para o cultivo das uvas. Além de seca, a região tem solos pobres, que retém pouca umidade e possui baixo teor de matéria orgânica (MAYORCA, 2014).

A latitude implica num efeito sobre a temperatura do ar e é também determinante na radiação solar total recebida nas diferentes estações do ano. No Brasil, a viticultura destinada à agroindústria, é encontrada desde os 8° (Vale do Submédio São Francisco) até os 32° de latitude Sul (Serra do Sudeste no Estado do Rio Grande do Sul). Está, portanto, localizada em latitudes baixas a médias, situação bastante diversa da viticultura desenvolvida nas latitudes mais elevadas das regiões da Europa e da América do Norte, onde a viticultura chega até os 52° de latitude Norte. Por outro lado, a altitude implica num efeito térmico, que é o efeito mais importante para a viticultura, já que 100 metros de elevação representam diminuição na temperatura média do ar ao redor de 0,6°C. Alguns países quentes buscam obter condições térmicas mais favoráveis à viticultura em zonas de maior altitude, compensando em certa medida o efeito latitude (TONIETTO e MANDELLI, 2003).

Os fatores que influenciam na qualidade dos vinhos e de outros produtos vitivinícolas, nas diferentes regiões, é função do clima, do solo, do cultivar, das técnicas de cultivo e dos sistemas de processamento empregados. As características climáticas da vitivinicultura brasileira são bastante particulares e distintas daquelas encontradas na maioria dos países vitivinícolas. Tal situação confere aos produtos um conjunto de características e uma tipicidade própria. Essa tipicidade deve-se em grande parte ao efeito clima (TONIETTO e MANDELLI, 2003).

Sato et al. (2012) observaram que durante a fase de maturação das uvas ‘Alicante’ e ‘Syrah’, a elevação da temperatura média diária e da temperatura máxima diária, bem como da precipitação influenciam a degradação de compostos antioxidantes, tais como os polifenóis totais. Tendo em vista que, quando se buscam uvas destinadas à elaboração de vinhos, deve-se considerar o índice de polifenóis totais, principalmente na fase final de maturação, ou seja, no período próximo à colheita, e no momento em que estas serão utilizadas na elaboração dos vinhos, e desta forma, definir as técnicas de vinificação mais adequadas, de acordo com a matéria-prima disponível.

## 2.4 VINHO

O vinho é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto de uvas saudáveis, frescas e maduras. Essa denominação é exclusiva do produto, sendo proibida sua utilização para produtos obtidos de quaisquer outras matérias-primas (BRASIL, 1990); em bioquímica, pode ser definido como a bebida proveniente da fermentação alcoólica dos açúcares do suco ou mosto de uva pelas leveduras e, em alguns casos, por bactérias lácticas (AQUARONE, 2001) (fermentação malolática).

O vinho é uma matriz complexa com uma composição química que inclui 80-86% de água, 10-15% de álcool e de 1-2% de outros compostos minoritários, tais como os compostos fenólicos, além de compostos voláteis (CABRERA-BAÑEGIL et al., 2017). Segundo Ali et al. (2010), essa bebida é composta por: água, álcoois, glicerol, açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos (metabólitos primários) e compostos fenólicos (metabólitos secundários). Os metabólitos secundários, geralmente, possuem estruturas complexas, baixo peso molecular, atividades biológicas marcantes e são encontrados em plantas e vegetais em baixas concentrações (BERG e LUBERT, 2008).

O vinho tinto fino é feito com uvas da espécie *Vitis vinífera*; essas uvas são específicas para essa utilização, pois acumulam mais açúcares do que as comuns de mesa das espécies *Vitis rupestris*, *Vitis aestivalis*, *Vitis labrusca* e *Vitis riparia*. Com o maior acúmulo de açúcares, a fermentação do mosto melhora, desde que as uvas viníferas sejam produzidas de forma correta obedecendo às características de solo e clima. Além disso, as diversas técnicas de viticultura devem ser respeitadas conforme as variedades da uva (Cabernet Sauvignon, Syrah, Merlot, Tannat, Tempranillo, etc). Para formar novos paladares nos vinhos, essas variedades podem ser misturadas, originando novos sabores e aromas (FERREIRA, ROSINA e MOCHIUTTI, 2010).

Gonzalez-Manzano et al. (2004) afirmam que durante a fermentação e envelhecimento, os compostos do vinho passam por transformações estruturais através de reações de oxidação e de condensação influenciando na adstringência e cor do vinho.

O prolongamento do tempo de maceração e dos períodos de fermentação aumenta o teor de compostos fenólicos no vinho, porém se esse prolongamento for exagerado, a qualidade dos componentes produzidos será afetada de modo indesejável produzindo excesso de amargor, adstringência e sabores desagradáveis (GUBUZ et al., 2007).



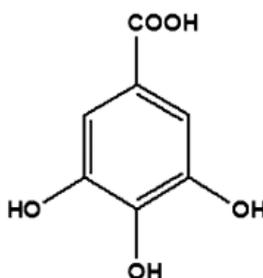
## 2.5.1 Não-flavonóides

### 2.5.1.1 Fenóis simples

Os fenóis simples, também chamados de ácidos fenólicos, são originados predominantemente da polpa da uva (RIBÉREAU-GAYON, 2006), e são sintetizados inicialmente a partir da fenilalanina (HRAZDINA et al., 1984), que é convertida pela enzima fenilalanina amônia liase, em ácido cinâmico (GUTZEIT e LUDWIG-MULLER, 2014). Esses ácidos fenólicos são derivados de ácidos hidroxicinâmicos (HCAs) e de ácidos hidroxibenzóicos (HBAs). Os HCAs mais comuns são ácido p-coumarico, ácido caféico, ácido sinápico e ácido ferúlico e os HBAs mais comuns são ácido gálico, ácido gentísico, ácido protocatequico e ácido p-hidroxibenzóico, que são encontrados principalmente na sua forma livre (ALI et al., 2010).

Um dos HBAs de maior concentração no vinho é o ácido gálico. Ele participa de várias reações no desenvolvimento da coloração e da estabilização do vinho, incluindo: a conversão do grupo carboxila (-COOH) em aldeído (-CHO), este último grupo participa das reações de condensação com compostos fenólicos do tipo catequina; e da reação direta com antocianinas (malvidina, petunidina, peonidina, delphinidina, etc.) para gerar piranoantocianinas (SCOLLARY, 2010).

O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico), Figura 2, é um ácido fenólico amplamente distribuído em famílias diferentes de plantas superiores, tanto no estado livre, ou como parte de moléculas mais complexas, como derivados de ésteres ou polímeros (DAGLIA et al., 2014).



**Figura 2.** Estrutura do ácido gálico

Na natureza, o ácido gálico e seus derivados estão presentes em quase todas as partes da planta, como casca, madeira, folhas, frutos, raízes e sementes. Eles estão presentes em diferentes concentrações em alimentos e bebidas comuns, como mirtilo, amora, morango, ameixas, uvas, manga, castanha de caju, avelã, noz, chá, vinho e outros (DAGLIA et al., 2014).

Sato et al. (2012), em seu trabalho, verificaram que durante a fase de maturação das uvas das variedades 'Alicante' e 'Syrah', a precipitação e as temperaturas média e máxima diária influenciaram a degradação dos ácidos fenólicos. De acordo com Ribéreau-Gayon e Stonestreet (1965), após o início da maturação das uvas, ocorre a polimerização dos taninos, por isso a maioria dos ácidos fenólicos passam a se degradar no decorrer da maturação, sendo esta degradação diretamente influenciada pelas condições climáticas, tais como temperatura e precipitação.

#### 2.5.1.1.1 Estilbenóides

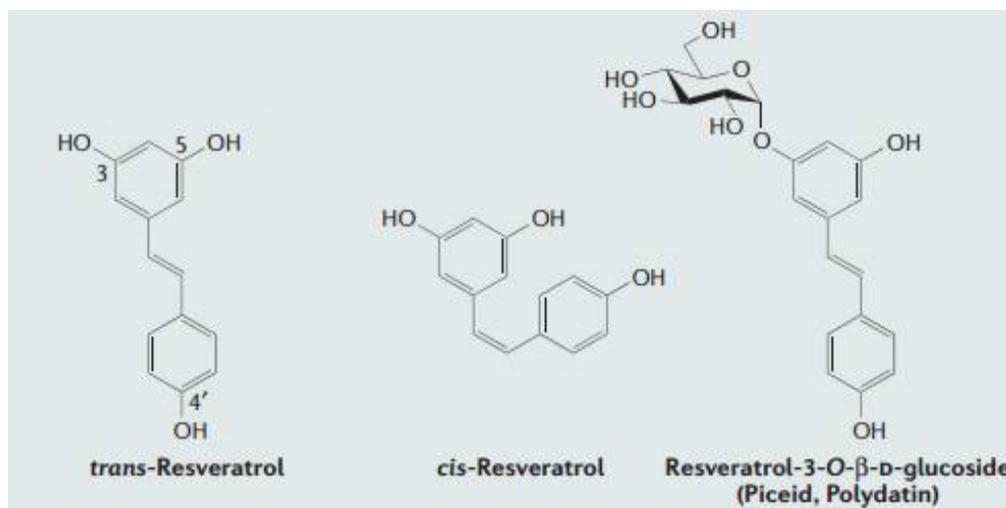
Os Estilbenos fazem parte dos compostos fenólicos não-flavonóides (ANDERSEN e MARKHAM, 2006) encontrados em uva, vinho, castanhas, amêndoas e nozes e algumas frutas de cor vermelha ou azul (SOUTO, 2001). O vinho tinto é mais concentrado em estilbenos do que os vinhos rosé e branco (PERRONE et al., 2007).

O resveratrol, que é um estilbeno não flavonóide, é também sintetizado inicialmente a partir da fenilalanina (Figura 1) (ALI et al. 2010), nesse caso, o ácido cinâmico é ativado pela coenzima-A (CoA) e atua como precursor na rota para a síntese do resveratrol (GUTZEIT & LUDWIG-MULLER, 2014).

A molécula de resveratrol ocorre como aglicona (sem unidades de açúcares) ou como 3-glucosídeo, e pode ser encontrado na forma de isômeros cis e trans (Figura 3). Ela é encontrada naturalmente, em pequenas quantidades, em plantas comestíveis (VANG et al., 2011), e em maior quantidade em alimentos e bebidas, como por exemplos: uvas, vinhos e amendoim (ANDERSEN e MARKHAM, 2006).

A forma *trans*-resveratrol (*trans*-3,5,4'-tri-hidroxiestilbeno) foi identificada como um dos principais compostos ativos das fitoalexinas de estilbeno (SCHWARZ et al., 2011). Esta forma é encontrada essencialmente nas cascas das uvas, e extraída

principalmente durante a fermentação do vinho tinto; nesse caso o vinho branco não possui *trans*-resveratrol, pois a casca é separada do mosto na fase de fermentação da bebida (YOSHIDA, CHEYNIER e QUIDEAU, 2017).



**Figura 3.** Isômeros *cis* e *trans* do resveratrol e a forma glicosilada.

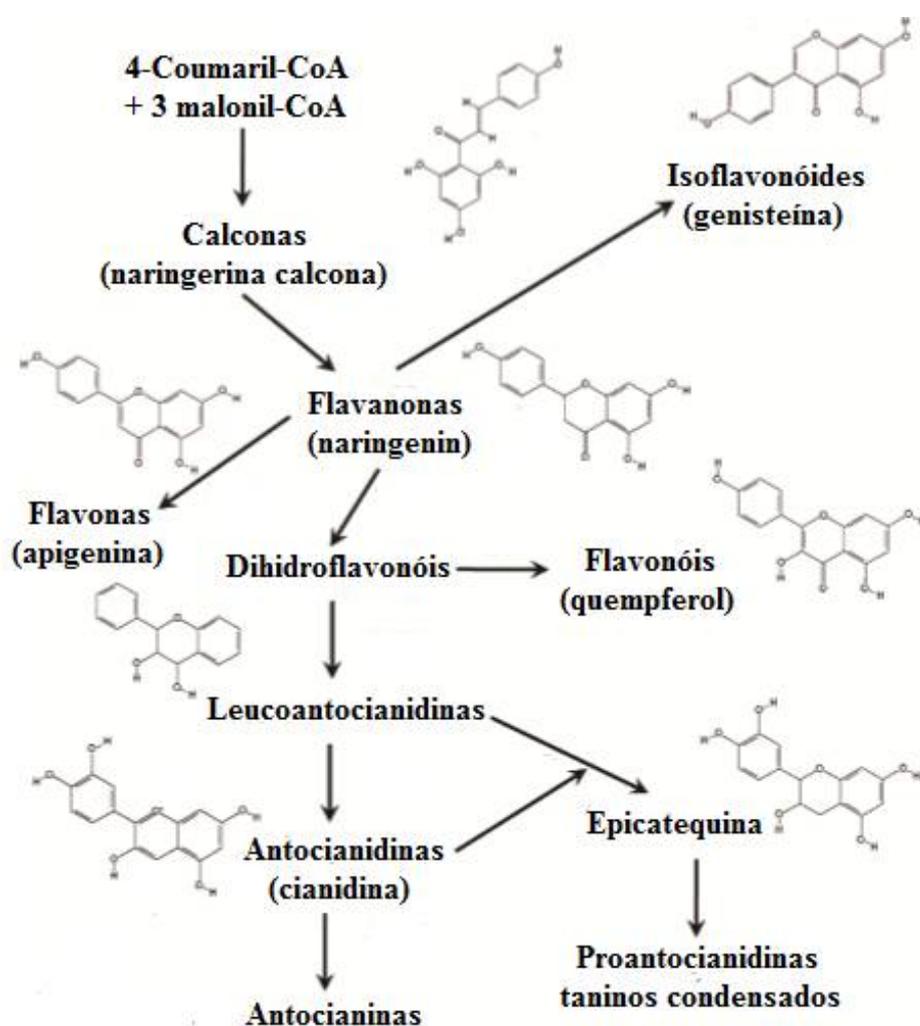
### 2.5.3 Flavonóides

Flavonóides são pigmentos naturais, presentes em plantas e vegetais. Essas substâncias desempenham ação antioxidante, atuando também como agentes terapêuticos em diversas patologias. Como não são sintetizadas pelo organismo humano, podem ser obtidos a partir da ingestão de alimentos ou bebidas, tais como: frutas, folhas, verduras, vinho, chá verde, chá preto, etc, ou a partir de suplementos (PEREIRA e CARDOSO, 2012).

Os flavonóides também são sintetizados a partir da fenilalanina, e nesse caso, o ácido cinâmico, ativado pela coenzima-A (CoA), atua como precursor de outras rotas na síntese dos flavonóides (Figura 1) (ALI et al. 2010).

A enzima chave para a rota dos flavonóides é a calcona sintase, que catalisa a reação à narigenina calcona, o primeiro flavonóide da rota (Figura 4). Dihidroflavonóides são intermediários para a formação de flavonóis, mas também são convertidos nos pigmentos de antocianinas. Além disso, eles dão origem às

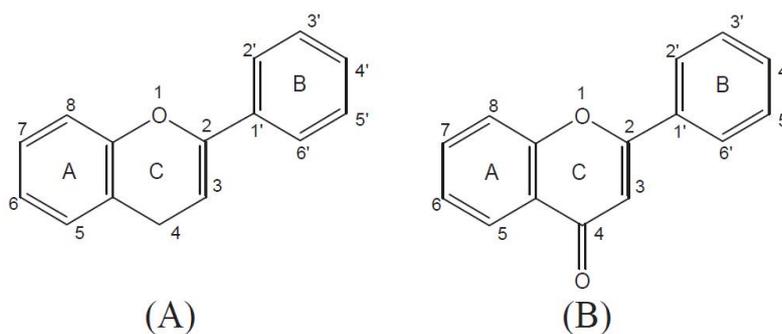
proantocianidinas, também conhecidas como "taninos condensados". As catequinas são derivados de intermediários da rota da antocianina, as (leuco) antocianidinas. As estruturas altamente diversas são obtidas por reações de glicosilação com vários açúcares, onde a maioria dos monoglicosídeos ou diglicósidos são formados (Figura 1). A porção de açúcar é adicionada como um monossacárido ou dissacárido a uma posição, embora os açúcares também possam ser adicionados em diferentes posições da molécula. Essas glicosilações também tornam as moléculas mais hidrofílicas (GUTZEIT e LUDWIG-MULLER, 2014).



**Figura 4.** Principais rotas para a síntese dos flavonóides derivados de plantas de diferentes espécies (GUTZEIT e LUDWIG-MULLER, 2014).

Os flavonóides são os compostos fenólicos mais abundantes no vinho tinto (LÓPEZ-VÉLEZ et al., 2003), em que os mais comuns são flavanóis (catequinas ou flavan-3-óis), flavonóis e antocianinas (ALI et al., 2010). Geralmente, flavanóis e flavonóis, devido à estrutura química, são melhores absorvidos do que as antocianinas (HEIM, TAGLIA e BOBILYA, 2002).

A estrutura química básica dos flavonóides (Figura 5) é baseada no núcleo que consiste de dois anéis aromáticos A e B e um anel C, que pode ser um pirano heterocíclico, como no caso dos flavanóis (Estrutura A), ou pirona, como nos flavonóis, que possuem um grupo carbonila (C=O) na posição C-4 do anel C (Estrutura B) (HUBER e RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; RICE-EVANS et al., 1996).



**Figura 5.** Estruturas básicas dos flavonóides. Flavanóis (A) e Flavonóis (B).

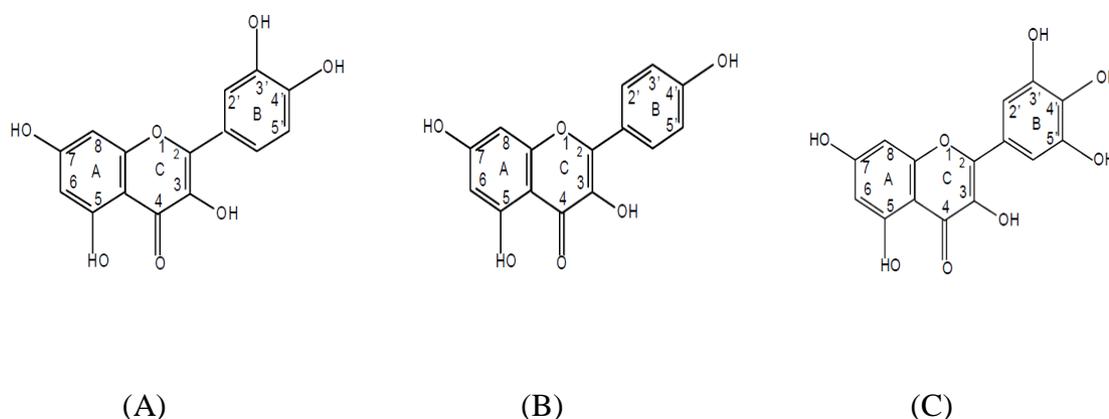
Existem vários compostos flavanóis (Figura 6) que participam como unidades de construção de taninos condensados (taninos são constituídos por unidades de flavonóides). Estes incluem (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-epicatequina-3-O-galato, (+)-galocatequina, (+)galocatequina-3-O-galato e (-)-epigallocatequina-3-O-galato (Figura 3). Porém, os dois flavonóides mais importantes em relação à composição de taninos são os flavanóis, (+)-catequina e (-)-epicatequina, descrito mais apropriadamente na literatura como flavan-3-óis, para indicar que o grupo OH está localizado na posição 3 do anel pirano (SCOLLARY, 2010).



As catequinas são compostos incolores e hidrossolúveis, e contribuem com o amargor e a adstringência do vegetal. Dentre as principais representantes desse grupo estão: catequina, epigallocatequina, epigallocatequinaagalato, epicatequina e a epicatequinaagalato (ARAÚJO, 2008).

As substâncias mais importantes como antioxidantes são os flavanóis (catequinas e epicatequinas), pois possuem a maior atividade antioxidante entre os vários polifenóis presentes nos vinhos (TREISSEDE et al., 1996). Além disso, as epicatequinas têm a capacidade de conservar outros compostos antioxidantes importantes para a saúde, tais como as vitaminas C e E (AUGER et al., 2004).

Os flavonóis, quercetina, quempferol e miricetina (Figura 8) possuem importante papel no desenvolvimento da coloração do vinho (ABE et al., 2007). No entanto, a quercetina está presente em outras bebidas, como chás e cervejas, e em várias frutas e vegetais, sendo o principal flavonol encontrado em nossa dieta (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000).



**Figura 8.** Estruturas químicas da quercetina (A), quempferol (B) e miricetina (C).

Os hidrogênios dos grupos hidroxilas adjacentes (orto-difenóis), localizados em várias posições dos anéis A e B, as duplas ligações dos anéis benzênicos e a dupla ligação da função oxo (-C=O) das moléculas dos flavonóides fornecem a esses compostos alta atividade antioxidante. A quercetina é o flavonóide do vinho que apresenta a maior atividade antioxidante (RICE-EVANS et al., 1996).

## 2.6 EFEITOS BENÉFICOS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS À SAÚDE

Os compostos fenólicos atuam como potentes antioxidantes, prevenindo o excesso de radicais livres produzidos pelo metabolismo humano, provenientes de agentes oxidantes tais como: radiação ultravioleta, poluição ambiental, stress, insônia, dieta alimentar ruim com excesso de agrotóxicos, conservantes, metais pesados, etc. (LOBO et al., 2010; LÜ et al., 2010; PEREIRA e CARDOSO, 2012).

Os compostos fenólicos advindos de plantas e alimentos são compostos bioativos capazes de reduzir o stress oxidativo em células. Esta propriedade biológica é atribuída principalmente ao seu forte comportamento antioxidante. A estrutura química dos polifenóis favorece a capacidade antioxidante (LINGUA et al., 2016). Para que as propriedades antioxidantes desses compostos sejam asseguradas, o tecido das frutas deve estar livre de lesão e os produtos manufaturados serem armazenados ao abrigo da luz, pois tais compostos são sensíveis à luz em razão das suas duplas ligações alternadas (MAMEDE e PASTORE, 2004).

Sánchez-Moreno (2002) explica de forma detalhada, que a excelente atividade antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada com a presença de grupos hidroxila nas posições 3' e 4' do anel B. Estes grupos conferem uma elevada estabilidade ao radical formado através da participação no deslocamento do elétron, e uma dupla ligação entre os carbonos C2 e C3 no anel C, juntamente com o grupo carbonila na posição C4, o que faz com que o deslocamento de um elétron seja possível a partir do anel B. Além disso, grupos hidroxila livres na posição 3 do anel C e na posição 5 do anel A, em conjunto com o grupo carbonila na posição 4, são também importantes para a atividade antioxidante destes compostos.

Lingua et al. (2016), estudaram a evolução dos compostos fenólicos e sua relação com a capacidade antioxidante (CA) de amostras colhidas ao longo do processo de vinificação de três *Vitis Vinífera L.* cv., Syrah, Merlot e Cabernet Sauvignon produzidas na Argentina. Quarenta e cinco compostos foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), enquanto a CA foi determinada por três metodologias diferentes. Os resultados mostraram que a composição fenólica e CA variaram ao longo do processo de vinificação e entre variedades de uva. A análise de regressão múltipla mostrou uma alta correlação entre a composição fenólica e CA das amostras, sendo as

antocianinas o grupo principal com contribuição significativa para CA. Um elevado teor de compostos fenólicos e bioatividade ainda permanecem em bagaços que suportam o seu uso como uma fonte de antioxidantes de baixo custo.

Hidalgo et al. (2010) mediram a atividade antioxidante de onze flavonóides (cianidina, malvidina, delphinidina, peonidina, pelargonidina, catequina, epicatequina, quempferol, miricetina, quercetina e quercetina-3- $\beta$ -glicosídeo) por dois testes *in vitro*: atividade sequestradora de radicais (DPPH) e poder antioxidante redutor do íon  $Fe^{3+}$  (FRAP). A fim de avaliar o efeito das interações dos flavonóides sobre sua capacidade antioxidante, os autores comparam a capacidade antioxidante dos flavonóides individuais com a capacidade obtida pelas combinações entre eles. A maioria dos testes *in vitro* da DPPH promoveu efeitos antagônicos para os flavonóides combinados, com exceção de algumas interações sinérgicas entre quempferol e miricetina. No teste FRAP, a interação entre epicatequina e quercetina-3- $\beta$ -glicosídeo apresentou o maior efeito sinérgico, enquanto que entre miricetina e quercetina houve um efeito antagonista. Dessa forma, os autores concluíram que existem interações sinérgicas e antagônicas entre flavonóides que podem explicar os resultados obtidos quando se mede o efeito antioxidante em um alimento tal como o vinho tinto.

A estrutura química dos polifenóis determina a sua taxa e extensão de absorção intestinal. Os poucos estudos de biodisponibilidade em humanos mostram que as quantidades de polifenóis encontradas intactas na urina variam de um composto fenólico para outro. A maior parte dos polifenóis ingeridos (75-99%) não são encontrados na urina (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000).

Dados clínicos epidemiológicos indicaram que os compostos fenólicos presentes no vinho tinto diminuem a incidência de doenças cardiovasculares e apresentam efeitos anticarcinogênico, antivasculares e antioxidante (NOGUEIRA, 2006). Estes benefícios de saúde têm sido principalmente atribuídos a um aumento da capacidade antioxidante, mudanças no perfil de lípidos e os efeitos anti-inflamatórios produzidos por esta bebida alcoólica (ARRANZ et al., 2012).

O ácido gálico é um composto antioxidante que tem ações neuroprotetoras em diferentes modelos de neurodegeneração, neurotoxicidade e estresse oxidativo. Após o consumo, cerca de 70% de ácido gálico é adsorvido e, em seguida, excretado na urina como ácido 4-O-metilgálico (DAGLIA et al., 2014).

Em um estudo realizado com 20 voluntários jovens não-fumantes saudáveis, com média de 31 anos de idade, foi observado que o consumo moderado de vinho tinto está associado à prevenção de doenças cardiovasculares e à neutralização da maior parte dos efeitos vasculares adversos do tabagismo. A fumaça de cigarro resulta em danos endoteliais agudos, vasculares e inflamação sistêmica, além de indicadores de processos de envelhecimento celular em não-fumantes saudáveis. O pré-tratamento com vinho tinto foi preventivo. Os resultados ressaltaram a magnitude do dano agudo exercido pela fumaça do cigarro em fumantes ocasionais e demonstra o potencial do vinho tinto como uma estratégia de proteção para evitar marcadores de danos vasculares (SCHWARZ et al., 2016).

Oliveira et al. (2016) avaliaram os mecanismos de ação envolvidos no efeito vasorelaxante do ácido gálico em ratos e observaram que o ácido gálico exerceu um efeito vasorelaxante quando se empregou concentrações elevadas (0,4 - 10 mmol L<sup>-1</sup>).

Banu et al. (2016) observaram efeitos positivos da atividade do resveratrol sobre a toxicidade ovariana, em ratos, induzida pelo metal pesado Cr (VI).

Estudos clínicos, de longo prazo em humanos, iniciaram-se em 2010 para se ter conhecimento sobre os efeitos biológicos do resveratrol em seres humanos (VANG et al., 2011). Inúmeros artigos científicos sugerem efeitos de promoção da saúde do resveratrol, (VANG, 2013) incluindo a prevenção de doença cardiovascular (ZORDOKY, 2015) e câncer (LIN et al., 2013).

Um estudo clínico randomizado, realizado com 10 participantes, durante 120 dias, mostrou que o consumo de vinho tinto (272 mL/dia), com ou sem álcool, pode aumentar significativamente o crescimento da microbiota saudável do intestino em seres humanos, o que sugere possíveis efeitos prebióticos, que estão associados ao conteúdo de compostos fenólicos (nesse caso mais especificamente ao resveratrol) presente na dieta, especialmente, pelo consumo moderado e regular dessa bebida. Além disso, esse trabalho apresentou outros benefícios a saúde, tais como, melhora cardiovascular e anti-inflamatória (QUEIPO-ORTUNÕ et al., 2012).

Em um outro estudo realizado com 224 pacientes com diabetes tipo 2, em que se empregou a dieta mediterrânea sem restrição calórica, durante 2 anos, observou-se que o consumo de 150 mL de vinho tinto por dia, no jantar aumentou o colesterol bom, HDL (lipoproteína que transporta o colesterol no sangue) e o consumo de 150 mL de vinho

branco por dia, controlou a glicose no sangue dos diabéticos. Tanto o consumo de vinho tinto ou de vinho branco melhorou a qualidade do sono e da síndrome metabólica (pressão alta, glicose e/ou insulina alta no sangue, gordura visceral, etc) (GUEPNER, et al., 2015).

Em um trabalho realizado com 2031 idosos, durante 2 anos, verificou-se que o consumo de 75-100 mL por dia de vinho tinto, branco ou rosé, melhorou funções cognitivas tais como: memória, atenção, linguagem e percepção (NURK et al., 2009).

## 2.7 COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHOS

Vinhos tintos da Hungria, elaborados no período de 1996 a 2003 foram analisados para determinar o teor de compostos fenólicos (antocianinas, flavan-3-ols e trans-resveratrol) por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) com detecção no UV/Vis. Os teores encontrados nos vinhos variaram de 62,1 a 103 mg L<sup>-1</sup> para catequina, 64,6 a 126 mg L<sup>-1</sup> para epicatequina e 2,4 a 13,4 mg L<sup>-1</sup> para quercetina. Para as 67 amostras analisadas, a análise de componentes principais (PCA) revelou que os flavan-3-ols (catequina e epicatequina) e as antocianinas (delfinidina e petunidina-3-glucosídeos) são os principais responsáveis pela separação dos vinhos de acordo com o teor de compostos fenólicos (NIKFARDJAM et al., 2006).

Repollés et al. (2006) desenvolveram e validaram um método por cromatografia líquida em fase reversa para determinação simultânea de onze flavonóides em amostras de alimentos e bebidas. No vinho tinto foram quantificados quatro deles, catequina, epicatequina, quercetina e kaempferol nos teores de 26,7; 9,3; 9,9 e 0,69 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Kumar, Malika e Tewaryb (2009) quantificaram quercetina e miricetina em uvas, vegetais e vinhos (Baaglioni Cabernet, Nasik, India) preparando a amostra a partir da microextração em fase sólida, utilizando a HPLC-UV-Vis e obtiveram teores de 24,92 µg kg<sup>-1</sup> para quercetina e 23,19 µg kg<sup>-1</sup> para miricetina.

Seruga, Novak e Jakobek (2011) desenvolveram um método por RP-HPLC com detector de arranjo de fotodiodo (PDA) para a determinação simultânea de compostos fenólicos, em vinhos tintos comerciais elaborados em diferentes regiões da Croácia, das

safras de 2005 e 2006. Dentre os compostos quantificados estavam: ácido gálico, ácido p-cumárico, ácido caféico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, quercetina e quempferol. O ácido gálico foi o ácido fenólico dominante nos vinhos tintos e (+)-catequina, (-)-epicatequina e ácido p-cumárico foram os compostos seguintes mais abundantes.

Dias, Silva e David (2013) aplicaram uma metodologia para a determinação de resveratrol, ácido gálico, catequina, quercetina e malvidina em vinhos tintos brasileiros produzidos na região do Vale do São Francisco, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). O processo inclui uma fase de extração líquido-líquido assistido por ultrassom e posterior derivatização com N-O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA). A concentração de quercetina variou de 2,4 - 3,0 mg L<sup>-1</sup> e de catequina de 11,7 - 18,2 mg L<sup>-1</sup>.

Vinte e seis vinhos produzidos a partir da casta Malmsey, envelhecidos por 20 anos (teor alcoólico variando de 17 % a 21 %), foram analisados em diferentes tempos de envelhecimento para prever a idade do vinho a partir da composição volátil e do teor de compostos fenólicos. Para as análises empregou-se a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (DAD-HPLC), a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) e a espectroscopia a partir das medições de absorvância na região UV-Vis. Um total de 23 compostos fenólicos, dentre eles 3 flavanóis (catequina, epicatequina e epigallocatequina) e 2 flavonóis (miricetina e quercetina) foram identificados e quantificados. A melhor precisão da previsão da idade do vinho foi obtida com as duas técnicas cromatográficas, porém as medidas baseadas em UV-Vis também permitiram chegar a previsões de idade aceitáveis. De acordo com os autores as medidas espectroscópicas oferecem uma solução prática e acessível para a avaliação da idade do vinho, por ser uma técnica rápida e de baixo custo (PEREIRA et al., 2011).

Anastasiadi et al. (2010) determinaram o teor de flavonóides, por HPLC com detecção no UV-Vis, em vinhos tintos das variedades de uva Mandilaria e Voidomatis e em vinhos brancos das variedades Asyrtico e Aidani. As uvas, da safra de 2006, foram cultivadas nas ilhas Cíclades, na Grécia. O teor de flavanóis, catequina e epicatequina, para os vinhos tintos e brancos, variaram de 7,29 a 83,86 mg L<sup>-1</sup> e de 4,80 a 62,61 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Já o teor de flavonóis, quercetina e quempferol, variaram de 0,86 a 3,73 mg L<sup>-1</sup> e de 0,34 a 0,68 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os autores observaram que o teor

de catequina estava presente em quantidades consideráveis nos vinhos tintos, enquanto que a epicatequina estava presente em menores concentrações; já a quercetina foi predominante em relação ao quemferol.

Seis compostos fenólicos, dentre eles, quemferol, miricetina e quercetina, foram determinados em vinhos tintos produzidos na região do Vale São Francisco por eletroforese capilar com detecção no UV a 280 nm. Os vinhos analisados foram provenientes de seis diferentes variedades de uva. O teor de quemferol, miricetina e quercetina variaram de 2,32 a 3,03  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; 13,52 a 25,13  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; e de 1,68 a 3,79  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente (DIAS et al., 2013).

Ballus et al. (2012) desenvolveram um método empregando a eletroforese capilar com detecção no UV-Vis para separar simultaneamente 16 compostos fenólicos em vinhos brasileiros, chilenos e argentinos. Dentre os compostos separados estavam epicatequina (1,41 a 10,22  $\text{mg L}^{-1}$ ), catequina (1,83 a 13,52  $\text{mg L}^{-1}$ ), quemferol (não detectado a 1,52  $\text{mg L}^{-1}$ ), miricetina (6,26 a 25,64  $\text{mg L}^{-1}$ ), quercetina (33,8 a 74,76  $\text{mg L}^{-1}$ ). O método foi validado e aplicado a um total de 23 amostras de vinhos tinto, rosé e branco. De acordo com os autores o método desenvolvido mostrou excelente aplicabilidade devido ao procedimento de extração simples e ao baixo volume de reagentes empregados.

De Nisco et al. (2013) identificaram e quantificaram, por HPLC-DAD, flavonóis glicosilados (myricetina-3-O-glucosídeo, quercetina-3-O-glucoronídeo, quercetina-3-O-glucosídeo, quemferol-3-O-glucosídeo e quercetina-3-O-cafeolato) em 9 amostras de vinhos tintos experimentais produzidos em Basilicata, sul da Itália. As estruturas dos compostos foram confirmadas por LC-MS e do total de flavonóis analisados, quercetina-3-O-glucosídeo representou o maior percentual (39,4%).

Dois vinhos tintos suaves obtidos a partir das variedades de uva Merlot e Tempranillo, safra de 2009, foram analisados por HPLC-DAD para determinação de compostos fenólicos, dentre eles estavam: catequina, epicatequina, quercetina e quemferol. Segundo os autores estas amostras foram escolhidas por serem os únicos vinhos tintos comerciais produzidos a partir de um processo tradicional de secagem das uvas ao sol. Os vinhos produzidos foram analisados após 0, 24, 48, 72 e 96 horas de maceração. O teor de flavonóides, encontrados nos vinhos nos tempos 0 h e 24 h de maceração, aumentaram mais de 100 % para os analitos avaliados. Desta forma, os

autores concluíram que, o tempo de maceração ideal é de 24 h, pois proporciona um produto final com uma cor e composição de composto fenólicos altamente aceitável para comercialização em comparação com outros vinhos tintos suaves comerciais (MARQUEZ, 2012).

Andreu-Navarro et al. (2011) desenvolveram um método para classificar o vinho quanto à variedade e área geográfica baseado no teor de compostos fenólicos. Foram analisadas quinze amostras de vinhos por cromatografia líquida (LC) com detecção fluorimétrica e por medidas fotométricas. Os vinhos foram elaborados na Sicília (Itália) e em Córdoba (Espanha). Dezoito compostos fenólicos foram determinados, dentre eles, ácido gálico, catequina, epicatequina, trans resveratrol, quercetina e quemperol. A matriz de dados foi construída a partir da concentração de cada analito presente no vinho. Esta matriz foi submetida a diferentes algoritmos para classificar e caracterizar as amostras de vinho de forma adequada. O método supervisionado análise de discriminante linear (LDA) e o não supervisionado análise de fator (FA) foram empregados para fazer o reconhecimento de padrões. Sendo assim, os autores concluíram que o método é adequado para classificar os vinhos de acordo com a sua variedade ou origem geográfica.

Um método simples foi desenvolvido para a determinação de oito polifenóis em vinhos tintos americanos, por eletroforese capilar (CE). Vários parâmetros foram investigados para determinar as melhores condições de separação dos analitos nas amostras de vinho. Catequina, ácido siringico, apigenina, miricetina, luteolina, quercetina, ácido cafeico e ácido gálico foram detectados em todas as amostras, com ácido gálico e miricetina ocorrendo nas concentrações mais altas (SANLI et al., 2016).

Compostos fenólicos foram determinados em dezesseis amostras de vinho Cabernet Sauvignon provenientes de diferentes sub-regiões dos Balcãs. As técnicas empregadas foram HPLC/DAD, eletroforese capilar e análise espectroscópica. O teor de ácidos hidroxibenzóicos totais, detectado a 280 nm, foi o mais elevado nos vinhos da sub-região vitivinícola de Tikveš, Macedônia (127-140 mg L<sup>-1</sup>). Os ácidos hidroxicinâmicos totais detectados 320 nm, foram os mais elevados nos vinhos da sub-região vitícola de Župa, Sérvia (43-45 mg L<sup>-1</sup>). A concentração dos flavonóides (flavanois, flavonóis, flavons e Flavanon), detectados a 280, 360, 322 e 275 nm, respectivamente, foi o mais elevado em vinhos da sub-região vinícola, Bulgária (167 mg L<sup>-1</sup>). Os resultados da

análise de componentes principais (PCA) confirmou que o teor de compostos fenólicos em vinhos Cabernet Sauvignon depende de fatores agro-climáticos e das práticas enológicas em diferentes vinícolas. As áreas na região dos Balcãs com características agro-climáticas semelhantes mostraram menor distância de agrupamento, indicando perfis similares de fenóis nos vinhos tintos testados (RADOVANOVIĆ et al., 2016).

Para analisar o pó de vinho tinto, uma concentração de 9% (p/p) de maltodextrina e goma arábica foi adicionada a um determinado volume de vinho Cabernet Sauvignon; essa mistura foi liofilizada para se obter um pó de vinho desalcoholizado com uma concentração de polifenóis 7,1 vezes superior ao do vinho tinto líquido. O pó de vinho foi armazenado em frascos de vidro opacos pequenos em temperatura constante (38 °C) nas seguintes condições: em frascos hermeticamente fechados, a fim de preservar a sua condição de atividade de água inicial ( $a_w$ ) igual a 0,11; em frascos abertos colocados sobre uma solução saturada de  $MgCl_2$ , que proporcionou uma umidade relativa constante de 33%; e em frascos abertos colocados sobre uma solução saturada de NaBr que proporcionou uma umidade relativa constante de 58%. Amostras de todos os sistemas foram periodicamente removidas dos frascos e analisadas durante 145 dias. Malvidina e antocianinas totais foram os compostos fenólicos que apresentaram a maior perda durante o armazenamento. Dos ácidos fenólicos analisados, o ácido gálico foi o que apresentou a maior estabilidade, pois seu conteúdo permaneceu constante durante o armazenamento a todos os níveis de atividade de água investigados. O teor de epicatequina, catequina, ácido caféico e resveratrol permaneceu constante com  $a_w = 0,11$ , no entanto, com  $a_w = 0,33$ , catequina e epicatequina sofreram perdas importantes. Os resultados indicaram que a atividade da água foi um fator de estabilidade fenólica durante o armazenamento (ROCHA-PARRA et al., 2016).

Ribeiro et al. (2016), caracterizaram os principais constituintes polifenólicos de um extrato liofilizado de vinho tinto Cabernet Sauvignon (RSCS) da vinícola Rio Sol, do vale do rio São Francisco, da safra de 2006. Os autores determinaram os mecanismos subjacentes aos efeitos cardiovasculares usando tanto abordagem *in vitro* quanto *in vivo*. O presente estudo indicou que o RSCS induziu a hipotensão em ratos, mais provavelmente pela redução da resistência vascular periférica. De acordo com os autores, estes resultados podem ser explicados pela presença do elevado nível de compostos fenólicos no RSCS. A quantidade total de polifenóis em RSCS foi de 4,2 mg

GAE/L, e os teores de quercetina, miricetina e kaempferol foi  $6,37 \pm 0,29$ ,  $3,25 \pm 0,13$  e  $0,07 \pm 0,03$  mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

## 2.8 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS

Após desenvolver um método analítico, é importante realizar a validação. A validação utiliza um conjunto de testes para estabelecer as características ou parâmetros analíticos de desempenho de um método e assim demonstrar se ele é adequado para uma finalidade analítica particular. Algumas características típicas de desempenho de métodos analíticos são: seletividade, linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, recuperação e precisão (IUPAC, 2002). No caso de metodologia analítica não descrita em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os parâmetros anteriormente citados (ANVISA, 2003).

### 2.8.1 Parâmetro seletividade

Seletividade é a capacidade do método em quantificar com exatidão o analito de interesse na presença de interferentes. Os interferentes são compostos que podem estar presentes na amostra como substâncias similares, impurezas, produtos de degradação, entre outros (IUPAC, 2002).

A seletividade para um método de separação, tal como a cromatografia, assegura que um determinado sinal ou pico no cromatograma é somente do analito de interesse, dessa forma, esse parâmetro analítico de desempenho deve ser o primeiro a ser verificado.

De acordo com Ribani et al. (2004), a seletividade pode ser obtida comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (de referência), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse. Outro modo de verificar a seletividade é o método de adição

de padrão, que só é utilizado quando não se obtém a matriz isenta dos analitos de interesse.

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011) o efeito matriz é um estudo de seletividade que tem o objetivo de verificar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral gerando diminuição ou ampliação do sinal ou resposta instrumental. O estudo de efeito matriz é fundamental quando se deseja trabalhar com uma curva analítica do analito preparado em solvente, ou seja, uma curva analítica não matrizada. Para aceitação da não existência de efeito matriz, não deve haver efeito matriz em nenhum nível de concentração das fortificações.

### **2.8.2 Parâmetro linearidade**

A linearidade é a obtenção de resultados, a partir de um método analítico, que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em um determinado intervalo ou faixa de concentração. Segundo a IUPAC (2002), a faixa de trabalho é o intervalo de concentração do analito no qual o método é considerado validado.

Para assegurar a linearidade do método é necessário um mínimo de 5 níveis de concentração na curva analítica com um número de replicatas por nível o mais próximo possível daquele empregado na rotina do laboratório (INMETRO, 2007).

Um coeficiente de correlação (R) a partir de 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003). A ANVISA (2012) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90.

### **2.8.3 Parâmetros limite de detecção e de quantificação**

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito presente na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, já o limite de

quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2003; ICH, 2013)

Para Ribani et al. (2004) em técnicas analíticas de separação, como as cromatográficas e eletroforéticas, a melhor forma de calcular o LD e o LQ é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável. O LD pode ser expresso como (equação 1):

$$LD = 3,0 \cdot \frac{s}{S} \quad \text{eq. 1}$$

Em que,  $s$  é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e  $S$  é a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica. Os mesmos critérios do LD podem ser adotados para o LQ utilizando a equação 2:

$$LQ = 10 \cdot \frac{s}{S} \quad \text{eq. 2}$$

#### **2.8.4 Parâmetro recuperação**

Recuperação é o grau de concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro. A recuperação tem por objetivo corrigir os erros sistemáticos das perdas advindas de todas as etapas da marcha analítica, realizadas até a leitura da resposta instrumental, tais como, diluições ou pré-concentração, derivatizações, secagens, etc. (MAPA, 2011).

### 2.8.5 Parâmetro precisão

A precisão expressa o grau de dispersão de uma série de medidas e deve ser considerada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (ICH, 2013). De acordo com o INMETRO (2007), precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, de amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. E os dois modos mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio-padrão.

A repetibilidade ou repetitividade refere-se à variabilidade do método quando é executado pelo mesmo analista, na mesma matriz, no mesmo equipamento em um curto espaço de tempo. Enquanto que, a precisão intermediária refere-se à precisão quando um ou vários fatores são alterados no método dentro de um mesmo laboratório. No entanto, a reprodutibilidade refere-se a precisão entre laboratórios, quando a mesma amostra é analisada por vários laboratórios para fins comparativos (FABRE e ALTRIA, 2001).

Não se deve confundir repetitividade com precisão instrumental. A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações, já a precisão instrumental é medida pelas injeções repetitivas, sequenciais da mesma amostra (RIBANI et al., 2004) ou solução padrão, de 10 a 15 vezes, de forma sucessiva (LANÇAS, 2009).

Não existe uma regra geral para valores máximos de desvio padrão relativo aceitável, entretanto, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um desvio padrão relativo (RSD) de 1 a 2% e em análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD de até 15%, exceto para o limite inferior de quantificação (LIQ), para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (ANVISA, 2012).

## 2.9 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

A análise de componentes principais (ACP) ou PCA, do inglês – Principal Component Analysis, é uma técnica estatística de análise multivariada de dados que

transforma linearmente um conjunto original de variáveis, inicialmente correlacionadas entre si, num conjunto substancialmente menor de variáveis não correlacionadas, que contenha a maior parte da informação do conjunto original (HONGYU et al., 2015).

Um conjunto de dados químicos consiste em um certo número de objetos, descritos por um determinado número de variáveis. Tipicamente, os objetos químicos são compostos, amostras analíticas, espectros ou cromatogramas. As variáveis são características ou propriedades dos objetos, muitas vezes associadas à sua composição, como, por ex., concentrações dos elementos mais importantes, alturas de picos em perfis cromatográficos, ou intensidades e absorvâncias em diferentes comprimentos de onda. A análise exploratória é usada para se tentar detectar padrões de associação no conjunto de dados, a partir dos quais se pode estabelecer relações entre objetos e variáveis, descobrir objetos anômalos ou agrupar objetos (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2006).

O principal objetivo da PCA é reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados, preservando ao mesmo tempo o máximo da informação. Isto é feito calculando-se combinações lineares das variáveis originais. A primeira componente principal,  $PC_1$ , é a combinação linear de máxima variância (isto é, de máxima informação). A segunda componente,  $PC_2$ , também é de máxima variância, porém ortogonal a  $PC_1$ . A terceira é de máxima variância e ortogonal às duas primeiras PCs, e assim por diante. Como esses eixos são calculados em ordem decrescente de importância, muitas vezes a informação relevante fica concentrada nas duas ou três primeiras PCs, que podem ser então examinadas à procura de padrões (BARROS NETO, SCARMINIO & BRUNS, 2006).

A PCA permite reduzir a dimensionalidade a partir da representação do conjunto de dados em um novo sistema de eixos ortogonais, que são as componentes principais (PCs). No espaço original, as amostras são representadas por pontos localizados em um espaço n-dimensional, em que n é igual ao número de variáveis originais. Com a redução de dimensionalidade, os pontos ficam localizados em espaços de dimensões menores definidos pelas PCs, por exemplo, bi- ou tridimensionais (SOUZA e POPPI, 2012).

Matematicamente, a realização da PCA consiste em fatorar a matriz de dados X, de modo que:

$$X = TL^T + E \quad \text{eq 3}$$

Em que  $T$  é a matriz dos escores,  $L$  é a matriz dos pesos, e  $E$  a matriz dos resíduos ou erros. O símbolo  $T$  ( $T$  sobrescrito) é o operador de transposição de matriz (matriz transposta). A primeira componente principal é  $PC_1 = t_1 l_1^T$ , que é a melhor aproximação de posto 1 para  $X$  e corresponde à direção de maior variância no espaço multivariado.  $E_1 = X - t_1 l_1^T$  é o resíduo de  $X$ , descontado  $PC_1$ . A segunda componente principal é  $PC_2 = t_2 l_2^T$ , que é a melhor aproximação de posto 1 para  $E_1$  e corresponde à direção de maior variância no espaço multivariado não modelada por  $PC_1$ , ou seja, ortogonal a ela.  $E_2 = E_1 - t_2 l_2^T$  é o resíduo (erro) deixado por  $PC_1$  e  $PC_2$ . As componentes subsequentes modelam sempre a direção de maior variância no espaço multidimensional não modelado pelas PCs anteriores e são sempre ortogonais a todas elas. É possível realizar uma truncagem na sequência das componentes principais mantendo apenas um número pequeno de PCs que já respondem por uma parcela significativa da informação total contida na estrutura de dados. Na prática, para fazer uma análise de componentes principais, calcula-se inicialmente a matriz de covariância,  $C$ , para dados centrados na média, ou a matriz de correlação,  $R$ , para dados autoescalados, em que:

$$C(\text{ou } R) = \frac{E_0^T \cdot E_0}{(n-1)} \quad \text{eq 4}$$

Onde  $E_0$  é a matriz pré-processada (que será definida posteriormente), e  $n$  é o número de linhas da matriz. Em seguida calcula-se os autovalores e autovetores normalizados de  $C$  ou  $R$ , então tem-se:

$$CL = \Lambda L \quad \text{eq 5}$$

Em que,  $L$  é a matriz diagonal dos autovalores. Cada autovetor  $l$  é um vetor de pesos de uma componente principal. Cada autovalor  $l$  fornece a quantidade de variância explicada pela respectiva componente, de modo que  $PC_1$  tem o maior autovalor,  $PC_2$  o segundo maior, e assim por diante. Outra operação algébrica, a decomposição em valores singulares, e um algoritmo numérico, o NIPALS, também podem ser usados para executar uma análise de componentes principais (LYRA et al., 2010).

Os escores representam as coordenadas das amostras (linhas da matriz  $X$ ) no sistema de eixos formados pelos componentes principais. Cada componente principal é constituído pela combinação linear das variáveis originais e os coeficientes da combinação são denominados pesos. Matematicamente, os pesos são os cossenos dos ângulos entre as variáveis originais e os componentes principais (PC), representando, portanto, o quanto cada variável original contribui para uma determinada PC. A primeira componente principal (PC1) é traçada no sentido da maior variação no conjunto de dados; a segunda (PC2) é traçada ortogonalmente à primeira, com o intuito de descrever a maior porcentagem da variação não explicada pela PC1 e assim por diante; enquanto os escores representam as relações de similaridade entre as amostras. A avaliação dos pesos permite entender quais variáveis mais contribuem para os agrupamentos observados no gráfico dos escores. Através da análise conjunta do gráfico de escores e pesos, é possível verificar quais variáveis são responsáveis pelas diferenças observadas entre as amostras. O número de componentes principais a ser utilizado no modelo PCA é determinado pela porcentagem de variância explicada. Assim, seleciona-se um número de componentes de tal maneira que a maior porcentagem da variação presente no conjunto de dados originais seja capturada (WOLD, ESBENSEN e GELADI, 1987, citado por SOUZA & POPPI, 2012).

Componentes que possuem pouca informação devem ser retirados da análise sem que isso implique em uma perda significativa de informação. O descarte de variáveis pode ser feito por meio de componentes principais, que têm como principal função resumir a informação contida no complexo de variáveis originais, possibilitando eliminar as informações redundantes, em decorrência da correlação com outras variáveis presentes na análise (KHATTREE e NAIK, 2000).

### **2.9.1 Técnica de Pré-processamento: autoescalamento**

A matriz de dados construída usando os valores das propriedades dos elementos apresenta variáveis com significados físicos, magnitudes e unidades distintas. Dessa forma, tais dados não podem ser combinados. Sendo assim, nas variáveis, a técnica de pré-processamento mais adequado é o autoescalamento, em que a matriz de dados é centrada na média dos valores subtraindo-se o valor de cada elemento da matriz da

média de cada variável (coluna) e, em seguida, é normalizada pelo desvio padrão dividindo-se o valor de cada elemento centrado na média pelo desvio padrão da variável. O propósito dessa transformação é permitir que todas as variáveis exerçam influências equitativas nos resultados das componentes principais, além de torná-las adimensionais (LYRA et al., 2010).

## 2.10 ANÁLISE DE AGRUPAMENTOS

O segundo método de análise exploratória mais usado é a análise de agrupamentos hierárquica (AAH), que é usada para analisar a estrutura do conjunto de dados em termos de grupos definidos de maneira hierárquica, de acordo com a similaridade entre objetos ou variáveis. Embora existam muitas variantes matemáticas, o que define a similaridade entre dois pontos é a distância entre eles no espaço multidimensional. Quanto menor essa distância, maior a similaridade entre os objetos (ou variáveis) representados pelos dois pontos (BARROS NETO, SCARMINIO & BRUNS, 2006).

Para aplicar a AAH, em um conjunto de dados, é muito importante a escolha de um coeficiente que quantifique quão semelhantes são dois objetos. Esse coeficiente pode ser dividido em duas categorias, que dizem respeito à estimação de uma medida de similaridade, ou dissimilaridade, entre os indivíduos, ou populações, a serem agrupados. Um exemplo de medida de similaridade é o coeficiente de correlação, pois quanto maior seu valor, maior a associação, e de dissimilaridade a distância euclidiana, pois quanto menor o valor mais próximo os objetos estão uns dos outros (VINCINI e SOUZA, 2005). Segundo Regazzi (2001), citado por Vincini e Souza (2005), “embora a distância euclidiana seja uma medida de dissimilaridade, às vezes ela é referida como uma medida de semelhança, pois quanto maior seu valor, menos parecidos são os indivíduos ou unidades amostrais”.

De acordo com Manly (1986), a distância euclidiana, quando for estimada a partir das variáveis originais, apresenta a inconveniência de ser influenciada pela escala de medida, pelo número de variáveis e pela correlação existente entre as mesmas. Para contornar as escalas, faz-se o autoescalamento, ou seja, a padronização das variáveis em estudo, para que possuam a variância igual à unidade (VINCINI E SOUZA, 2005).

Acredita-se que a formulação do problema seja a parte mais importante da análise de agrupamentos, ou seja, a escolha das variáveis nas quais se baseará o processo de aglomeração. A inclusão de uma, ou duas variáveis, sem importância, poderá vir a distorcer o resultado final da análise. O conjunto de variáveis escolhido deve descrever a semelhança entre objetos, em termos relevantes para o problema em pesquisa. Esta fase é importante para a AA, pois é onde se fixa o critério de homogeneidade. Logo após, faz-se a coleta dos dados, que serão reunidos numa tabela com m colunas (variáveis) e n linhas (objetos) (VINCINI E SOUZA, 2005).

De acordo com Pereira (1999) a AA pode ser sintetizada pelos seguintes procedimentos:

- 1) Cálculo das distâncias euclidianas entre os objetos estudados no espaço multiplano de todas as variáveis consideradas, em que as principais medidas de distâncias são: euclidiana, euclidiana ao quadrado, city block, entre outros.
- 2) Seqüência de agrupamento por proximidade geométrica, em que as regras para agrupamento mais utilizadas são a ligação simples, do inglês *single linkage*, que é o cálculo a partir do objeto mais próximo, e a ligação completa, que é computado pela maior distância entre dois objetos.
- 3) Reconhecimento dos passos de agrupamento para identificação coerente de grupos dentro do universo de objetos estudados.

A síntese gráfica do trabalho desenvolvido é representada pelo dendograma, também chamado de gráfico ou diagrama em árvore, que sintetiza a informação, ocasionando uma pequena perda da mesma. Embora aconteça essa perda de informação, esse gráfico é de grande utilidade para a classificação, comparação e discussão de agrupamentos (VINCINI E SOUZA, 2005).

Existem três regras que se deve utilizar para interpretar um dendograma, VALENTIN (2000).

- 1) Escrever no próprio dendograma, em frente de cada amostra, as suas características, tudo o que poderá revelar os aspectos comuns entre as amostras de um mesmo grupo e as diferenças com as amostras de outro grupo;
- 2) Começar a “ler” o dendograma dos baixos valores de similaridade, para os maiores. Assim, deverão ser interpretados, em primeiro lugar, os “grandes

grupos”, geralmente poucos numerosos, pois seria em vão tentar explicar os grupos menores sem ter conseguido formular, antes, uma hipótese plausível sobre os grandes;

- 3) Quando é possível, desenvolver, paralelamente, com os mesmos dados, uma análise de ordenação, que evidenciará os fatores responsáveis pelos agrupamentos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método para determinação de polifenóis em vinhos tintos comerciais da América do Sul, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção (HPLC) no UV-Vis e avaliar agrupamentos nos vinhos de acordo com o teor dos compostos fenólicos individuais e a origem geográfica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar os modos de eluição isocrático e gradiente, em soluções de referência e em amostras de vinhos tintos, para realizar a separação dos analitos em estudo por HPLC/UV-Vis;
- Estabelecer as melhores condições de análise;
- Realizar a validação do método proposto;
- Aplicar o método validado a amostras reais de vinho tinto;
- Fazer análise de agrupamentos (AA) para encontrar os grupos de vinhos com as mesmas características de acordo com a região de origem e com o teor dos polifenóis individuais quantificados.
- Fazer análise de componentes principais (PCA) para investigar as diferenças entre os vinhos de acordo com a região de origem e com o teor dos polifenóis individuais quantificados.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 EQUIPAMENTOS, COLUNA CROMATOGRÁFICA E SOFTWARE

Um espectrômetro de UV/VIS Lambda 25 (Perkin Elmer) foi usado para a aquisição do espectro de absorção das soluções padrão dos oito analitos estudados. O sistema cromatográfico consistiu de: cromatógrafo líquido (Shimadzu LC-20A, Kyoto, Japão), equipado com um sistema de bombeamento binário de solventes (modelo LC-6AD), detector de UV-VIS (modelo SPD-10AV), injetor automático (modelo SIL-20A), forno para coluna (modelo CTO-20A), degaseificador (modelo DGU-14A) e módulo de comunicação entre o HPLC e o computador (modelo CBM-20A).

As separações cromatográficas foram conduzidas com uma coluna de fase reversa com partículas de núcleo fundido (do inglês, fused-core) da Supelco, sendo denominada de Ascentis™ Express C-18, com dimensões 250 mm x 4,6 mm d.i. (diâmetro interno) e 5,0 µm de tamanho de partícula. O software empregado para a aquisição e tratamento dos dados foi o LC Solution v.1.21. E as condições cromatográficas foram estabelecidas a partir de testes de eluição isocrática e em gradiente.

### 4.2 REAGENTES E SOLVENTES

Todos os reagentes usados foram de grau analítico. A água ultra-pura, utilizada nas análises e para compor a fase móvel, foi obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA) com resistividade de 18,2 MΩ cm.

Os solventes, metanol e acetonitrila, de grau HPLC foram obtidos da Sigma Aldrich (EUA) e J. T. Baker (EUA), respectivamente. Oito substâncias de referência de ácido gálico (≥99%), (+)-Catequina (≥98%), (-)-epicatequina (≥96%), quercetina-3-glucosídeo, miricetina (≥96%), *trans*-resveratol (≥99%), quercetina (≥95%) e quempferol (≥90%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Ácido fórmico (J.T. Baker, EUA) foi utilizado para acidificar a água que compõe a fase móvel. Os solventes

utilizados como fase móvel foram previamente filtrados por meio de membranas de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore) e desgaseificados por sonicação sob vácuo por 40 minutos.

#### 4.3 SOLUÇÕES ESTOQUE DE REFERÊNCIA

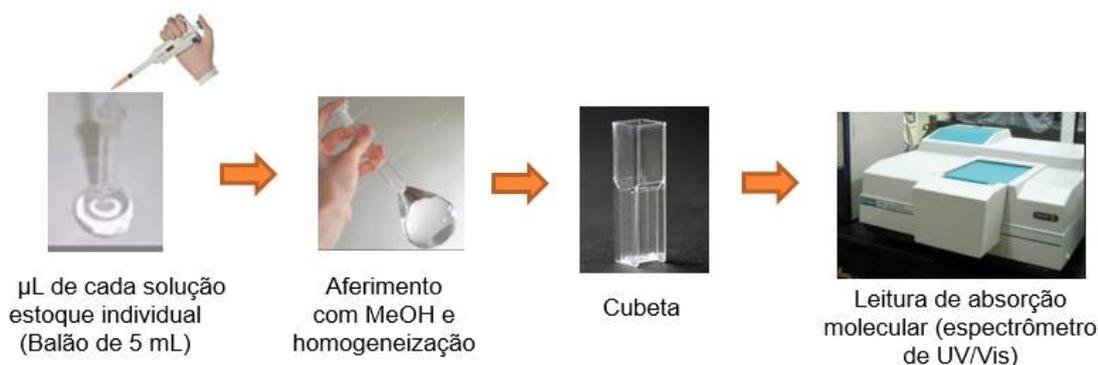
Soluções estoque à 100  $\text{mg L}^{-1}$ , dos oito analitos: ácido gálico (GA), catequina (CAT), epicatequina (EPI), quercetina-3-glicosídeo (Q3G), miricetina (MYR), resveratrol (REV), quercetina (QUR), e quempferol (KAM) foram preparadas individualmente em metanol (MeOH), rotuladas e armazenadas em freezer na ausência de luz, de -18 a -20  $^{\circ}\text{C}$ , (Figura 9) permanecendo estáveis durante 4 meses.



**Figura 9.** Fluxograma do preparo das soluções estoque a 100  $\text{mg L}^{-1}$

##### 4.3.1 Preparo das soluções para seleção do comprimento de onda dos analitos

As soluções estoque (100  $\text{mg L}^{-1}$ ) dos analitos, foram diluídas, individualmente, em MeOH à concentração de 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  para GA, MYR, REV, QUR e KAM; de 5  $\text{mg L}^{-1}$  para CAT e EPI e de 10,0  $\text{mg L}^{-1}$  para Q3G. O volume em  $\mu\text{L}$  de cada solução estoque foi transferido para balões volumétricos de 5 mL, os quais foram, em seguida, aferidos e homogeneizados. A solução diluída de cada analito, foi transferida para uma cubeta, e a varredura do comprimento de onda foi realizada para cada solução (Figura 10). A varredura foi realizada para selecionar o comprimento de onda de absorção de cada analito.



**Figura 10.** Fluxograma do preparo das soluções diluídas e da leitura de absorção molecular.

#### 4.3.2 Preparo da solução com os oito analitos

Foram preparadas duas soluções contendo a mistura das soluções estoque dos oito analitos nas concentrações de 5,0 e 10,0 mg L<sup>-1</sup>, para isso 500 e 1000 μL, respectivamente, de cada uma das oito soluções estoque de GA, CAT, EPI, REV, MYR, QUR, Q3G e KAM, foram transferidos para dois balões volumétricos de 10 mL, que em seguida foram aferidos e homogeneizados. As soluções foram filtradas, empregando filtro micropore, os filtrados foram coletados em vials de vidro com capacidade de 1,5 mL (Figura 11) e imediatamente, posicionados no suporte do injetor automático do cromatógrafo.



**Figura 11.** Fluxograma do preparo da solução à 5,0 mg L<sup>-1</sup> com os oito analitos

### 4.3.3 Preparo da solução da amostra

Uma solução contendo vinho, metanol e água ultra-pura foi preparada para realizar a separação dos analitos da amostra no cromatograma. Dessa forma, 1000  $\mu\text{L}$  de vinho + 4000  $\mu\text{L}$  de metanol foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL, que foi aferido com água ultra-pura, e em seguida homogeneizado (diluição 1:10). Essa solução foi filtrada, empregando filtro micropore, o filtrado foi coletado em vial de vidro com capacidade de 1,5 mL, (Figura 12) e imediatamente, posicionado no suporte do injetor automático do cromatógrafo.



**Figura 12.** Fluxograma do preparo da solução de vinho

### 4.3.4 Preparo das soluções contendo cada analito individualmente

Oito soluções a 10,0  $\text{mg L}^{-1}$  foram preparadas, contendo cada um dos analitos individualmente. Para o preparo, foi transferido 1000  $\mu\text{L}$  de cada uma das oito soluções estoque de referência de GA, CAT, EPI, REV, MYR, QUR, Q3G e KAM, para oito balões volumétricos de 10 mL. Em seguida, cada balão foi aferido com água ultra-pura e homogeneizado. As soluções foram filtradas separadamente, empregando um filtro micropore para cada uma das oito soluções. O filtrado foi coletado em oito vials de vidro, previamente identificados, com capacidade de 1,5 mL, e imediatamente posicionados no suporte do injetor automático do cromatógrafo.

## 4.4 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

### 4.4.1 Seleção da fase móvel

A fase móvel na cromatografia líquida em fase reversa é composta por água ultrapura e solvente orgânico polar, em que os solventes mais empregados são acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH). Alguns testes de corridas cromatográficas foram realizados com metanol. No entanto, decidiu-se utilizar ACN em vez de MeOH pelo fato da ACN ser menos viscosa, o que facilita o bombeamento da fase móvel e possibilita o uso de vazões altas, diminuindo o tempo da corrida cromatográfica e mantendo a eficiência da coluna, que é afetada pelo alargamento do sinal (HOLLER, SKOOG e CROUCH, 2009).

A água ultrapura foi acidificada até  $\text{pH} = 3,0$ , pois os valores de  $\text{pK}_a$  para os polifenóis são em torno de 9 (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 2012). A adição de um ácido fraco evita a ionização dos grupos hidroxilas das substâncias como os polifenóis. A facilidade da ionização dos grupos hidroxilas dos compostos fenólicos faz com que apareçam caudas nos picos das substâncias correspondentes (PORGALI e BUYUKTUNCEL, 2012) prejudicando a simetria dos mesmos e conseqüentemente reduzindo os valores de resolução (HOLLER, SKOOG e CROUCH, 2009).

Porgali e Buyuktuncel (2012) avaliaram o comportamento da retenção dos polifenóis na presença de ácido acético e ácido fórmico e com este último, os autores observaram que todos os picos referentes às substâncias padrão foram separados com sucesso. Portanto, adicionou-se ácido fórmico como um modificador de fase móvel para inibir a dissociação dos grupos hidroxilas dos compostos fenólicos.

### 4.4.2 Testes com eluição isocrática

A vazão e a composição da fase móvel foram definidas, inicialmente, a partir de um planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central (Tabela 1).

**Tabela 1.** Planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central, com a percentagem de ACN variando de 20 a 40%.

Ensaio	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	ACN (%)	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>
1	0,8	20	-	-
2	1,2	20	+	-
3	0,8	40	-	+
4	1,2	40	+	+
5*	1,0	30	0	0

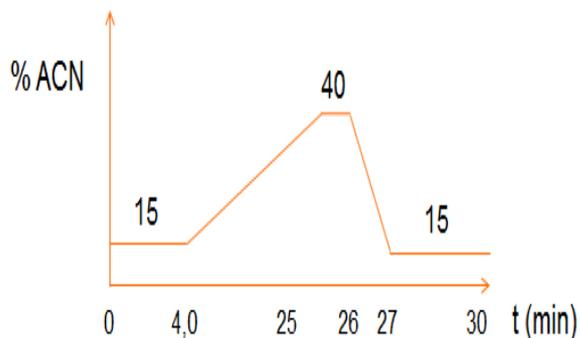
X<sub>1</sub> = Vazão; X<sub>2</sub> = ACN; \* = triplicata de ponto central

Primeiramente, realizaram-se cinco ensaios empregando a eluição isocrática, com a solução contendo a mistura dos 8 analitos, sem adição de amostra. O volume de injeção empregado foi de 20 µL e a temperatura da coluna foi fixada em 35 °C. Apenas os ensaios 1 e 2 foram testados também com amostra de vinho diluída 1:1, 1:5 e 1:10 (v/v), sem adição de analitos. Os ensaios 1 e 2 também foram testados com metanol, no lugar da acetonitrila, porém o tempo da corrida cromatográfica foi significativamente maior empregando o metanol, devido a maior viscosidade dele. A partir deste momento, fez-se testes usando apenas a acetonitrila como componente da fase móvel juntamente com a água ultra-pura acidificada (solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%).

#### 4.4.3 Testes com a eluição em gradiente

Dois gradientes de eluição foram testados com o objetivo de se obter a melhor separação dos picos cromatográficos, ou seja, melhores valores de resolução (R) LANÇAS (2009) e seletividade ( $\alpha$ ) (HOLLER, SKOOG e CROUCH, 2009).

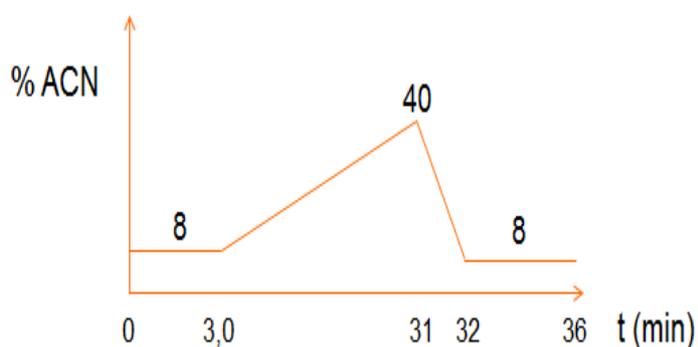
Após os testes em que se empregou a eluição isocrática, testou-se a eluição em gradiente (Figura 13), em que se aumentou o percentual de água na fase móvel para 85% (15% de acetonitrila, ACN), no início da corrida cromatográfica, com o intuito de se obter valores maiores de  $\alpha$  e R, principalmente para os analitos que eluem primeiro. A vazão empregada foi de 1,2 mL min<sup>-1</sup>.



**Figura 13.** Gradiente de eluição: porcentagem de ACN (15%) em função do tempo.

Nesse primeiro teste, a eluição em gradiente iniciou com 15% de ACN (92% de água) e permaneceu na mesma composição durante 4 minutos. O percentual de ACN aumentou gradativamente, de 4 a 25 min, até alcançar 40%, e permaneceu nesse mesmo percentual por 1 min. Em seguida, retornou à composição inicial (15% de ACN + 85% de água) e permaneceu nessa mesma composição por 3 min, para estabilizar a fase estacionária (coluna) para a próxima injeção.

Um novo gradiente de eluição (Figura 14) foi testado, no qual o percentual de água da fase móvel foi aumentado para 92% (8% de ACN), no início da corrida cromatográfica, para se alcançar valores de  $\alpha$  e R aceitáveis para todos os analitos, tanto na solução da mistura dos 8 analitos, quanto na amostra de vinho diluída 1:10.



**Figura 14:** Gradiente de eluição: porcentagem de ACN (8%) em função do tempo.

Nesse segundo teste, a eluição em gradiente iniciou com 8% de ACN (92% de água) e permaneceu nessa composição durante 3 minutos. O percentual de ACN aumentou gradativamente, de 3 a 31 min, até alcançar 40%. Em seguida, retornou à composição inicial (8% de ACN + 92% de água) e permaneceu nessa mesma composição por 4 min, para estabilizar a fase estacionária para a próxima injeção.

Testou-se também a eluição em gradiente com a amostra de vinho diluída em 1:5 e 1:10 (v/v), sem adição de analitos. Devido a essas diluições da amostra, além do volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$  empregado nas análises anteriores, mais dois volumes de injeção foram testados, de 30 e 50  $\mu\text{L}$ , com objetivo de aumentar intensidade dos sinais cromatográficos. Além disso, diferentes temperaturas, 25, 35 e 45  $^{\circ}\text{C}$  foram testadas, e a vazão foi aumentada para 1,5  $\text{mL min}^{-1}$ , com intuito de reduzir o tempo da corrida cromatográfica. Desta forma, o gradiente da Figura 15 foi empregado nas análises posteriores.

#### **4.4.4 Identificação dos analitos nos cromatogramas**

A identificação dos compostos foi realizada por injeção individual de cada uma das soluções de referência diluídas. Assim, para cada composto o tempo de retenção foi determinado, como também a ordem de eluição.

##### **4.4.4.1 Corridas cromatográficas realizadas**

Inicialmente, foram realizadas oito corridas cromatográficas com as soluções contendo cada analito individualmente, para ser identificado o tempo de retenção ( $T_R$ ), de cada analito.

A 9ª e a 10ª corridas cromatográficas foram realizadas com a injeção da solução contendo os 8 analitos misturados, na concentração de 5 e 10  $\text{mg L}^{-1}$  para se observar a separação dos mesmos, e também se os tempos de retenção eram os mesmos.

A 11<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup>, 13<sup>a</sup> corridas cromatográficas foram realizadas com as amostras de vinho diluído (1:1, 1:5 e 1:10), para se observar a separação dos analitos do vinho na amostra.

A 14<sup>a</sup> corrida cromatográfica foi realizada com uma amostra de vinho (diluído 1:10) fortificada com as 8 soluções estoque de referência, para se confirmar o tempo de retenção dos oito analitos de interesse.

#### 4.5 AMOSTRAS DE VINHO

Trinta e duas amostras de vinho tinto do Brasil (Vale do São Francisco e Rio Grande do Sul) e da Argentina, de diferentes safras de 2008 a 2015, foram adquiridas em mercados locais do Recife-PE.

Na Tabela 2 estão apresentados a codificação das amostras, procedência dos vinhos, e as respectivas vinícolas, variedades de uva, ano de produção e teor alcoólico.

As amostras de vinhos tintos provenientes do Vale do São Francisco, região localizada em Pernambuco/Bahia, no Nordeste do Brasil, consistiu em 10 amostras, sendo quatro amostras de Cabernet Sauvignon: 2013 (2) e 2014 (2); quatro amostras de Syrah: 2012 (1) 2013 (2) e 2014 (1); uma amostra de Ruby Cabernet (2012) e uma amostra de Petite Syrah (2012). Outras 10 amostras de vinhos tintos foram provenientes do Rio Grande do Sul, no Sul do Brasil, sendo compostas de oito amostras de Cabernet Sauvignon: 2008 (1) 2010 (1) 2011 (2) 2013 (2) 2014 (1) 2015 (1) e duas amostras de Cabernet/Merlot (2013). Os vinhos tintos da Argentina, num total de 12 amostras, consistiram em oito amostras de Cabernet Sauvignon: 2010 (2) 2011 (1) 2012 (1) 2013 (2) 2014 (1), e 2015 (1); e quatro amostras de Syrah: 2011 (2) 2013 (1), e 2014 (1).

Além disso, duas amostras das variedades Ruby Cabernet e Petite Syrah provenientes do VSF, e mais duas amostras da variedade Cabernet/Merlot produzidas no RS, foram incluídas com o intuito de aumentar o número de amostras.

Os vinhos foram armazenados em local escuro a temperatura ambiente até o momento das análises. As amostras foram analisadas imediatamente após abertura da garrafa.

**Tabela 2.** Amostras de vinhos, variedades de uva, procedência, ano de elaboração e teor alcoólico.

<b>Amostras</b>	<b>Variedades de uva</b>	<b>Procedência</b>	<b>Ano</b>	<b>Teor alcoólico (%)</b>
1	CS	Campanha-RS	2014	12,5
2	CS	Campanha-RS	2013	13,0
3	CS	VSF-PE	2013	12,0
4	CS	VSF-PE	2014	12,0
5	CS	VSF-PE	2014	13,0
6	Syrah	VSF-PE	2014	13,0
7	Syrah	VSF-PE	2013	14,0
8	Syrah	VSF-PE	2013	13,0
9	Cab/Merlot	Serra Gaúcha-RS	2013	12,0
10	Syrah	VSF-PE	2012	12,0
11	Ruby Cab	VSF-PE	2012	12,0
12	Syrah	San Juan-ARG	2011	13,5
13	Syrah	Mendoza-ARG	2011	13,5
14	CS	Mendoza-ARG	2013	13,5
15	Syrah	San Juan-ARG	2014	13,0
16	Syrah	Mendoza-ARG	2013	13,0
17	CS	Mendoza-ARG	2013	13,8
18	CS	Valle Cafayate-ARG	2014	13,5
19	CS	Serra Gaúcha - RS	2011	13,5
20	Cab/Merlot	Campanha-RS	2013	12,5
21	CS	Valle Cafayate-ARG	2012	13,5
22	CS	Bento Gonçalves-RS	2013	13,0
23	CS	Mendoza-ARG	2010	13,5
24	CS	Mendoza-ARG	2010	14,0
25	CS	Bento Gonçalves-RS	2011	13,5
26	Syrah	V.S.F-PE	2012	14,0
27	CS	San Juan-ARG	2011	13,5
28	CS	Serra Gaúcha-RS	2010	13,0
29	CS	Campanha-RS	2015	12,0
30	CS	Serra Gaúcha-RS	2008	13,5
31	CS	Mendoza-ARG	2015	13,0
32	Petit Syrah	VSF-PE	2012	12,0

CS = Cabernet Sauvignon; Cab = Carbenet; VSF-PE = Vale do São Francisco-Pernambuco; RS = Rio Grande do Sul; ARG = Argentina.

## 4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS DE VINHO

### 4.6.1 Amostra com adição de analitos no nível de concentração 1 (adição 1)

Separaram-se três balões volumétricos de 10 mL e para cada um deles transferiu-se 1000  $\mu\text{L}$  de vinho e 1960  $\mu\text{L}$  de metanol. Em seguida foi adicionado: 5,0  $\mu\text{L}$  de quempferol, 25  $\mu\text{L}$  de miricetina, 25  $\mu\text{L}$  quercetina, 25  $\mu\text{L}$  resveratrol, 100  $\mu\text{L}$  de ácido gálico, 100  $\mu\text{L}$  epicatequina, 300  $\mu\text{L}$  de catequina e 300  $\mu\text{L}$  quercetina-3-glucosídeo, em cada balão individualmente; por fim completou-se o volume de cada balão com água ultrapura.

### 4.6.2 Amostra com adição de analitos no nível de concentração 2 (adição 2)

Separaram-se três balões volumétricos de 10 mL e para cada um deles transferiu-se 1000  $\mu\text{L}$  de vinho. Em seguida foi adicionado: 15,0  $\mu\text{L}$  de quempferol, 75  $\mu\text{L}$  de miricetina, 75  $\mu\text{L}$  quercetina, 75  $\mu\text{L}$  resveratrol, 300  $\mu\text{L}$  de ácido gálico, 300  $\mu\text{L}$  epicatequina, 1000  $\mu\text{L}$  de catequina e 1000  $\mu\text{L}$  quercetina-3-glucosídeo, em cada balão individualmente; por fim os balões foram aferidos com água ultrapura.

### 4.6.3 Preparo das soluções das amostras de vinho

Separaram-se três balões volumétricos de 10 mL e para cada um deles transferiu-se 1000  $\mu\text{L}$  da amostra de vinho. Em seguida foi adicionado 2840  $\mu\text{L}$  de metanol e por fim, cada balão foi aferido com água ultrapura. O volume de metanol (2840  $\mu\text{L}$ ) adicionado na preparação dessa amostra de vinho sem adição de analitos, corresponde tanto ao somatório do volume adicionado no preparo da amostra de adição 1 (1960 + 5,0 + 25 + 25 + 25 + 100 + 100 + 300 + 300)  $\mu\text{L}$ , quanto na da amostra de adição 2 (15,0 + 75 + 75 + 75 + 300 + 300 + 1000 + 1000)  $\mu\text{L}$ .

Cada amostra foi filtrada com filtro de membrana de fluoreto de polivinilideno de 0,45  $\mu\text{m}$  e o filtrado foi injetado automaticamente no cromatógrafo.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NOS VINHOS

Os compostos fenólicos foram identificados nos vinhos tintos por comparação dos tempos de retenção dos sinais obtidos com as soluções padrão e com as soluções das amostras. A área do sinal foi usada para a análise quantitativa. Três replicatas foram realizadas para cada amostra sem fortificação, e também com adição de padrão em dois níveis de concentração (100% e 200%). Os valores foram registrados como  $\text{mg L}^{-1}$ .

#### 4.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Os parâmetros de qualidade do método cromatográfico tais como linearidade, limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão e exatidão (recuperação) foram calculados de acordo com os critérios estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011).

##### 4.8.1 Linearidade

Para definir a faixa de concentração apropriada para cada analito, para fazer as curvas analíticas, comparou-se a área do sinal, obtida pelo cromatograma, de cada analito (GA, CAT, EPI, REV, MYR, QUR, Q3G e KAM) na solução de referência à 5  $\text{mg L}^{-1}$ , com a área do sinal dos respectivos analitos de interesse, na solução da amostra de vinho diluído 1:10. Desse modo, a concentração das soluções padrão, para as curvas analíticas, variaram de 0,20 a 9,0  $\text{mg L}^{-1}$  para ácido gálico e epicatequina; 0,40 a 22,0  $\text{mg L}^{-1}$  para catequina e quercetina-3-glucosídeo; 0,05-1,50  $\text{mg L}^{-1}$  para miricetina, quercetina e resveratrol; 0,025-0,30  $\text{mg L}^{-1}$  para quemperol.

As curvas analíticas foram calculadas com base na correlação linear entre a área do sinal (eixo dos y) e a concentração (eixo x) da solução padrão em  $\text{mg L}^{-1}$ . As análises de regressão linear foram usadas para calcular os coeficientes linear, angular e a correlação de cada curva de calibração.

#### **4.8.2 Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ)**

Os cálculos para limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram baseados no desvio padrão da resposta do branco (s) ( $n = 15$ ) e no coeficiente angular (S) ( $n = 4$ ) da curva analítica, de acordo com a equação  $\text{LOD} = 3,3 (s/S)$  e  $\text{LOQ} = 10 (s/S)$ .

#### **4.8.3 Precisão**

A precisão, expressa como desvio padrão relativo (RSD), foi avaliada de duas formas: a partir da variabilidade intradia, em que o preparo da solução padrão, com a menor concentração da curva de calibração de cada analito, foi repetida 15 vezes em 1 dia (precisão intradia); e a partir das replicatas ( $n=3$ ) das alíquotas de vinho diluídas fortificadas nos dois níveis de concentração. O critério de aceitação foi de 20 % no máximo (MAPA, 2011).

#### **4.8.4 Exatidão**

A recuperação foi estimada fortificando três alíquotas de vinho diluídas (1:10) em dois níveis de concentração dentro da faixa de trabalho para cada analito. Os níveis de fortificação empregados foram: aproximadamente 100% e 200% da concentração de cada analito encontrado nas amostras de vinho estudadas.

Os valores de recuperação, expressos em percentagem, foram calculados usando a equação 6:

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_0}{C_a} \cdot 100 \quad \text{eq. 6}$$

Onde R representa os valores de recuperação dos compostos fenólicos;  $C_1$  é a concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) do polifenol detectado no sistema quando quantidades conhecidas de soluções padrão são adicionadas;  $C_0$  é a concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de polifenol presente na amostra de vinho sem solução padrão acrescentada; e  $C_a$  é a concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de soluções padrão adicionadas à amostra.

## 4.9 PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

### 4.9.1 Resolução

A resolução, R, foi calculada de acordo com a equação 7, empregando a largura do pico a meia altura, (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2010) nos cromatogramas das amostras de vinho. De acordo com Lanças (2009), uma indicação de picos bem resolvidos é obtida quando o valor de resolução se encontra a partir de 1,5.

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} = 1,177 \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h1} + w_{h2}} \right) \quad \text{eq. 7}$$

### 4.9.2 Fator de separação ou seletividade

A seletividade,  $\alpha$ , foi calculada de acordo com a equação 8, empregando os tempos de retenção de dois analitos consecutivos nos cromatogramas das amostras. Os valores de  $\alpha$  acima da unidade (1,0), indicam que não houve co-eluição dos analitos (HOLLER, SKOOG E CROUCH, 2009).

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} \quad \text{eq. 8}$$

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Um conjunto de dados foi obtido e consistiu em 32 amostras e 8 variáveis. Esses dados foram dispostos em uma tabela ou matriz de tamanho 32 x 8 (linhas x colunas), representando 32 amostras de vinho tinto e 8 compostos fenólicos (GA; CAT; EPI; Q3G; MYR; REV; QUR e KAM) com concentração expressa em mg L<sup>-1</sup>.

Para encontrar as componentes principais para a matriz foi necessário pré-processar os dados, ou seja, fazer o autoescalamento. Isso significa dizer que de cada dado a média foi subtraída e depois o valor obtido foi dividido pelo desvio padrão (BROA e SMILD, 2014).

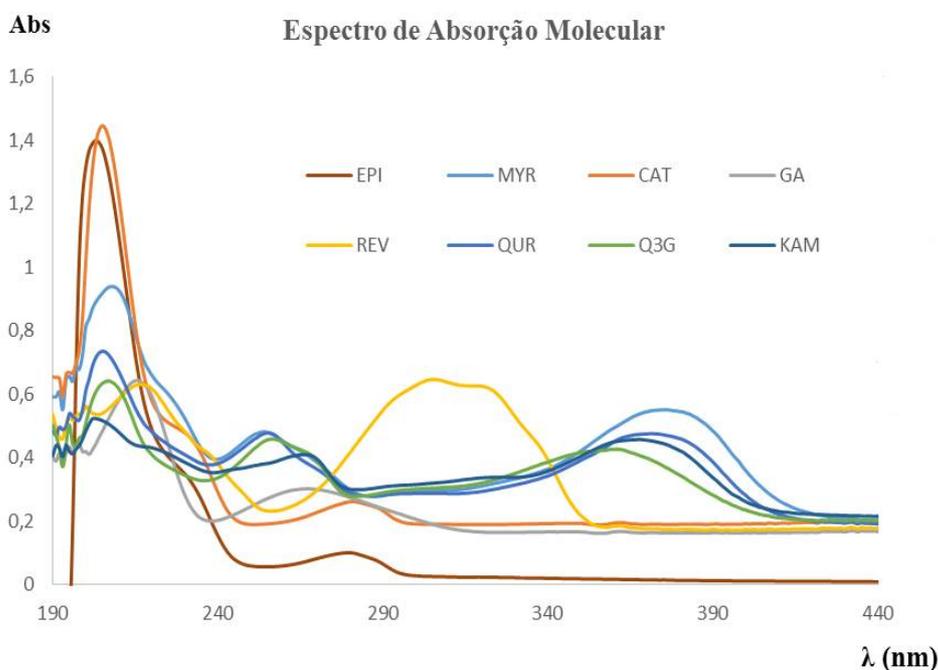
A análise de agrupamentos (AA) foi aplicada a matriz de dados com o objetivo de reunir amostras de vinhos semelhantes em grupos por região. As amostras que possuem a menor distância entre si são mais semelhantes, do que as amostras com a maior distância.

Os softwares LC solution, Unscrambler e Statística 7.0 foram utilizados para processamento dos dados e análise estatística.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SELEÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA DOS ANALITOS

A seleção dos comprimentos de onda ( $\lambda$ s) foi realizada a partir dos resultados do espectro de absorção molecular, Figura 15, de cada solução de referência ( $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) na região ultravioleta-visível (UV/Vis). Após a obtenção do espectro observou-se que a região de absorção ótima ocorreu em 279 nm para ácido gálico (GA), catequina (CAT), epicatequina (EPI) e resveratrol (REV), e que o  $\lambda$  ótimo para miricetina (MYR), quercetina (QUR), quercetina-3-glucosídeo (Q-3-G) e quemperol (KAM), foi de 360 nm, confirmando os resultados descritos na literatura. (NIKFARDJAM et al., 2006; PORGALI e BUYUKTUNCEL, 2012; GUBUZ et al., 2007; SERUGA, NOVAK e JAKOBEK, 2011). Devido ao fato de o sistema cromatográfico consistir de um detector de UV-VIS com apenas duas lâmpadas, uma de deutério e outra de arco de xenônio, apenas dois comprimentos de onda puderam ser empregados.



**Figura 15.** Espectro de absorção molecular na região UV/Vis (190-500 nm) para ácido gálico (GA), catequina (CAT), epicatequina (EPI), resveratrol (REV), miricetina (MYR), quercetina (QUR), quercetina-3-glucosídeo (Q-3-G) e quemperol (KAM).

Observou-se, no espectro de absorção molecular, que abaixo do comprimento de onda de 240 nm (190 - 240 nm), aparecem sinais de absorbância (Abs) intensos. O comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\text{max}}$ ) do metanol (empregado no preparo das soluções de referência) é de 205 nm, e em geral, os compostos aromáticos exibem uma série de bandas relativamente intensas nesse mesmo comprimento de onda. Por isso, a faixa de comprimento de onda de 190 nm a 240 nm foi rejeitada, e as bandas menos intensas na faixa de 240 - 390 nm foram consideradas na seleção dos  $\lambda$ s ótimos para os analitos, ou seja, 279 nm para ácido gálico (GA), catequina (CAT), epicatequina (EPI) e resveratrol (REV), e 360 nm para miricetina (MYR), quercetina (QUR), quercetina-3-glucosídeo (Q-3-G) e quempferol (KAM).

## 5.2 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

### 5.2.1 Seleção da fase móvel

A seleção da fase móvel foi estabelecida com base nos experimentos de Porgali e Buyuktuncel (2012), sendo composta por solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (eluyente A) e acetonitrila (eluyente B).

A acetonitrila foi empregada como solvente orgânico devido à baixa viscosidade em comparação com o metanol. Dessa forma, se pôde trabalhar com maior vazão de fase móvel e o tempo da corrida cromatográfica foi reduzido.

A adição de ácido fórmico na solução do eluyente A preveniu o surgimento de caudas nos picos cromatográficos dos analitos de interesse. Os picos se apresentaram simétricos com ótimos valores de resolução, inclusive nas amostras.

### 5.2.2 Testes com eluição isocrática

Uma vez selecionada a fase móvel (solução 0,1% HCOOH v/v, eluyente A; CH<sub>3</sub>CN, eluyente B), as condições de eluição isocrática foram investigadas. Quando se empregou a fase móvel com 30 ou com 40% de acetonitrila observaram-se co-eluições

de alguns analitos na solução de referência, nesse caso as amostras de vinho não precisaram ser testadas, logo os ensaios 3, 4 e 5\* foram descartados, Tabela 3.

Dos 5 ensaios do planejamento fatorial ( $2^2$ ), em apenas dois deles (ensaios 1 e 2) houve separação de todos os analitos na solução de referência. Contudo, quando foram as amostras de vinho foram injetadas, nestas condições, observaram-se co-eluições de alguns analitos.

**Tabela 3.** Resultados do planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central, com a percentagem de ACN variando de 20 a 40%.

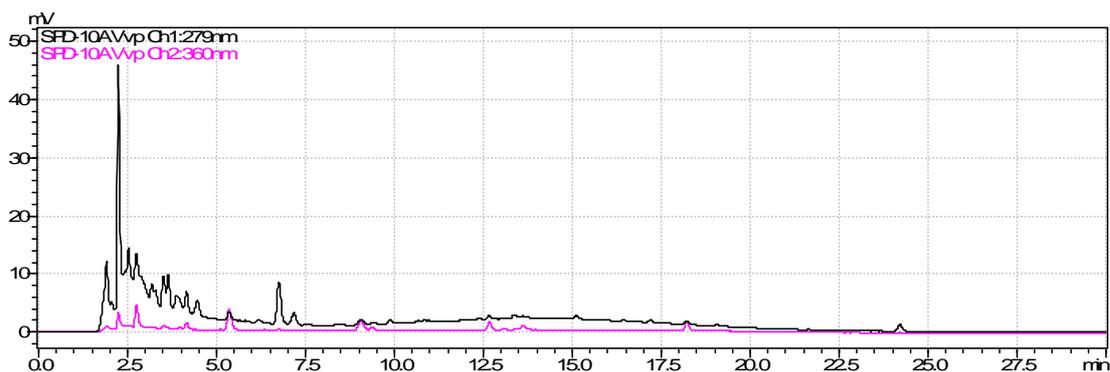
Ensaio	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	ACN (%)	Resultado
1	0,8	20	Separação/co-eluição
2	1,2	20	Separação/co-eluição
3	0,8	40	Co-eluição
4	1,2	40	Co-eluição
5*	1,0	30	Co-eluição

X<sub>1</sub> = Vazão; X<sub>2</sub> = ACN; \* triplicata de ponto central

### 5.2.3 Testes com eluição em gradiente

Considerando estes resultados, empregou-se a eluição em gradiente, em que a fase móvel foi composta por solvente A (HCOOH 0,1% v/v) e solvente B (CH<sub>3</sub>CN ou ACN).

No teste do gradiente da Figura 14, observa-se no cromatograma (Figura 16) que os analitos presentes no vinho eluíram praticamente ao mesmo tempo formando aparentemente uma banda de 1,5 a 4,5 min, ou seja, uma linha de base irregular, no comprimento de onda de 279 nm. Além disso, o tempo de retenção do primeiro analito (ácido gálico) encontrava-se muito próximo ao “tempo morto” (tempo de uma espécie que não interage com a FM). Nesse caso, o percentual de solvente orgânico de 15% ainda foi considerado elevado para iniciar o gradiente.



**Figura 16:** Cromatograma obtido a partir do gradiente de eluição com percentual de acetonitrila inicial de 15%, empregando-se a amostra de vinho diluída.

Desta forma, os analitos das amostras de vinho foram separados usando o gradiente de eluição de acordo com a Tabela 4.

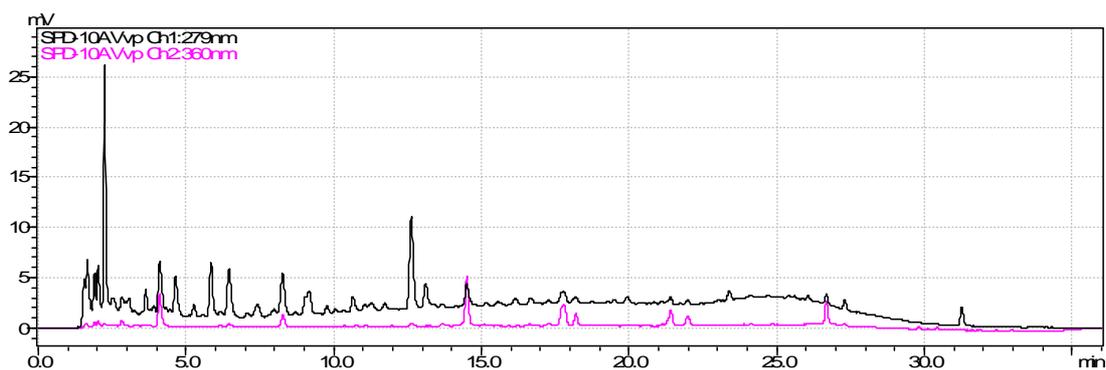
**Tabela 4.** Gradiente de eluição para separação dos compostos fenólicos.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	92	8
3	92	8
31	60	40
32	92	8
36	92	8

Solvente A = solução de ácido fórmico 0,1%; solvente B = acetonitrila

O gradiente inicia com um percentual de ACN de 8% e permanece nesse mesmo percentual até 3 min, depois aumenta gradativamente durante 28 min até alcançar 40% e em seguida retorna as condições iniciais (8% de ACN) em 1 min, permanecendo nesse percentual por 4 min para estabilizar a fase estacionária.

No cromatograma obtido (Figura 17) observa-se que os analitos estão separados, a linha de base se tornou mais regular a 279 nm e o primeiro analito eluído da amostra de vinho apresenta tempo de retenção suficientemente distante do “tempo morto”, ao ponto de o valor da seletividade para o ácido gálico ser maior que 1,0 e a resolução maior que 1,5 (LANÇAS, 2009; HOLLER, SKOOG e CROUCH, 2009).



**Figura 17:** Cromatograma obtido a partir do gradiente com percentual de acetonitrila inicial de 8% empregando-se a amostra de vinho diluída 1:10, com vazão de 1,5 mL min<sup>-1</sup> e temperatura do forno de 35 °C.

A eluição em gradiente foi testada utilizando duas vazões: 1,2 mL min<sup>-1</sup> e 1,5 mL min<sup>-1</sup>. Os melhores resultados para os parâmetros cromatográficos: tempo de retenção ( $t_R$ ), seletividade ( $\alpha$ ) e resolução ( $R_s$ ) (Tabela 5), para cada analito foi obtido a 1,5 mL min<sup>-1</sup>, o que reduziu o tempo de corrida cromatográfica e a largura de todos os sinais.

**Tabela 5.** Parâmetros cromatográficos: tempo de retenção ( $t_R$ ), seletividade ( $\alpha$ ) e resolução ( $R_s$ ), para cada composto estudado.

Analitos	$t_R$ (min)	$\alpha$	$R_s$
GA	2,19	2,1	1,51
CAT	5,87	1,44	5,74
EPI	10,03	1,1	2,39
Q3G	17,45	1,02	1,55
MYR	21,52	1,03	1,9
REV	22,91	1,07	3,44
QUR	26,39	1,13	12,9
KAM	29,58	1,02	9,49

Os valores de resolução ( $R_s$ ) estão entre 1,5 e 13,0, indicando que os picos cromatográficos estão bem resolvidos. De acordo com Lanças (2009), valores de resolução a partir de 1,5 indicam boa resolução dos sinais cromatográficos. Enquanto

que, os valores de seletividade ( $\alpha$ ) estão acima da unidade, indicando que não houve co-eluição dos analitos estudados, nas amostras de vinho (HOLLER, SKOOG E CROUCH, 2009).

#### **5.2.4 Seleção da temperatura do forno para a coluna cromatográfica**

As temperaturas da coluna de 25, 35 e 45 °C foram testadas para tentar reduzir ainda mais a viscosidade da fase móvel e conseqüentemente obter uma corrida cromatográfica mais rápida. Empregando a temperatura ambiente (25 °C) a pressão do equipamento era bastante alta. Quando a temperatura de 45 °C foi testada, alguns analitos foram sobrepostos ou degradados. Por outro lado, com a temperatura de 35° C, todos os picos foram bem separados e a pressão do equipamento foi reduzida. Por conseguinte, foi selecionada a temperatura de 35° C.

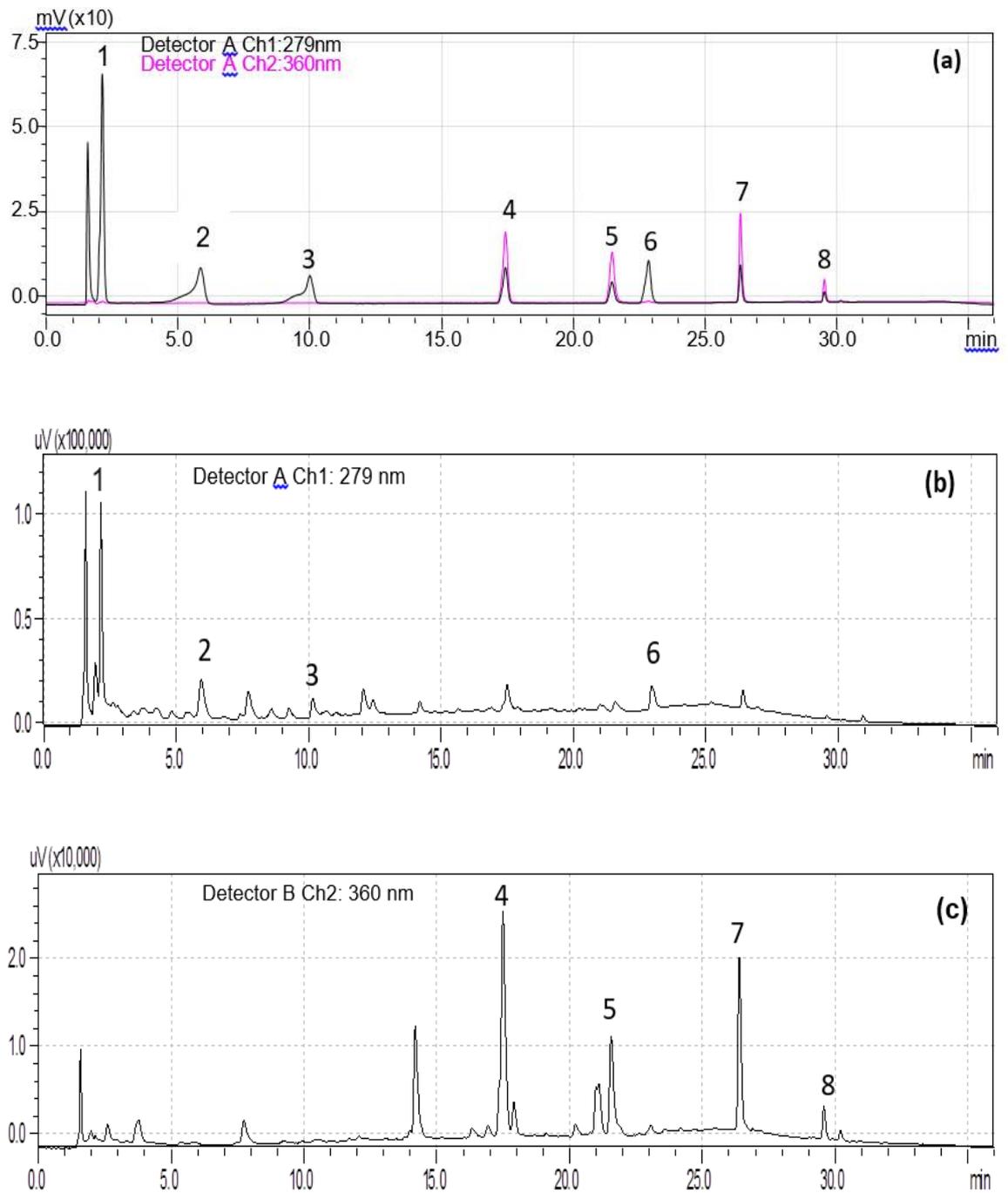
#### **5.2.5 Condições cromatográficas estabelecidas**

Dessa forma, as condições cromatográficas estabelecidas para a realização das análises nas amostras de vinho foram as seguintes:

- ✓ Fase estacionária (coluna cromatográfica): Ascentis Express C -18 (250 mm x 4,6 mm diâmetro interno, 5,0  $\mu$ m tamanho de partícula);
- ✓ Fase móvel: solução 0,1% HCOOH (eluente A) e CH<sub>3</sub>CN (eluente B);
- ✓ Vazão: 1,5 mL min<sup>-1</sup>; volume de injeção: 50  $\mu$ L; temperatura do forno: 35 °C.

### **5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ANALITOS NOS CROMATOGRAMAS**

Na figura 18 estão apresentados, o cromatograma (a) para a solução de referência e os cromatogramas (b) e (c) para a amostra de vinho tinto.



**Figura 18.** Cromatogramas dos compostos fenólicos determinados por HPLC UV-Vis. a) Mistura das soluções contendo os analitos (solução de referência): 1 - GA; 2- CAT; 3 - EPI; 4 - Q3G; 5 - MYR; 6 - REV; 7-QUR; 8 - KAM. b) amostra de vinho tinto brasileiro; Identificação de pico: 1 - GA; 2 - CAT; 3 - EPI; 6 - REV. c) amostra de vinho tinto brasileiro; Identificação de pico: 4 - Q3G; 5 - MYR; 7 - QUR; 8 - KAM.

Com as condições cromatográficas estabelecidas, se pôde separar e identificar os oito analitos estudados em menos de 30 min com valores de resolução e seletividade aceitáveis (LANÇAS, 2009; HOLLER, SKOOG e CROUCH, 2009), tanto para a solução de referência, como, principalmente, para as amostras de vinho tinto, que é uma matriz bastante complexa devido à grande quantidade de compostos que a compõe.

Os comprimentos de onda selecionados para a determinação dos oito compostos fenólicos foram: 279 nm para ácido gálico (GA), catequina (CAT), epicatequina (EP) e resveratrol (REV) e 360 nm para quercetina-3-glucosídeo (Q3G), kaempferol (KAM), quercetina (QUR) e miricetina (MYR).

#### 5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

As figuras de mérito da metodologia, para as amostras de vinho, tais como linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e repetibilidade (intra-dia) RSD (%) estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Equações lineares, coeficientes de determinação ( $R^2$ ), limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ), repetibilidade (intra-dia) e RSD (%) para cada composto estudado.

Analitos	Equações da curva	$R^2$	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	RSD (%)
GA	$A = - 2820,9 + 72589,9 C$	0,9963	0,75	2,51	1,82
CAT	$A = - 3186,8 + 17957,5 C$	0,9982	1,11	3,69	2,68
EPI	$A = 2496,5 + 23875,3 C$	0,9996	1,02	3,41	2,47
Q3G	$A = 244,3 + 12272,8 C$	0,9984	1,38	4,6	3,34
MYR	$A = 4900,4 + 97883,6 C$	0,9958	0,35	1,18	0,85
VER	$A = 2538,6 + 109699,8 C$	0,9989	0,19	6,52	0,47
QUR	$A = 8386,1 + 134932,4 C$	0,9971	0,26	0,86	0,62
KAM	$A = 883,9 + 161401,7 C$	0,9968	0,1	0,34	0,24

A: Área; C: concentração

### 5.4.1 Linearidade

As curvas de calibração foram construídas com seis concentrações, em quadruplicata ( $n = 4$ ), para cada composto fenólico. Todos os compostos apresentaram um coeficiente de correlação  $R^2 > 0,995$ , indicando um bom ajuste das concentrações dos compostos fenólicos ao modelo, dentro das faixas estudadas para cada analito, ou seja, de 0,20 a 9,0 mg L<sup>-1</sup> para ácido gálico e epicatequina; 0,40 a 22,0 mg L<sup>-1</sup> para catequina e quercetina-3-glucosídeo; 0,05-1,50 mg L<sup>-1</sup> para miricetina, quercetina e resveratrol; 0,025-0,30 mg L<sup>-1</sup> para quempferol.

### 5.4.2 Precisão

A repetibilidade intra-dia foi realizada como uma forma de avaliar a precisão do método. Os valores de RSD variaram de 0,24 a 3,34% ( $n = 3$ ) e estão abaixo do limite máximo para análise de traços ou impurezas em amostras, que é de 20% para análises cromatográficas (RIBANI et al. 2004).

### 5.4.3 Limites de detecção e de quantificação

O LD e o LQ foram calculados e apresentaram valores que estavam abaixo dos níveis de concentração das substâncias fenólicas encontradas nos vinhos.

### 5.4.4 Recuperação

Os testes de recuperação foram realizados utilizando dois níveis de fortificação para cada analito: 1,0 e 3,0 mg L<sup>-1</sup> para ácido gálico e epicatequina; 3,0 e 10,0 mg L<sup>-1</sup> para catequina e quercetina-3-glucosídeo; 0,25 e 0,75 mg L<sup>-1</sup> para miricetina, quercetina e resveratrol; 0,05 e 0,15 mg L<sup>-1</sup> para kaempferol.

**Tabela 7.** Percentual médio de recuperação (%) e valores de desvio padrão (SD) para cada nível de concentração de polifenóis analisados em amostras de vinhos tintos do Rio Grande do Sul (RS), Vale do São Francisco (VSF) e Argentina (ARG).

<b>Nível 1</b>								
Amostras	GA	CAT	EPI	Q3G	MYR	REV	QUR	KAM
1RS	103 ± 2	98 ± 1	96 ± 2	95 ± 2	95 ± 2	100 ± 2	95 ± 2	92 ± 3
2RS	94 ± 2	99 ± 2	108 ± 4	90 ± 2	94 ± 2	93 ± 2	92 ± 2	94 ± 3
3VSF	84 ± 1	95 ± 1	97 ± 1	98 ± 2	103 ± 4	90 ± 1	104 ± 5	89 ± 2
4VSF	97 ± 1	107 ± 5	105 ± 3	91 ± 2	95 ± 2	91 ± 2	88 ± 2	99 ± 4
5VSF	97 ± 1	104 ± 3	97 ± 2	101 ± 4	104 ± 4	102 ± 4	107 ± 6	110 ± 6
6VSF	98 ± 2	105 ± 4	97 ± 2	103 ± 4	109 ± 6	104 ± 5	105 ± 5	111 ± 7
7VSF	99 ± 1	96 ± 1	92 ± 1	91 ± 2	98 ± 3	96 ± 3	95 ± 1	96 ± 3
8VSF	99 ± 2	97 ± 1	99 ± 2	92 ± 2	98 ± 3	94 ± 3	93 ± 2	97 ± 3
9RS	82 ± 1	96 ± 2	94 ± 2	90 ± 2	91 ± 2	93 ± 3	97 ± 3	107 ± 6
10VSF	110 ± 3	81 ± 1	96 ± 2	91 ± 2	95 ± 2	86 ± 2	84 ± 3	84 ± 2
11VSF	88 ± 1	93 ± 1	94 ± 2	103 ± 4	100 ± 3	98 ± 3	104 ± 4	103 ± 4
12ARG	89 ± 1	97 ± 2	85 ± 1	100 ± 3	94 ± 2	97 ± 3	101 ± 3	98 ± 4
13ARG	105 ± 3	85 ± 1	99 ± 1	82 ± 1	104 ± 4	85 ± 2	110 ± 6	109 ± 6
14ARG	97 ± 2	107 ± 3	82,0 ± 0,5	96 ± 2	96 ± 2	101 ± 5	103 ± 4	99 ± 3
15ARG	110 ± 5	97 ± 1	109 ± 5	104 ± 4	107 ± 5	103 ± 5	104 ± 4	103 ± 4
16ARG	106 ± 4	108 ± 4	107 ± 3	110 ± 6	110 ± 6	109 ± 6	109 ± 6	106 ± 5
17ARG	95 ± 1	99 ± 1	101 ± 2	98 ± 3	105 ± 4	100 ± 3	102 ± 3	96 ± 4
18ARG	93 ± 1	99 ± 2	87 ± 1	103 ± 4	106 ± 5	101 ± 4	101 ± 3	88 ± 3
19RS	96 ± 3	82 ± 1	104 ± 5	97 ± 3	110 ± 6	93 ± 2	111 ± 7	104 ± 4
20RS	81 ± 1	106 ± 4	95 ± 1	93 ± 2	101 ± 3	84 ± 2	101 ± 4	88 ± 1
21ARG	96 ± 2	93 ± 1	98 ± 2	102 ± 4	91 ± 2	103 ± 4	99 ± 3	115 ± 6
22RS	104 ± 3	95 ± 2	106 ± 3	81 ± 1	95 ± 2	96 ± 3	104 ± 5	86 ± 2
23ARG	99 ± 2	88 ± 1	99 ± 2	103 ± 4	100 ± 4	94 ± 3	94 ± 3	91 ± 2
24ARG	109 ± 4	97 ± 1	100 ± 3	99 ± 3	94 ± 2	107 ± 5	91 ± 2	105 ± 4
25RS	92 ± 1	102 ± 3	97 ± 1	92 ± 2	104 ± 4	97 ± 3	87 ± 2	109 ± 6
26VSF	107 ± 4	97 ± 2	104 ± 3	86 ± 1	96 ± 3	100 ± 3	83 ± 1	89 ± 2
27ARG	97 ± 2	107 ± 4	103 ± 4	105 ± 3	107 ± 4	95 ± 2	106 ± 6	101 ± 3
28RS	91 ± 1	102 ± 2	96 ± 2	110 ± 5	110 ± 6	99 ± 1	88 ± 1	79 ± 1
29RS	97 ± 1	109 ± 5	97 ± 1	98 ± 1	105 ± 4	102 ± 3	95 ± 2	103 ± 2
30RS	94 ± 1	104 ± 2	106 ± 5	108 ± 5	106 ± 4	98 ± 1	91 ± 2	107 ± 6
31ARG	105 ± 3	96 ± 2	91 ± 1	97 ± 1	110 ± 6	91 ± 2	102 ± 4	72 ± 1
32VSF	88 ± 1	101 ± 2	108 ± 5	104 ± 3	101 ± 3	104 ± 3	89 ± 1	99 ± 2

Amostras **Nível 2**

	GA	CAT	EPI	Q3G	MYR	REV	QUR	KAM
1RS	96 ± 1	106 ± 3	95 ± 2	104 ± 3	108 ± 5	105 ± 3	103 ± 5	76 ± 1
2RS	106 ± 3	100 ± 3	97 ± 2	93 ± 3	109 ± 6	99 ± 1	94 ± 1	79 ± 1
3VSF	93 ± 2	99 ± 1	107 ± 4	85 ± 1	89 ± 1	99 ± 1	103 ± 4	110 ± 6
4VSF	101 ± 2	99 ± 2	96 ± 1	96 ± 1	103 ± 4	95 ± 2	101 ± 2	99 ± 1
5VSF	89 ± 2	88 ± 1	95 ± 1	98 ± 1	104 ± 3	89 ± 1	99 ± 2	90 ± 1
6VSF	102 ± 3	97 ± 2	92 ± 1	96 ± 1	95 ± 4	97 ± 2	110 ± 4	95 ± 2
7VSF	104 ± 3	99 ± 1	104 ± 2	100 ± 1	96 ± 1	92 ± 1	104 ± 4	102 ± 1
8VSF	98 ± 1	95 ± 2	103 ± 3	98 ± 2	97 ± 1	108 ± 6	98 ± 1	92 ± 2
9RS	99 ± 2	103 ± 3	93 ± 1	95 ± 1	96 ± 2	94 ± 1	109 ± 4	100 ± 3
10VSF	95 ± 1	89 ± 1	90 ± 1	102 ± 3	101 ± 3	106 ± 4	89 ± 1	94 ± 1
11VSF	96 ± 1	106 ± 3	89 ± 1	88 ± 1	93 ± 1	104 ± 5	96 ± 1	114 ± 7
12ARG	100 ± 2	101 ± 3	108 ± 8	89 ± 1	97 ± 2	85 ± 1	93 ± 1	96 ± 3
13ARG	99 ± 2	99 ± 2	95 ± 1	108 ± 3	96 ± 1	106 ± 4	108 ± 3	107 ± 4
14ARG	89 ± 2	91 ± 1	106 ± 3	91 ± 3	110 ± 5	92 ± 1	89 ± 1	89 ± 1
15ARG	92 ± 1	109 ± 5	95 ± 1	111 ± 4	97 ± 1	103 ± 5	92 ± 1	99 ± 4
16ARG	93 ± 2	92 ± 1	91 ± 2	103 ± 3	108 ± 4	109 ± 4	106 ± 3	72 ± 1
17ARG	98 ± 1	104 ± 3	93 ± 1	98 ± 1	102 ± 3	101 ± 2	98 ± 1	104 ± 3
18ARG	95 ± 2	98 ± 1	83,0 ± 0,5	91 ± 1	99 ± 2	87 ± 1	100 ± 4	108 ± 4
19RS	103 ± 4	102 ± 3	99 ± 1	99 ± 2	82 ± 1	104 ± 4	93 ± 1	100 ± 3
20RS	99 ± 1	89 ± 1	106 ± 5	86 ± 1	106 ± 4	95 ± 1	104 ± 2	99 ± 1
21ARG	84 ± 1	96 ± 2	109 ± 7	90 ± 1	93 ± 1	98 ± 2	104 ± 1	86 ± 1
22RS	99 ± 1	105 ± 4	96 ± 1	107 ± 4	95 ± 2	106 ± 3	99 ± 1	102 ± 4
23ARG	107 ± 4	99 ± 2	90 ± 1	102 ± 3	98 ± 1	99 ± 2	87 ± 1	89 ± 2
24ARG	94 ± 1	104 ± 4	99 ± 1	107 ± 3	97 ± 1	100 ± 3	94 ± 2	109 ± 5
25RS	103 ± 2	96 ± 1	99 ± 2	99 ± 1	102 ± 3	97 ± 1	103 ± 4	99 ± 1
26VSF	95 ± 1	95 ± 1	98 ± 2	101 ± 4	97 ± 2	104 ± 3	95 ± 1	111 ± 6
27ARG	101 ± 3	91 ± 1	90 ± 1	100 ± 2	97 ± 2	103 ± 4	91 ± 1	89 ± 1
28RS	103 ± 2	94 ± 1	99 ± 1	98 ± 1	102 ± 2	96 ± 2	93 ± 2	74 ± 1
29RS	88 ± 1	105 ± 4	105 ± 3	94,2 ± 0,5	109 ± 5	97 ± 1	109 ± 4	113 ± 5
30RS	109 ± 5	99 ± 2	93 ± 1	99 ± 1	104 ± 2	109 ± 6	91 ± 2	109 ± 4
31ARG	96 ± 1	100 ± 2	99 ± 1	101 ± 2	95 ± 1	90 ± 1	110 ± 5	74 ± 1
32VSF	99 ± 2	93 ± 1	86 ± 1	98 ± 1	93 ± 1	105 ± 3	102 ± 4	98 ± 3

Níveis 1 e 2, correspondem a: 1,0 e 3,0 mg L<sup>-1</sup> para ácido gálico e epicatequina; 3,0 e 10,0 mg L<sup>-1</sup> para catequina e quercetina-3-glucosídeo; 0,25 e 0,75 mg L<sup>-1</sup> para miricetina, quercetina e resveratrol; 0,05 e 0,15 mg L<sup>-1</sup> para kaempferol, respectivamente.

A percentagem média de recuperação e os valores de SD para cada nível de concentração de polifenóis analisados estão apresentados na Tabela 7.

Os percentuais de recuperação para as amostras fortificadas variaram de 82 a 110%, para ácido gálico, epicatequina, catequina, quercetina-3-glucosídeo, miricetina, quercetina e resveratrol. No entanto, para o kaempferol esses mesmos percentuais variaram de 72 a 114%. Estes resultados estão de acordo com os descritos na literatura (BALLUS, et al., 2012; ICH, 2013).

## 5.5 INTERVALOS DE CONCENTRAÇÃO PARA AS AMOSTRAS

O método foi aplicado para determinar o teor de compostos fenólicos de trinta e duas amostras de vinhos tintos comerciais do Brasil (VSF e RS) e da Argentina. Na Tabela 8 estão apresentados os intervalos de concentração para estas amostras.

**Tabela 8.** Intervalos de concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) do teor de compostos fenólicos determinados nas amostras de vinhos tintos analisadas.

Origem	Vale do São Francisco				Rio Grande do Sul		Argentina	
	Cabernet Sauvignon	Syrah	Rubi/Cab*	Petit Syrah*	Cabernet Sauvignon	Cabernet/Merlot	Cabernet Sauvignon	Syrah
GA	25,2 - 89,1	37,4 - 89,9	53,21	35,78	26,9 - 54,4	14,0 - 22,1	76,4 - 97,6	80,0 - 96,2
CAT	22,5 - 87,6	29,8 - 94,6	33,07	8,67	41,4 - 89,7	46,8 - 54,8	8,9 - 56,9	14,1 - 45,6
EPI	1,8 - 30,7	4,5 - 35,9	12,9	4,52	8,6 - 18,0	6,0 - 10,3	5,4 - 22,3	8,0 - 22,7
Q3G	28,2 - 54,5	34,6 - 125,5	25,34	34,67	15,3 - 53,5	17,9 - 20,8	4,0 - 30,5	7,9 - 15,7
MYR	6,9 - 7,2	3,3 - 6,5	4,76	7,31	1,9 - 13,2	8,0 - 14,7	3,6 - 9,2	4,9 - 9,9
VER	1,7 - 4,8	1,0 - 7,4	1,61	2,33	1,4 - 6,2	3,9 - 4,9	0,6 - 4,7	0,5 - 2,7
QUR	3,5 - 4,3	3,5 - 6,5	2,81	4,64	1,0 - 16,1	2,0 - 5,0	1,7 - 6,5	4,4 - 7,5
KAM	0,4 - 0,5	0,3 - 0,8	0,25	0,48	0,4 - 1,4	0,4 - 1,2	0,3 - 0,4	0,3 - 0,4

\* Concentração individual; Rubi/Cab = Rubi/Cabernet

A interpretação dos intervalos de concentração foi baseada na via biossintética dos polifenóis e do “terroir”, de acordo com a literatura (ALI et al. 2010; RIBÉREAU-GAYON, 2006; BALLUS et al. 2012; SCOLLARY, 2010; AMAROWICZ et al. 2009; SATO et al., 2012; CAMARGO, PEREIRA e GUERRA, 2011).

Na biossíntese dos polifenóis encontrados nos vinhos, a precursora fenilalanina é convertida em ácido cinâmico (Figura 1), que, por sua vez, pode seguir diferentes rotas biossintéticas (ALI et al., 2010).

A rota do ácido benzóico gera ácidos hidroxibenzóicos, tais como ácido gálico (AG), ácido gentísico, ácido protocateíco e ácido p-hidroxibenzóico. A via de p-coumaril-CoA produz resveratrol (RES) e/ou chalcona e/ou pode seguir o caminho da naringenina chalcona. A rota da leucocianidina termina com a bioconversão para (+)-catequina (CAT) ou (-)-Epicatequina (EPI) após a biossíntese da cianidina (ALI et al, 2010).

Os intervalos de concentração nas amostras dos vinhos da variedade Cabernet Sauvignon indicam que os vinhos argentinos têm uma quantidade de GA superior à dos brasileiros (Vale do São Francisco e Rio Grande do Sul). Estes resultados podem ser explicados, provavelmente pelos seguintes motivos: o clima seco da Argentina, pelo fato dos vinhos argentinos usarem “chip” no barril de carvalho, onde são envelhecidos, liberando ácido gálico durante o envelhecimento e/ou pelo fato dos ácidos hidroxibenzóicos das amostras da Argentina seguirem preferencialmente a rota: fenilalanina → ácido cinâmico → ácido benzóico → derivados de ácidos benzóicos (por exemplo ácido gálico, bem como devido a maceração (consiste no contato do mosto, suco de uvas, com as cascas para extrair os compostos fenólicos, responsáveis pela cor e aromas do vinho, e também os taninos). Ballus et al. (2012) demonstraram resultados semelhantes para o teor individual de ácido gálico em vinhos tintos elaborados com a cultivar Cabernet Sauvignon elaborados no Brasil e na Argentina. Por outro lado, os vinhos argentinos Cabernet Sauvignon têm intervalos de concentração de CAT, Q3G e KAM menores que os vinhos do Brasil.

A temperatura de armazenamento é o principal fator que contribui para as mudanças no teor de ácido fenólico em uvas (SATO et al., 2012). No entanto, a degradação de ácidos fenólicos, como o ácido gálico (AG), pode ser influenciada não só por elevadas temperaturas, como também por elevada precipitação pluviométrica durante a fase de maturação de algumas cultivares de uva (RIBERÉAU-GAYON, 2006; CAMARGO, PEREIRA & GUERRA, 2011). Portanto, a redução da concentração de ácido gálico nos vinhos brasileiros pode ter sido uma consequência de fatores climáticos

como temperatura, radiação solar e precipitação durante a fase de maturação das uvas, antes de serem submetidas à fermentação para a elaboração do vinho.

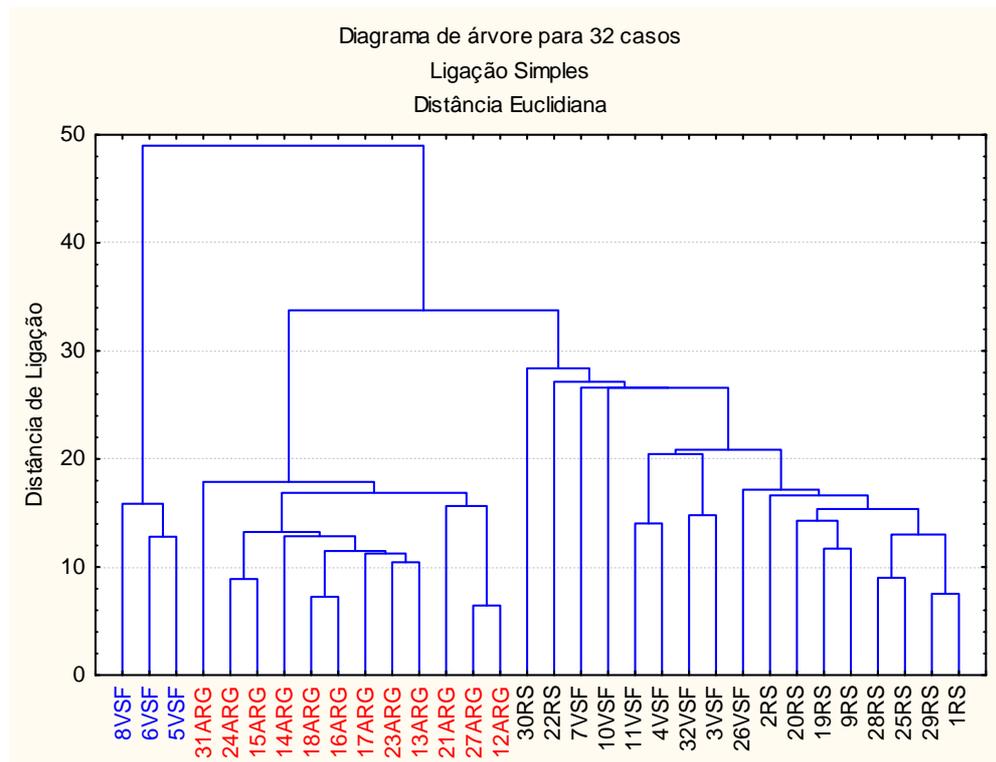
Para as amostras de vinhos elaborados com a cultivar Syrah provenientes do Vale do São Francisco, os intervalos de concentração de CAT, Q3G e REV foram maiores do que os encontrados nos vinhos Argentinos. Uma possível justificativa é a rota biossintética preferencial ser a rota para REV: ácido cinâmico → ácido p-cumárico → p-coumaril-CoA → Resveratrol; e via para CAT: p-coumaril-CoA → naringenina chalcona → naringenina → dihidrokaempferol → dihidroquercetina → leucocianidina → (+) - catequina (ALI et al. 2010). Estes resultados sugerem uma adaptação excelente desta cultivar ao "terroir" do Nordeste do Brasil, pois a Syrah apresenta plasticidade em termos de adaptação, é capaz de se adaptar a diferentes "terroirs" (CAMARGO, PEREIRA e GUERRA, 2011).

Os intervalos de concentração para REV, Q3G e KAM encontrados nas amostras de vinhos tintos argentinos das variedades Syrah e Cabernet Sauvignon estão na faixa dos teores encontrados por LINGUA et al. (2016); enquanto, para os demais analitos (AG, CAT, EP, MYR e QUR) os teores são aproximados.

## 5.6 ANÁLISE DE AGRUPAMENTOS

Realizou-se a análise de agrupamentos (AA) utilizando-se o método de encadeamento único (ligação simples), que se baseia na distância mínima, utilizando a regra do vizinho mais próximo como o algoritmo de agrupamento dos dados. A distância euclidiana foi considerada como medida de similaridade.

O nosso objetivo foi encontrar os grupos de vinhos com as mesmas características, que constituem o dendograma na análise. O dendograma é formado com base nos pares de objetos (vinhos) mais similares, ou seja, com a menor distância entre eles. Tais objetos, ou grupos formados, foram reunidos em razão de similaridade decrescente. No dendograma (Figura 19), a escala vertical indica o nível de similaridade, e no eixo horizontal são marcados os indivíduos, na ordem em que são agrupados. As linhas verticais partem dos indivíduos, e têm altura correspondente ao nível em que os indivíduos são considerados semelhantes.

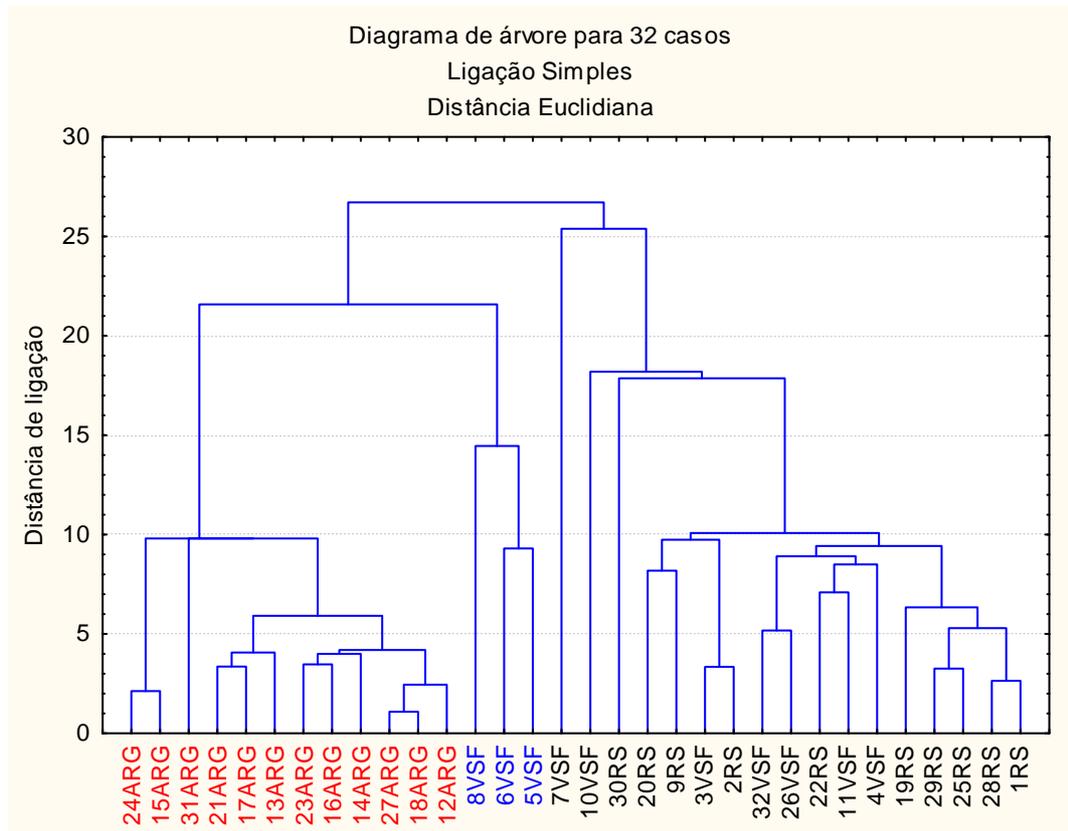


**Figura 19.** Dendrograma da matriz de distâncias, pelo método de agrupamento por ligação simples, para 8 variáveis (AG, CAT, EPI, MYR, QUR, REV, Q3G e KAM).

Ao fazer um corte no gráfico no valor de distância 30, verificam-se três grupos homogêneos distintos. O primeiro grupo é formado pela maior parte dos vinhos brasileiros do VSF e do RS, e pode estar relacionado com as amostras de vinho que possuem as concentrações mais altas dos polifenóis Q3G e VER, e as mais baixas de AG. O segundo grupo é formado pelos vinhos argentinos, que possuem baixa concentração de Q3G e REV e alta concentração de AG. Por sua vez, o terceiro grupo é formado por 3 amostras do VSF (5VSF, 6VSF e 8VSF), distintas das demais, por ter formado um grupo isolado, que possuem concentrações semelhantes de AG, CAT, EP e Q3G. Apesar disso, essas amostras possuem teor de AG muito semelhante ao encontrado nas amostras de vinho da Argentina e os teores de Q3G e REV são bastante similares aos encontrados nos vinhos brasileiros.

Esse fato pôde ser confirmado pelo dendrograma da Figura 20, em que somente as 3 principais variáveis, AG, Q3G e REV, foram incluídas na análise. Embora as amostras 5VSF, 6VSF e 7VSF tenham formado um grupo isolado nos dendogramas das Figuras 20 e 21, devido principalmente, a ter teores de AG semelhantes aos encontrados

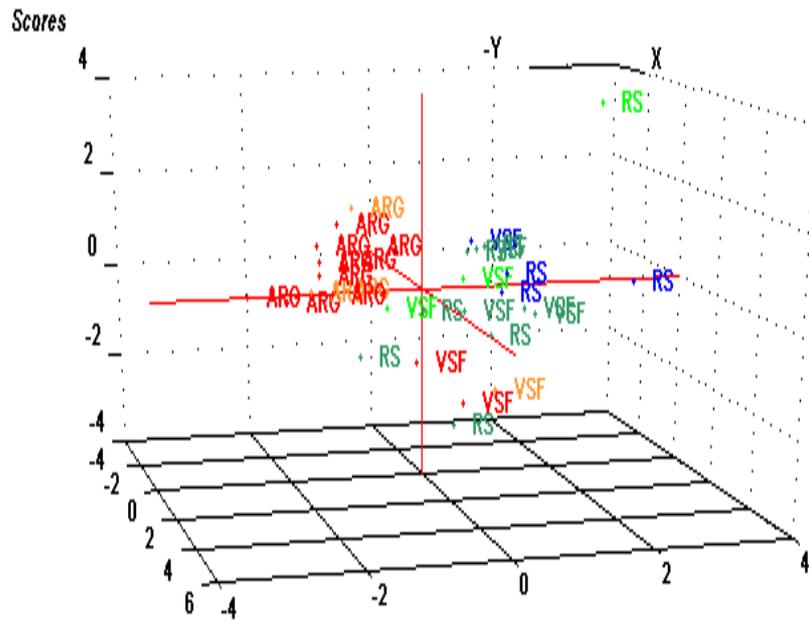
nos vinhos argentinos, elas também carregam informações relevantes das variáveis Q3G e REV, por isso se encontram posicionadas mais próximas das amostras de vinhos brasileiros no dendograma da Figura 21, se comparadas a posição dessas amostras no dendograma da Figura 20.



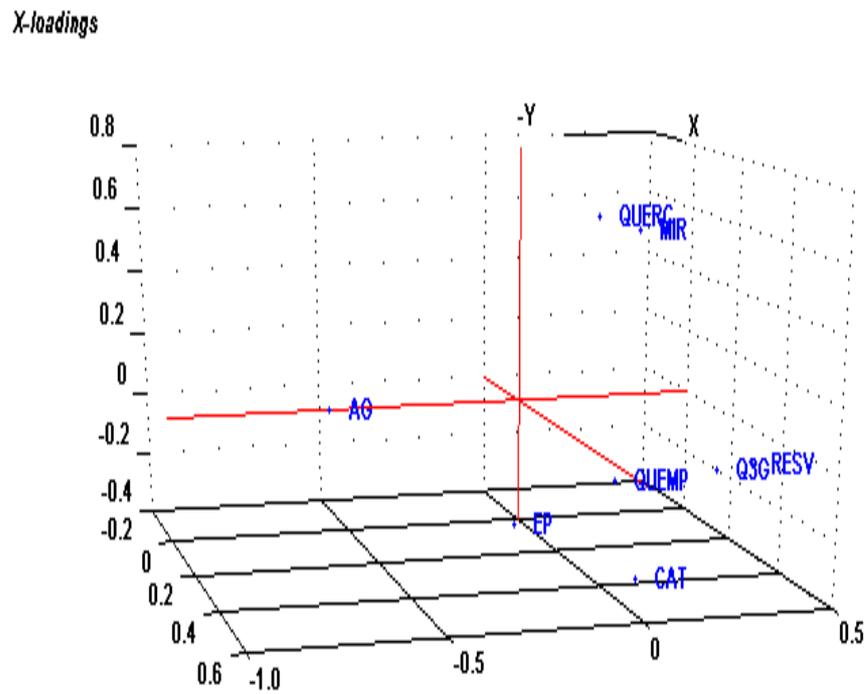
**Figura 20.** Dendograma da matriz de distâncias, pelo método de agrupamento por ligação simples para 3 variáveis (AG, REV e Q3G).

## 5.7 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

Nas figuras 21 e 22, estão apresentados os gráficos dos scores e dos loadings, respectivamente, no plano tri-dimensional, para a análise de componentes principais (PCA). Ao comparar o gráfico dos scores (Figura 21) com o gráfico dos loadings (Figura 22), verifica-se uma tendência de separação entre os vinhos brasileiros (RS e VSF) e argentinos (ARG), devido ao teor de AG.

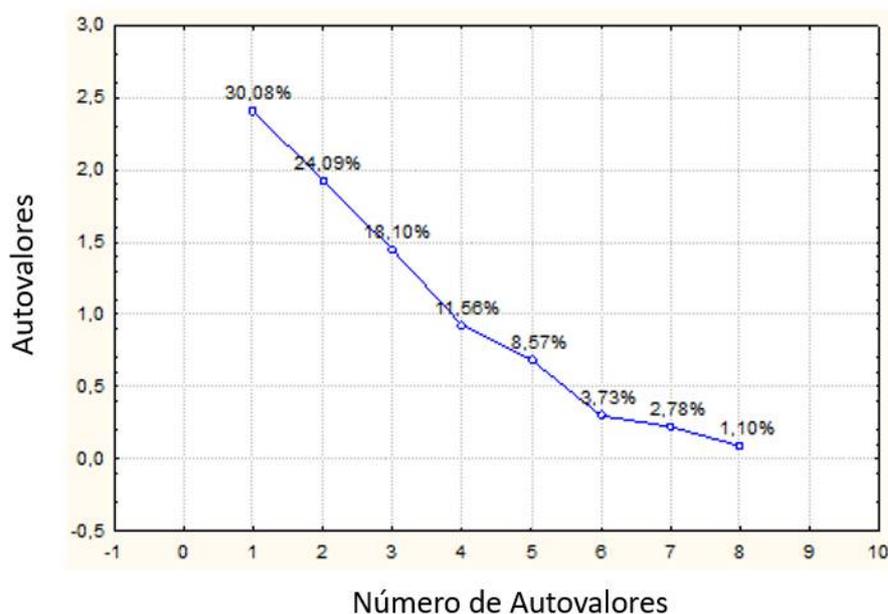


**Figura 21.** Gráfico no plano tri-dimensional dos scores da PCA ( $PC_1 \times PC_2 \times PC_3$ ).



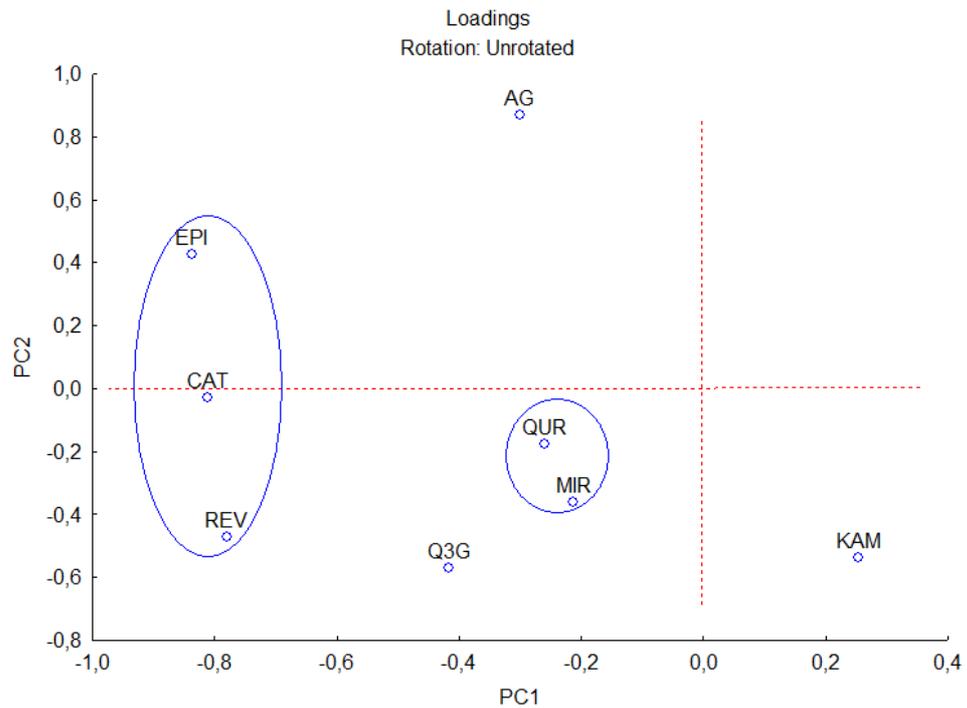
**Figura 22.** Gráfico no plano tri-dimensional dos loadings da PCA.

As três primeiras componentes (PC1, PC2 e PC3) apresentam autovalores, que correspondem a 30,08%, 24,09% e 18,10% da variância total, respectivamente, e essas componentes juntas explicam 72,27% das variações das medidas originais (Figura 23). As outras componentes, de PC4 a PC8, apresentaram baixa explicação, ou seja, autovalor menor que a unidade, logo não foram incluídas na análise. Desse modo, apenas 27,73% das variações, não puderam ser explicadas pelas 3 primeiras componentes principais. Como se teve um bom nível de explicação (72,27%) para os dados analisados, a síntese fornecida por essa redução de dimensionalidade foi viável.

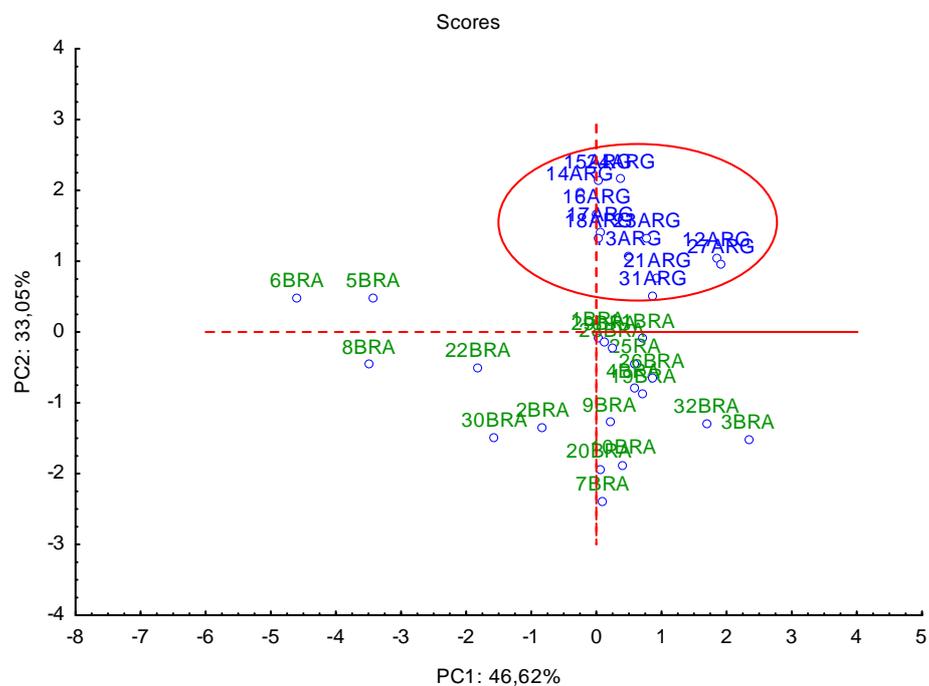


**Figura 23.** Gráfico de explicação da proporção de variação das componentes principais.

Uma característica interessante foi extraída da inspeção dos loadings de PC1 x PC2 (Figura 24). Observou-se que as variáveis CAT, EPI e REV foram as que melhor representaram PC1; GA foi a variável que melhor representou PC2. A informação dada por Q3G foi considerada moderada para PC1 e PC2. Para QUR e MYR as informações fornecidas foram praticamente as mesmas e ambas forneceram as menores contribuições. A variável KAM forneceu baixa contribuição para PC1 e uma contribuição moderada para PC2, apesar disso, KAM foi desconsiderada, pelo fato de ter concentração nula para a maioria das amostras de vinho. Portanto, demonstrou-se que a informação de discriminação foi suficiente para as cinco variáveis selecionadas, AG, CAT, EP, RES e Q3G, como pode ser confirmado no gráfico de escores (Figura 25).



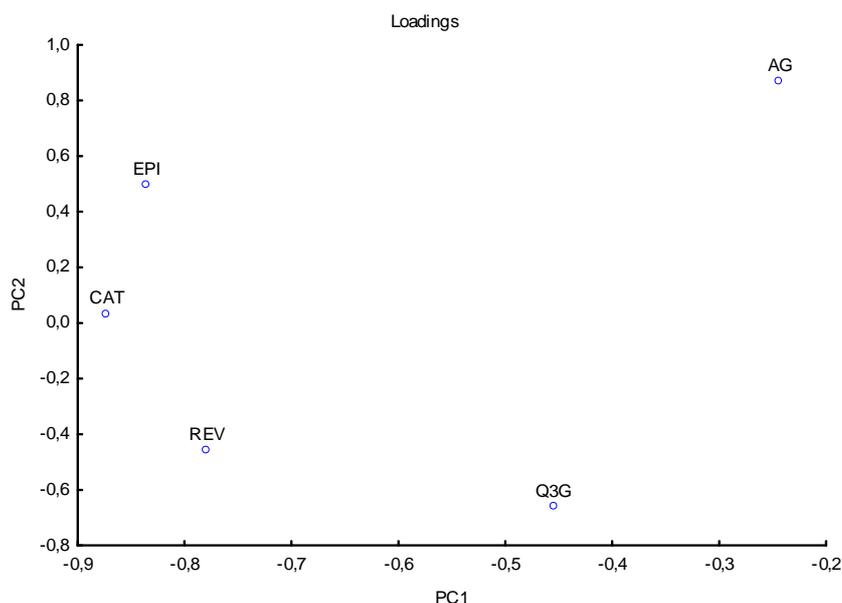
**Figura 24.** Gráfico dos loadings para PC1 x PC2 obtidos pela análise de componentes principais empregando 8 variáveis (AG, CAT, EPI, MYR, QUR, REV, Q3G e KAM).



**Figura 25.** Gráfico dos scores para PC1 x PC2 obtidos pela análise de componentes principais empregando 5 variáveis (AG, CAT, EPI, REV e Q3G).

Na Figura 25 estão apresentados os resultados obtidos para a análise de componentes principais (PCA), PC1 x PC2. A PCA mostra que, aproximadamente 80% da informação contida na Tabela 3 pode ser representada, por apenas duas componentes principais, PC1 *versus* PC2 com 46,62 % e 33,05% da variância, respectivamente. Como pode ser visto, é possível notar que PC2, diferencia os vinhos argentinos, em valores de escores positivos, da maior parte dos vinhos brasileiros, com valores de escores negativos.

Avaliando-se o gráfico dos loadings (Figura 26) para PC1 e PC2, verifica-se que a distinção entre vinhos argentinos e brasileiros em PC2, é determinada, principalmente, pelo teor de AG (com “loadings positivos) e pelos teores de REV e Q3G (com “loadings” negativos). Assim, os vinhos argentinos se encontram mais à direita no gráfico dos escores (Figura 25) por exibirem maior conteúdo de AG. No entanto, a maior parte dos vinhos brasileiros têm escores negativos em PC2, refletindo sua maior concentração de Q3G e REV quando comparados com os vinhos da Argentina.



**Figura 26.** Gráfico dos loadings para PC1 x PC2 obtidos pela análise de componentes principais empregando 5 variáveis (AG, CAT, EPI, REV, Q3G).

Estes resultados indicam que o teor de compostos fenólicos individuais, analisados com os dados multivariados, permitem distinguir e avaliar grupos de amostras de vinho tinto por origem geográfica.

## 6 CONCLUSÕES

O melhor modo de eluição para realizar a separação dos analitos de interesse nas amostras de vinho tinto, por HPLC/UV-Vis, foi a eluição em gradiente.

As melhores condições de análise foram estabelecidas para o método desenvolvido com parâmetros cromatográficos (resolução e seletividade) aceitáveis de acordo com a literatura.

O método cromatográfico foi validado para os compostos fenólicos analisados nas amostras de vinho tinto e os parâmetros analíticos de desempenho, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, recuperação e repetibilidade, apresentaram valores aceitáveis de acordo com a literatura, dessa forma, trinta e duas amostras de vinho foram analisadas.

A análise de agrupamentos permitiu encontrar três grupos de vinhos com as mesmas características de acordo com a região de origem e com o teor dos polifenóis individuais quantificados.

Os vinhos tintos Argentinos apresentaram maior teor de ácido gálico do que os brasileiros, sugerindo que os ácidos fenólicos em vinhos da Argentina seguem preferencialmente a rota: fenilalanina → ácido cinâmico → ácido benzóico → derivados de ácidos benzóicos (por exemplo, ácido gálico). Os teores mais baixos de ácido gálico nos vinhos brasileiros podem ser explicados pelas condições climáticas, que promovem a degradação dos ácidos fenólicos. De acordo com a literatura, quando a temperatura e a precipitação estão elevadas durante a fase de maturação das uvas, há degradação dos ácidos fenólicos.

Os vinhos brasileiros do Vale do São Francisco e do Rio Grande do Sul apresentaram maiores concentrações de resveratrol e quercetina-3-glucosídeo. O tempo e a temperatura de armazenamento das uvas tintas podem ter influenciado positivamente os teores desses analitos, independentemente das condições climáticas da região. No entanto, estudos específicos são necessários para detectar exatamente de que maneira isso ocorre.

Os vinhos tintos elaborados com as uvas da variedade Syrah, provenientes do Vale do São Francisco, apresentaram maiores concentrações de catequina, quercetina-3-glucosídeo e resveratrol, do que os vinhos de Cabernet Sauvignon e Syrah provenientes da Argentina. Estas amostras de vinho das uvas Syrah do Vale do São Francisco, seguem preferencialmente a rota para REV: ácido cinâmico → ácido p-cumárico → p-cumaroil-CoA → Resveratrol e a rota para CAT: p-cumaroil-CoA → naringenina chalcona → naringenina → dihidrocaempferol → dihidroquercetina → leucocianidina → (+)-catequina. Isso sugere uma satisfatória adaptação das uvas da variedade Syrah no *terroir* do Nordeste do Brasil.

## REFERÊNCIAS

1. ABE, L. T.; MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27, 394-400, 2007.
2. ALBERT A. Z. Vinho e Saúde, Segredos para beber e viver melhor. **Revista ADEGA 42** - Abril/2009. Disponível em: <[http://revistaadega.uol.com.br/artigo/outra-terra-da-malbec\\_439.html](http://revistaadega.uol.com.br/artigo/outra-terra-da-malbec_439.html)>. Acesso em: 21 dez. 2016.
3. ALI, K., MALTESE, F., CHOE, Y. H., VERPOORT, R. Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. **Phytochemistry Review**, 9, 357-378, 2010.
4. ALMEIDA, C. M. S, ALMEIDA, A. C., GODOY, M. L. D. P., SAINT'PIERRE, T. D., GODOY, J. M. Differentiation Among Brazilian Wine Regions Based on Lead Isotopic Data. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 27, 1026-1031, 2016.
5. AMAROWICZ, A.; CARLE, R.; DONGOWSKI, G.; DURAZZO, A.; GALENSA, R.; KAMMERER, D.; MAIANI, G.; PISKULA M. K. Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods Review. **Molecular Nutrition Food Research**, 53, 151-183, 2009.
6. ANASTASIADI, M.; PRATSINIS, H.; KLETSAS, D.; SKALTSOUNIS, A. L.; HAROUTOUNIAN, S. A. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts **Food Research International**, , 43, 805-813, 2010.
7. ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids** - Chemistry, Biochemistry and Applications. CRC Taylor & Francis: Boca Raton, 2006.

8. ANDRADE, R. H. S.; NASCIMENTO, L. S.; PEREIRA, G. E.; HALLWASS, F.; PAIM, A. P. S. Anthocyanic composition of Brazilian red wines and use of HPLC-UV-Vis associated to chemometrics to distinguish wines from different regions. **Microchemical Journal**, 110, 256-262, 2013.
9. ANDREU-NAVARRO, A.; RUSSO, P.; AGUILAR-CABALLOS, M.P.; Fernández-Romero, J. M.; Gómez-Hens, A. Usefulness of terbium-sensitised luminescence detection for the chemometric classification of Usefulness of wines by their content in phenolics compounds. **Food Chemistry**, 124 1753-1759, 2011.
10. ANVISA, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**: Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RESOLUÇÃO RE nº 899, de 29 de maio de 2003.
11. ANVISA, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**: Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RESOLUÇÃO RDC N.º 27, de 17 de maio de 2012.
12. AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. 1. ed. São Paulo: Edgar Blücher, 2001.
13. ARAÚJO, J. M. **Química de Alimentos**: Teoria e Prática. 4ª Edição. Viçosa: Editora UFV, 477p, 2008.
14. ARRANZ, S.; CHIVA-BLANCH, G. VALDERAS-MARTÍNEZ, P.; MEDINA-REMÓN, A. LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. ESTRUCH, R. Review Wine; Beer, Alcohol and Polyphenols on Cardiovascular Disease and Cancer. **Nutrients**, 4, 759-781, 2012.

15. ARRIBAS, A. S., MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, M., MORENO, M., BERMEJO, E., ZAPARDIEL, A., CHICHARRO, M. Classification of Spanish white wines using their electrophoretic profiles obtained by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. **Electrophoresis**, 35, 1693-1700, 2014.
16. AUGER, C.; AL-AWWADI, N.; BORNET, A.; ROUANET, J. M. F. Catechins and Procyanidins in Mediterranean Diets. **Food Research International**, 37, 233, 2004.
17. BALLUS, C. A.; MEINHART, A. D.; OLIVEIRA, R. G.; GODOY, H. T. Optimization of capillary zone electrophoresis separation and on-line preconcentration of 16 phenolic compounds from wines produced in South America. **Food Research International**, 45, 136-144, 2012.
18. BANU, S. K.; STANLEY, J. A. SIVAKUMAR, K. K. AROSH, J. A.; BURGHARDT, R. C. Resveratrol protects the ovary against chromium-toxicity by enhancing endogenous antioxidant enzymes and inhibiting metabolic clearance of estradiol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 303, 65-78, 2016.
19. BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 Anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, 29, 1401-1406, 2006.
20. BERG, J. M. T.; LUBERT, J. **Bioquímica**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p., 2008.
21. BORGES, A., FERREIRA, C., SAAVEDRA, M. J., SIMOES, M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. **Microbial Drug Resistance**, 19, 256-265, 2013.

22. BRASIL, Lei n° 7.678, de 8 de novembro de 1988 que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, 1990. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/admin/arquivos/leis/1456249319.pdf>> Acesso em: 06 de novembro de 2016.
23. BRO, R; SMILDE, A. K. Principal component analysis. **Analytical Methods**, 6, 2812-2831, 2014.
24. CABRERA-BAÑEGIL, M.; HURTADO-SÁNCHEZ, M. C.; GALEANO-DÍAZ, T.; DURÁN-MERÁS, I. Front-face fluorescence spectroscopy combined with second-order multivariate algorithms for the quantification of polyphenols in red wine samples. **Food Chemistry**, 220, 168-176, 2017.
25. CABRITA, M. J.; RICARDO-DA-SILVA, J.; LAUREANO, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. In: I SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE VITIVINICULTURA. **Anais...** Ensenada, México, 2003.
26. CAMARGO, U. A. **Cultivares**. AGEITEC - Agência Embrapa de Identificação Tecnológica. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/uva\\_para\\_processamento/arvore/CONT00g5f8cou802wx5ok0bb4szwyx060i6.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/uva_para_processamento/arvore/CONT00g5f8cou802wx5ok0bb4szwyx060i6.html)>. Acesso em: 01 dez. 2016.
27. CAMARGO, U. A. **Uvas Viníferas para Processamento em Regiões de Clima Temperado: Porta-Enxertos e Cultivares**. 2003. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/cultivar.htm>. Acesso em: 01 dez. 2016.
28. CAMARGO, U. A., PEREIRA, G. E., GUERRA C. C. Wine grape cultivars adaptation and selection for tropical wines. **Acta Horticultural**, 919, 121-129, 2011.

29. CATTEL, R. B. The scree test for the number of factors: Multivariate behavior research. **This Week's Citation Classic**. University of Illinois, Urbana-Champaign, IL. v.1, p. 245-276, 1966.
30. CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. Editora Edgard Blucher: São Paulo - SP, 2000.
31. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Editora Unicamp: Campinas - SP, 2010.
32. CORREA, S. M. B. B. **Probabilidade e estatística**. 2<sup>a</sup> ed. - Belo Horizonte: PUC Minas Virtual, 116 p. 2003.
33. CVEJIĆ, J.; PUŠKAŠ, V.; MILJIĆ, U.; TOROVIĆ, L.; RAKIĆ, D. Varietal phenolic composition of Probus, Rumenika and Frankovka red wines from Fruška Gora (Serbia) and changes in main compounds during maceration. **European Food Research and Technology**, 242, 1319, 2016.
34. DAGLIA, M.; DI LORENZO, A.; NABAVI, S. F.; TALAS, Z. S.; NABAVI, S. M. Polyphenols: well beyond the antioxidant capacity: gallic acid and related compounds as neuroprotective agents: you are what you eat! **Current Pharmaceutical Biotechnology Journal**, 15, 362-372, 2014.
35. DAUDT, C. E., FOGAÇA, A. O. Phenolic compounds in Merlot wines from two wine regions of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Science and Technology**, 33, 355-361. 2013.

36. DE NISCO, M., MANFRA, M., BOLOGNES, A., SOFO, A., SCOPA, A., TENORE, G. C., F. P., MILITE, C., RUSSO, M. T. Nutraceutical properties and polyphenolic profile of berry skin and wine of *Vitis vinifera* L. (cv. Aglianico). **Food Chemistry**, 140, 623-629, 2013.
37. DEGANI, A. L.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, 7, 21-25. 1998
38. DELGADO DE LA TORRE, M. P., PRIEGO-CAPOTE, F., LUQUE DE CASTRO, M. D. Characterization and comparison of wine lees by liquid chromatography-mass spectrometry in high-resolution mode. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 63, 1116-1125, 2015.
39. DI STEFANO, V.; AVELLONE, G.; D. BONGIORNO; CUNSOLO, V.; MUCCILLIB, V.; SFORZA, S.; DOSSENAC, A.; DRAHOSD, L.; VÉKEY, K. Applications of liquid chromatography-mass spectrometry for food analysis. **Journal de Chromatographia A. Review**, 1259, 74-85, 2012.
40. DIAS, F. S., KLASSEN, A., TAVARES, M. F. M., DAVID, J. M. Fast Determination of Phenolic Compounds in Brazilian Wines from Vale do São Francisco Region by CE. **Chromatographia**, 76, 559-563, 2013.
41. DIAS, F. S., SILVA, M. F., DAVID, J. M. Determination of quercetin, gallic acid, resveratrol, catechin and malvidin in brazilian wines elaborated in the Vale do São Francisco using liquid-liquid extraction assisted by ultrasound and GC-MS. **Food Analytical Methods**, 6, 963-968, 2013.
42. DORSEY, J. G.; COOPER. Retention Mechanisms of bonded-phase Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, 66, 17, 857-867, 1994.

43. FABRE, H.; ALTRIA, K. D. Validating CE Methods for Pharmaceutical Analysis. **Capillary Electrophoresis Currents**, 2001. Disponível em: [http://images.alfresco.advanstar.com/alfresco\\_images/pharma/2014/08/22/b9d775d6-a463-4810-8840-07b93c327bca/article-18095.pdf](http://images.alfresco.advanstar.com/alfresco_images/pharma/2014/08/22/b9d775d6-a463-4810-8840-07b93c327bca/article-18095.pdf)> Acesso em: 14 mar. 2017.
44. FERREIRA, E. T. D.; ROSINA C. D. MOCHIUTTI, F. G. Processo de produção do vinho fino tinto. **IV Encontro de Engenharia de Produção Agroindustrial**, FECILCAM, Paraná, 2010.
45. GARAGUSO, I., NARDINI, M. Polyphenols content, phenolics profile and antioxidant activity of organic red wines produced without sulfur dioxide/sulfites addition in comparison to conventional red wines. **Food Chemistry**, 179, 336-342, 2015.
46. GUEPNER, Y. et al. Effects of initiating moderate alcohol intake on cardiometabolic risk in adults with type 2 diabetes. **Annals of Internal Medicine**, 2015.
47. GONSALEZ-MANZANO, S.; RIVAS-GONZALO, J. C.; SANTOS-BUELGA, C. Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. **Analytica Chimica Acta**, 513, 283-289, 2004.
48. GRIS, E. F., MATTIVI, F., FERREIRA, E. A., VRHOVSEK, U., FILHO, D. W., PEDROSA, R. C., BOR-DIGNON-LUIZ, M. T. Phenolic profile and effect of regular consumption of Brazilian red wines on in vivo antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, 31, 31-40, 2013.
49. GUBUZ, O.; GOÇMEN, D.; DAGDELEN, F.; GURSOY, M.; AYDIN, S.; SAHIN, I.; BUYUKUYSAL, L.; USTA, M. Determination of Flavan-3-ols and Trans-Resveratrol in Grapes and Wine Using HPLC with Fluorescence Detection, **Food Chemistry**, 100, 518-525, 2007.

50. GUERRA, C. C.; MANDELLI, F.; TONIETTO, J.; ZANUS, M. C.; CAMARGO, U. A. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. Bento Gonçalves-RS: Embrapa Uva e Vinho, (Documentos / Embrapa Uva e Vinho, ISSN 1516-8107; 48), 69 p. 2009.
51. GUTZEIT, H. O.; LUDWIG-MULLER, J. *Plant Natural Products: Synthesis, Biological Functions and Practical Applications*, First Edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2014.
52. HIDALGO, M.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; PASCUAL-TERESA DE S. Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. **Food Chemistry**. 121, 691-696, 2010.
53. HRAZDINA, G.; PARSONS, G. F.; MATTICK, L. R. Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries. **American Journal Enology Viticultural**. 35, 220-227, 1984.
54. HEIM, K. E.; TAGLIA, F. A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal Nutritional Biochemistry**. 13, 572-584, 2002.
55. HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. Editora Bookman: Porto Alegre, 2009.
56. HONGYU K.; SANDANIELO, V. L. M.; OLIVEIRA JUNIOR, G. J. Análise de Componentes Principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. **Engineering and Science**, 5, 83-90, 2015.

57. HUANG, Y., LU, W., CHEN, B., WU, M., LI, S. Determination of 13 Phenolic Compounds in Rice Wine by High-Performance Liquid Chromatography. **Food Analytical Methods**, 8, 825-832, 2015.
58. HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, 19, 97-108, 2008.
59. HUGH, J.; JANCIS, R. **Atlas Mundial do Vinho**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2008.
60. ICH, **International Conference Harmonization**. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 1995. Disponível em: <[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf)>. Acesso em: 17 mar 2013.
61. INMETRO, **Instituto Nacional de Metrologia**: Normalização e Qualidade Industrial. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGCRE-008- Revisão 02 (2007).
62. IUPAC, Union of Pure and Applied Chemistry. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. International. **Pure and Applied Chemistry**, Vol. 74, No. 5, pp. 835-855, 2002. Disponível em: <<https://www.iupac.org/publications/pac/2002/pdf/7405x0835.pdf>> Acesso em: 13 dez. 2013.
63. JACKSON, R. S. **Wine Science**: Principles and Applications. Elsevier, 2008.

64. JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**. Madison: Prentice Hall International. 816p. 1998.
65. JOLLIFFE, I. T. Discarding Variables in a Principal Component Analysis. **Journal of the Royal Statistical Society**, 21, 160-173, 1972.
66. KAISER, H. F. The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. **Psychometrika**, 23, 187- 200, 1958.
67. KATTREE, R.; NAIK, D.N. Multivariate data reduction and discrimination with SAS Software. Cary, NC: SAS Institute Inc. 558p. 2000.
68. KENNEDY, J. A. Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. **Ciencia e Investigacion Agraria**, 35, 107-120, 2008.
69. KUMAR, A.; MALIKA, A. K.; TEWARYB, D. K. A new method for determination of mirycetin and quercetin. **Analytica Chimica Acta.**, 631, 177-181, 2009.
70. LAMPÍŘ, L., PAVLOUŠEK, P. Influence of locality on content of phenolic compounds in white wines. **Czech Journal Food Science**, 31, 619-626, 2013.
71. LANÇAS, F. M. Cromatografia Líquida Moderna HPLC/CLAE. Editora Átomo, Campinas-SP, 2009.
72. LIBERMAN, G. L. The Argentine wine industry: creating new spaces for coordination?. **Prometheus**, 31, 305-318, 2013.

73. LIN, C. Y.; HSIAO, W. C.; WRIGHT, D. E.; HSU, C. L.; LO, Y. C., HSU, G. S. W.; KAO, C. F. Resveratrol activates the histone H2B ubiquitin ligase, RNF20, in MDA-MB-231 breast cancer cells. **Journal of Functional Foods**, 5, 790-800, 2013.
74. LINGUA, M. S, FABANI, M. P., WUNDERLIN, D. A., BARONI, M. V. In vivo antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: Its relationship to phenolic profile. **Journal of Functional Foods**, 20, 332-345, 2016.
75. LYRA, W. S.; CIRINO DA SILVA, E.; ARAÚJO U. M. C.; FRAGOSO, W. D. 2010. Classificação periódica: um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. **Química Nova**, 33,1594-1597, 2010.
76. LÓPEZ-VÉLEZ, M.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, F.; VALLE-RIBES, C.D. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. **Food Science**, 43, 233, 2003.
77. LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**. 4 (8),118–126, 2010.
78. LÜ, J.M.; LIN, P. H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. 14(4): 840–860. 2010.
79. MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. B. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos (CEPPA)**, 22, 233-252, 2004.

80. MANACH, G.; WILLIAMSON, C.; MORAND, A.; SCALBERT, C. REMESY. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, 81, 230, 2005.

81. MANLY, B. F. J. **Multivariate statistical methods**. New York, Chapman and Hall, 159 p. 1986.

82. MAPA, **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Brasil. Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 72 p. 2011.

83. MARQUEZ, A.; SERRATOSA, M. P.; LOPEZ-TOLEDANO, A.; MERIDA, J. Colour and phenolic compounds in sweet red wines from Merlot and Tempranillo grapes chamber-dried under controlled conditions. **Food Chemistry**, 130, 111-120, 2012.

84. MAYORCA, S. **Globo Rural**. Província de Mendoza é uma das maiores produtoras de vinho. 27 de janeiro de 2014. Disponível em: <[http://www.olhardireto.com.br/agro/noticias/exibir.asp?noticia=provincia-de Mendoza e-uma-das-maiores-produtoras-de-vinho&edt=1&id=13181](http://www.olhardireto.com.br/agro/noticias/exibir.asp?noticia=provincia-de-Mendoza-e-uma-das-maiores-produtoras-de-vinho&edt=1&id=13181)>. Acesso em: 20 dez. 2016.

85. MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada**: uma abordagem aplicada. Belo Horizonte: UFMG, 297p, 2005.

86. MOURA, M. S. B.; BRANDÃO, E. O.; SOARES, J. M.; DONOSO, C. D. S.; SOUSA, L. S. B. Exigência térmica e caracterização fenológica da videira Syrah no Vale do Rio São Francisco. **XV Congresso Brasileiro de Agrometeorologia**. Aracaju - SE, jul. 2007.

87. NACZK, M., & SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, 1054, 95-111, 2004.
88. NEUE, U. D.; **HPLC Columns, Theory, Technology and Practice**. Editora Wiley-VCH: New York, 1997.
89. NIKFARDJAM, M. S. P.; MÀRK, L.; AVAR, P.; FIGLER, M.; OHMACHT, R. Polyphenols, anthocyanins, and trans-resveratrol in red wines from the Hungarian Villány region. **Food Chemistry**, 98, 453-462, 2006.
90. NOGUEIRA, J. M. F. Mikhail S. Tswett: Um legado para a cromatografia moderna. **Química**, n.100, p.51-56, 2006.
91. NURK, E.; REFSUM, H.; DREVON, C. A.; TELL, G. S.; NYGAARD, H. A.; ENGEDAL, K.; SMITH, A. D. Intake of Flavonoid-Rich Wine, Tea, and Chocolate by Elderly Men and Women Is Associated with Better Cognitive Test Performance. **The Journal of Nutrition**. 139: 120-127, 2009.
92. OIV, **International Organisation of Vine and Wine**. State of the vitiviniculture world market: abril 2016. Disponível em: <<http://www.oiv.int/public/medias/4710/oiv-noteconjmars2016-en.pdf>> Acesso em: 11 set. 2016.
93. OLIVEIRA, L. M.; OLIVEIRA, T. S.; COSTA, R. M.; GIL, E. S.; COSTA, E. A.; PASSAGLIA, R. C. A. T.; FILGUEIRA, F. P.; GHEDINI, P. C. The vasorelaxant effect of gallic acid involves endothelium-dependent and independent mechanisms. **Vascular Pharmacology**, 81, 69-74, 2016.

94. PACKTER, N. M. (1980). Biosynthesis of acetate-derived phenols (polyketides). In: Stumpf PK (ed) *The biochemistry of plants*, vol 4. Academic Press, New York, pp 535-570.
95. PEREIRA, A. C.; M. S. REIS; P. M. SARAIVA; J. C. MARQUES. Madeira wine ageing prediction based on different analytical techniques: UV-vis, GC-MS, HPLC-DAD. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. 105, p. 43-55, 2011.
96. PEREIRA, G. E. **Os vinhos tropicais em desenvolvimento no Nordeste do Brasil**. Disponível em: <[https://www.ufpe.br/agencia/clipping/index.php?option=com\\_content&view=article&id=12271:os-vinhos-tropicais-em-desenvolvimento-no-nordeste-do-brasil&catid=541&Itemid=243](https://www.ufpe.br/agencia/clipping/index.php?option=com_content&view=article&id=12271:os-vinhos-tropicais-em-desenvolvimento-no-nordeste-do-brasil&catid=541&Itemid=243)> Acesso em 26 dez. 2016.
97. PEREIRA, J. C. R. *Análise de dados qualitativos*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo/FAPESP, 1999.
98. PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, 146, 146-152, 2012.
99. PERRONE, G.; NOCOLETTI, I.; PASCALE, M.; DE ROSSI, A.; DE GIROLAMO, A.; VISCONTI, A. Positive correlation between high levels of ochratoxin A and resveratrol-related compounds in red wines. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 55, 6807-6812, 2007.
100. PORGALI, E., BUYUKTUNCEL, E. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. **Food Research International**, 45, 145-154, 2012.

101. PÖTTER, G. H., DAUDT, C. E., BRACKAMNN, A., LEITE, T. T., PENNA, N. G. Desfolha parcial em videiras e seus efeitos em uvas e vinhos Cabernet Sauvignon da região da Campanha do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, 40, 2011-2016, 2010.
102. PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A.; MELO, L. M. R. A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas. 2016. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura/>>. Acesso em: 02 dez. 2016.
103. QUEIPO-ORTUNÕ, I. M.; BOTO-ORDÓÑEZ, M.; MURRI, M.; GOMEZ-ZUMAQUERO, J. M.; CLEMENTE-POSTIGO, M.; ESTRUCH, R.; DIAZ, F. C.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; TINAHONES, F. J. Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. **American Journal Clinical Nutrition**, 95, 1323-1334, 2012.
104. RADOVANOVICA, A.; BRANIMIR J.; BILJANA A.; BLAGA R.; LJILJANA G. B. Application of non-supervised pattern recognition techniques to classify Cabernet Sauvignon wines from the Balkan region based on individual phenolic compounds. **Journal of Food Composition and Analysis**, 49, 42-48, 2016.
105. RAGONE, R., CRUPI, P., PICCINONNA, S., BERGAMINI, C., MAZZONE, F., FANIZZI, F. P., SCHENA, F. P., ANTONACCI, D. Classification and Chemometric Study of Southern Italy Monovarietal Wines Based on NMR and HPLC-DAD-MS. **Food Science Biotechnology**, 24, 817-826, 2015.
106. REGAZZI, A. J. INF 766 - Análise multivariada. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. Departamento de Informática, 2001. 166p. Apostila de disciplina.

107. REPOLLÉS, C.; HERRERO-MARTÍNEZ J. M.; RÀFOLS, C. **Journal of Chromatography A**, 1131, 51-57, 2006.
108. 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.
109. RIBEIRO, T. P.; OLIVEIRA, A. C., MENDES-JUNIOR, L. G.; FRANÇA, K. C.; NAKAO L. S.; SCHINI-KERTH, V. B.; MEDEIROS, I. A. Cardiovascular effects induced by northeastern Brazilian red wine: Role of nitric oxide and redox sensitive pathways. **Journal of Functional Foods**, 22, 82-92, 2016.
110. RIBÉREAU-GAYON, P., GLORIES, Y., MAUJEAN, A., & DUBOURDIEU, D. **Handbook of enology**. vol. 2. John Wiley & Sons Ltd, 2006.
111. RIBEREAU-GAYON, P.; STONESTREET, E. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. **Bulletin de la Societe Chimique de France**, 9, 2649-2652, 1965.
112. RICE-EVANS, C.; NICOLAS, J.; MILLER, J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, 20, 933-956, 1996.
113. ROCHA-PARRA, D. F.; LANARI, M. C.; ZAMORA, M. C.; CHIRIFE, J. "Influence of storage conditions on phenolic compounds stability, antioxidant capacity and colour of freeze-dried encapsulated red wine". **LWT - Food Science and Technology**, 70, 162-170, 2016.
114. SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos, Actividad antioxidante. **Alimentaria**, 329, 29-40, 2002.

115. SANLI S., SANLI N., OZKAN S. A., LUNTE, C. Development and Validation of a Green Capillary Electrophoretic Method for Determination of Polyphenolic Compounds in Red Wine Samples. **Chromatographia**, 79, 1351-1358, 2016.
116. SATO, A. J, FRANCO ROSA, C. I. L.; MENEZES, D.; KWIATKOWSK, A.; CLEMENTE, E.; ROBERTO, S. R. Caracterização fenólica das uvas Alicante e Syrah cultivadas em safra fora de época. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 34, 116-123, 2012.
117. SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of nutrition**, 130, 2073-2085, 2000.
118. SCHWARZ, L. J.; DANYLEC. B.; HARRIS, S. J.; BOYSEN, R. I.; HEARN, M. T. W. Preparation of molecularly imprinted polymers for the selective recognition of the bioactive polyphenol, (E)-resveratrol. **Journal of Chromatography A**, 1218, 2189-2195, 2011.
119. SCHWARZ, V.; BACHELIER, K.; SCHIRMER, S. H.; WERNER, C.; LAUFS, U.; BÖHM M. Red wine prevents the acute negative vascular effects of smoking, **The American Journal of Medicine**, 130, 95-100, 2016.
120. SCOLLARY, G. R. Grape and wine research & development corporation. **GWRDC Taninn Review**, 1-132, 2010.
121. SERUGA, M.; NOVAK, I.; JAKOBEK, L. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods, **Food Chemistry**, 124, 1208-1216, 2011.

122. SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, 57, 987, 2003.
123. SNYDER, L. R., KIRKLAND J. J., GLAJCH J. L., **Practical HPLC method development**, second ed., Editora Wiley, New York, 2012.
124. SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, 15, 71-81, 2002.
125. SOUTO, A. H.; CARNEIRO, M. C.; SEFERIN M.; SENNA, M. J. H.; CONZ, A.; GOBBI, K. Determination of trans-resveratrol concentration in Brazilian red wines by HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**. 14, 441-445, 2001.
126. SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, 35, 223-229, 2012.
127. TAUCHEN, J., MARSIK, P., KVASNICOVA, M., MAGHRADZE, D., KOKOSKA, L., VANEK, T., LANDA, P. In vitro antioxidant activity and phenolic composition of Georgian, Central and West European wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, 41, 113-121, 2015.
128. TONIETTO, J. MANDELLI, F. Uvas Viníferas para Processamento em Regiões de Clima Temperado. Julho de 2003 Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/clima.htm>. Acesso em: 02 dez. 2016.

129. TONIETTO, J; CARBONNEAU, A. **O clima para a viticultura**. 2003. Disponível em: <http://www.cnpqv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura/clima.html>. Acesso em: 02 dez. 2016.
130. TREISSEDE, P. L.; FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; PELEG, H.; GERMAN, J. B. Inhibition of in Vitro Human LDL Oxidation by Phenolic Antioxidants from Grapes and Wines, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 70, 55-61, 1996.
131. VALENTIN, J. L. Ecologia numérica: Uma introdução à análise multivariada de dados ecológicos. Editora Interciência, Rio de Janeiro, p.117, 2000.
132. VANG, O. What is new for resveratrol? Is a new set of recommendations necessary? Resveratrol and Health. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1290, 1-11, 2013.
133. VANG, O; AHMAD, N.; BAILE, C. A.; BAUR, J. A.; BROWN, K, et al. What Is New for an Old Molecule? Systematic Review and Recommendations on the Use of Resveratrol, **PLoS ONE**, 6, 1-11, 2011.
134. VINCINI, L. SOUZA, A. M. **Análise multivariada da teoria à prática**. Santa Maria: UFSM, CCNE, 215 p., 2005.
135. XIAO, Z., FANG, L., NIU, Y., YU, H. Effect of cultivar and variety on phenolic compounds and antioxidant activity of cherry wine. **Food Chemistry**, 186, 69-73, 2015.
136. ZORDOKY, B. N., ROBERTSON, I. M., & DYCK, J. R. Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases. **Biochimica and Biophysica Acta**, 1852, 1155-1177, 2015.

137. WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P.; **Principal Component Analysis. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. 2, 37-52, 1987.**

138. YOSHIDA, K; CHEYNIER, V.; QUIDEAU, S. **Recent Advances in Polyphenol Research**, V. 5, 376 p. John Wiley & Sons, England, 2017. ISBN: 978-1-118-88326-6.