



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

YURI RENAN BOVOLENTA

**UVA 'ISABEL':**

PERFIL FENOLICO DE CASCAS E SEMENTES E  
INFLUÊNCIA SOB A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COR  
DO SUCO APÓS APLICAÇÃO DO ÁCIDO **ABSCÍSICO**

---

Londrina

2015

YURI RENAN BOVOLENTA

**UVA 'ISABEL':**  
PERFIL FENOLICO DE CASCAS E SEMENTES E  
INFLUÊNCIA SOB A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COR  
DO SUCO APÓS APLICAÇÃO DO ÁCIDO **ABSCÍSICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial á obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf.

Londrina

2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

B783u Bovolenta, Yuri Renan.

Uva 'Isabel' : perfil fenolico de cascas e sementes e influência sob a capacidade antioxidante e cor do suco após aplicação do ácido abscísico / Yuri Renan Bovolenta. – Londrina, 2015.  
85 f. : il.

Orientador: Suzana Lucy Nixdorf.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.  
Inclui bibliografia.

1. Química analítica – Teses. 2. Antioxidantes – Teses. 3. Fenóis – Teses. 4. Suco de uva – Indústria – Teses. 5. Uva – Cultivo – Teses. I. Nixdorf, Suzana Lucy. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 543

YURI RENAN BOVOLENTA

**UVA 'ISABEL':**

**PERFIL FENOLICO DE CASCAS E SEMENTES E INFLUÊNCIA SOB A  
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COR DO SUCO APÓS APLICAÇÃO  
DO ÁCIDO **ABSCÍSICO****

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Marta de Toledo Benassi  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Marilde Terezinha Bordignon Luiz  
Universidade Federal de Santa Catarina –  
UFSC

Londrina, 18 de junho de 2015.

Dedico este trabalho a meus pais  
Valdir e Marcia, pelo exemplo de vida,  
amor e dignidade.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf não só pela constante orientação neste trabalho, mas, sobretudo pela sua amizade e todos os ensinamentos durante este período.

Ao Professor Doutor Isidro Hermosín-Gutiérrez pela imensa colaboração neste trabalho, e por todas as análises realizadas na Universidad de Castilla-La Mancha e, pelos ensinamentos durante sua visita ao Brasil.

A Professora Doutora Lilian Yukari Yamamoto pela grande contribuição na realização das análises, preparo das amostras e pela troca de experiências.

Aos companheiros de laboratório e amigos, por toda a troca de conhecimentos durante a realização deste trabalho e amizade, em especial Lycio, Vinícius, Tiago e Agerdânio.

Aos meus amigos: Rodolfo, Maurício, Leandro, Gabriel, Yuri A., Eduardo, Henrique, Lucas B., Rodrigo S. e Diego, pela amizade em todas as horas.

A minha eterna companheira Elisiane pela paciência, força e por todo amor e atenção.

A minha família, em especial a meus pais, Valdir e Marcia e meu irmão Yves, por todo o amor, apoio e força que me deram para chegar até aqui.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.1</b> - Uva do cultivar Isabel .....	20
<b>Figura 1.2</b> - Estruturas básicas dos compostos da classe dos flavonoides .	22
<b>Figura 1.3</b> - Estrutura molecular básica das antocianinas .....	23
<b>Figura 1.4</b> - Estrutura das antocianidinas. Pelagornidina (A); cianidina (B); peonidina (C); delphinidina (D); petunidina (E); malvidina (F) .....	24
<b>Figura 1.5</b> - Estrutura da cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3,5-diglicosídeo	25
<b>Figura 1.6</b> - Estrutura dos flavan-3-ols .....	26
<b>Figura 1.7</b> - Estrutura dos flavonóis. Canferol (A); quercetina (B); miricetina (C); siringetina (D); isoramnetina (E); laricitrina (F). .....	28
<b>Figura 1.8</b> – Estrutura dos ácidos hidroxicinâmicos .....	30
<b>Figura 1.9</b> - Perfil cromatográfico das antocianinas identificadas nas cascas da uva do cultivar Isabel .....	40
<b>Figura 1.10</b> - Porcentagem das antocianinas nas cascas de uva do cultivar Isabel .....	41
<b>Figura 1.11</b> - Porcentagem dos flavan-3-ols nas cascas e sementes da uva 'Isabel' .....	42
<b>Figura 1.12</b> - Porcentagem das proantocianidinas (porcentagem de cada flavan-3-ols) encontrados nas cascas e sementes de uva do cultivar Isabel	43
<b>Figura 1.13</b> - Perfil cromatográfico dos ácidos hidroxicinâmicos das cascas de uva do cultivar Isabel .....	44
<b>Figura 1.14</b> - Porcentagem dos ácidos hidroxicinâmicos nas cascas de uva do cultivar Isabel .....	45
<b>Figura 1.15</b> - Perfil cromatográfico dos flavonóis nas cascas de uva do cultivar Isabel .....	46

<b>Figura 1.16</b> - Porcentagem dos flavonóis nas cascas de uva 'Isabel' .....	47
<b>Figura 2.1</b> - Estruturas (S)-cis-ABA (A), (R)-cis-ABA (B) e (S)-2-trans-ABA (C) .....	59
<b>Figura 2.2</b> - Uvas do cultivar Isabel sem aplicação do S-ABA (A) e com aplicação do S-ABA (B).....	61
<b>Figura 2.3</b> - Estabilização do radical livre DPPH• .....	63
<b>Figura 2.4</b> - Cubo de cores RGB e representação da escala de cinza.....	64
<b>Figura 2.5</b> - Dendrograma considerando a absorção em 420, 520 e 620 nm dos sucos de uva elaborados a partir de uvas 'Isabel' submetidas a diferentes aplicações de S-ABA na safra regular de 2011, safra fora de época de 2012, safra regular de 2012 e safra fora de época de 2013 .....	74
<b>Figura 2.6</b> - Análise de componentes principais considerando a absorção em 420, 520 e 620 nm dos sucos de uva elaborados a partir de uvas 'Isabel' submetidas a diferentes aplicações de S-ABA na safra regular de 2011, safra fora de época de 2012, safra regular de 2012 e safra fora de época de 2013 .....	75
<b>Figura 2.7</b> - Círculo de correlações dos comprimentos de onda em 420, 520 e 620 nm das amostras de sucos elaborados a partir da uva 'Isabel' submetida a aplicações de S-ABA na safra regular de 2011, safra fora de época de 2012, safra regular de 2012 e safra fora de época de 2013.....	80

## Lista de Tabelas

- Tabela 1.1-** Principais substituintes das antocianinas ..... 24
- Tabela 1.2** - Identificação genética por microsatélite de troncos das videiras das quais foram coletadas as uvas 'Isabel' caracterizadas de 3 propriedades distintas em Veranópolis (RS, Brasil) ..... 33
- Tabela 1.3** - Antocianinas identificadas nas cascas de uva do cultivar Isabel com dados do tempo de retenção, máximo de comprimento de onda no UV-Vis e dos espectros de massas ..... 40
- Tabela 1.4** - Flavan-3-ols encontrados nas cascas e sementes de uva do cultivar Isabel ..... 42
- Tabela 1.5** - Proantocianidinas (porcentagem de cada flavan-3-ol) encontrados nas cascas e sementes de uva do cultivar Isabel ..... 43
- Tabela 1.6** - Ácidos hidroxicinâmicos (porcentagem molar de cada ácido) nas cascas de uva do cultivar Isabel ..... 44
- Tabela 1.7-** Flavonois ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) das cascas de uva 'Isabel' ..... 46
- Tabela 2.1-** Capacidade antioxidante do suco elaborado de uva 'Isabel' submetida a aplicações exógena de ácido abscísico (S-ABA) em duas etapas em diferentes estádios de maturação – antes, no início e depois do *véraison* ..... 68
- Tabela 2.2** - Capacidade antioxidante de sucos elaborados á partir das bagas de uva 'Isabel' submetida a 1 ou 2 aplicações exógenas de S-ABA69
- Tabela 2.3** – Intensidade cromática de sucos elaborados a partir da uva 'Isabel' submetida a aplicações de S-ABA em diferentes estágios de maturação - antes, no início e depois do *véraison* na safra regular de 2011 e safra fora de época de 2012 ..... 71

**Tabela 2.4** – Intensidade cromática de sucos elaborados a partir da uva ‘Isabel’ submetida a aplicações de S-ABA em diferentes estágios de maturação - antes, no início e depois do *véraison* com etapa única e em 2 etapas na safra regular de 2012 e safra fora de época de 2013..... 72

## Sumário

RESUMO GERAL .....	14
1.1 INTRODUÇÃO .....	18
1.1.1 PRODUÇÃO DE UVA NO BRASIL.....	18
1.1.2 'ISABEL' .....	19
1.1.3 ANTIOXIDANTES .....	21
1.1.4 POLIFENOIS .....	22
1.1.4.1 <i>Compostos Flavonoides</i> .....	22
1.1.4.1.1 <i>Antocianinas</i> .....	22
1.1.4.1.2 <i>Flavan-3-ols e Proantocianidinas</i> .....	25
1.1.4.1.3 <i>Flavonois</i> .....	27
1.1.4.2 <i>Não Flavonoides – Ácidos Hidroxicinâmicos e ácidos benzoicos</i> .....	28
1.1.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS EM ANÁLISES.....	29
1.1.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	31
1.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	31
1.2.1 SOLVENTES E REAGENTES.....	31
1.2.2 AMOSTRAGEM DAS UVAS .....	32
1.2.3 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DA CULTIVAR .....	32
1.2.4 PREPARO DAS AMOSTRAS - EXTRAÇÃO DOS POLIFENÓIS DAS CASCAS E SEMENTES .....	33
1.2.5 ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR ...	34
1.2.5.1 <i>Preparação das amostras</i> .....	34
1.2.6 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DAS CASCAS E SEMENTES DAS UVAS 'ISABEL' POR HPLC-DAD-ESI-MS <sup>N</sup> .....	35

1.2.6.1 <i>Instrumental</i> .....	35
1.2.6.2 <i>Condição Cromatográfica e do Espectrômetro de Massas para a Análise das Antocianinas das Cascas da Uva 'Isabel'</i> .....	36
1.2.6.3 <i>Condição Cromatográfica e do Espectrômetro de Massas para a Análise da Fração Livre de Antocianinas (Flavonois e Ácidos Hidroxicinâmicos) das Cascas da Uva 'Isabel'</i> .....	36
1.2.6.4 <i>Condição Cromatográfica e do Espectrômetro de Massas para a Análise de Flavan-3-ols das Cascas e Sementes da Uva 'Isabel'</i> .....	37
1.3 RESULTADOS .....	38
1.3.2 OCORRÊNCIA DE COMPOSTOS FENÓLICOS NA UVA 'ISABEL' .....	40
1.3.2 FLAVAN-3-OLS .....	41
1.3.3 ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS .....	43
1.3.4 FLAVONOIS .....	45
1.4 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	47
2.1 INTRODUÇÃO .....	57
2.1.1 SUCO DE UVA .....	57
2.1.2 ÁCIDO ABCÍSIKO (S-ABA).....	61
2.1.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE .....	62
2.1.4 INTENSIDADE CROMÁTICA .....	63
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
2.2.1 AMOSTRAGEM E TRATAMENTOS .....	65
2.2.2 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE .....	67
2.2.3 INTENSIDADE CROMÁTICA .....	67

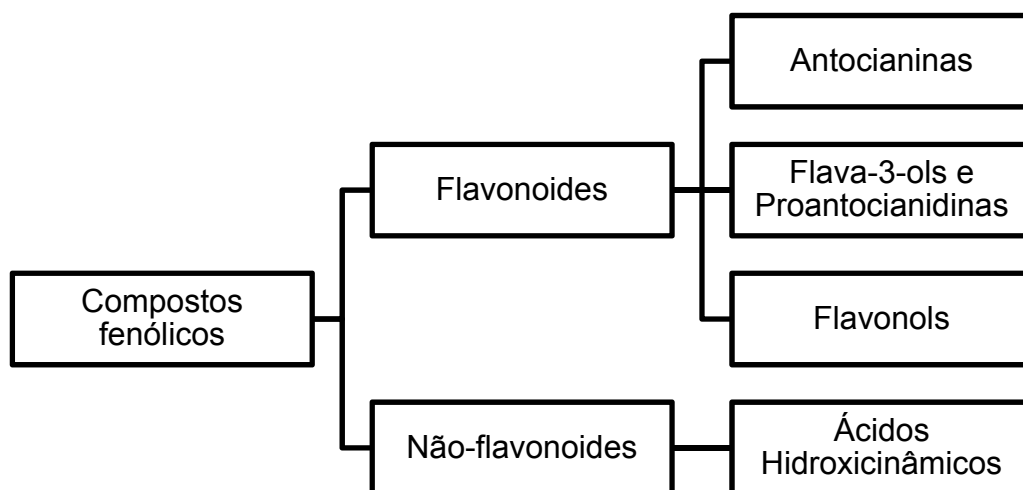
2.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	70
2.3 RESULTADOS .....	70
2.3.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	70
2.3.2 INTENSIDADE CROMÁTICA .....	70
2.4 CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS.....	78
CONCLUSÃO GERAL .....	86

Esta dissertação foi dividida em dois capítulos, considerando o tipo de amostra e as determinações analíticas realizadas.

No Capítulo 1 foram estudadas as cascas e sementes da uva 'Isabel', produzida no município de Veranópolis (RS) em 2011, intitulado: **“PERFIL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DAS UVAS DO CULTIVAR ISABEL”**.

No Capítulo 2 estudou-se a influência sofrida no suco integral, elaborado a partir do mesmo cultivar, após aplicações de S-ABA, intitulado: **“INFLUÊNCIA SOBRE A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E A INTENSIDADE CROMÁTICA DO SUCO DE UVA 'ISABEL' APÓS TRATAMENTOS EXÓGENOS COM ÁCIDO ABCSÍCICO”**.

Os compostos fenólicos, alvo do estudo, foram separados, considerando-se a divisão por classes:



Esses foram caracterizados por cromatografia líquida acoplada ao detector de arranjo de diodos e a espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM/EM do inglês HPLC-PDA-ESI-MS/MS), com a confirmação genética do cultivar realizada por microsatélite, através de fragmentos das videiras das uvas analisadas. O estudo foi feito, para caracterizar o perfil das uvas 'Isabel', visto que não foi encontrado na literatura *fingerprint* de fenólicos similar, exceto pela caracterização de vinhos elaborados a partir deste cultivar, em estudo anterior do Grupo, em colaboração com a UCLM da Espanha.

Já, no segundo Capítulo foram estudadas amostras de suco de uva integral do cultivar Isabel, elaboradas por uvas produzidas no município de Maringá-PR. As uvas, utilizadas para a produção dos sucos, passaram por diferentes tratamentos, em distintos intervalos de aplicação do regulador de crescimento ácido abscísico (S-ABA), visando o aumento dos compostos fenólicos, e conseqüente aumento na

coloração das bagas e do suco integral da uva 'Isabel', que naturalmente apresenta pouca cor. A produção se deu em diferentes épocas, durante quatro safras consecutivas: safra regular de 2011, safra regular e fora de época de 2012 e safra fora de época de 2013. Estas amostras foram produzidas pela doutoranda em Agronomia da UEL - Lilian Yukari Yamamoto. Este foi um trabalho em Colaboração entre a UEL-Agronomia, UEL-Química e UCLM-Alimentos, em que ela estudou em sua Tese a influencia sofrida pelos compostos fenolicos pela aplicação do S-ABA. Aqui neste trabalho, avaliou-se á influencia produzida pelo S-ABA na intensidade cromática e na capacidade antioxidante do suco de uva 'Isabel'.

BOVOLENTA, Yuri Renan. **Uva 'Isabel': perfil fenólico de cascas e sementes e influência sob a capacidade antioxidante e cor do suco após aplicação do ácido abscísico**. 2015. 88 fls. Dissertação de Mestrado em Química – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO GERAL

As uvas do cultivar Isabel (*V. labrusca*) são as produzidas em maior quantidade no Brasil. Apesar desta representativa produção, a sua composição fenólica ainda não foi totalmente descrita na literatura. Desta forma, um dos objetivos deste estudo foi encontrar um perfil dos compostos fenólicos - flavonoides (antocianinas, flavonóis e flavan-3-ols) e não flavonoides (ácidos hidroxicinâmicos) das cascas e sementes da uva 'Isabel' por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM/EM do inglês HPLC-PDA-ESI-MS/MS). O perfil cromatográfico mostrou o predomínio das antocianinas do tipo malvidina neste cultivar. Dentre os flavonóis, a quercetina foi encontrada em maior proporção. Dos flavan-3-ols, a (+)-catequina se destacou pelas maiores quantidades e, o ácido caftarico foi predominante dentre os ácidos hidroxicinâmicos. É esperado que o conhecimento da composição fenólica das uvas 'Isabel' auxilie no desenvolvimento de tecnologias inovadoras no processamento de seus derivados. O suco de uva é o derivado que tem se destacado pelo alto crescimento no consumo, impulsionado pelo estilo de vida mais saudáveis. Por sua boa adaptação ao solo e clima do sul do Brasil, apresentando alta resistência á doenças fúngicas, o cultivar Isabel representa a base produtiva do suco de uva nacional. Apesar desta alta produtividade, as bagas deste cultivar apresentam tonalidade violeta clara e pigmentação heterogênea, o que afeta diretamente a aceitação do suco pelo mercado, exigindo cortes com outras variedades tintureiras. Portanto, o outro objetivo deste estudo foi avaliar a influência sobre a capacidade antioxidante e a intensidade cromática do suco integral, produzido á partir de uvas 'Isabel', submetidas a aplicações do ácido abscísico (S-ABA) em diferentes estádios de maturação e distintos intervalos. A capacidade antioxidante do suco de uva avaliado não foi afetada pelas aplicações do S-ABA, independente do tratamento. A intensidade cromática apresentou aumento após a aplicação do S-ABA, especialmente na aplicação efetuada em duas etapas - a 1ª aos 7 dias antes da maturação (*véraison*) e a 2ª aos 10 dias antes da colheita. Assim, a aplicação do S-ABA mostrou ser uma alternativa tecnológica viável com objetivo de intensificar a cor do suco de uva 'Isabel' sem, contudo comprometer a sua capacidade antioxidante.

**Palavras-Chave:** suco de uva, *V. labrusca*, S-ABA, CLAE-EM/EM, antocianinas.

BOVOLENTA, Yuri Renan. **Grape 'Isabel': skins and seeds phenolic profile and the influence on juice antioxidant capacity and color of grapes treated with abscisic acid application**. 2015. 88 p. Master Degree Dissertation (Master in Chemistry) – State University of Londrina. 2015.

### ABSTRACT

Isabel grape cultivar (*V. labrusca*) is produced in large amounts in Brazil. Although their representative production their phenolic composition has not been fully described in literature. In this way, one of the objectives of this study was to find the phenolic compounds profile including - flavonoids (anthocyanins, flavonols, and flavan-3-ols) and non-flavonoids (hydroxycinnamic acids) of 'Isabel' grape skins and seeds by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-PDA-ESI-MS/MS). Chromatographic profile showed predominance of malvidin anthocyanins type in this cultivar. Among the flavonols, quercetin is found in greatest proportion. Of flavan-3-ols, the (+) - catechin is highlighted by its large amount, and the caftaric acid was predominant among hydroxycinnamic acids. We hope that 'Isabel' grapes phenolic composition knowledge can assist in innovative technologies for derivatives development and processing. Grape juice is the derivative that highlighted by its high growth in consumption, driven by a healthier style of life. Isabel cultivar is well adapted to the soil and climate in southern Brazil, with high resistance to fungi diseases, being the base of national grape juice production. Although this high productivity, berries of this cultivar have a light violet color tone and heterogeneous pigmentation, which directly affects juice acceptance by the market, requiring blends with other coloring varieties. Therefore, another objective of this study was to evaluate the influence on antioxidant capacity and chromatic intensity of integral juice elaborated with 'Isabel' grape, submitted to abscisic acid (S-ABA) applications in different maturity stages in different intervals. Antioxidant capacity of the evaluated grape juice was not affected by S-ABA applications, regardless of treatment. Color intensity showed an increase after S-ABA application, especially in two steps application - the 1<sup>st</sup> in 7 days before maturation (*véraison*) and the 2<sup>nd</sup> 10 days prior to harvest. Thus, S-ABA application proved to be a viable technological alternative in order to enhance the color of 'Isabel' grape juice without however compromising their antioxidant capacity.

**Keywords:** grape juice, *V. labrusca*, S-ABA, HPLC-MS/MS, anthocyanins.

## CAPÍTULO 1

### PERFIL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DAS UVAS DO CULTIVAR ISABEL

#### RESUMO

O cultivar Isabel (*Vitis labrusca*) constitui aproximadamente 50% do montante nacional de uvas produzidas no Brasil. Apesar da representativa produção, sendo utilizada na elaboração da maior parte dos sucos e vinhos rústicos, e embora seus compostos fenólicos influenciem diretamente nas propriedades antioxidantes, sua composição ainda não foi totalmente elucidada e descrita. Desta forma, o objetivo deste estudo foi criar um perfil característico de flavonoides (antocianinas, flavonóis e flavan-3-ols) e de não-flavonoides (ácidos hidroxicinâmicos) das cascas e sementes da uva 'Isabel' por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM/EM do inglês HPLC-PDA-ESI-MS/MS). A certificação de que o cultivar estudado era Isabel, foi feita por identificação genética por microsatélite, através de fragmentos das videiras das uvas analisadas. O perfil cromatográfico dos polifenóis propiciou a criação de um *fingerprint* para a uva 'Isabel', determinante na verificação da autenticidade varietal. As antocianinas do tipo malvidina, com destaque para a malvidina 3-glicosídeo, característica de *V. labruscas*, predominam neste cultivar. Na classe dos flavonóis, compostos a base de quercetina como o 3-glicuronídeo e 3-glicosídeo foram os mais frequentes. Entre os flavan-3-ols (+)-catequina esteve presente em maiores quantidades. Dos ácidos hidroxicinâmicos, o ácido caftárico prevalece em relação ao cumárico. Como perspectivas futuras, espera-se que o conhecimento da composição fenólica contribua para desenvolvimentos tecnológicos inovadores nos processos e produtos envolvendo as uvas 'Isabel'.

**Palavras-chave:** composição de flavonoides, *Vitis labrusca*, ácidos hidroxicinâmicos, taninos, LC-MS.

## CULTIVAR ISABEL GRAPES PHENOLIC COMPOUNDS PROFILE

### ABSTRACT

Isabel cultivar (*Vitis labrusca*) constitutes approximately 50% of Brazilian national grape production. Although their representative production, for juices and rustic wines elaboration, which phenolic compounds directly influencing antioxidant properties, until now their composition has not been fully elucidated and described. Thus, this study aims to create a characteristic profile of flavonoids (anthocyanins, flavonols and flavan-3-ols) and non-flavonoids (hydroxycinnamic acids) of skins and seeds of 'Isabel' grapes by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-PDA-ESI-MS/MS). 'Isabel' was identified genetically through vines fragments by microsatellite. Chromatographic polyphenols profile of 'Isabel' grape led to a fingerprint, able for varietal authenticity recognition. Anthocyanins of malvidin type, especially the malvidin-3-glucoside, characteristic of non-vinifera grapes, predominate in this cultivar. Flavonols has quercetin-based compounds such as 3-glucuronide and 3-glucoside as the most frequent. Of hydroxycinnamic acids, caftaric acid prevails over coumaric. As future prospects, we expect that phenolic composition knowledge contribute to processes and products technological innovations involving 'Isabel' grapes.

**Keywords:** flavonoids composition, *Vitis labrusca*, hydroxycinnamic acids, tannin, LC-MS.

## 1.1 INTRODUÇÃO

Atualmente cerca de 81 mil hectares são destinados a viticultura no Brasil, apresentando duas regiões com grande destaque: Petrolina (PE) e Juazeiro(BA), que são responsáveis por 95% das exportações nacionais de uvas finas de mesa e, o Rio Grande do Sul, que é responsável por 777 milhões de quilos de uva produzidas por ano. Apesar da produção de suco de uva, vinhos e derivados ocorrer em diversas regiões do país, o Rio Grande do Sul concentra a maior média de produção anual, alcançando a marca de 330 milhões de litros de vinhos e mostos. Uma grande estrutura agroindustrial existente neste estado é um dos fatores responsáveis pela produção favorável de uva no Rio Grande do Sul. Cerca de 90% da produção nacional é destinada para elaboração de vinhos. A Embrapa vem testando um total de 28 cultivares de uvas para a produção de vinho no Brasil, dentre elas espécies de origem: portuguesa, espanhola, alemã, italiana e francesa (MAPA, 2014).

Diversos fatores podem influenciar na qualidade da uva. Logo, cada safra poderá apresentar características únicas, que conseqüentemente, influenciarão a bebida elaborada a partir desses frutos. A videira necessita de radiação solar nos períodos de floração e maturação, o que é típico do clima brasileiro, apresentando assim diversas regiões produtoras (GIOVANNINI, 2005). O fator mais importante no desenvolvimento das videiras é a temperatura em que são submetidas. Para o processo de fotossíntese as temperaturas adequadas são entre 20 e 30°C, sendo que temperaturas mais elevadas podem levar a uma série de problemáticas no desenvolvimento das plantas (WESTPHALEN, MALUF 2000).

### 1.1.1 PRODUÇÃO DE UVA NO BRASIL

As primeiras videiras foram cultivadas no Brasil no século XVI segundo registros históricos, entretanto a vitivinicultura teve sua ascensão a partir de 1875, com a colonização italiana no Rio Grande do Sul. No início a produção era destinada ao consumo da região, sendo expandida até atingir o mercado nacional. A produção de uvas apresentou um aumento significativo próximo à década de 1930, devido ao

aumento populacional brasileiro e a criação de cooperativas, reduzindo os custos de fabricação de sucos e vinhos. Ao longo de todo esse período, o vinho brasileiro era obtido em sua grande maioria de uvas americanas ou de híbridas de americanas com *Vitis vinifera*. A escolha destas espécies se deve a elevada umidade do clima brasileiro, sendo estas espécies mais robustas e mais resistentes a pragas, dando origem assim, a uma indústria vinícola baseada em uvas diferentes das *Vitis viniferas*. A produção de uva para consumo *in natura* predomina nos estados de Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso. Já a produção dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina é destinada quase que em sua totalidade para processamento industrial. O consumo de uva *in natura* cresceu de aproximadamente 398.878 toneladas para 598.421 toneladas de 1995 até 2002, sendo que em 2013 a produção de uvas processadas apenas pelas empresas do RS foi de 611.300 toneladas, o que mostra o grande crescimento na produção de uvas no Brasil, sendo deste total 87,89% de cultivares americanas/híbridas (BNDS, 2004; IBRAVIN, 2013).

A produção de suco de uva apresentou um salto muito expressivo. Só no Rio Grande do Sul em 2004 foram produzidos 8,79 milhões de litros, enquanto essa quantidade passou em 2012 para 53,67 milhões de litros de suco integral, reprocessado e adoçado (IBRAVIN, 2013).

### 1.1.2 'ISABEL'

Altamente fértil e muito rústica o cultivar 'Isabel' proporciona colheitas abundantes com intervenções de manejo muito reduzidas. Seu sabor é característico das *V. labruscas*, podendo ter diversos destinos como na preparação de vinhos, vinagre, suco, doces, geleias e até consumida como uva de mesa. Atualmente, os cultivares *V. labruscas* são as mais plantadas em Santa Catarina e Rio Grande do Sul, apresentando boa tolerância ao clima tropical do Brasil, sendo cultivada também em Goiás e no Mato Grosso (MELLO, 2013).

O cultivar da uva Isabel (*V. labrusca*) (Figura 1.1), empregada na elaboração de sucos e vinhos, representa a base do desenvolvimento da viticultura brasileira. Devido à alta resistência á fungos, doenças, fertilidade e capacidade produtiva a

'Isabel' foi introduzida nos Estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, trazida dos Estados Unidos em 1830 (CAMARGO, 2010). Estudos demonstram que a qualidade dos vinhos está diretamente relacionada aos compostos fenólicos presentes nos diferentes estágios de maturação das uvas (KENNEDY, MATTHEWS, WATERHOUSE, 2002; RYAN, REVILLA, 2003), interferindo diretamente na composição, na cor e capacidade antioxidante (MARQUEZ, SERRATOSA, MERIDA, 2013). Portanto, considerando a sua importância, diversas investigações têm sido conduzidas visando estabelecer o perfil dos fenólicos dos cultivares de uvas viníferas, como Cabernet Sauvignon, Petit Verdot e Syrah (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009; GIL et al., 2013). Apesar das antocianinas serem as mais estudadas (DE ROSSO et al., 2012; FAVRETTO, FLAMINI, 2000; OIV, SÁNCHEZ-MORENO et al., 2003), entretanto, pouco se conhece sobre o perfil dos demais flavonoides e não-flavonoides, principalmente das uvas *V. labruscas*, embora estas sejam a maior parte das uvas destinadas para processamento no Brasil, 57% de toda produção nacional (MELLO, 2013).

**Figura 1.1** Uva do cultivar Isabel



**Fonte:** Yamamoto (2014)

### 1.1.3 ANTIOXIDANTES

Os compostos bioativos, como os antioxidantes, têm estado em evidência nas pesquisas nos últimos anos, pelos benefícios correlacionados a saúde. Os antioxidantes provêm de uma família de diferentes moléculas naturais, que, presentes em baixas concentrações, comparativamente às biomoléculas que supostamente protegeriam o fruto, podem prevenir ou reduzir a extensão do dano oxidativo (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). O dano ou estresse oxidativo é definido como a diferença entre a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre e, sua remoção pelo sistema químico como mecanismo de defesa antioxidante e reparo enzimático das biomoléculas lesadas (RAHMAN, BISWAS, KODE, 2006; VASCONCELOS et al., 2007). As espécies reativas mais estudadas nos sistemas biológicos incluem as espécies reativas de oxigênio, nitrogênio, os radicais derivados de tióis ( $RS^{\cdot}$ ), cloro, carbono e complexos de metais de transição, principalmente Fe, Cu, Mn e Cr (FINKEL, HOLBROOK, 2000; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS et al., 2007).

Os antioxidantes de baixa massa molar podem ser sintetizados no próprio organismo dos indivíduos ou podem ser ingeridos através da dieta. Esses estão presentes em número e concentração maiores que os antioxidantes enzimáticos, e distribuídos em ambientes lipofílicos e hidrofílicos. Nenhum antioxidante, atuando isoladamente, apresenta todas as propriedades de um bom antioxidante (VENDEMIALE, GRATAGLIANO, ALTOMARE, 1999).

Os compostos fenólicos são biossintetizados nas uvas, sendo que cada cultivar apresenta um perfil de composição distinto, quanto ao tipo e quantidade de compostos fenólicos presentes. Desta forma, estudar a composição como um todo, permite estabelecer um perfil de identidade também denominado *fingerprint*, que permite a verificação da autenticidade varietal (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2007; RODRÍGUEZ-MONTEALEGRE et al., 2006).

Os polifenóis podem ser divididos basicamente em dois grupos: flavonoides (antocianinas, flavan-3-ols e flavonóis) e não flavonoides (hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos, estilbenos e fenóis voláteis).

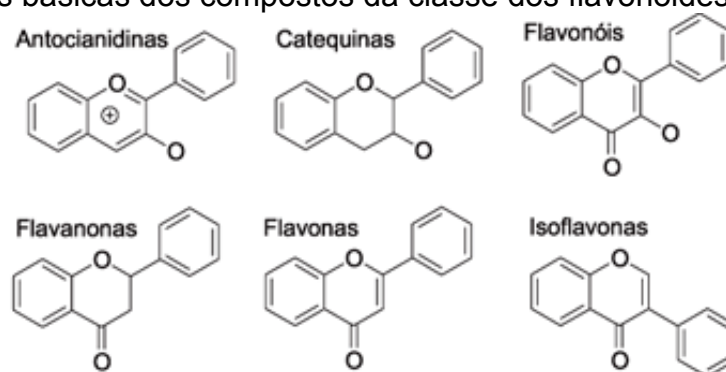
## 1.1.4 POLIFENOIS

Os polifenóis basicamente dividem-se em dois grupos: flavonoides (antocianinas, flavan-3-ols e dihidroflavonóis) e não-flavonoides (hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos, estilbenos e fenóis voláteis) (JACKSON, 1994).

### 1.1.4.1 Compostos Flavonoides

Os compostos flavonoides (Figura 1.2) são compostos fenólicos com uma estrutura composta por dois anéis aromáticos, ligados por um anel pirano C6-C3-C6 (ZOECKLEIN et al., 1995). De acordo com o grau de oxidação do anel pirano é que são classificados os compostos fenólicos. A coloração dos vinhos se deve a presença destes compostos, já que são encontrados em todos os tecidos da uva (semente, casca e polpa). Os flavonoides são encontrados também polimerizados com açúcares, não flavonoides e até mesmo com outros flavonoides. Os mais expressivos são as antocianinas, os flavano-3-ols e as proantocianidinas, devendo a coloração característica dos vinhos em sua maior parte á estes compostos (CABRITA, RICARDO-DA-SILVA, LAUREANO, 2004).

**Figura 1.2** Estruturas básicas dos compostos da classe dos flavonoides



Fonte: Março, Poppi, Scarminio (2008)

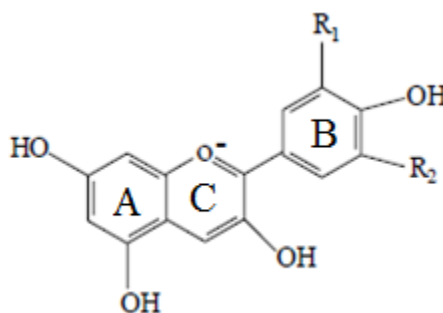
#### 1.1.4.1.1 Antocianinas

Quanto aos antioxidantes pigmentados, as antocianinas são um grupo de pigmentos naturais, que apresentam grande importância na prevenção ou retardamento do aparecimento de várias doenças, por suas propriedades antioxidantes (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002; KUSKOSKI et al., 2004; DOWNHAM, COLLINS, 2000). A palavra antocianina vem do grego (*anthos*, uma flor, e *kyanos*, azul escuro). Depois da clorofila, as antocianinas são o mais frequente grupo de origem vegetal (HARBORNE, GRAYER, 1988). As antocianinas que são os componentes encontrados em uvas, romã, repolho roxo, milho roxo, maçã, rabanete, tulipas, rosas e orquídeas (MENA et al., 2014), apresentam estruturas fenolicas variadas, apresentando grande concentração nas cascas de uvas tintas (KUSKOSKI et al., 2004; NIJVELDT et al., 2001). Quando comparado com antioxidantes clássicos, como butilato hidroxianisol e alfa tocoferol (vitamina E), as antocianinas se mostram um potente antioxidante (NARAYAN et al., 1999).

Devido a solubilidade em água, as antocianinas se encontram presentes nos tecidos de plantas e frutas, que geralmente apresentam um pH levemente ácido. As antocianinas mais encontradas em frutas são: cianidina, delphinidina, peonidina, pelargonidina, petunidina e malvidina. O consumo diário de antocianinas totais varia muito com a dieta e escolha dos alimentos, sendo entre 3 a 215 mg/dia (de PASCUAL-TERESA, MORENO, GARCIA-VIGUERA, 2010).

As antocianinas são baseadas em uma estrutura policíclica, mostrada na Figura 1.3. Estes compostos, em sua maior parte existem em plantas na forma de glicosídeos. Estruturalmente possuem um anel aromático [A] ligado á um anel heterocíclico, que contém oxigênio [C] e, também ligados por uma ligação carbono-carbono com um terceiro anel aromático [B] (MENA et al., 2014).

**Figura 1.3** - Estrutura molecular básica das antocianinas



**Fonte:** Março, Poppi, Scarminio (2008)

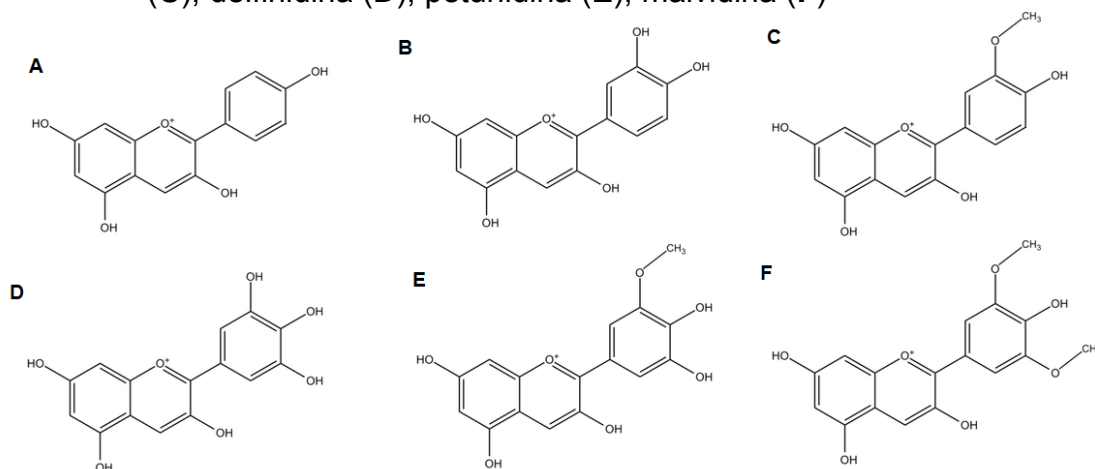
As antocianinas podem ser classificadas de acordo com o número e posição dos grupos hidróxi e metóxi no anel [B], conforme Tabela 1.1 e Figura 1.4.

**Tabela 1.1-** Principais substituintes das antocianinas

Antocianina	R1	R2
Pelargonidina ( <i>pg</i> )	H	H
Cianidina ( <i>cy</i> )	OH	H
Peonidina ( <i>pn</i> )	OCH <sub>3</sub>	H
Delfinidina ( <i>dp</i> )	OH	OH
Petunidina ( <i>pt</i> )	OCH <sub>3</sub>	OH
Malvidina ( <i>mv</i> )	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Fonte: Terci, Rossi (2002).

**Figura 1.4 -** Estrutura das antocianidinas. Pelargonidina (A); cianidina (B); peonidina (C); delfinidina (D); petunidina (E); malvidina (F)



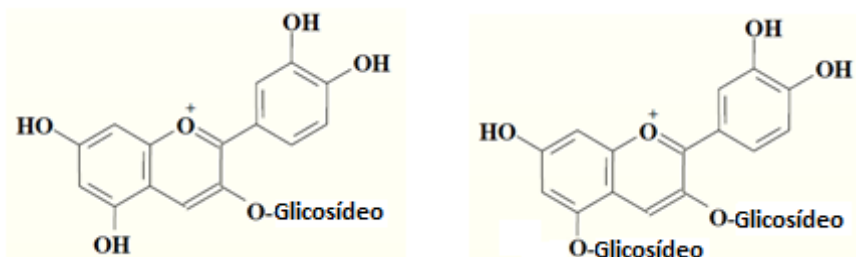
Fonte: Polyphenols (2015)

Além de substituintes hidroxílicos e metóxi, as antocianinas podem apresentar grupos açúcares (glicose, arabinose, xilose e galactose) ligados á molécula, assim como ácidos alifáticos e aromáticos, ligados aos açúcares na molécula de antocianina (MENA et al., 2014).

Cultivares *V. labruscas* possuem em sua composição antocianinas do grupo das cianidina (*cy*), delfinidina (*dp*), malvidina (*mv*), peonidina (*pn*) e petunidina (*pt*) podendo apresentar substituintes 3-monoglicosídeos e 3,5-diglicosídeos, conforme

Figura 1.5 (NIXDORF, HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b; WANG, RACE, SHRIKHANDE, 2003).

**Figura 1.5** - Estrutura da cianidina 3-glicosídeo e cianidina 3,5-diglicosídeo



Fonte: Março, Poppi, Scarminio (2008)

#### 1.1.4.1.2 Flavan-3-ols e Proantocianidinas

Os Flavan-3-ols (Figura 1.6) são os monômeros responsáveis pela constituição dos polímeros e oligômeros chamados proantocianidina, nomenclatura atual, para os que são conhecidos como taninos. Esses vêm ganhando destaque em estudos nos últimos anos, devido a sua importância em potenciais benefícios à saúde humana, além de assumirem um grande papel nas características gustativas dos vinhos, já que reagem com as proteínas da saliva atribuindo adstringência aos vinhos e, apresentando propriedades importantíssimas como anti-inflamatório (JORDÃO, 2000; MENA et al., 2014).

Os teores dos compostos fenólicos presentes nas uvas variam de acordo com uma série de fatores, muitos deles correlacionados. A condição climática, na qual as uvas foram submetidas durante a maturação, é uma das condições mais importantes na evolução dos valores de fenóis, e o fator casta (JORDÃO, 2000).

A estrutura química destas moléculas é composta por estruturas monoméricas de 2-fenilbenzopiranos, formando assim uma estrutura de C6-C3-C6. As proantocianidinas em meio ácido, alcoólico e quente liberam antocianidinas devido à ruptura de suas ligações entre unidades monoméricas. Entre as antocianidinas liberadas estão a pelargonidina, a cianidina e delphinidina.

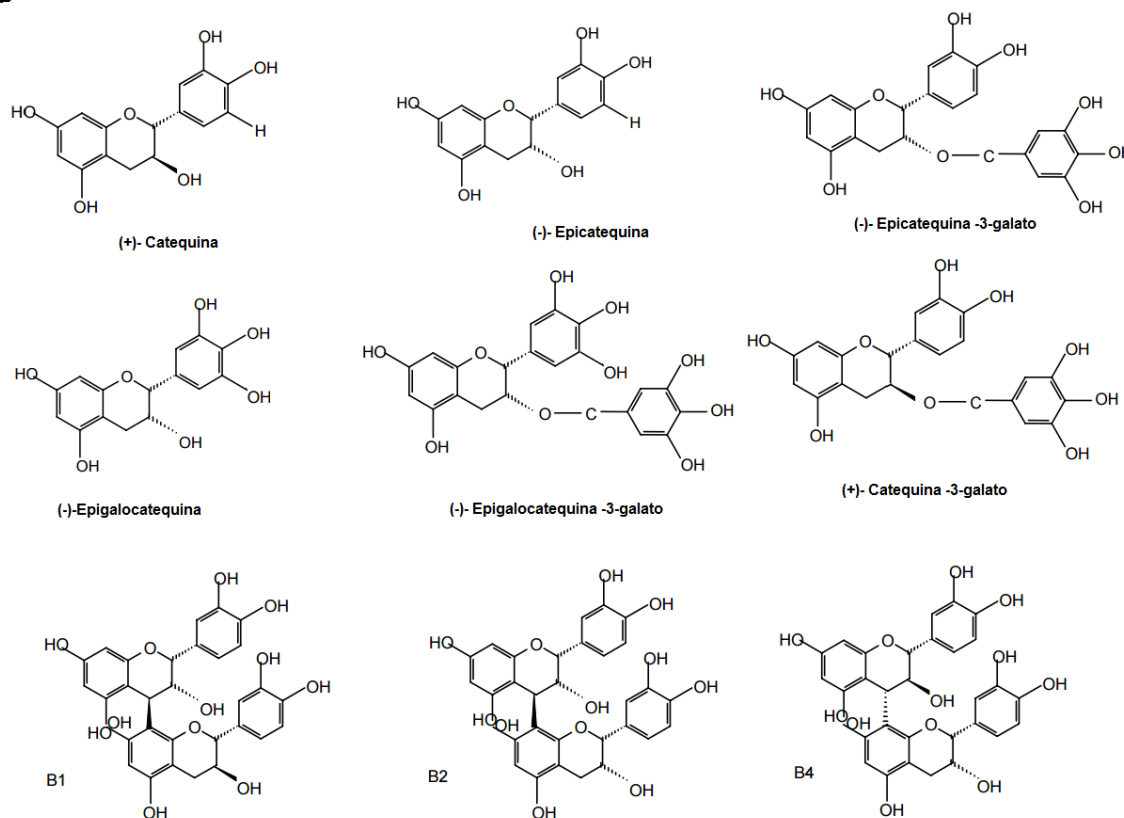
Os taninos são compostos por dois grupos, os condensados (proantocianidina) e os hidrolisáveis, que pela própria nomenclatura são facilmente

hidrolisáveis. Somente os taninos condensados são encontrados nas uvas e seus derivados. Em uvas (*Vitis viniferas*), as formas monoméricas mais encontradas são a catequina e epicatequina, os oligômeros e polímeros formados, a partir destas formas, também são muito encontrados. A quantidade destes compostos pode variar de acordo com a parte do cacho de uva estudado e, também nas diferentes partes da uva, como sementes e casca (JORDÃO, 2000).

Algumas práticas culturais, realizadas na vinha durante a maturação das uvas, também apresentam significâncias nos teores de fenois. A adubação, a forma de condução da vinha e, a prática da desfolha são fatores determinantes. Os teores de flavan-3-ols encontrados nas uvas variam também de acordo com o tipo de uva cultivado. Alguns estudos indicam que a variação climática entre os anos é um dos principais fatores, que modificam o teor de taninos presentes nas uvas (JORDÃO, 2000).

Já os flavan-3-ols estão presentes em cultivares *Vitis viniferas* e *V. labruscas*, como (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epicatequina-3-galato e epigalocatequina.

**Figura 1.6 - Estrutura dos flavan-3-ols**



Fonte: Cabrita, Ricardo-Da-Silva, Laureano (2004)

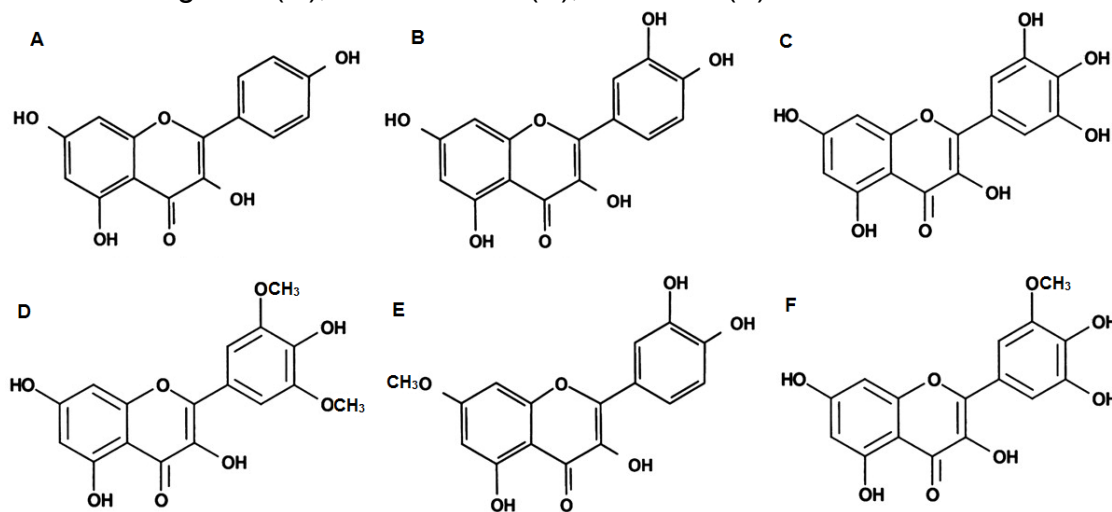
#### 1.1.4.1.3 Flavonois

Os flavonois pertencem ao grupo dos flavonoides com estrutura muito semelhante a das antocianinas (CASTILLO-MUNOZ et al., 2007), possuem uma coloração amarelada e são representados principalmente pelo canferol, miricetina, quercetina, siringetina, isoramnetina e laricitrina (Figura 1.7) nas cultivares denominadas tintas. Atuam diretamente na cor dos vinhos brancos e como copigmentos em vinhos tintos, já que a coloração das antocianinas é predominante (BOULTON, 2001; SCHWARZ et al., 2005).

A presença de isoramnetina e miricetina durante algum tempo foi considerada como sendo exclusiva de uvas tintas, porém também foram identificadas em uvas brancas (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2010a; RODRÍGUEZ-MONTEALEGRE et al., 2006). Em cultivares de *Vitis labrusca* a quercetina é encontrada em maiores quantidades, enquanto nos cultivares de *Vitis vinifera* a quercetina e miricetina apresentam níveis mais elevados (JACKSON, 1994).

Dentre os açúcares, a glicose é o mais encontrado ligado aos flavonois, podendo ser encontrados também galactose e ácido glucurônico (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2007, 2009a). Nixdorf e Herмосín-Gutiérrez (2010) identificaram e quantificaram miricetina e quercetina do tipo 3-O-glicuronídeo em vinhos produzidos a partir do cultivar Isabel. Os flavonois apresentam alta absorbância em comprimentos de onda entre 250 e 400 nm, exercendo assim a função de proteção contra a radiação UV, principalmente nas cascas das uvas. A luz estimula a produção dos flavonois nas uvas, portanto, variabilidade na incidência de luz, dentro de uma mesma propriedade de cultivo, pode significar diferentes níveis destes compostos entre cachos de um mesmo cultivar de uva (PRICE et al., 1995).

**Figura 1.7** - Estrutura dos flavonóis. Canferol (**A**); quercetina (**B**); miricetina (**C**); siringetina (**D**); isoramnetina (**E**); laricitrina (**F**).



Fonte: Chen et al. (2004)

#### 1.1.4.2 Não Flavonoides – Ácidos Hidroxicinâmicos e ácidos benzoicos

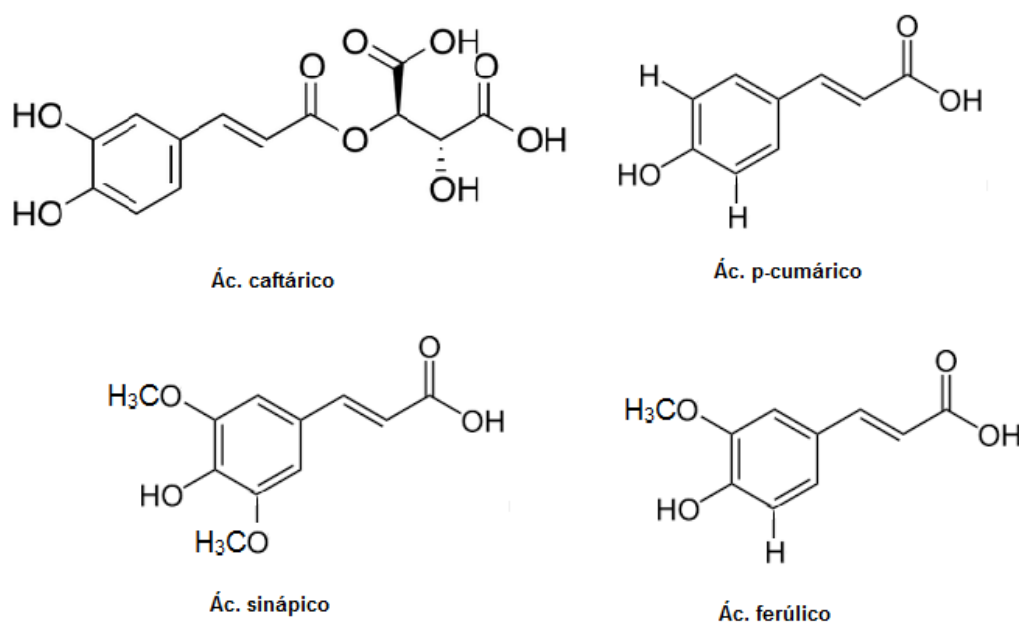
Estes compostos compreendem os ácidos fenólicos, benzóicos e cinâmicos, além dos estilbenos. Estes compostos podem ser classificados de acordo com as estruturas químicas que lhes dão origem como: C6-C1 dos ácidos hidroxibenzoico, gálico e elágico, C6-C3 dos ácidos caféico, p-cumárico e hidroxicinâmicos (Figura 1.8), C6-C2-C6 do trans e cis-resveratrol (BURNS et al., 2001).

Na casca e polpa da uva é que se encontram os fenóis ácidos, sendo que a sua concentração é reduzida, conforme o avanço do amadurecimento da fruta. Os ácidos fenólicos mais encontrados nas uvas são os ácidos hidroxicinâmicos, apresentando um papel importante na oxidação, responsável pela coloração castanha dos mostos e vinhos (SINGLETON, 1987). A concentração destes compostos também pode variar de acordo com o cultivar (MACHEIX, SAPIS, FLEURIET, 1991). A porcentagem encontrada de ácido caftárico e cutárico podem ser parâmetros para identificação dos cultivares de uvas. Os fenóis podem ser associados com o gosto amargo e adstringente, porém em concentrações baixas não devem influenciar no sabor. Os valores de ácido caftárico e p-cumárico

diminuem ao longo da fermentação das uvas na fabricação do vinho, já que os vinhos apresentam valores menores, do que os mostos que os originaram. Os teores destes ácidos podem sofrer variações de acordo com o clima e região das cultivares, além do tipo de uva (VRHOVSEK, 1998; PENNA, DAUDT, HENRIQUES, 2001).

Os ácidos caftárico e cumárico são comumente encontrados em diversas concentrações, independente de serem *V. viniferas* ou *V. labruscas*, apresentando variações mais significativas, de acordo com as condições climáticas. Em geral, as quantidades de ácido caftárico são maiores que as de cumárico, e estes compostos apresentam diminuição na sua concentração durante a fermentação dos vinhos (PENNA, DAUDT, HENRIQUES, 2001).

**Figura 1.8** – Estrutura dos ácidos hidroxicinâmicos



Fonte: Cabrita, Ricardo-Da-Silva, Laureano (2004)

### 1.1.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS EM ANÁLISES

A técnica mais utilizada para análise dos compostos fenólicos presentes em uvas é a técnica de CLAE-DAD-EM ou do ingles HPLC-PDA-MS. O método é

baseado na fragmentação e quantificação da relação massa-carga ( $m/z$ ) dos compostos separados pela cromatografia, tornando possível assim o estudo das estruturas dos compostos de interesse. A técnica de HPLC com detector de arranjo de diodos (PDA) é a mais utilizada na quantificação dos compostos fenólicos. Este tipo de detector é um dos mais comumente encontrados em cromatografia líquida de alta eficiência (ABE et al., 2007; GONZÁLEZ-PARAMÁS et al., 2004).

A composição fenólica de uvas *Vitis viniferas*, identificando os compostos por classes por LC-MS/MS, já tem sido descrita na literatura (GÓMEZ-ALONSO, GARCÍA-ROMERO, HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2007; CASTILLO-MUÑOZ et al., 2007; CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009, 2009a), especialmente para a classe das antocianinas (SANTOS-BUELGA, FRANCIÁ-ARICHA, ESCRIBANO-BAILÓN, 1995; RYAN, REVILLA, 2003; SÁNCHEZ-MORENO et al., 2003; RODRÍGUEZ-MONTEALEGRE et al., 2006). Quanto as uvas *V. labruscas* a composição de antocianinas tem sido descrita (DE ROSSO et al., 2012), porém somente alguns artigos apresentam além desta, a composição de flavan-3-ols, ácidos hidroxicinâmicos e flavonois, para as uvas como a BRS Violeta (REBELLO et al., LAGO-VANZELA et al., 2013; BARCIA et al., 2014); BRS Lorena (BARCIA et al., 2014); BRS Clara e BRS Morena (LAGO-VANZELA et al., 2011a) e Bordô (LAGO-VANZELA et al., 2011b). Quanto à composição fenólica para a uva do cv. Isabel, a maioria dos trabalhos descrevem as antocianinas (RIZZON et al., 2000; ABE et al., 2007; SOARES et al., 2008) e caracterizam as mesmas (De ROSSO et al., 2014, FAVRETTO, FLAMINI, 2000). No artigo de Nixdorf e Hermosín-Gutiérrez (2010) antocianinas, flavan-3-ols, ácidos hidroxicinâmicos e flavonois foram identificados, porém apenas para os vinhos elaborados a partir de 'Isabel'.

Para a identificação de compostos em matrizes complexas utiliza-se o modo de análise chamado MRM (Reações múltiplas monitoradas), onde o íon precursor de interesse é selecionado no massas, assim o cromatograma apresenta-se mais simples e com apenas um pico (PETTA, 2008).

Como a literatura que descreve a composição fenólica de uvas e vinhos de *V. labruscas* é escassa (NIXDORF, HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010; BARCIA et al., 2014; VANZELA et al., 2011a), o objetivo deste estudo consiste em encontrar o perfil dos compostos fenólicos da uva 'Isabel', proveniente de diferentes propriedades no

Rio Grande do Sul (Brasil), determinando pela primeira vez, para as cascas das uvas e sementes deste cultivar.

### **1.1.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Atualmente diversas técnicas podem ser utilizadas para determinação da atividade antioxidante de diferentes matrizes. Estas técnicas permitem avaliar o potencial de diversas substâncias na prevenção de uma série de doenças causadas pelo estresse oxidativo ou reparando lesões (BIANCHI, 1999). Para esta finalidade é possível destacar o método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006) no qual através do sequestro de radicais livres, se determina a capacidade antioxidante do material. Os radicais livres são átomos ou grupo de átomos que apresentam um ou mais elétrons não pareados, tornando-se assim, muito instáveis e altamente reativos. Essas moléculas tem o poder de oxidar lipídios, proteínas e até mesmo o DNA, podendo assim causar diversos prejuízos a saúde de um indivíduo (OLIVEIRA, 2011).

O método é baseado na mudança de coloração de uma solução contendo radicais livres estáveis (DPPH) através de um espectrofotômetro. A solução que inicialmente apresenta uma cor violeta, gradualmente vai perdendo a coloração.

## **1.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **1.2.1 SOLVENTES E REAGENTES**

Todos os solventes utilizados foram de grau LC-MS e todos os reagentes de pureza analítica (>99%). Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura do sistema Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Billerica, MA, USA). As antocianinas foram quantificadas por equivalentes em mg kg<sup>-1</sup> de malvidina 3,5-diglicosídeo (Phytolab, Vestenbergsgreuth, Alemanha). Malvidina 3-glicosídeo, malvidina 3,5-diglicosídeo,

peonidina 3,5-diglicosídeo, ácido caftárico, ácido *p*-cumárico, ácido *trans*-caftarico, (-)-epigallocatequina, e (-)-galocatequina foram adquiridos da Phytolab (Vestenbergsgreuth, Alemanha). Cianidina 3-glicosídeo, cianidina 3,5-diglicosídeo, procianidina B1 e B2, canferol, quercetina, isoramnetina, miricetina, siringetina, 3-glicoronídeos de canferol, quercetina, isoramnetina, siringetina e os 3-glicosídeos de canferol, quercetina, isoramnetina, miricetina, siringetina, provenientes da Extrasynthese (Genay, França). Miricetina 3-glicosídeo, quercetina 3-glicoronídeo e laricitrina 3-glicosídeo foram isolados anteriormente das cascas de uva Petit Verdot (CASTILLO-MUNOZ et al., 2009a).

### **1.2.2 AMOSTRAGEM DAS UVAS**

As uvas foram coletadas em três propriedades distintas da Cidade de Veranópolis no Rio Grande do Sul (Brasil) das videiras da Vinícola Simonetto (29°00'26.6"S 51°34'20.7"W) e Vinícola Barbarano (28°57'21.0"S 51°31'17.8"W face norte e 28°57'21.2"S 51°30'56.9"W face oeste). Os cachos de uvas em estágio de maturação foram colhidos randomicamente da parte central e laterais do parreiral de mais de 70 anos de cultivo em sistema de latada (EMBRAPA, 2014) no mês de fevereiro de 2011. De um total de 2 kg de uvas colhidas foram amostradas 10 bagas por cacho em um total de 13 amostras. As bagas foram retiradas das partes superiores, meio e inferiores dos cachos, sempre rotacionando o cacho, para efetuar uma amostragem representativa em relação a incidência dos raios solares.

### **1.2.3 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DO CULTIVAR**

Visando garantir a identidade do cultivar da uva a ser caracterizada, quanto aos polifenóis, foi realizada a identificação genética por microsatélite. Foram coletados nos 3 vinhedos cinco fragmentos do tronco das videiras, do qual foram colhidas as uvas, cujas cascas e sementes foram caracterizadas pelo nosso estudo. Seis marcadores nucleares microsatélites (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62 e VrZAG79) foram utilizados, considerando serem os mais frequentemente empregados para a identificação dos cultivares de uvas, correspondendo aos

descritores OIV 801 a OIV 806 (OIV, 2009). Estes foram determinados mediante eletroforese capilar utilizando um sequenciador automático ABIPRISM 310 (Applied Biosystems, CA, EUA).

As amostras de troncos foram analisadas e, a partir do conjunto de alelos presentes, foi possível a obtenção da classificação das videiras. Todas apresentaram o mesmo conjunto para os seis marcadores nucleares de microsatélite. A partir destes dados, (Tabela 1.2) e através da base de dados “Spanish Vitis microsatellite database” (<http://www.sivvem.monbyte.com/sivvem.asp>) foi possível a confirmação de todas as videiras, como sendo do cultivar Isabel, com origem da Carolina do Sul (USA), *Vitis labrusca*. A utilização dos marcadores moleculares OIV 801 até 806 são recomendados a fim de garantir a identificação e caracterização de espécies (MARTÍN et al., 2011).

**Tabela 1.2** - Identificação genética por microsatélite de troncos das videiras das quais foram coletadas as uvas ‘Isabel’ caracterizadas de 3 propriedades distintas em Veranópolis (RS, Brasil)

VVMD5		VVMD7		VVMD27		VVS2		ZAG62		ZAG79	
Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
234	234	233	247	175	179	120	150	201	203	235	245

Os valores referem-se ao tamanho dos alelos em pares de bases (bp)

#### 1.2.4 PREPARO DAS AMOSTRAS - EXTRAÇÃO DOS POLIFENOIS DAS CASCAS E SEMENTES

As amostras de uvas das três procedências foram cuidadosamente separadas em cascas e sementes manualmente. As cascas foram lavadas com água ultrapura, secas levemente com papel, e congeladas (-80°C por 12 h). Após, foram liofilizadas (Christ Alpha-1-2-LDPlus, Shropshire, Inglaterra), pesadas (Shimadzu AX200, Quioto, Japão) e embaladas á vácuo (TecMaq, TM 250, SP, Brasil). As uvas foram cortadas ao meio, as sementes retiradas, pesadas, e posteriormente congeladas (-18°C).

Às cascas liofilizadas (0,50 g de amostra) adicionou-se 50,0 mL da solução de metanol, água, ácido fórmico (50:48,5:1,5 v/v/v). Após ser triturada a mistura foi submetida à ultrassonicação por 10 minutos e centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos (NT 810, Nova técnica, Brasil) a 20°C. O sobrenadante foi passado para

uma proveta de 100 mL com cuidado. Na amostra precipitada foi adicionado mais 50 mL da mesma solução, repetindo-se o procedimento anterior. O sobrenadante foi colocado na mesma proveta e o volume final foi anotado. Uma alíquota da amostra foi filtrada (membrana de poliéster, 0,20 µm, Chromafil PET 20/25, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). Para análise das antocianinas tomou-se 0,75 mL de amostra, adicionando-se ao *vial*, 0,75 mL de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, a qual foi diretamente injetada no sistema de HPLC.

As sementes separadas (2,00 g) passaram por procedimento idêntico ao descritos anteriormente para as cascas, tendo sido o sobrenadante congelado a -18 °C até a análise.

## **1.2.5 ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR**

### **1.2.5.1 *Preparação das amostras***

A fração dos compostos fenólicos livre de antocianinas, dos extratos das cascas das uvas 'Isabel', foram utilizadas para a análise dos flavonóis e derivados de ácidos hidroxicinâmicos, tendo sido isoladas após a diluição de 3 mL do extrato com 3 mL de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, segundo o procedimento descrito por Castillo-Munõz et al. (2007). Usando cartuchos de extração em fase sólida ECX SPE (40 µm, 500 mg, 6 mL; Scharlab, Sentmenat, Barcelona, Spain) previamente condicionados com 5 mL de metanol e 5 mL de água, a eluição utilizou 3 x 5 mL de metanol. Este eluato foi evaporado em um rotaevaporador (Hei-VAP Precision HL/G3, Heidolph Instruments GmbH & Co, Schwabach, Alemanha) a 35°C. O resíduo seco foi redissolvido em 1,0

mL de solução água: metanol (80:20 v/v), transferido para o *vial* e injetado no sistema de HPLC.

Os flavan-3-ols (monômeros, dímeros do tipo B, e proantocianidinas poliméricas) foram isolados dos extratos das cascas e sementes das uvas 'Isabel', seguindo o procedimento descrito por Rebello et al. (2013). Dois (2 mL) de cada extrato misturados a 12 mL de água ultrapura foram passados no Sep-Pak Plus C18 (820 mg de adsorvente, Waters, Mildford, MA, EUA) pré-condicionados com metanol e água, e levados á secura (Visiprep™ SPE Vacuum Manifold, 12-Port, Supelco, Bellefonte, PA, EUA). Os fenolicos foram eluídos com 15 mL de metanol e 5 mL de acetato de etila. O solvente foi rotaevaporado (35°C) e o resíduo ressuspendido em 2 mL de metanol foi reservado, mantido a -18°C até análise.

## **1.2.6 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENOLICOS DAS CASCAS E SEMENTES DAS UVAS 'ISABEL' POR HPLC-PDA-ESI-MS<sup>N</sup>**

### **1.2.6.1 Instrumental**

A separação, quantificação e identificação dos compostos fenolicos presentes nas cascas das uvas 'Isabel' foi realizada em um sistema de HPLC da Agilent da Série 1100 (Waldbronn, Alemanha), equipado com PDA (G1315B) e LC/MS-MS<sup>n</sup> (G2445C VL), espectrômetro de massas com ionização por eletrospray (ESI), acoplado a estação de processamento de dados Agilent Chem Station (Versão B.01.03). O *software* utilizado para gerenciamento do espectrômetro de massas foi o Agilent LC/MS Trap (Versão 5.3). A coluna cromatográfica empregada foi uma de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 µm, Agilent, Waldbronn, Alemanha).

### **1.2.6.2 Condição Cromatográfica e do Espectrômetro de Massas para a Análise das Antocianinas das Cascas da Uva 'Isabel'**

As amostras dos extratos das cascas (10,0 µL), preparadas conforme procedimento descrito anteriormente foram injetadas na coluna mantida a 40°C. As condições cromatográficas utilizadas para as análises de antocianinas foram baseadas em Lago-Vanzela et al. (2013) com modificações. As fases móveis consistiram de uma mistura de água ultrapura, acetonitrila, e ácido fórmico (88,5:3:8,5, v/v/v, Fase A; 41,5:50:8,5, v/v/v, Fase B) na vazão de 0,19 mL min<sup>-1</sup>. Um gradiente linear foi empregado da Fase B nas proporções: zero min, 6%; 10 min, 30%; 30 min, 50%; 34 min, 100%; 36 min, 100%; 42 min, 6%. A ionização para a identificação empregou ESI-MS<sup>n</sup>: no modo positivo; N<sub>2</sub> seco, 11 mL min<sup>-1</sup>; temperatura de 350 °C; nebulizador: 65 psi; capilar: 2500 V; capilar de saída: 70 V; skimmer 1: 20 V; skimmer 2: 6 V; estabilidade do composto: 100%; alcance do scan: 50-1200 m/z. Para a quantificação foi empregado um detector de arranjo de diodos (PDA) com os cromatogramas extraídos á 520 nm, e as concentrações foram expressas em termos de malvidina-3,5-diglicosídeo (NIXDORF, HERMOSIN-GUTIERREZ, 2010; RENTZSCH et al., 2007). As antocianinas foram calculadas a partir das áreas dos respectivos picos identificados nos cromatogramas. A porcentagem de cada antocianina foi calculada de acordo com os valores de área de cada pico em relação á soma de todas as áreas do cromatograma.

### **1.2.6.3 Condição Cromatográfica e do Espectrômetro de Massas para a Análise da Fração Livre de Antocianinas (Flavonois e Ácidos Hidroxicinâmicos) das Cascas da Uva 'Isabel'**

As amostras dos extratos das cascas livres de antocianinas (20,0 µL), conforme procedimento descrito anteriormente, foram injetadas na coluna mantida a 40°C. As condições cromatográficas utilizadas para as análises dos flavonols e derivados de ácidos hidroxicinâmicos foram as utilizadas por Rebello et al. (2013) com modificações. O gradiente linear para as análises dos flavonols e derivados dos

ácidos hidroxicinâmicos empregou além das Fases A e B, a Fase C (água, metanol, ácido fórmico 1,5:90:8,5 v/v/v), conforme as proporções: zero min, 98% A e 2% B; 8 min, 96% A e 4% B; 37 min, 70% A, 17% B e 13% C; 51 min, 50% A, 30% B e 20 % C; 51,5 min, 30 % A, 40 % B e 30 % C; 56 min, 50% B e 50% C; 64 min, 96% A e 4% B. Os parâmetros do massas foram: ionização no modo negativo; N<sub>2</sub> seco, 8 mL min<sup>-1</sup>; temperatura de 325 °C; nebulizador: 50 psi; capilar: 2500 V; capilar de saída: 70 V; skimmer 1: 20V; skimmer 2: 6 V; estabilidade do composto: 100%; alcance do *scan*: 50-1200 m/z. A quantificação foi feita pelos cromatogramas extraídos do PDA em 360 nm para os flavonols e, em 320 nm para os derivados de ácidos hidroxicinâmicos.

#### **1.2.6.4 Condição Cromatográfica e do Espectrômetro de Massas para a Análise de Flavan-3-ols das Cascas e Sementes da Uva 'Isabel'**

Para as análises dos monômeros dos flavan-3-ols e dos dímeros das procianidinas das cascas de uvas e sementes, 0,25 mL do extrato passado pelo Sep-Pak C18 e reservado (fração sem reação) foram diluídos em 4,75 mL da solução de água: ácido fórmico (98,5:1,5 v/v) em um *vial* cromatográfico, fechado e levado para injeção no HPLC-PDA-MS.

Para análise das proantocianidinas, foi feita a reação de despolimerização catalisada por ácido, em que 0,5 mL de solução reagente de pirogalol (100 g L<sup>-1</sup> de pirogalol e 20 g L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico em 0,3 mol L<sup>-1</sup> em metanol) foram adicionados á 0,25 mL do extrato passado pelo SPE-C18, e a mistura foi mantida a 30°C por 40 min. Após, adicionou-se 2,25 mL de acetato de sódio 67 mmol L<sup>-1</sup> e 2 mL de água, tendo sido está mistura reacional injetada (fração com reação de despolimerização).

As amostras (sem e com a reação de despolimerização catalisada por ácido) foram injetadas (10,0 µL) na coluna a 16°C. Utilizou-se a fase móvel A (água: metanol: ácido fórmico 97:2:1, v/v/v) e fase B (metanol) em uma vazão de 0,1 mL min<sup>-1</sup>. O gradiente linear apresentou as seguintes proporções da fase B: 0 min, 5%; 2 min, 5%; 25 min, 30 %; 40 min, 55%; 50 min, 95%; 65 min, 95%; 70 min, 5%; e 80 min, 5%. Dois modos de *scan* foram usados: (EMS - espectro de massas reforçado,

em condições MS) para identificação dos compostos e (MRM - Reações múltiplas monitoradas; em condições MS/MS) para quantificação. As condições do MS para os dois modos foram: voltagem do íon spray, 4000 V; temperatura da fonte de íons, 500°C; gás de colisão, alto; cortina de gás, 15 psi; gás da fonte de íons 1,50 (unidades arbitrárias); potencial declustering, 35 V; potencial de entrada, 3 V. Os dados referentes as concentrações dos monômeros de flavan-3-ols, obtidos sem a reação de despolimerização, foram usados para a correção na medida das concentrações do monômeros gerados a partir dos flavan-3-ols (subunidades terminais dos polímeros das proantocianidinas) durante a despolimerização das proantocianidinas.

Para a identificação e quantificação de diversos flavan-3-ols, padrões dos monômeros foram utilizados: (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-galactocatequina, e (-)-epicatequina-3-galato; os dímeros procianidinas B1, B2 e B4. As proantocianidinas poliméricas totais foram quantificadas por equivalentes de (+)-catequina. Seguindo métodos já desenvolvidos para a identificação usando EMS e MRM para a quantificação (LAGO-VANZELA et al., 2011a e 2011b).

## 1.3 RESULTADOS

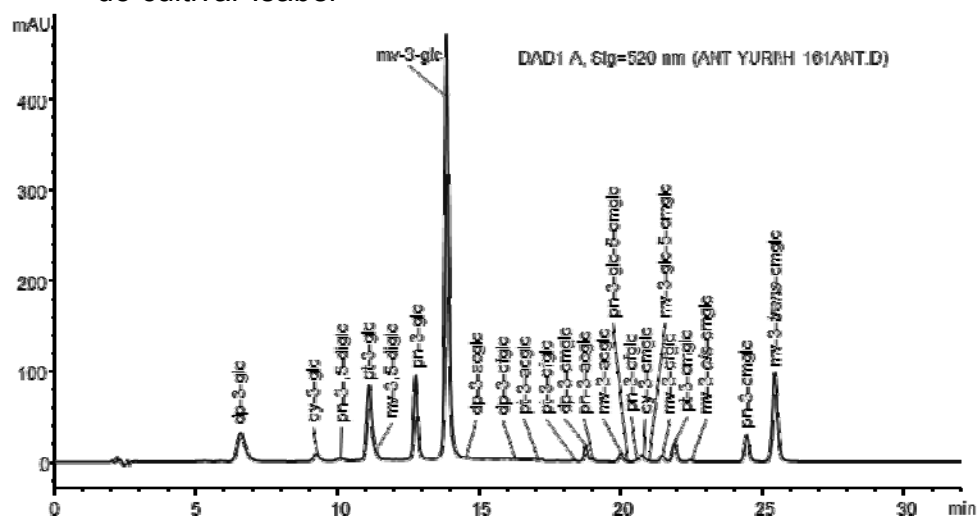
### 1.3.2 OCORRÊNCIA DE COMPOSTOS FENÓLICOS NA UVA 'ISABEL'

O perfil de fenólicos em termos de antocianinas para as 13 amostras de uvas, todas provenientes da 'Isabel' (*Vitis labrusca*), cultivadas em três diferentes propriedades da Região de Veranópolis (RS, Brasil), está apresentada no perfil cromatográfico (Figura 1.9 e 1.10), com os respectivos tempos de retenção e comprimento de absorção máximo para cada uma das antocianinas (Tabela 1.3). As antocianinas encontradas são identificadas em trabalhos anteriores como procedentes de espécies *V. viniferas* e *V. labruscas* (REBELLO, 2013; LAGO-VANZELA et al., 2011a; BARCIA, et al., 2014). A antocianina encontrada em maior quantidade em todas as amostras de casca de uva 'Isabel', pertencente ao grupo 3-

glicosídeo, foi a malvidina 3-glicosídeo, seguida pela petunidina-3-glicosídeo. As 3-(6-coumaroil)-glicosídeo derivadas das cinco antocianinas (*pn*, *pt*, *mv*, *cy* e *dp*) foram identificadas através dos espectros de MS e MS<sup>2</sup>, sendo a malvidina-3-t-(6-coumaroil)-glicosídeo a mais abundante. Em menores quantidades encontrou-se malvidina 3-(6-cafeoil)-glicosídeo (*mv-3-cfglc*). Um segundo grupo de antocianinas também foi detectado nas uvas 'Isabel', os 3,5-diglicosídeos, que são característicos dos cultivares *V. labruscas* (REBELLO et al., 2013; BARCIA, et al., 2014). Os 3,5-diglicosídeos de malvidina e peonidina foram identificados através dos espectros MS e MS<sup>2</sup>, apresentando o íon molecular esperado (M<sup>+</sup>, modo MS), sendo que a fragmentação pelo "ion trap" (Modo MS<sup>2</sup>), resultou em duas perdas de glicoses independentes, gerando os produtos [M-glc]<sup>+</sup> e [M-glc-glc]<sup>+</sup>. O cultivar Isabel apresentou uma média de 46% de malvidina-3-glicosídeo em sua composição, já cultivares como 'Seibel', 'Burdin' e 'Terci', apresentaram 44,8%, 34,6% e 30,7%, (De ROSSO et al. 2012) respectivamente, já a concentração de malvidina-3,5-diglicosídeo, que no cultivar Isabel apresentou níveis próximos a 1%, em outras cultivares *V. labruscas* como 'Seyve Villard', apresenta valores em torno de 44% (De ROSSO et al. 2012).

No que diz respeito à variação da quantidade total de antocianinas presentes nas amostras, os resultados mostram uma pequena variação nos valores, atribuídos á diversos fatores climatológicos, diferentes manejos das videiras e peculiaridades dos solos. Todas as amostras provenientes do cultivar Isabel apresentaram em torno de 500 mg kg<sup>-1</sup> de antocianinas totais, cultivares também *Vitis labrusca* como 'Bacò', 'Bertille Seyve' e 'Terci', apresentam níveis diferenciados e mais elevados de antocianinas totais entre 1880 e 5291 mg kg<sup>-1</sup>(De ROSSO et al., 2012). Portanto, o perfil dos compostos fenólicos pode ser utilizado para uma possível distinção entre os cultivares. Os resultados deste estudo são preliminares, sugerindo-se que outras amostras e de diferentes locais, deverão ser avaliadas.

**Figura 1.9** - Perfil cromatográfico das antocianinas identificadas nas cascas da uva do cultivar Isabel



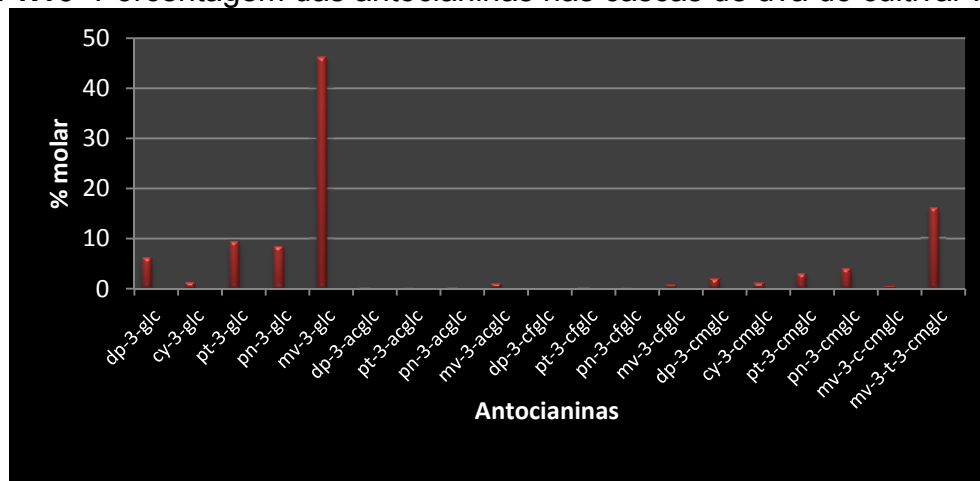
**Tabela 1.3** - Antocianinas identificadas nas cascas de uva do cultivar Isabel com dados do tempo de retenção, máximo de comprimento de onda no UV-Vis e dos espectros de massas

Antocianina	T.R. (min)	UV-Vis Max (nm)	IM; PI ( <i>m/z</i> )	(%) molar	DP
<i>dp-3-glc</i>	6,57	277, 298 (sh), 346, 440 (sh), 524	465; 303	6,00	1,14
<i>cy-3-glc</i>	9,25	280, 292 (sh), 325 (sh), 380 (sh), 440 (sh), 517	449; 287	1,14	0,27
<i>pt-3-glc</i>	11,12	277, 294 (sh), 346, 440 (sh), 525	479; 317	9,38	1,1
<i>pn-3-glc</i>	12,76	280, 292 (sh), 325 (sh), 380 (sh), 440 (sh), 518	463; 301	8,38	1,35
<i>mv-3-glc</i>	13,87	277, 298 (sh), 349, 440 (sh), 526	493; 331	46,27	0,61
<i>dp-3-acglc</i>	14,49	524	507; 303	0,19	0,01
<i>pt-3-acglc</i>	17,21	278, 298 (sh), 346, 440 (sh), 527	521; 317	0,15	0
<i>pn-3-acglc</i>	18,98	280, 312 (sh), 378 (sh), 440 (sh), 520	505; 301	0,20	0,03
<i>mv-3-acglc</i>	19,99	278, 298 (sh), 349, 440 (sh), 528	535; 331	0,90	0,09
<i>dp-3-cfglc</i>	16,30	278, 298 (sh), 328 (sh), 404 (sh), 532	627; 303	0,08	0,01
<i>pt-3-cfglc</i>	18,35	530	641; 317	0,19	0,04
<i>pn-3-cfglc</i>	20,61	284, 325, 440 (sh), 519	625; 301	0,17	0,04
<i>mv-3-cfglc</i>	21,43	283, 298 (sh), 328, 440 (sh), 530	655; 331	0,61	0,29
<i>dp-3-cmglc</i>	18,76	282, 298 (sh), 316 (sh), 440 (sh), 530	611; 303	1,93	0,14
<i>cy-3-cmglc</i>	20,73	283, 313, 387 (sh), 440 (sh), 522	595; 287	1,00	0,09
<i>pt-3-cmglc</i>	21,87	282, 298 (sh), 316(sh), 440 (sh), 531	625; 317	2,98	0,22
<i>pn-3-cmglc</i>	24,41	283, 313, 440 (sh), 521	609; 301	4,00	0,79
<i>mv-3-c-cmglc</i>	22,42	280, 300 (sh), 440 (sh), 534	639; 331	0,36	0,06
<i>mv-3-t-3-cmglc</i>	25,41	284, 298 (sh), 316 (sh), 440 (sh), 532	639; 331	16,04	1,94
<b>Total (mg kg<sup>-1</sup>)</b>				496,20	64,96

**dp:** delfinidina; **cy:** cianidina; **pt:** petunidina; **pn:** peonidina; **mv:** malvidina; **3-glc:** 3-glicosídeo; **3-acglc:** 3-(6-acetil) glicosídeo; **3-cmglc:** 3-(6-p-coumaroil) glicosídeo; **3-cfglc:** 3-(6-cafeoil) glicosídeo. sh: *shoulder* –

ombro. **T.R.:** tempo de retenção. **DP:** desvio padrão; **IM:** íon molecular; **PI:** produto iônico; %molar: porcentagem molar.

**Figura 1.10-** Porcentagem das antocianinas nas cascas de uva do cultivar Isabel



*dp:* delphinidina; *cy:* cianidina; *pt:* petunidina; *pn:* peonidina; *mv:* malvidina; *3-glc:* 3-glicosídeo; *3-acglc:* 3-(6-acetil) glicosídeo; *3-cmglc:* 3-(6-p-coumaroil) glicosídeo; *3-cfglc:* 3-(6-cafeoil) glicosídeo

### 1.3.2 FLAVAN-3-OLS

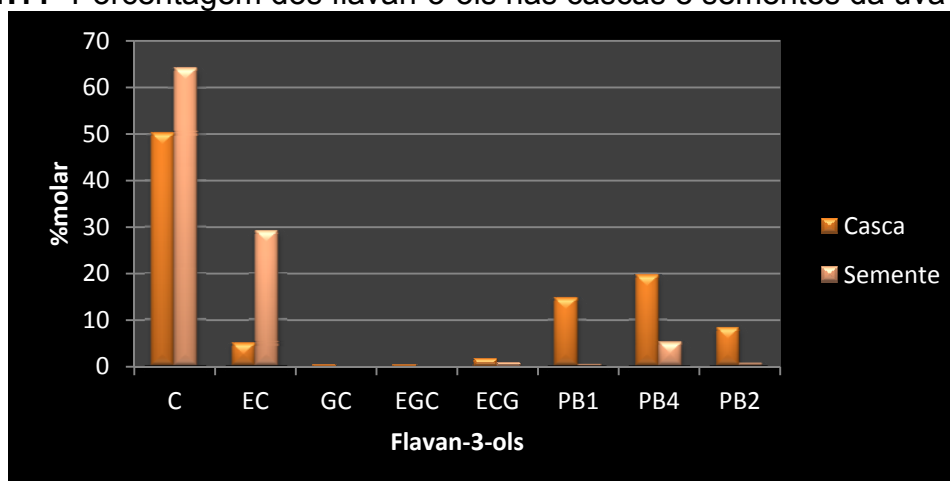
Os flavan-3-ols encontrados foram (+)-catequina (C), (-)-epicatequina (EC), (-)-epicatequina 3-galato (ECG), galocatequina (GC) e epigalocatequina (EGC) (Tabela 1.4), seguindo a mesma tendência de alguns cultivares de *V. viniferas* e *V. labruscas* (REBELLO et al., 2013; LAGO-VANZELA et al., 2011a). Como esperado, a ocorrência dos monômeros flavan-3-ols das uvas do cv. Isabel da região de Veranópolis apresentaram altos níveis de (+)-catequina, próximo de 50% do total de flavan-3-ols nas cascas (Figura 1.11), seguida por (-)-epicatequina, quase que 5% nas cascas, sendo então semelhante aos níveis encontrados para cultivares híbridas como BRS Clara com 59 e 3%, e BRS Morena com 41 e 7,2% para níveis de (+)-catequina e (-)-epicatequina, respectivamente (LAGO-VANZELA et al., 2011a). Proantocianidinas B1, B2 e B4 também foram encontradas nas amostras, porém em menores quantidades. Pode-se observar que os valores totais de flavan-3-ols encontrados nas sementes é muito superior, quando comparado com os resultados referentes às cascas de uva 'Isabel' (46,46 mg kg<sup>-1</sup> nas sementes e 1,07 mg kg<sup>-1</sup> nas cascas).

**Tabela 1.4** - Flavan-3-ols encontrados nas cascas e sementes de uva do cultivar Isabel

Flavan-3-ols	Cascas		Semente	
	(%) molar	DP	(%) molar	DP
<b>C</b>	50,20	4,88	64,28	6,97
<b>EC</b>	4,87	4,94	29,19	5,79
<b>GC</b>	0,33	0,39	ND	ND
<b>EGC</b>	0,29	0,38	ND	ND
<b>ECG</b>	1,60	1,2	0,68	0,15
<b>PB1</b>	14,72	1,86	0,33	0,1
<b>PB4</b>	19,67	2,88	5,05	1,08
<b>PB2</b>	8,29	2,7	0,44	0,14
<b>Total (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	1,07	0,32	46,46	14,08

**C:** (+)-catequina; **EC:** (-)-epicatequina; **GC:** galocatequina; **EGC:** epigalocatequina; **ECG:** (-)-epicatequina 3-galato; **PB1:** proantocianidinas B1; **PB4:** proantocianidinas B4; **PB2:** proantocianidinas B2; **(%) molar:** porcentagem molar; **DP:** desvio padrão; **ND:** não detectado.

**Figura 1.11-** Porcentagem dos flavan-3-ols nas cascas e sementes da uva 'Isabel'



**C:** (+)-catequina; **EC:** (-)-epicatequina; **GC:** galocatequina; **EGC:** epigalocatequina; **ECG:** (-)-epicatequina 3-galato; **PB1:** proantocianidinas B1; **PB4:** proantocianidinas B4; **PB2:** proantocianidinas B2

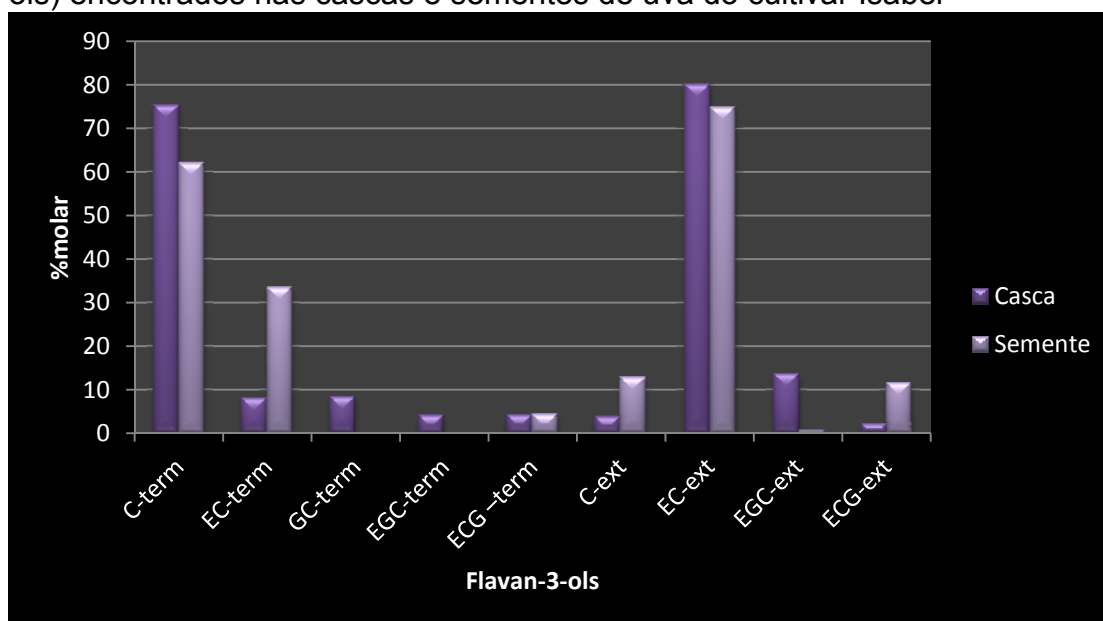
Os flavan-3-ols encontrados após a reação de despolimerização apresentaram níveis mais altos para (+)-catequina em unidades terminais das proantocianidinas e (-)-epicatequina nas extensões de proantocianidinas (Figura 1.12), da mesma forma que os resultados encontrados em outros cultivares de *V. labruscas*. Enquanto, na casca do cv. Isabel foram encontrados apenas cerca de 25 mg kg<sup>-1</sup> de proantocianidinas (Tabela 1.5), em cultivares híbridas como BRS Morena e BRS Clara foram encontrados 391 e 264 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente (LAGO-VANZELA et al., 2011a).

**Tabela 1.5** - Proantocianidinas (porcentagem de cada flavan-3-ol) encontrados nas cascas e sementes de uva do cultivar Isabel

Flavan-3-ols	Casca		Sementes	
	(%) molar	DP	(%) molar	DP
<i>C-term</i>	75,24	5,11	62,06	4,92
<i>EC-term</i>	8,09	2,5	33,49	4,37
<i>GC-term</i>	8,34	4,39	ND	ND
<i>EGC-term</i>	4,14	1,65	ND	ND
<i>ECG-term</i>	4,22	0,79	4,46	0,9
<i>C-ext</i>	3,82	0,67	12,94	1,98
<i>EC-ext</i>	80,26	2,41	74,96	3,23
<i>EGC-ext</i>	13,71	1,9	0,57	0,29
<i>ECG-ext</i>	2,21	0,48	11,54	1,34
<b>Total (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>25,42</b>	<b>7,36</b>	<b>71,37</b>	<b>16,45</b>

**C:** (+)-catequina; **EC:** (-)-epicatequina; **GC:** galocatequina; **EGC:** epigalocatequina; **ECG:** (-)-epicatequina 3-galato; **term:** unidades terminais da proantocianidina; **ext:** unidades de extensão da proantocianidina; **(%) molar:** porcentagem molar; **DP:** Desvio Padrão; ND: não detectado.

**Figura 1.12** - Porcentagem das proantocianidinas (porcentagem de cada flavan-3-ols) encontrados nas cascas e sementes de uva do cultivar Isabel



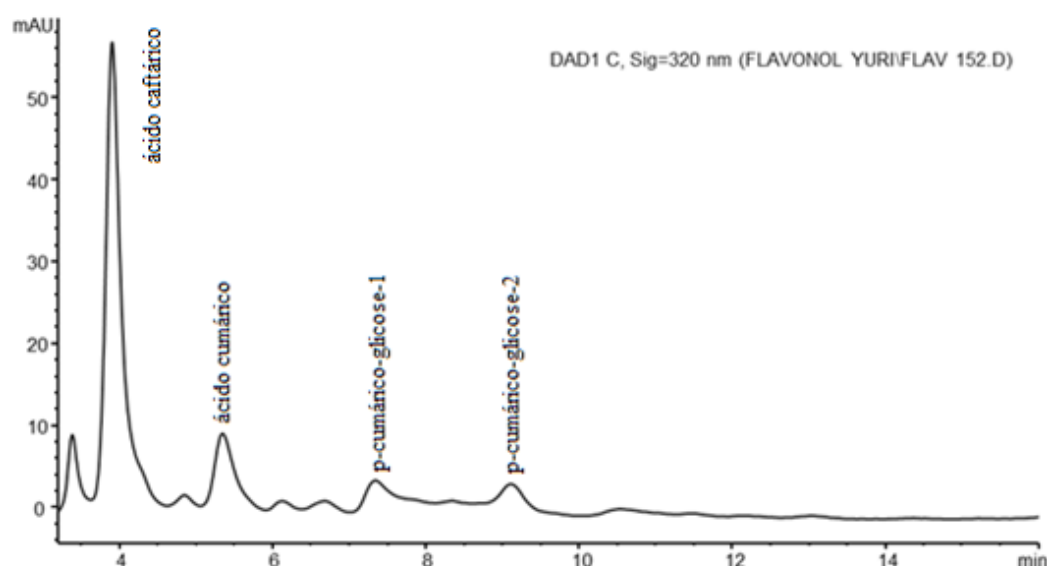
**C:** (+)-catequina; **EC:** (-)-epicatequina; **GC:** galocatequina; **EGC:** epigalocatequina; **ECG:** (-)-epicatequina 3-galato; **term:** unidades terminais da proantocianidina; **ext:** unidades de extensão da proantocianidina

### 1.3.3 ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS

Nas amostras de uvas foram encontrados os ácidos hidroxicinâmicos – tartáricos, ácido caftárico e ácido cumárico (apenas o isômero trans foi detectado),

sendo que o ácido hidroxicinâmico encontrado nas cascas das uvas de Veranópolis em maior concentração foi o ácido caftárico, como mostrado na Figura 1.13, Figura 1.14 e Tabela 1.6. Os resultados seguiram as mesmas tendências encontradas para cultivares híbridas como: BRS Violeta, BRS Clara e BRS Morena, porém os níveis de ácido caftárico e cumárico variaram. Enquanto, para as cascas do cv. Isabel, os níveis de ácido caftárico e ácido cumárico foram próximos a 75 e 13% respectivamente; os da BRS Violeta foram de cerca de 50 e 13%; da BRS Clara de 82 e 9%; e, da BRS Morena de 61 e 23%, respectivamente (LAGO-VANZELA et al., 2011a; BARCIA, et al., 2014).

**Figura 1.13** - Perfil cromatográfico dos ácidos hidroxicinâmicos das cascas de uva do cultivar Isabel

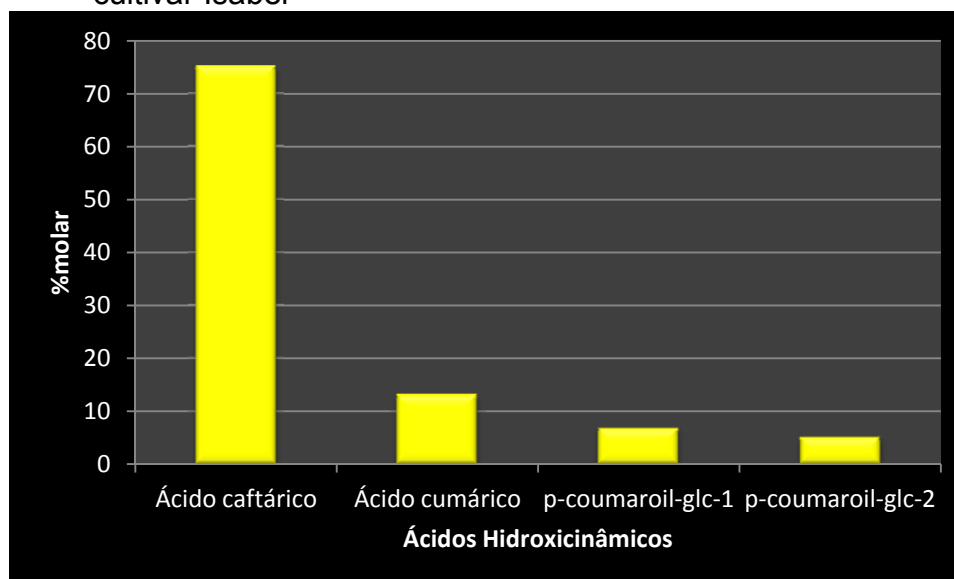


**Tabela 1.6** - Ácidos hidroxicinâmicos (porcentagem molar de cada ácido) nas cascas de uva do cultivar Isabel

Ácidos hidroxicinâmicos	T.R. (min)	UV-Vis (nm)	IM; PI (m/z)	(%) molar	DP
Ácido caftárico	3,91	300 (sh), 328	311; 179, 149	75,13	2,92
Ácido cumárico	5,36	300 (sh), 313	295; 163, 149	13,15	2,23
p-coumárico-glc-1	7,37	300 (sh), 315	325; 163, 145	6,80	1,52
p-coumárico-glc-2	9,16	300 (sh), 313	325; 193, 149	5,11	0,96
<b>Total (mg kg<sup>-1</sup>)</b>				5,24	1,18

glc: glicosídeo; T.R.: tempo de retenção; IM: íon molecular; PI: produto iônico; (%) molar: porcentagem molar; DP: desvio padrão; sh: *shoulder* – ombro

**Figura 1.14** - Porcentagem dos ácidos hidroxicinâmicos nas cascas de uva do cultivar Isabel



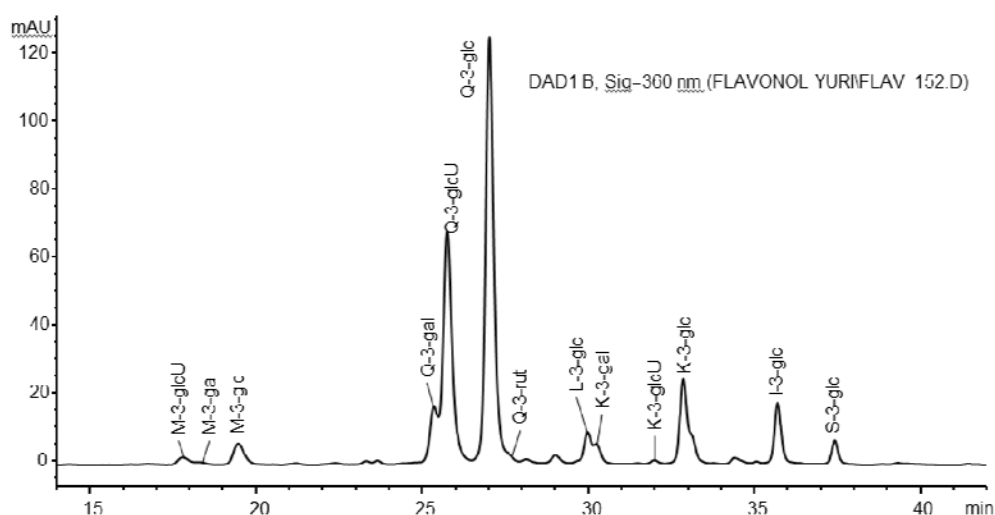
glc:glicosídeo

### 1.3.4 FLAVONOIS

Os níveis qualitativos e quantitativos de flavonois das uvas 'Isabel' foram investigados através de espectrômetro de massas, conforme a Figura 1.15, Figura 1.16 e a Tabela 1.7. Detectou-se nas amostras de cascas da uva do cv. Isabel os 3-glicosídeos (3-*glc*) de seis agliconas de: *Q*, quercetina; *I*, isoramnetina; *M*, miricetina; *L*, laricitrina; *S*, siringetina; e *K*, canferol), juntamente com os 3-glicuronídeos (3-*glcU*) de *M*, *Q* e *K*, sendo o *M-glcU* e *Q-glcU*, além de canferol-galactose também encontrados em cultivares *V. viniferas* e *V. labruscas* como Petit Verdot, Merlot, Syrah, BRS Lorena e BRS Violeta (CASTILLO-MUNÓZ et al., 2007; BARCIA, et al., 2014). Além destas, foram encontrados níveis de quercetina-rutinosídeo (*Q-rut*) presente também em cultivares viníferas como 'Sultana' (KARADENIZ, DURST, WROLSTAD 2000) e híbridas, BRS Clara e BRS Morena (LAGO-VANZELA et al., 2011a). Siringetina e isoramnetina foram detectados em sua forma livre. As concentrações encontradas de flavonois nas uvas de Veranópolis apresentaram-se em torno de 20,62 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto cultivares *V. labrusca* como 'Bacò' e 'Seibel' apresentam 49,66 e 224,60 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente (De ROSSO et al., 2014). Outros cultivares híbridos como BRS Clara e BRS Morena apresentaram maiores níveis para flavonois do tipo miricetina chegando a aproximadamente 47% (LAGO-

VANZELA et al., 2011a), enquanto o cv. Isabel apresentou maiores níveis de flavonóis do tipo quercetina somando cerca de 72%.

**Figura 1.15** - Perfil cromatográfico dos flavonóis nas cascas de uva do cultivar Isabel

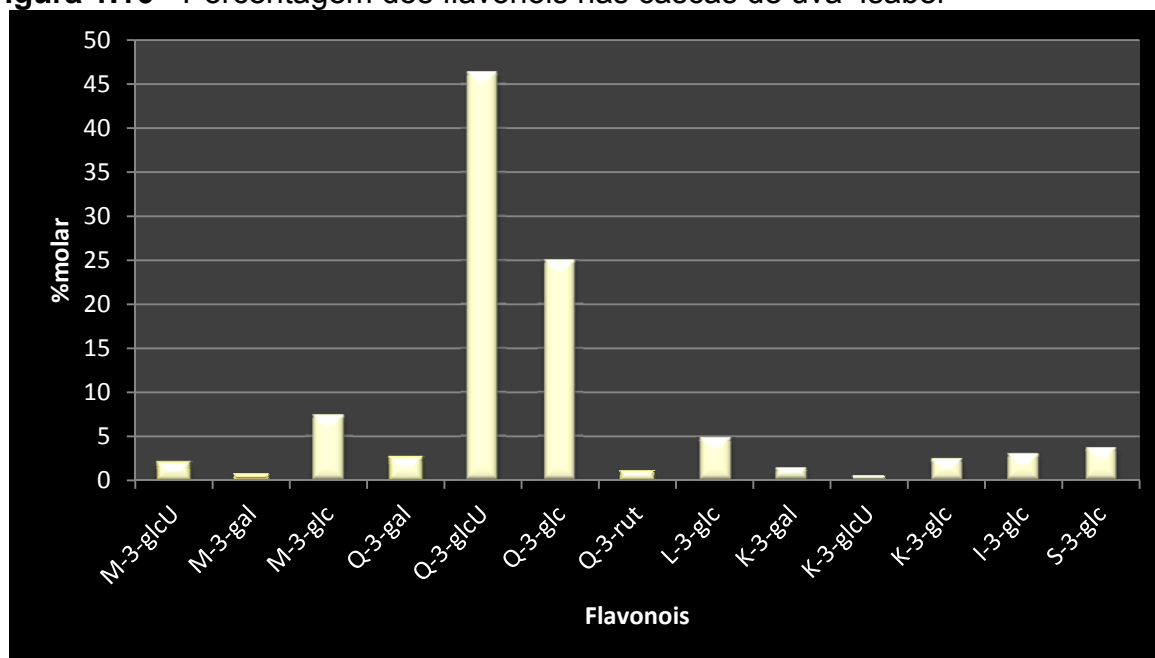


**Tabela 1.7-** Flavonóis ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) das cascas de uva 'Isabel'

Flavonol	T.R. (min)	UV-Vis (nm)	IM; PI (m/z)	(%) molar	DP
<i>M-3-glcU</i>	17,84	257 (sh), 260, 305 (sh), 354	493; 317	1,80	0,64
<i>M-3-gal</i>	18,22	254 (sh), 261, 305 (sh), 356	479; 317	0,53	0,17
<i>M-3-glc</i>	19,51	255 (sh), 261, 305 (sh), 355	479; 317	7,36	3,5
<i>Q-3-gal</i>	25,43	256, 264 (sh), 302 (sh), 354	463; 301	2,42	1,11
<i>Q-3-glcU</i>	25,76	254, 264 (sh), 300 (sh), 353	477; 301	46,38	8,46
<i>Q-3-glc</i>	27,03	256, 264 (sh), 300 (sh), 354	463; 301	24,93	8,71
<i>Q-3-rut</i>	27,52	256, 264 (sh), 300 (sh), 354	609; 301	0,88	0,19
<i>L-3-glc</i>	29,95	255, 262(sh), 305 (sh), 357	493; 331	4,82	2,38
<i>K-3-gal</i>	30,19	265, 298 (sh), 325 (sh), 349	447; 285	1,31	1,95
<i>K-3-glcU</i>	31,86	265, 300 (sh), 325 (sh), 348	461; 285	0,47	0,17
<i>K-3-glc</i>	32,92	264, 300 (sh), 325 (sh), 349	447; 285	2,45	1,79
<i>I-3-glc</i>	35,73	254, 264 (sh), 300 (sh), 354	477; 315	2,99	0,92
<i>S-3-glc</i>	37,47	253, 264 (sh), 305 (sh), 357	507; 345	3,67	2,03
<b>Total (<math>\text{mg kg}^{-1}</math>)</b>				20,62	11,78

**Q:** quercetina; **I:** isoramnetina; **M:** miricetina; **L:** laricitrina; **S:** siringetina; **K:** canferol; **3-glc:** 3-glicosídeo; **3-glcU:** 3-glicuronídeos; **gal:** galactose; **rut:** rutinosídeo; **T.R.:** tempo de retenção; **IM:** íon molecular; **PI:** produto iônico; **(%)molar:** porcentagem molar; **DP:** desvio padrão; sh: *shoulder* – ombro.

**Figura 1.16** - Porcentagem dos flavonóis nas cascas de uva 'Isabel'



Q: quercetina; I: isoramnetina; M: miricetina; L: laricitrina; S: siringetina; K: canferol; 3-glc: 3-glicosídeo; 3-glcU: 3-glicuronídeos; gal: galactose; rut: rutinosídeo

## 1.4 CONCLUSÃO

Este estudo possibilitou traçar o perfil dos compostos fenólicos das cascas e semente de uvas do cultivar Isabel, a mais produzida, utilizada na elaboração de sucos e vinhos de mesa no Brasil. A identificação e quantificação feitas por HPLC-PDA-ESI-MS<sup>n</sup> mostraram que a antocianina presente em maior quantidade foi a malvidina 3-glicosídeo e a 3,5-diglicosídeo, características de cultivares *V. labruscas*, não encontrada em cultivares *V. viniferas*. Entre os flavan-3-ols, o destaque ocorreu para a quantidade dos monômeros (+)-catequina e (-)-epicatequina. Dentre os ácidos hidroxicinâmicos, o ácido caftárico foi encontrado majoritariamente. Nos flavonóis os derivados de quercetina foram predominantes, enquanto os de canferol foram encontrados em menores quantidades.

## REFERÊNCIAS

ABDI, H.; WILLIAMS, L.J. "Principal component analysis". **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v.2, p. 433-459, 2010.

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

BARCIA, M. T.; PERTUZATTI, P. B.; GÓMEZ-ALONSO, S. GODOY, H. T. HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Phenolic composition of grape and winemaking by-products of Brazilian hybrid cultivars BRS Violeta and BRS Lorena. **Food Chemistry**, v.159, p. 95-105, Sep. 2014.

BNDS. **Banco Nacional do Desenvolvimento**. Disponível em: <[http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/bndes/bndes\\_pt/Institucional/Publicacoes/Consulta\\_Expressa/Setor/Bebidas/200403\\_5.html](http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/bndes/bndes_pt/Institucional/Publicacoes/Consulta_Expressa/Setor/Bebidas/200403_5.html)> **Acessado em: 16 de fevereiro de 2015.**

BOULTON, R. B. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 52, n. 2, p. 67-87, June 2001.

BURNS J.; GARDNER P. T.; MATTHEWS D.; DUTHIE G. G.; LEAN M.E.; CROZIER A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.49, p. 5797-808, 2001.

CABRITA, M. J.; RICARDO-DA-SILVA, J.; LAUREANO, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. **1º Seminário Internacional de Vitivinicultura**. 2004, Lisboa. **Anais**. Lisboa: INIFAP, p. 61-102, 2004.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; RITSCHER, P. S. Embrapa Uva e Vinho: **novas cultivares brasileiras de uva**. p. 64, 2010. Disponível em: <[http://www.cnpqv.embrapa.br/publica/livro/novas\\_cultivares\\_brasileiras\\_uva.pdf](http://www.cnpqv.embrapa.br/publica/livro/novas_cultivares_brasileiras_uva.pdf)>. Acesso em: 15 de novembro de 2014.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, London, v. 113, n. 4, p. 859-871, Apr. 2009.

CASTILLO-MUÑOZ, N.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCIA-ROMERO, E.; GÓMEZ, M. V.; VELDEERS, A. H.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Flavonol 3-O-Glycosides Series of *Vitis vinifera* Cv. Petit Verdot Red Wine Grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, 209–219, 2009a.

CASTILLO-MUÑOZ, N.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ M.; GOMEZ-ALONSO, S.; GARCIA-ROMERO, E.; HERMOSIN-GUTIERREZ, I. Red-color related phenolic composition of Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes and red wines. **Journal**

of **Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 17, p. 7883-7891, Sept. 2009b.

CASTILLO-MUNÓZ, N.; GOMEZ-ALONSO, S.; GARCIA-ROMERO, E.; HERMOSIN-GUTIERREZ, I. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.992–1002, 2007.

CHEN, C.; CHOW, M.; HUANG, W.; LIN, Y.; CHANG, Y. Flavonoids Inhibit Tumor Necrosis Factor-Induced Up-Regulation of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) in Respiratory Epithelial Cells through Activator Protein-1 and Nuclear Factor-B: Structure-Activity Relationships. **Molecular Pharmacology**. 66, p.683–693, 2004.

de PASCUAL-TERESA, S., MORENO, D. A., GARCIA-VIGUERA, C. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. **Int. J. Mol. Sci.** 11, 1679–1703, 2010

De ROSSO, M.; TONIDANDEL, L.; LARCHER, R.; NICOLINI, G.; RUGGERI, V.; DALLA VEDOVA, A.; De MARCHI, F.; GARDIMAN, M.; FLAMINI, R. Study of anthocyanin profiles of twenty-one hybrid grape varieties by liquid chromatography and precursor-ion mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta** v. 732, p 120–129, 2012.

De ROSSO, M.; TONIDANDEL, L.; LARCHER, R.; NICOLINI, G.; DALLA VEDOVA, A.; De MARCHI, F.; GIUST, M.; FLAMINI, R. Identification of new flavonols in hybrid grapes by combined liquid chromatography–mass spectrometry approaches. **Food Chemistry** v.163, p.244–251, 2014

DOWNHAM, A.; COLLINS, P.; Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science & Technology**. v.35, n.1, p.5-22, 2000.

DUARTE – ALMEIDA J. M.; SANTOS R. J.; GENOVESE M. I.; LAJOLO F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, abr.-jun. 2006.

**EMBRAPA**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistemas de condução da videira. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura/latada.html>>. Acesso em: 3 de nov. 2014.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.408, p.239-247, 2000

FAVRETTO, D., and FLAMINI, R. Application of electrospray ionization mass spectrometry to the study of grape anthocyanins. **American Journal of Enology and Viticulture**. 51:55-64, 2000.

GIL, M.; ESTERUELAS, M.; GONZÁLEZ, E.; KONTOUDAKIS, N.; JIMÉNEZ, J.; FORT, F.; CANALS, J. M.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; ZAMORA, F. Effect of Two Different Treatments for Reducing Grape Yield in *Vitis vinifera* cv Syrah on Wine Composition and Quality: Berry Thinning versus Cluster Thinning. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, n.20, p.4968–4978, 2013.

GIOVANNINI, E. Produção de Uvas para vinho, suco e mesa. **Editora Renascença**, Porto Alegre, 2ª Ed. 368 p. 2005.

GÓMEZ-ALONSO, S., GARCÍA-ROMERO, E., & HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. **Journal of Food Composition and Analysis**, 20, 618–626, 2007.

GONZÁLEZ – PARAMÁS A. M.; ESTEBAN – RUANO S.; SANTOS – BUELGA C.; PASCUAL – TERESA S.; RIVAS – GONZALO J. C. Flavanol Content and Antioxidant Activity in Winery Byproducts. **J of Agric. and Food Chem**, v. 52, p. 234-238, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; Free Radicals in Biology and Medicine. 4ª ed.; Oxford University Press: Oxford, **2007**.

HARBORNE, J.B.; GRAYER, R.J., The anthocyanins. **The flavonoids: advances in research since 1980**. Chapman & Hall, London, p. 1-20, 1988

JACKSON, R. S. **Wine Science: Principles and applications**. San Diego: Academic Press, p. 475.1994.

JORDÃO, A. M.; Estrutura e Composição das Proantocianidinas da Uva. Evolução ao Longo da Maturação. **Instituto Politécnico de Viseu**. Relatório 19, 2000

KARADENIZ, F.; DURST R. W.; WROLSTAD R. E. Polyphenolic Composition of Raisins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p.5343-5350, 2000.

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

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; GARCÍA-PARILLA, M.C.; TRONCOSO, A. M.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. **Ciência Tecnologia e Alimentos**. v.24, n. 4, p.691-693, 2004.

LAGO-VANZELA, E. S.; REBELLO, L. P. G.; RAMOS, A. M.; STRINGHETA, P. C.; DA-SILVA, R.; GARCÍA-ROMERO, E.; GÓMEZ-ALONSO, S.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Chromatic characteristics and color-related phenolic composition of Brazilian young red wines made from the hybrid grape cultivar BRS Violeta ('BRS Rúbea' 'IAC 1398-21'). **Food Research International**, v.54, p.33–43. 2013.

LAGO-VANZELA, E.S.; DA-SILVA, R.; GOMES, E.; GARCÍA-ROMERO, E.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Phenolic Composition of the Brazilian Seedless Table Grape Varieties BRS Clara and BRS Morena. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.15, p. 8314–8323, 2011a.

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

MACHEIX, J. J.; SAPIS, J. C.; FLEURIET, A. Phenolic compounds and polyphenol oxidase in relation to browning in grapes and wines. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 30, n. 1, p. 441-486, 1991.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.

MARQUEZ, A.; SERRATOSA, M. P.; MERIDA, J. Pyranoanthocyanin Derived Pigments in Wine: Structure and Formation during Winemaking. **Journal of Chemistry**. v. 2013 (2013), Article ID 713028, 15 pages  
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/713028>

MARTÍN, J. P.; ARRANZ, C.; YUSTE, J.; CASTRO, I. D.; PINTO-CARNIDE, O.; RUBIO, J. A.; ORTIZ, J. M. Prospection and identification of grapevine varieties cultivated in north Portugal and northwest Spain. **Vitis: Journal of Grapevine Research**, v. 50. p. 29-33. 2011.

MARTÍNEZ-FLÓREZ S.; GONZÁLEZ-GALLEGO J.; CULEBRAS J. M.; TUÑÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**. v.17, n.6, p.271-278, 2002.

MELLO, L. M. R. de. Vitivinicultura brasileira: panorama 2012. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2013. 5 p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico 137). Disponível em <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/>>. Acesso em: 05 nov. 2014.

MENA P.; DOMÍNGUEZ-PERLES, R.; GIRONÉS-VILAPLANA A.; BAENAS, N.; GARCÍA-VIGUERA, C.; VILLAÑO, D.; Flavan-3-ols, anthocyanins, and inflammation. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 66, p. 745–758, November 2014.

**MAPA**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Governo Brasileiro. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/uva> > Acesso em: 16 de fevereiro de 2015.

NARAYAN, M.S.; NAIDU, K. A.; RAVISHANKAR, G.A. ; SRINIVAS L. ; VENKATARAMAN L. V. Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 60, n.1, p. 1-4, 1999

NIJVELDT R. J.; VAN NOOD E.; VAN HOORN D. E.; BOELENS P. G.; VAN NORREN K.; VAN LEEUWEN P.A.; Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.74, n.4. p.18-25, **2001**

NIXDORF, S. L.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: phenolic composition and antioxidant capacity. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 659, n. 1/2, p. 208-215, Feb. 2010.

**OIV**. OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN, Détermination par CLHP de Neuf Anthocyanes Principales dans le Vin Rouge et Rosé, Resolution OENO 22, 2003.

**OIV**. 2ª Edición de la Lista de Descriptores OIV para Variedades de vid y especies de Vitis. Eds. O.I.V., Paris, 2009.

OLIVEIRA, E. F. AVALIAÇÃO DE RESVERATROL, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ACIDEZ EM VINHO DA REGIÃO SUL DO BRASIL. Dissertação de mestrado. Programa de Mestrado em Química UEL. 99p. 2011.

PENNA, N.G.; DAUDT, C.E.; HENRIQUES, J.A.P.; Comportamento de ésteres hidroxicinâmicos durante a vinificação de vinhos brancos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.7, p.983-989, jul. 2001.

PETTA, T. Técnicas modernas em espectrometria de massas aplicadas no isolamento de bioherbicidas produzidos por microrganismos. **Dissertação de mestrado**. Universidade de São Paulo- Ribeirão Preto, 2008.

PRICE, S. F.; BREEN, P. J.; VALLADAO, M. WATSON, B. T. Cluster sun exposure and quercetin in Pinot Noir grapes and wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 46, n. 2, p. 187-194, June 1995.

POLYPHENOLS. Disponível em:<http://www.polyphenols.com/malvidin-products/malvidin-chloride-article156-184.html>. Acessado em 20 de abril de 2015.

RAHMAN, I.; BISWAS, S.; KODE, A.; Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal of Pharmacology**. v.533, p.222-239, 2006

REBELLO, L. P. G.; LAGO-VANZELA, E. S.; BARCIA, M. T.; RAMOS, A. M.; STRINGHETA, P. C.; DA-SILVA, R.; CASTILLO-MUÑOZ, N.; GÓMEZ-ALONSO, S. HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Phenolic composition of the berry parts of hybrid grape cultivar BRS Violeta (BRS Rubea × IAC 1398-21) using HPLC–DAD–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 54, p. 354-366, Nov. 2013

RENTZSCH, M. SCHWARZ, M. WINTERHALTER, P. HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Formation of hydroxyphenyl-pyranoanthocyanins in Grenache wines: precursor levels and evolution during aging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.4883–4888, 2007.

RODRÍGUEZ-MONTEALEGRE, R.; ROMERO-PECES, R.; CHACÓN-VOZMEDIANO, J. L.; MARTÍNEZ-GASCUEÑA, J.; GARCÍA-ROMERO, E. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.19, p.687–693. 2006.

RYAN, J. M.; REVILLA, E. Anthocyanin composition of cabernet sauvignon and tempranillo grapes at different stages of ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.3372–3378, 2003.

SÁNCHEZ-MORENO, C., CAO, G., OU, B., & PRIOR, R.; Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected white and red wines. Oxygen radical absorbance capacity comparison with nontraditional wines obtained from high bush blueberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 48889-4896, 2003.

SANTOS-BUELGA, C.; FRANCIA-ARICHA, E. M.; ESCRIBANO-BAILÓN, M. T. Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. **Food Chemistry**, v.53, p.197–201, 1995.

SINGLETON V. L. Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines and model systems. Observations and practical implications. **American Journal of Enology and Viticulture**., 38, 69-77. 1987.

SCHWARZ, M.; PICAZO-BACETE, J. J.; WINTERHALTER, P.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Effect of copigments and grape cultivar on the color of red wines fermented after the addition of copigments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 21, p. 8372-8381, Sept. 2005.

TERCI, D. B. L.; ROSSI, A. V. Indicadores aturais de ph: usar papel ou solução?. **Química Nova**, vol.25 no.4, p.684-688, 2002.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

VENDEMIALE, G.; GRATAGLIANO, I.; ALTOMARE, E. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis Research**. v.29, p.49-55, 1999.

VRHOVSEK, U. Extraction of hydroxycinnamoyltartaric acids from berries of different grape varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 10, p. 4203-4208, 1998.

WANG, H.; RACE, E. J.; SHRIKHANDE, A. J. Characterization of anthocyanins in grape juices by ion trap liquid chromatograph-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.7, p.1839-1844, Março. 2003.

WESTPHALEN, S. L.; MALUF, J. R. T. Caracterização das áreas bioclimáticas para o cultivo de *Vitis vinifera* L.: regiões da serra do nordeste e planalto do Estado do Rio Grande do Sul. **Embrapa Uva e Vinho**, Bento Gonçalves, 99 p. 2000.

ZOECKLEIN, B.W.; FUGELSANG, K.C.; GUMP, B.H.; NURY, F.S. Wine analysis and production. In vino verities: oligomer procyanidins and the ageing of red wines. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2577-2582, 1995.

## CAPÍTULO 2

### **INFLUÊNCIA SOBRE A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E A INTENSIDADE CROMÁTICA DO SUCO DE UVA 'ISABEL' APÓS TRATAMENTOS EXÓGENOS COM ÁCIDO ABCSÍCIO**

#### **RESUMO**

O suco de uva vem apresentando crescimento exponencial de consumo, motivado pelo interesse dos consumidores em produtos saudáveis, principalmente ricos em compostos bioativos. No Brasil o cultivar de uva Isabel (*Vitis labrusca*) é o mais produzido, por apresentar tolerância às principais doenças fúngicas, com boa capacidade de adaptação e alta produtividade, representando, por conseguinte, o cultivar mais amplamente utilizado na elaboração de sucos. Entretanto, devido à tonalidade violeta clara e heterogênea de suas bagas, considerando a maturação irregular, a aparência de seu suco é diretamente afetada, tendo a aceitação pelo mercado consequente comprometida. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a influência sobre a capacidade antioxidante e a intensidade cromática do

suco integral, elaborado á partir das bagas de uva 'Isabel', submetidas á diferentes aplicações do ácido abscísico (S-ABA). Os tratamentos diferenciaram-se pela aplicação do S-ABA em distintos estádios de maturação – antes, no início e depois do *véraison*, testando-se ainda distintos intervalos, com uma 2ª aplicação feita aos 10 e 15 dias antes da colheita, durante 4 safras consecutivas, em 2 safras regulares e 2 fora de época. A capacidade antioxidante e a intensidade cromática dos sucos foram comparadas pelo teste de Duncan em nível de 5% de significância. A partir das variáveis colorimétricas, verificou-se que a capacidade antioxidante do suco integral não foi afetada pelas aplicações do S-ABA, independente do tratamento. Já, a intensidade cromática, sofreu aumento com aplicação do regulador S-ABA, podendo ser agrupada de acordo com os tratamentos aplicados, pela análise de componentes principais. O maior valor, em termos de intensidade cromática, foi observado para a aplicação do S-ABA em duas etapas - a 1ª aos 7 dias antes do *véraison* e a 2ª aos 10 dias antes da colheita, produzindo a cor amarela (420 nm) e a violeta (620 nm), concordando com o círculo de correlação. Desta forma, a aplicação do S-ABA mostrou ser uma alternativa tecnológica viável e interessante para agregar qualidade ao suco de 'Isabel' pelo aumento de cor, sem, contudo, promover a perda da capacidade antioxidante.

**Palavras-Chave:** intensidade cromática, S-ABA, capacidade antioxidante, fenolicos.

## **INFLUENCE ON 'ISABEL' GRAPE JUICE ANTIOXIDANT CAPACITY AND CHROMATIC INTENSITY AFTER ABSCISIC ACID EXOGENOUS TREATMENTS**

### **ABSTRACT**

Grape juice has shown exponential growth in consumption, motivated by consumers' interest in healthy products, particularly rich in bioactive compounds. In Brazil the cultivar Isabel grape (*Vitis labrusca*) is the most produced, by presenting tolerance to main fungal diseases, with good adaptability and high yield, representing consequently the widely variety for juice elaboration. However, due to 'Isabel' berries light color with violet hue and heterogeneity, by its irregular maturation, this feature tends to directly impair juice appearance, compromising consequently its market acceptance. Therefore, this study aimed to evaluate the influence on antioxidant capacity and color intensity of the whole grape juice, made from 'Isabel' berries, submitted to different applications of abscisic acid (S-ABA). Treatments differed by application of S-ABA at different maturation stages – before, in the beginning and after *véraison*, also testing at different intervals, with the 2<sup>nd</sup> application made after 10 and 15 days before harvest, during 4 consecutive harvests - in two regular and two out of seasons. Juices antioxidant capacity and color intensity were treated statistically by Duncan test at 5% significance level. From whole juice colorimetric variables, was concluded that the antioxidant activity was not affected by S-ABA

applications, regardless of treatment. However, the chromatic intensity increased with S-ABA regulator application, allowing to be grouped according to the treatment, by principal component analysis. The best result in terms of color intensity was observed by two stages S-ABA application - the 1<sup>st</sup> in 7 days prior to *véraison* and the 2<sup>nd</sup> in 10 days before harvest, agreeing with correlation circle between yellow (420 nm) and violet (620 nm). Thus, S-ABA application shown to be a viable and interesting technology alternative to aggregate quality to 'Isabel' juices concerning the color increase, without, however, losing of antioxidant capacity.

**Keywords:** color intensity, S -ABA, antioxidant capacity, phenolic

## 2.1 INTRODUÇÃO

### 2.1.1 SUCO DE UVA

No Brasil, a produção de suco de uva vem aumentando, principalmente após o crescimento do interesse do consumidor, em adquirir produtos mais saudáveis, buscando a qualidade de vida e prevenção á doenças (IBRAVIN, 2013; IBRAVIN, 2011; GURAK et al., 2010; RIZZON, MENEGUZZO, 2007). O Brasil é o 9º país no mundo que mais consome sucos em geral, com aproximadamente 4 litros *per capita* (IBRAVIN, 2013). O suco de uva representa cerca de 20% de todo este consumo, apresentando um aumento de 0,56 para 0,8 L *per capita* entre os anos de 2006 e 2011 (CONAB, 2011), e um aumento de 42,94% entre os anos de 2012 e 2013 (IBRAVIN, 2013). Utilizando como base a produção de sucos e vinhos no Rio Grande do Sul, houve um aumento de aproximadamente 68% na produção nacional, considerando-se o suco de uva integral (MELLO, 2013).

O suco de uva é uma bebida não fermentada, obtido da uva madura e sã, que através do processamento tecnológico adequado, apresenta-se conservado até o momento do consumo (BRASIL, 2009). O processamento da uva é conhecido desde a Grécia antiga. No processo, as uvas são colocadas em um recipiente, e o suco é delicadamente extraído por meio de tratamento térmico e por maceração, entretanto sem que a baga seja totalmente esmagada, para não conferir gosto amargo. A partir daí, o suco de uva pode ser pasteurizado e engarrafado, como suco de uva integral (IBRAVIN; SEBRAE, 2015).

Segundo Marzarotto (2010) o suco pode ser classificado em: integral, concentrado, desidratado, reconstituído e adoçado. Entretanto, as denominações nos rótulos para os diferentes tipos de sucos comercializados no mercado brasileiro, frequentemente induzem ao consumidor a inferências errôneas, quanto a sua qualidade. O suco de uva integral é composto de 100% da fruta, sem qualquer adição (BRASIL, 2009). Já o suco concentrado é o produto parcialmente desidratado, enquanto, o reconstituído é o suco que foi concentrado, a fim de poder guardá-lo ou transportá-lo, tendo posteriormente a mesma quantidade de água reencorporada (IBRAVIN; SEBRAE, 2015), podendo ainda conter um máximo de 10% de adição de açúcar, quando denominado de adoçado (BRASIL, 2009). Por sua vez, o denominado néctar, é a bebida elaborada com no mínimo 50% de suco,

segundo a IN nº 24/2012 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2012), preparada pela adição de água, açúcar e aditivos como: acidulante, antioxidante, corante, aromatizante, espessante, estabilizante e conservante. O Refresco ou Bebida de uva é similar ao néctar, porém a diferença é que contém somente 30% de suco. Já o Refresco Misto contém apenas 10% de suco de fruta (IBRAVIN; SEBRAE, 2015).

O valor nutricional do suco é bem amplo, já que apresenta entre seus constituintes: açúcares, minerais, ácidos e vitaminas, destacando-se, porém, a presença de compostos bioativos, como os compostos fenólicos que são responsáveis pela: cor, sabor, atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena (RIZZON, MENEGUZZO, 2007; REBELLO et al., 2013), e inibição da peroxidação lipídica (TOALDO et al., 2015).

A ausência de álcool é uma das principais vantagens do consumo de suco de uva quando comparado com o vinho, já que pode ser consumido até mesmo por crianças (ROMERO-PEREZ et al., 1999). No Brasil, para que uma bebida seja considerada não alcoólica, ela deve ter até 0,5% de álcool em volume (IBRAVIN e SEBRAE, 2015).

Qualquer cultivar de uva pode ser utilizado para a elaboração do suco, desde que esteja no estágio de maturação adequado. Os parâmetros mais valorizados nos cultivares destinados à produção de suco são: doçura, aroma, sabor e coloração. Sendo também possível a produção de suco de uva utilizando cortes (*blends*) de cultivares (RIZZON, MENEGUZZO, 2007; MAIA et al., 2013). O suco de uva denominado de tinto é elaborado a partir de uvas tintas como: Bordô, Concord, entre outras tintureiras; já o Rosé, é elaborado com uvas tintas de coloração mais claras, como a 'Isabel', ou uvas rosadas, como a 'Niágara Rosada' (IBRAVIN; SEBRAE, 2015).

### **2.1.2 ÁCIDO ABCÍSIKO (S-ABA)**

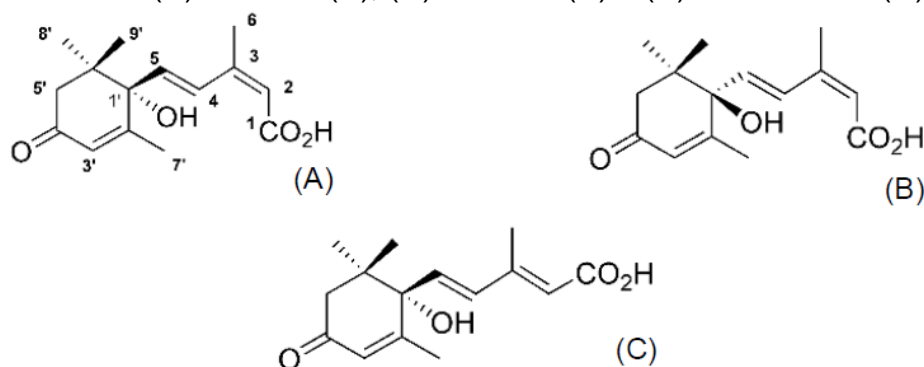
Os níveis dos compostos fenólicos presentes em frutas e vegetais são regulados por reguladores de crescimento e diversos fatores, dentre eles: genético,

fisiológico, químicos e ambientais como: temperatura, luz, precipitação e solo (HIRATSUKA et al., 2001; SANDHU et al., 2011). Os reguladores de crescimento induzem, inibem ou modificam processos fisiológicos e morfológicos dos vegetais. Sua origem pode ser orgânica ou sintética. Exemplos de reguladores de crescimento são: auxinas, citocininas, ácido abscísico, etileno, ácido jasmônico, entre outros (CASTRO, 2006).

O ácido abscísico (ABA) (Figura 2.1) possui em sua composição 15 carbonos, com isômeros geométricos *cis* e *trans*, além de também apresentar enantiômeros S e R, devido à presença de um carbono assimétrico. Devido ao avanço tecnológico, atualmente já é possível a aquisição do S-ABA a um preço acessível, visto que há alguns anos a sua utilização não era viável, devido aos altos custos de produção. O processo de produção atual é por processo biológico (CANTÍN, FIDELIBUS, CRISOTO, 2007; REDAGRICOLA, 2011; PEPPI, FIDELIBUS, DOKOOZLIN, 2006, 2007a). Atualmente, o produto disponível comercialmente é o S-ABA de origem sintética, composto por uma mistura dos enantiômeros (TAIZ, ZEIGER, 2009; VALENT BIOSCIENCES CORPORATION, 2010; ZAHARIA et al., 2005).

Os primeiros estudos visando à aplicação de S-ABA em uvas de cultivares *Vitis labruscas* já demonstraram um aumento na concentração das antocianinas nas cascas de cultivares como Kyoho e Olimpia (HAN, LEE, KIM, 1996; KATAOKA, SUGIURA, UTSUNOMIYA, 1982; LEE, TOMANA, 1980; MATSUSHIMA et al., 1989).

**Figura 2.1** - Estruturas (S)-*cis*-ABA (A), (R)-*cis*-ABA (B) e (S)-2-*trans*-ABA (C)

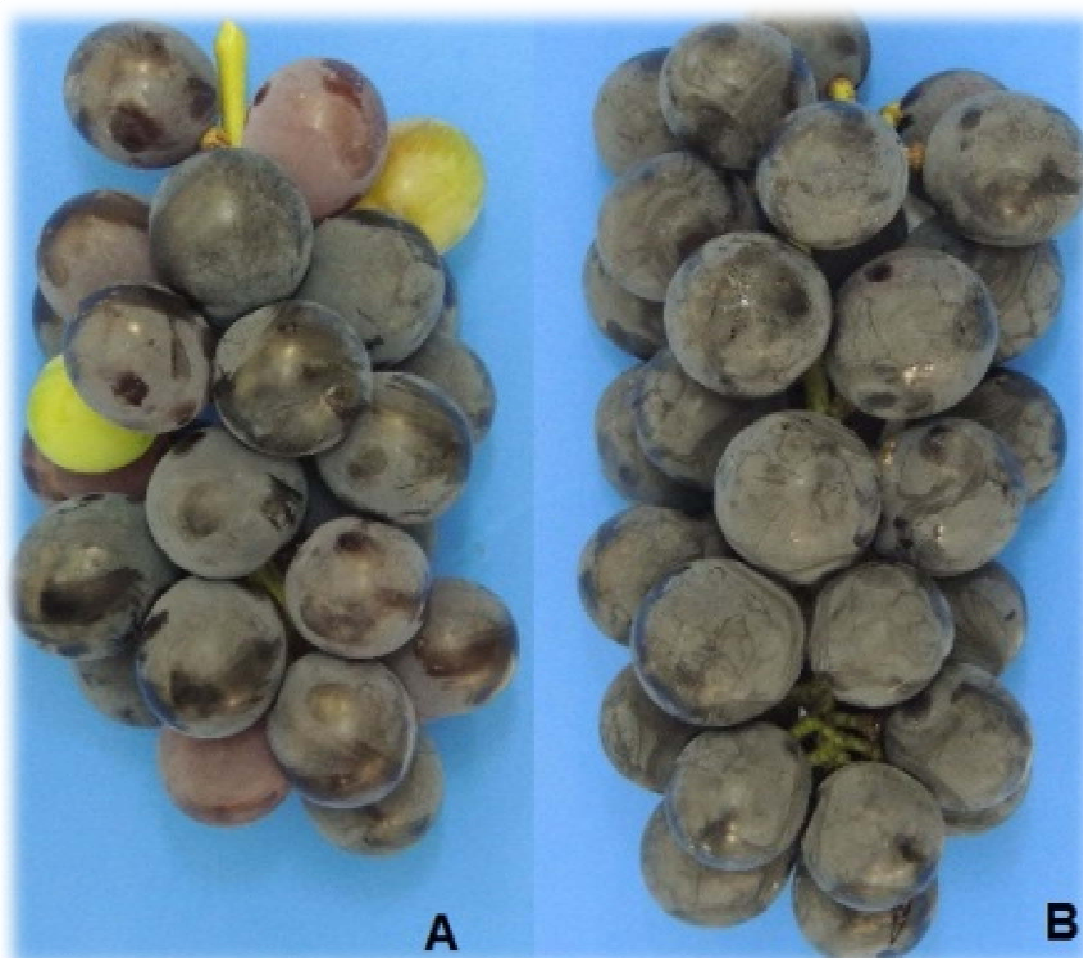


Fonte: Yamamoto (2014)

Estudos indicam que o S-ABA está envolvido na biossíntese de antocianinas. Há pesquisadores inclusive, que sugerem que ele pode ser o único responsável pela produção de antocianinas (BAN et al., 2003; GAGNÉ, 2011; HIRATSUKA et al., 2001; KOYAMA, SADAMATSU, GOTO-YAMAMOTO, 2010; NICOLAS et al., 2014; OWEN et al., 2009), ocorrendo somente posteriormente o acúmulo de açúcar, potássio, aminoácidos, e compostos fenólicos (DAVIES, BOSS, ROBINSON, 1997; JACKSON, 2008; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Portanto, a aplicação exógena de reguladores de crescimento, como o S-ABA pode vir a modificar a produção e o acúmulo de antocianinas (HE et al., 2010; SANDHU et al., 2011), já que esse influencia diretamente na maturação dos frutos. Entretanto, alguns fatores como o estresse hídrico podem prejudicar seus níveis e promover uma maturação irregular (TAIZ, ZEIGER, 2009).

A intensificação na cor das uvas, através da aplicação de S-ABA, vem sendo reportada por alguns autores, atestando que houve um aumento de antocianinas totais no produto (KOYAMA et al., 2014; ROBERTO et al., 2012, 2013; FERRARA et al., 2013; BALINT, REYNOLDS, 2013). Este aumento influencia diretamente no valor do produto final, como o suco ou vinho, já que o consumidor associa uma coloração mais forte, com um produto de maior qualidade. Portanto, as buscas por técnicas que aprimoram a aparência dos produtos são de grande importância para a indústria de alimentos (ARAÚJO, 2011; COULTATE, 2004). Este aumento na intensidade da coloração pode ser observado na Figura 2.2.

**Figura 2.2** - Uvas do cultivar Isabel sem aplicação do S-ABA (A) e com aplicação do S-ABA (B)



**Fonte:** Yamamoto (2014)

Desta maneira, diversos estudos procuram determinar qual a melhor época de aplicação do regulador, sendo difícil a determinação desta etapa, já que esta pode variar com respeito à maturação. Durante a maturação da uva, diversos compostos são metabolizados, como as antocianinas, ácidos orgânicos, aromáticos, entre outros, sendo que o nível destas substâncias pode variar entre os distintos cultivares de uva (ROBINSON, DAVIES, 2000). Segundo Sato et al. (2008) durante as fases de desenvolvimento das bagas há uma grande variação nas concentrações de S-ABA. Antes do *véraison*, estipulado quando metade das bagas apresentam cor tinta e iniciam o amolecimento, ocorre um declínio na concentração de S-ABA, atingindo assim o seu nível mais baixo. Durante o *véraison*, porém, seus níveis aumentam novamente até o fim da maturação, momento este, em que os níveis

voltam a cair. Desta forma, a época de aplicação do S-ABA com o objetivo de aumentar a cor nas bagas, deve ser bem definida. Assim, a aplicação do S-ABA é realizada utilizando-se como referência o início da maturação (*véraison*). Em uvas 'Flame Seedless' e 'Crimson Seedless' a aplicação ideal é durante e pós *véraison* (PEPPI, FIDELIBUS, DOKOOZLIN, 2006; FIDELIBUS, DOKOOZLIAN, 2007b) enquanto para 'Cabernet Sauvignon' a aplicação se mostrou mais efetiva antes do *véraison* (GIRIBALDI, HARTUNG, SCHUBERT, 2011).

Portanto, neste trabalho os períodos de aplicação do S-ABA foram avaliados em espaços de tempo mais amplos (antes, durante e após o *véraison*), e também em safras distintas para o cultivar Isabel, considerando-se ainda a aplicação em 2 etapas – a 1ª em função do *véraison* e a 2ª em relação a colheita.

### 2.1.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Compostos fenólicos fazem parte da composição de vinhos e sucos, podendo desta forma atuar como antioxidantes. Estes compostos apresentam capacidade de estabilizar radicais livres em sistema aquoso como: peroxila, hidroxila, azida e ânion superóxido (BORS, 1990). Desde 1995, Frankel Waterhouse, Teissedre, investigam a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), em presença dos compostos fenólicos encontrados nos vinhos. Observa-se que a oxidação é inibida, sendo relacionada à capacidade antioxidante com a concentração de ácido gálico, ácido caftárico, catequina, epicatequina, miricetina e quercetina, entre outros (TERRIER, PONCET-LEGRAND, CHEYNIER, 2009; TOALDO et al., 2015).

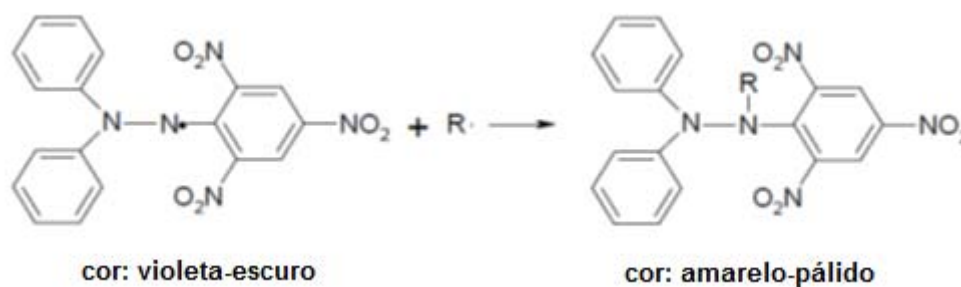
Diferentes técnicas são utilizadas para a determinação da atividade antioxidante *in vitro*, auxiliando assim na identificação de possíveis substâncias ou misturas com potencial na prevenção de doenças. O método mais aplicado na medida da capacidade antioxidante para uvas e derivados é o DPPH• - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila, no qual a quantificação é baseada no sequestro de radicais livres (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Os radicais livres são moléculas que contêm pelo menos um elétron não pareado, o que os tornam muito instáveis, uma vez que são altamente reativos, pois se estabilizam removendo um elétron de moléculas próximas e formando assim um

par eletrônico. Esses podem ser produzidos pelo metabolismo celular ou serem oriundo de outras fontes externas. Os compostos antioxidantes evitam e reparam diversos tipos de lesões causadas pelos radicais livres, que podem variar desde a oxidação de proteínas, lipídios, até mesmo de moléculas de DNA. A presença de apenas um radical, já é capaz de desencadear uma série de reações (PEGAS, 2006; BIANCHI, 1999).

Uma das metodologias para determinação da capacidade antioxidante foi proposta por Brand-Williams et al. em 1995, e consiste na análise espectrofotométrica de uma solução contendo radicais livres estáveis (DPPH) de coloração violeta (Figura 2.3) baseado no descoramento quando da adição com substâncias antioxidantes. Os níveis de capacidade de sequestro de radicais livres nas amostras de suco de uva 'Isabel' foram calculados a partir de curva analítica, com concentrações definidas do padrão Trolox (0,047; 0,093; 0,187; 0,374; 0,560; 0,748 e 0,935 mmol L<sup>-1</sup>) e suas respectivas absorbâncias em 515 nm.

**Figura 2.3** - Estabilização do radical livre DPPH•



Fonte: Rufino, Alves (2007)

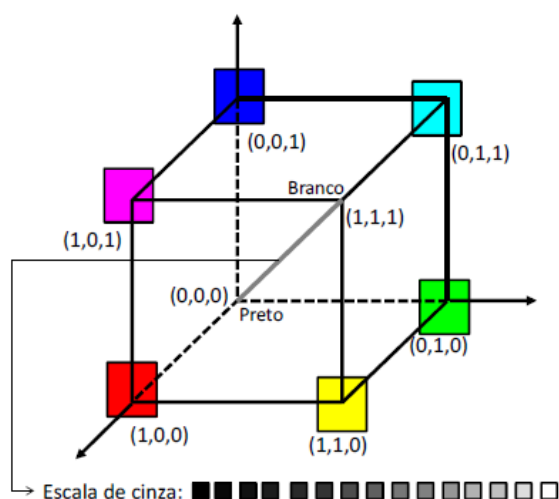
#### 2.1.4 INTENSIDADE CROMÁTICA

Três informações são utilizadas de uma imagem em forma de matrizes das cores absorvidas: são as cores vermelha (620 nm), verde (520 nm) e azul (420 nm), daí o nome RGB (*Red, Green e Blue*) (NÓBREGA, 2008; GODINHO et al., 2008).

Um sistema de coordenadas cartesianas é o que baseia o modelo de cores

RGB. Neste sistema o subespaço de interesse é um cubo, na qual as cores vermelha, verde e azul estão em três vértices, e de forma alternada as cores ciano, magenta e amarela estão nos três vértices restantes, como observado na Figura 2.4 . A cor preta se encontra na origem  $(0, 0, 0)$  e do lado oposto a cor branca  $(255, 255, 255)$  onde todas as bandas alcançam seu valor máximo. Uma escala de cinza também pode ser utilizada, que nada mais é do que quando os valores de RGB se igualam. Valores de 0 e 1 são normalizados para cada cor e as cores definidas pelos vetores que partem da origem (SOUZA et al., 2004) .

**Figura 2.4** - Cubo de cores RGB e representação da escala de cinza



**Fonte:** Oliveira (2012)

Uma cor pode ser diferenciada da outra através de características como luminosidade, matiz e saturação:

- Matiz*: Relaciona-se com a cor como percebida, ou seja a cor pura.
- Saturação*: Relaciona-se com o quanto de luz branca está inserido na matiz, ou seja a relação de pureza da matiz.
- Luminosidade*: Corresponde à intensidade da cor, sendo um dos fatores importantes na descrição da sensação das cores, sendo praticamente impossível de ser medido.

Cromaticidade pode ser definida como a soma da matiz e saturação, sendo

então uma cor caracterizada pelo seu brilho e cromaticidade (GONZALES, WOODS, 1992).

A coloração das uvas tintas, assim como de seus produtos, depende da sua exposição ao sol e condições meteorológicas, já que a síntese dos polifenóis está diretamente ligada a estas condições. De acordo com Peynaud (1996), Tonietto e Mandelli (2003) são em anos de verões quentes e com maiores diferenças de temperaturas entre o dia e noite, que se produzem vinhos com altos níveis de taninos. Podendo assim, a medida de intensidade cromática diferenciar a concentração de compostos polifenólicos em sucos de uva integral.

Os produtos com aparência mais atrativa são muito importantes para a indústria alimentícia, já que a cor é o primeiro fator impactante na aceitabilidade do produto, sendo utilizado também como indicador de qualidade (ARAÚJO, 2011; COULTATE, 2004).

## **2.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.2.1 AMOSTRAGEM E TRATAMENTOS**

As uvas utilizadas na elaboração do suco de uva 'Isabel' (*Vitis labrusca*) estudado foram originárias da Vinícola Intervin®, localizada em Maringá, PR (23°25'S, 51°57'W, altitude de 542 m). O nível de precipitação médio anual é de 1.596 mm, com maior concentração de chuvas nos meses de verão. As uvas foram colhidas em safras regulares com a colheita tendo sido feita em dezembro do respectivo ano, enquanto, para as safras fora de época a colheita foi realizada no mês de maio de cada ano.

Os efeitos da aplicação do ácido abscísico (S-ABA) foram avaliados nas produções de diferentes épocas, durante quatro safras consecutivas: safra regular de 2011, safra regular e fora de época de 2012 e safra fora de época de 2013. O S-ABA foi fornecido pela empresa Valent BioSciences Corporation® (Libertyville, Estados Unidos), com concentração do isômero (S)-*cis*-ácido abscísico em 100 g L<sup>-1</sup>. A concentração de S-ABA utilizada na aplicação exógena foi de 400 mg L<sup>-1</sup> (KOYAMA et al., 2014a).

Foram testados os seguintes tratamentos:

*Safra regular de 2011 e safra fora de época de 2012:*

- Testemunha (sem aplicação de S-ABA)
- S-ABA aplicado aos 7 dias antes do *véraison* (DAV) + S-ABA aplicado uma 2ª vez aos 15 dias antes da colheita (DAC);
- S-ABA aplicado no início do *véraison* (IV) + S-ABA aos 15 DAC;
- S-ABA aplicado aos 7 dias depois do *véraison* (DDV) + S-ABA aos 15 DAC.

*Safra regular de 2012 e safra fora de época de 2013:*

- Testemunha (sem aplicação de S-ABA)
- S-ABA aos 7 dias antes do *véraison* (DAV);
- S-ABA no início do *véraison* (IV);
- S-ABA aos 7 dias depois do *véraison* (DDV);
- S-ABA aos 7 DAV + S-ABA aos 10 dias antes da colheita (DAC);
- S-ABA no IV + S-ABA aos 10 DAC;
- S-ABA aos 7 DDV + S-ABA aos 10 DAC.

O *véraison* do cultivar Isabel foi estipulado quando metade das bagas apresentaram cor tinta e iniciaram o amolecimento (SATO et al., 2008). Estes tratamentos exógenos foram realizados pela doutoranda Lilian Yukari Yamamoto do Curso de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina. As análises químicas de caracterização fenólica foram efetuadas em parceria nos Laboratórios de Desenvolvimento de Instrumentação e Automação Analítica (DIA) da UEL e da Universidad Castilla La-Mancha (UCLM) em Ciudad Real na Espanha, descritas na Tese de Doutorado (YAMAMOTO, 2014), sendo que as análises de capacidade antioxidante e intensidade cromática estão descritas neste trabalho.

### 2.2.2 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A determinação da capacidade antioxidante foi realizada pelo método DPPH. Utilizou-se um espectrofotômetro UVmini-1240 (Shimadzu, Quioto, Japão) pré-setado em comprimento de onda de 515 nm e cubetas de acrílico com caminho óptico de 100 mm (Plastibrand, Alemanha). As amostras de suco foram diluídas (1:10, v/v) com metanol (Fmaia, Brasil). À 100 µL de cada uma destas diluições foi adicionado 2,9 mL de dissolução metanólica do radical DPPH• ( $6,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) (Sigma, Saint Louis, EUA), para garantir que estivessem dentro da faixa linear de trabalho estabelecida de 0,047 a 0,935 mmol L<sup>-1</sup>. Após 25 minutos, a porcentagem de diminuição da absorbância a 515 nm foi medida e quantificada, sendo que o cálculo considerou como padrão a medida da atividade antioxidante equivalente de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2- ácido carboxílico) (Sigma, Saint Louis, EUA) utilizado para a quantificação a partir da curva de calibração analítica de 0,047; 0,093; 0,187; 0,374; 0,560; 0,748 e 0,935 mmol L<sup>-1</sup>.

### 2.2.3 INTENSIDADE CROMÁTICA

A intensidade cromática foi medida pelo método espectrofotométrico em que as amostras foram analisadas em espectrofotômetro UVmini-1240 (Shimadzu, Quioto, Japão), utilizando-se cubeta de 100 mm nos comprimentos de onda 420 nm (para medir a intensidade do amarelo), de 520 nm (para medir a intensidade do vermelho) e de 620 nm (para medir a intensidade do violeta). A cor dos sucos integrais, de cada tratamento, foi avaliada segundo Rizzon e Salvador (2010). A intensidade da cor do suco (IC) foi determinada pela soma das leituras das densidades ópticas de cada amostra a 420, 520 e 620 nm, e a tonalidade (T) foi obtida pela razão entre a absorbância a 420 nm e a 520 nm.

### 2.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias foram comparadas através do teste de Duncan ( $p < 0,05$ ). A partir das variáveis significativas recorreu-se á técnicas de análise multivariadas. O teste de correlação e a análise dos componentes principais foram realizados para melhor explorar os dados, utilizando-se o Statistica 8.0 (Statsoft).

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As bagas verdes foram as que apresentam resultados mais positivos na aplicação do S-ABA, quando comparadas as bagas mais maduras. Pelo fato dos níveis de S-ABA reportados na literatura para as cascas das uvas, mostrarem aumento no início da maturação e diminuição até a colheita (BERLI et al., 2011), isto sugere que os níveis de S-ABA são modulados pelo desenvolvimento da uva, atingindo seus maiores níveis no início do *véraison* (GIRIBALDI, HARTUNG, SCHUBERT, 2011). Segundo a literatura, a aplicação do S-ABA varia ainda, de acordo com o cultivar, podendo ser efetiva até mesmo após o início do *véraison*, como para as uvas ‘Redglobe’ e ‘Crimson Seedless’, que apresentaram melhores resultados com aplicações no início do *véraison* (PEPPI, FIDELIBUS, DOKOOZLIAN, 2007a e 2007b). Por isso, foi realizada à investigação de como se comportam as bagas da uva ‘Isabel’ em função da aplicação do S-ABA, regulador de crescimento em diferentes tratamentos. Inicialmente verificou-se a influencia da aplicação antes, no início e depois da maturação (*véraison*) considerando-se a diferença de 1 semana (7 dias) na safra regular e não regular, tendo a 2ª aplicação sido feita á 2 semanas (15 dias) da colheita. A média das determinações para a atividade antioxidante (AA), feitas em quintuplicata, estão reportadas na Tabela 2.1, para a safra regular de 2011 e a safra fora de época de 2012.

**Tabela 2.1-** Capacidade antioxidante do suco elaborado a partir das uvas ‘Isabel’ submetidas a aplicações exógena de ácido abscísico (S-ABA) em duas

etapas em diferentes estádios de maturação – antes, no início e depois do *véraison*

Safr regular 2011				Safr fora de época 2012			
S-ABA (mg L <sup>-1</sup> )	Tratamento	AA (mmol L <sup>-1</sup> )	CV (%)	S-ABA (mg L <sup>-1</sup> )	Tratamento	AA (mmol L <sup>-1</sup> )	CV (%)
0	Testemunha	2,86 <sup>a</sup>	9,5	0	Testemunha	2,64 <sup>a</sup>	23,3
400	7DAV(1 <sup>a</sup> ) + 15DAC(2 <sup>a</sup> )	2,86 <sup>a</sup>	16,5	400	7DAV(1 <sup>a</sup> ) + 15DAC(2 <sup>a</sup> )	2,58 <sup>a</sup>	7,7
400	IV(1 <sup>a</sup> ) + 15DAC(2 <sup>a</sup> )	2,79 <sup>a</sup>	17,5	400	IV(1 <sup>a</sup> ) + 15DAC(2 <sup>a</sup> )	2,61 <sup>a</sup>	6,4
400	7DDV(1 <sup>a</sup> ) + 15DAC(2 <sup>a</sup> )	3,54 <sup>a</sup>	34,8	400	7DDV(1 <sup>a</sup> ) + 15DAC(2 <sup>a</sup> )	2,64 <sup>a</sup>	15,4

AA: Atividade Antioxidante média de 5 determinações. Aplicação aos 7DAV: 7 dias antes do *véraison*; IV: Início do *véraison*; 7DDV: 7 dias depois do *véraison*; 15DAC: 15 dias antes da colheita. CV: Coeficiente de variação.

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan (p<0,05).

Nas primeiras safras avaliadas, foi realizada uma 2<sup>a</sup> aplicação, efetuando-se a mesma 15 dias antes da colheita (15DAC) em todos os tratamentos, o que pode ter uniformizado os resultados observados. Nenhum tratamento apresentou resultados de aumento do nível de sequestro de radicais livres, quando testado em nível de 5% de significância, sendo que, a maioria não apresentou aumento independente do tratamento.

Aplicações em uma e duas etapas de S-ABA nas uvas 'Isabel' foram testadas na safra regular de 2012 e safra fora de época de 2013, uma vez que, estudos com uvas de mesa como Benitaka e Rubi demonstraram que a aplicação de S-ABA em duas etapas, apresentou maiores incrementos nos níveis de compostos fenolicos, quando comparados aos níveis da aplicação em uma única etapa (ROBERTO et al. 2012 e 2013). Já para alguns cultivares, como a Redglobe, uma única aplicação de S-ABA se mostrou suficiente (PEPPI, FIDELIBUS, DOKOOZLIAN, 2007a). A média das determinações para a atividade antioxidante (AA), feitas em quintuplicata, estão reportadas na Tabela 2.2, para a safra regular de 2012 e a safra fora de época de 2013.

**Tabela 2.2** - Capacidade antioxidante de sucos elaborados a partir das bagas de uva 'Isabel' submetida a 1 ou 2 aplicações exógenas de S-ABA

Safr regular 2012				Safr fora de época 2013			
S-ABA (mg L <sup>-1</sup> )	Tratamento	AA (mmol L <sup>-1</sup> )	CV (%)	S-ABA (mg L <sup>-1</sup> )	Tratamento	AA (mmol L <sup>-1</sup> )	CV (%)
0	Testemunha	3,38 <sup>a</sup>	18,9	0	Testemunha	3,04 <sup>a</sup>	13,5
400	7DAV(única)	3,25 <sup>a</sup>	20,1	400	7DAV(única)	3,02 <sup>a</sup>	15,8
400	IV(única)	3,66 <sup>a</sup>	9,0	400	IV(única)	2,91 <sup>a</sup>	31,5
400	7DDV(única)	4,81 <sup>a</sup>	45,5	400	7DDV(única)	2,53 <sup>a</sup>	29,4
400	7DAV(1 <sup>a</sup> ) +10DAC(2 <sup>a</sup> )	4,41 <sup>a</sup>	30,3	400	7DAV(1 <sup>a</sup> ) +10DAC(2 <sup>a</sup> )	3,21 <sup>a</sup>	32,8
400	IV(1 <sup>a</sup> ) +10DAC(2 <sup>a</sup> )	3,35 <sup>a</sup>	12,3	400	IV(1 <sup>a</sup> ) +10DAC(2 <sup>a</sup> )	3,47 <sup>a</sup>	14,7

400	7DDV(1ª) +10DAC(2ª)	3,90 <sup>a</sup>	28,1	400	7DDV(1ª) +10DAC(2ª)	3,31 <sup>a</sup>	23,1
-----	---------------------	-------------------	------	-----	---------------------	-------------------	------

**AA:** Atividade Antioxidante média de 5 determinações. Aplicação aos **7DAV:** 7 dias antes do *véraison*; **IV:** Início do *véraison*; **7DDV:** 7 dias depois do *véraison*; **10DAC:** 10 dias antes da colheita. **CV:** Coeficiente de variação.

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Considerando-se os altos desvios na atividade antioxidante (Tab. 2.2), não foram observadas diferenças significativas em nível de 5%, entre as amostras sem tratamento, com uma única aplicação em diferentes estádios de maturação, bem como, com uma 2ª aplicação feita 10 dias antes da colheita.

Apesar da quantificação de antocianinas totais para as diferentes aplicações de S-ABA em diferentes safras não ter sido reportada aqui, pode-se relacionar o aumento na intensidade das cores dos sucos com maiores níveis de antocianinas (YAMAMOTO, 2014), seguindo a tendência dos estudos em bagas, cascas, polpas e sucos de uvas 'Isabel', 'Cabernet Sauvignon', 'Pinot Noir' e 'Merlot' (DEIS et al., 2011; GIRIBALDI, HARTUNG, SCHUBERT, 2010; JEONG et al., 2004; KOYAMA, SADAMATSU, GOTO-YAMAMOTO, 2010; KOYAMA et al., 2014a; MORI et al., 2005; OWEN et al., 2009; PEPPI, FIDELIBUS, DOKOOZLIAN, 2007a e 2007b; BERLI et al., 2011).

### 2.3.2 INTENSIDADE CROMÁTICA

De acordo com Maia et al.(2013) e Borges et al.(2011) os sucos de uva elaborados com 'Isabel' e 'Isabel Precoce' apresentam menores valores de intensidade cromática, quando comparados aos produzidos com outros cultivares. Por esta razão, recomenda-se o corte dos sucos com cultivares como a Concord, BRS Violeta, BRS Carmem, entre outras, para a melhoria da cor e sabor. Porém, como a produção de uva 'Isabel' é predominante nas regiões produtoras de suco e o sabor deste suco apresenta grande aceitação pelos consumidores, é pouco provável que os grandes produtores cultivem outros cultivares (BORGES et al., 2011). Assim, qualquer ganho na intensidade de cor para a cv. Isabel, como pela aplicação do regulador S-ABA, pode representar uma alternativa tecnológica interessante.

Os dados das intensidades cromáticas para os sucos elaborados a partir das uvas 'Isabel' submetidas às diferentes aplicações do S-ABA em diferentes estádios

de maturação na safra regular de 2011 e safra fora de época de 2012 deste estudo estão apresentados na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3** – Intensidade cromática de sucos elaborados a partir de uvas ‘Isabel’ submetidas a aplicações de S-ABA em diferentes estágios de maturação - antes, no início e depois do *véraison* na safra regular de 2011 e safra fora de época de 2012

Safr regular de 2011										
Tratamentos	420 nm	CV(%)	520 nm	CV(%)	620 nm	CV(%)	IC	CV(%)	T	CV(%)
Testemunha	0,428 <sup>a</sup>	11,4	0,599 <sup>a</sup>	18,5	0,154 <sup>b</sup>	12,9	1,180 <sup>a</sup>	14,7	0,724 <sup>a</sup>	10,4
7DAV(1 <sup>a</sup> )+15DAC(2 <sup>a</sup> )	0,508 <sup>a</sup>	21,6	0,723 <sup>a</sup>	19,6	0,209 <sup>ab</sup>	27,9	1,441 <sup>a</sup>	19,8	0,710 <sup>a</sup>	20,3
IV (1 <sup>a</sup> ) +15DAC(2 <sup>a</sup> )	0,526 <sup>a</sup>	14,8	0,701 <sup>a</sup>	19,4	0,212 <sup>ab</sup>	19,7	1,438 <sup>a</sup>	17,3	0,758 <sup>a</sup>	8,8
7DDV(1 <sup>a</sup> )+15DAC(2 <sup>a</sup> )	0,535 <sup>a</sup>	13,7	0,685 <sup>a</sup>	28,4	0,215 <sup>a</sup>	16,8	1,435 <sup>a</sup>	18,6	0,813 <sup>a</sup>	18,2
Safr fora de época de 2012										
Testemunha	0,348 <sup>c</sup>	14,5	0,662 <sup>b</sup>	12,3	0,126 <sup>c</sup>	23,0	1,136 <sup>c</sup>	13,7	0,525 <sup>a</sup>	7,1
7DAV(1 <sup>a</sup> )+15DAC(2 <sup>a</sup> )	0,440 <sup>ab</sup>	10,4	0,785 <sup>ab</sup>	15,0	0,190 <sup>ab</sup>	14,8	1,415 <sup>ab</sup>	12,9	0,565 <sup>a</sup>	8,2
IV (1 <sup>a</sup> ) +15DAC(2 <sup>a</sup> )	0,502 <sup>a</sup>	10,8	0,915 <sup>a</sup>	14,0	0,217 <sup>a</sup>	15,8	1,634 <sup>a</sup>	12,7	0,552 <sup>a</sup>	6,9
7DDV(1 <sup>a</sup> )+15DAC(2 <sup>a</sup> )	0,403 <sup>bc</sup>	10,3	0,778 <sup>ab</sup>	12,8	0,164 <sup>bc</sup>	13,1	1,345 <sup>bc</sup>	11,9	0,520 <sup>a</sup>	4,9

Absorbância média de 5 determinações. Aplicação de S-ABA (400 mg L<sup>-1</sup>) aos **7DAV**: 7 dias antes do *véraison*; **IV**: Início do *véraison*; **7DDV**: 7 dias depois do *véraison*; **15DAC**: 15 dias antes da colheita. **IC**: Intensidade Cromática. **T**: Tonalidade; **CV**: Coeficiente de variação.

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan (p<0,05).

Observa-se que todas as amostras que sofreram a aplicação do S-ABA resultaram em maiores intensidades de coloração médias (IC) em relação à testemunha (sem tratamento), não havendo, entretanto, influência quanto aos tratamentos considerando-se um nível de significância de 5% para as amostras da safra de 2011. Para a safra de 2011 o maior aumento na absorção em 520 nm foi observado para a aplicação aos 7 dias após o *véraison* e para a safra fora de época de 2012 para a aplicação no início do *véraison*. Também não se observou diferenças significativas (p<0,05) entre os tratamentos quanto á tonalidade (T) em ambas as safras.

A absorção no comprimento de onda de 520 nm expressa à intensidade da cor vermelha, que no caso do suco de uva é devido á quantidade de antocianinas (BORGES et al., 2013), que no caso da ‘Isabel’ se deve ao predomínio de antocianinas do tipo malvidina (NIXDORF, GUTIERREZ, 2010). Comparando-se a intensidade cromática para outros cultivares tintureiras como ‘Concord’ os valores encontrados neste estudo se mostraram inferiores, enquanto sucos do cultivar Concord apresentaram intensidade cromática próximas a 1,94 (BORGES et al., 2013; CRISTOFOLI, 2007) os sucos do cultivar Isabel neste trabalho apresentaram

médias próximas a 1,4. Indicando assim, que o suco de uva 'Isabel' apresenta uma deficiência em cor. Contudo, a análise sensorial indicou que o suco elaborado com 100% de uva 'Isabel' tratadas com S-ABA, apresentou a mesma aceitação quanto à cor que sucos feitos com cortes (YAMAMOTO, 2014), utilizando 20% de uvas tintureiras, como a 'Concord' (BORGES et al., 2011).

Os dados das intensidades cromáticas para os sucos elaborados a partir das uvas 'Isabel' submetidas às diferentes aplicações do S-ABA em diferentes estádios de maturação na safra regular de 2012 e safra fora de época de 2013 estão apresentados na Tabela 2.4.

**Tabela 2.4** – Intensidade cromática de sucos elaborados a partir das uvas 'Isabel' submetidas a aplicações de S-ABA em diferentes estágios de maturação - antes, no início e depois do *véraison* com etapa única e em 2 etapas na safra regular de 2012 e safra fora de época de 2013

Safr regular de 2012										
Tratamentos	420 nm	CV(%)	520 nm	CV(%)	620 nm	CV(%)	IC	CV(%)	T	CV(%)
Testemunha	0,563 <sup>a</sup>	21,7	0,996 <sup>a</sup>	16,7	0,247 <sup>a</sup>	26,7	1,806 <sup>a</sup>	19,3	0,562 <sup>a</sup>	3,9
7DAV(única)	0,545 <sup>a</sup>	14,7	1,050 <sup>a</sup>	16,8	0,244 <sup>a</sup>	18,2	1,839 <sup>a</sup>	16,4	0,521 <sup>b</sup>	2,6
IV(única)	0,546 <sup>a</sup>	12,1	1,039 <sup>a</sup>	13,6	0,236 <sup>a</sup>	14,6	1,821 <sup>a</sup>	13,3	0,526 <sup>b</sup>	2,6
7DDV(única)	0,601 <sup>a</sup>	10,3	1,112 <sup>a</sup>	9,5	0,259 <sup>a</sup>	12,7	1,972 <sup>a</sup>	9,5	0,541 <sup>ab</sup>	7,1
7DAV(1 <sup>a</sup> ) +10DAC(2 <sup>a</sup> )	0,622 <sup>a</sup>	12,7	1,206 <sup>a</sup>	13,0	0,290 <sup>a</sup>	14,3	2,118 <sup>a</sup>	13,0	0,516 <sup>b</sup>	2,3
IV(1 <sup>a</sup> ) +10DAC(2 <sup>a</sup> )	0,561 <sup>a</sup>	11,1	1,078 <sup>a</sup>	12,6	0,248 <sup>a</sup>	13,0	1,887 <sup>a</sup>	11,7	0,523 <sup>b</sup>	7,3
7DDV(1 <sup>a</sup> ) +10DAC(2 <sup>a</sup> )	0,597 <sup>a</sup>	7,8	1,101 <sup>a</sup>	9,0	0,262 <sup>a</sup>	7,9	1,961 <sup>a</sup>	8,3	0,543 <sup>ab</sup>	3,8
Safr fora de época de 2013										
Testemunha	0,357 <sup>b</sup>	17,9	0,877 <sup>b</sup>	20,8	0,108 <sup>c</sup>	21,3	1,342 <sup>b</sup>	19,7	0,410 <sup>a</sup>	6,9
7DAV(única)	0,458 <sup>ab</sup>	18,2	1,121 <sup>ab</sup>	23,1	0,148 <sup>bc</sup>	16,2	1,726 <sup>ab</sup>	21,2	0,414 <sup>a</sup>	7,3
IV(única)	0,392 <sup>b</sup>	18,4	0,947 <sup>b</sup>	21,6	0,128 <sup>bc</sup>	22,2	1,467 <sup>b</sup>	20,7	0,416 <sup>a</sup>	3,1
7DDV(única)	0,389 <sup>b</sup>	18,4	0,930 <sup>b</sup>	24,2	0,123 <sup>bc</sup>	16,5	1,442 <sup>b</sup>	21,9	0,422 <sup>a</sup>	5,2
7DAV(1 <sup>a</sup> ) +10DAC(2 <sup>a</sup> )	0,585 <sup>a</sup>	26,2	1,437 <sup>a</sup>	26,9	0,210 <sup>a</sup>	29,3	2,232 <sup>a</sup>	26,8	0,409 <sup>a</sup>	2,6
IV(1 <sup>a</sup> ) +10DAC(2 <sup>a</sup> )	0,507 <sup>ab</sup>	17,6	1,233 <sup>ab</sup>	19,7	0,173 <sup>ab</sup>	17,2	1,912 <sup>ab</sup>	18,8	0,412 <sup>a</sup>	4,4
7DDV(1 <sup>a</sup> ) +10DAC(2 <sup>a</sup> )	0,519 <sup>ab</sup>	34,3	1,313 <sup>ab</sup>	35,8	0,161 <sup>abc</sup>	35,5	1,994 <sup>ab</sup>	35,4	0,397 <sup>a</sup>	2,2

Absorbância média de 5 determinações. Aplicação de S-ABA (400 mg L<sup>-1</sup>) aos **7DAV**: 7 dias antes do *véraison*; **IV**: Início do *véraison*; **7DDV**: 7 dias depois do *véraison*; **10DAC**: 10 dias antes da colheita. **IC**: Intensidade Cromática. **T**: Tonalidade; **CV**: Coeficiente de variação. Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan (p<0,05).

Com relação aos sucos tratados em 2013 (Tab. 2.4), não houve diferença na tonalidade (T) para os diferentes tratamentos, porém para as demais variáveis

avaliadas, verificou-se a influência da aplicação do S-ABA nos tratamentos com duas aplicações do regulador. Para as absorvâncias em 420, 520 e 620 nm e a intensidade de cor da safra de 2012 não houve diferença para os diferentes tratamentos. Os tratamentos com duas aplicações apresentaram em geral as maiores médias. Na absorção em 420, 520 e 620 nm e a intensidade de cor o tratamento 7DAV + 10DAC foi o tratamento que apresentou os maiores aumentos em ambas as safras, sendo significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) para a safra 2013.

Os resultados para absorção considerando todas as safras 2011 e 2012 (Tab. 2.3) e safras 2012 e 2013 (Tab. 2.4) em 420 nm que ficaram entre 0,348 e 0,622, sendo que as uvas tratadas com S-ABA em 2 etapas, mostraram valores próximos aos encontrados para sucos de uva 'Concord' 0,595 (CRISTOFOLI, 2007). A absorção em 420 nm pode ser relacionada com a cor amarela, indicando um possível aumento na concentração de taninos, polimerização de taninos e combinação de antocianinas com taninos (FREITAS, 2006). Entretanto, altos valores de absorção neste comprimento de onda não são desejáveis em sucos de uva, pois podem indicar também aumento da oxidação do produto (BORGES et al., 2013). Em relação á absorção em 520 nm neste estudo os valores se mostraram entre 0,599 e 1,437, com maiores absorvâncias para as safras 2012 e 2013, enquanto que em estudos com suco de uva 'Concord' (CRISTOFOLI, 2007) o valor médio (1,165) foi semelhante às amostras de suco de uva Isabel tratadas com S-ABA. A absorção em 520 nm pode indicar a concentração das antocianinas no suco de uva (BORGES et al., 2013). Os resultados encontrados para a absorção em 620 nm dos sucos tratados com S-ABA em todas as safras se mostraram entre 0,108 e 0,290 enquanto que em estudos com o cultivar 'Concord' o valor encontrado foi de 0,184 (CRISTOFOLI, 2007). A absorção em 620 nm pode ser atribuída aos produtos de condensação entre antocianinas, catequinas e grupos hidroxila (FREITAS, 2006).

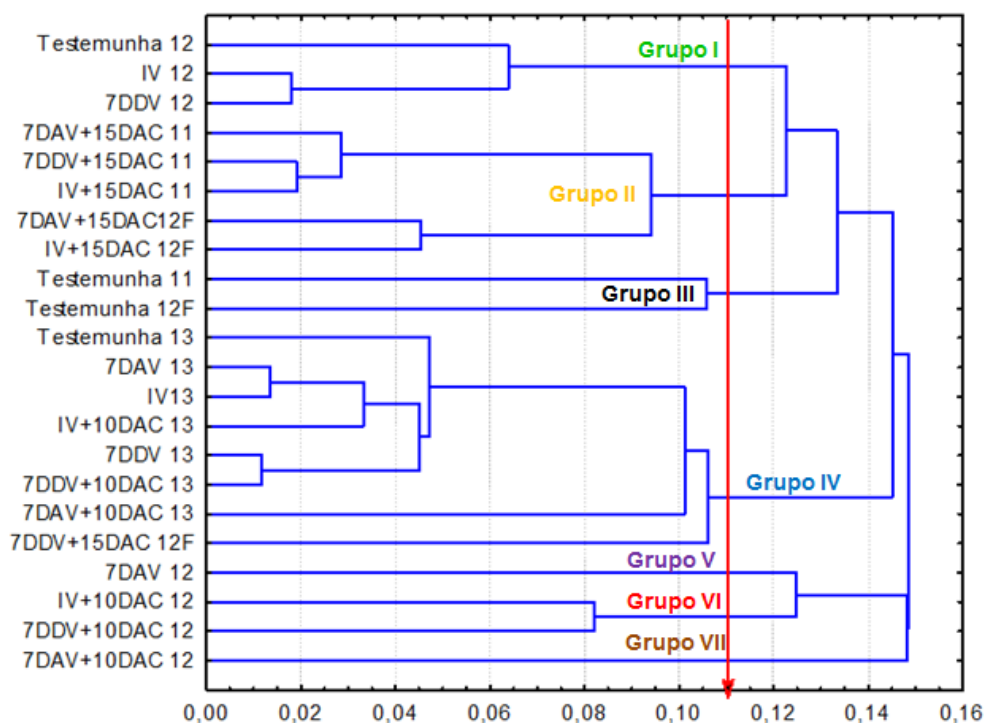
A aplicação de S-ABA sugere então, que a qualidade visual dos sucos pode ser alterada a ponto de ser perceptível pelo consumidor (KOYAMA, 2014), confirmando que sucos comerciais com maiores intensidades de cor apresentam níveis de aceitação superiores (PONTES et al., 2010), aumento que também foi observado nesse estudo, fato este que mostra a viabilidade da aplicação exógena do S-ABA, para o aumento da qualidade do produto final.

### 2.3.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

Considerando apenas as variáveis significativas ( $p < 0,05$ ), realizou-se a análise de correlação, verificando que as mesmas apresentaram correlação não nula, possibilitando assim a aplicação de técnicas de análise multivariada, para melhor explicar a variabilidade dos dados. Pela análise de componentes principais (ACP ou do inglês *PCA*) as amostras puderam ser agrupadas de acordo com os tratamentos. Nesta análise, os indivíduos são agrupados de acordo com suas variâncias, sendo assim, são representados em grupos segundo a variação de suas características dentro da população (ABDI, WILLIAMS, 2010).

As amostras agruparam-se de acordo com o dendrograma (Figura 2.5) obtido através do algoritmo hierárquico e foram classificadas de acordo com suas variâncias.

**Figura 2.5** - Dendrograma considerando a absorção em 420, 520 e 620 nm dos sucos de uva elaborados a partir de uvas 'Isabel' submetidas a diferentes aplicações de S-ABA na safra regular de 2011, safra fora de época de 2012, safra regular de 2012 e safra fora de época de 2013

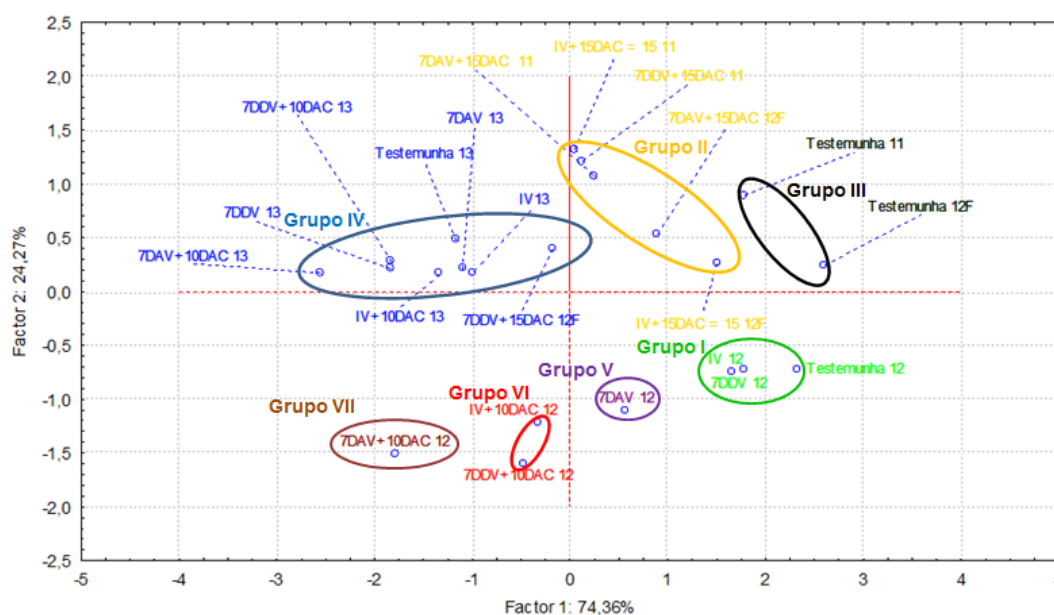


Aplicação de S-ABA (400 mg L<sup>-1</sup>) aos **7DAV**: 7 dias antes do véraison; **IV**: Início do véraison; **7DDV**: 7 dias depois do véraison; **15DAC**: 15 dias antes da colheita; **10DAC**: 10 dias antes da colheita; **11**: safra regular

de 2011; **12**: safra regular de 2012; **12F**: safra fora de época de 2012; **13**: safra fora de época de 2013.

Assim, as amostras puderam ser separadas em 7 grupos (I, II, III, IV, V, VI e VII), considerando-se a maior distância euclidiana na análise hierárquica em 0,11 (Fig. 2.5 – seta vermelha) no plano bidimensional (Fig. 2.6) de acordo com as duas componentes principais CP1 e CP2, que juntas explicaram 98,63% da variabilidade dos dados.

**Figura 2.6-** Análise de componentes principais considerando a absorção em 420, 520 e 620 nm dos sucos de uva elaborados a partir de uvas ‘Isabel’ submetidas a diferentes aplicações de S-ABA na safra regular de 2011, safra fora de época de 2012, safra regular de 2012 e safra fora de época de 2013



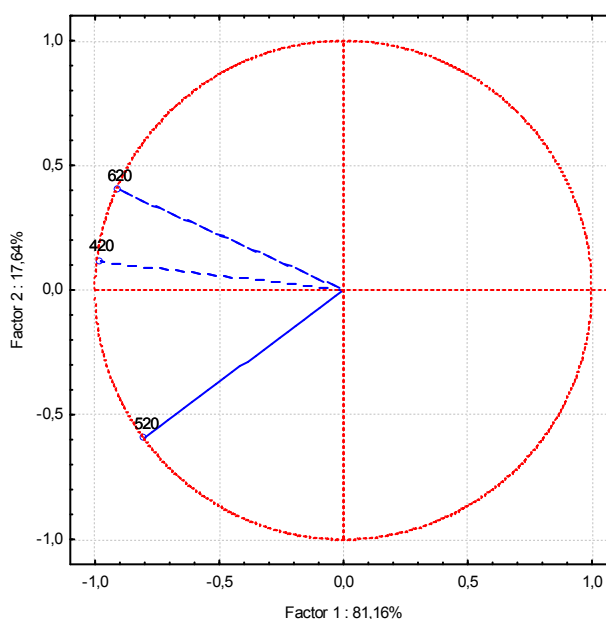
Aplicação de S-ABA ( $400 \text{ mg L}^{-1}$ ) aos **7DAV**: 7 dias antes do *véraison*; **IV**: Início do *véraison*; **7DDV**: 7 dias depois do *véraison*; **15DAC**: 15 dias antes da colheita; **10DAC**: 10 dias antes da colheita; **11**: safra regular de 2011; **12**: safra regular de 2012; **12F**: safra fora de época de 2012; **13**: safra fora de época de 2013.

As amostras de suco de uva ‘Isabel’ foram agrupadas de acordo com as suas variáveis (Figura 2.6). As amostras sem tratamento (testemunhas 11 e 12F – círculo preto, Grupo III), tanto da safra de 2011 quanto da safra fora de época de 2012, ficaram em um grupo separado das amostras que foram tratadas com S-ABA. As amostras da safra de 2011 com diferentes tratamentos agruparam-se (círculo amarelo- Grupo II). A amostra sem tratamento (testemunha 12 – círculo verde,

Grupo I) da safra de 2012, agrupou-se com as amostras de suco da mesma safra somente tratadas com uma única aplicação do ácido (IV 12 e 7DDV 12), exceto a amostra com aplicação 7 dias antes do *véraison* (7DAV 12, Grupo V). As amostras da safra de 2012 que passaram por duas etapas de aplicação do S-ABA agruparam-se (círculo vermelho- Grupo VI), com exceção da amostra com a 1ª aplicação 7 dias antes do *véraison* e a 2ª aplicação 10 dias antes da colheita (7DAV+10DAC 12, Grupo VII), que aparece mais a esquerda na CP1 e mais para baixo, no 4º quadrante. Da mesma forma, agruparam-se as amostras da safra fora de época de 2013 juntamente com as amostras que não foram submetidas à aplicação do regulador de crescimento (testemunha 13 – círculo azul, Grupo IV), observando-se que embora esteja no mesmo grupo a amostra da 1ª aplicação 7 dias antes do *véraison* e a 2ª aplicação 10 dias antes da colheita (7DAV+10DAC 13), aparece mais a esquerda da CP1 e para cima na CP2, no 3º quadrante. As amostras da safra fora de época de 2012 ficaram em três grupos distintos (círculos preto, amarelo e azul, grupos III, II e IV).

De acordo com o posicionamento das variáveis no círculo de correlações (Figura 2.7) o tratamento com aplicação a 1ª aplicação de S-ABA aos 7 dias antes do *véraison* e uma 2ª aplicação aos 10 dias antes da colheita (7DAV + 10DAC 12) foi o que apresentou maior incremento nas absorbâncias da safra 2012, especialmente em 520 nm, concordando com a maior intensidade de cor com tom avermelhado. Enquanto, a amostra com a 1ª aplicação de S-ABA aos 7 dias antes do *véraison* e uma 2ª aplicação aos 10 dias antes da colheita da safra de 2013 (7DAV + 10DAC 13), foi a que se destacou com maior incremento nas absorbâncias entre o 420 nm (amarelo) e 620 nm (violeta), produzindo uma cor violeta claro. Assim, observa-se que um maior acréscimo de cor aos sucos de uva elaborados a partir de uvas 'Isabel' tratadas, ocorreu quando o S-ABA foi aplicado 1 semana antes do *véraison* (7 dias) em 2 etapas (2ª feita 10 dias antes da colheita), pelo aumento das antocianinas do grupo das malvidinas, predominantes no cultivar Isabel.

**Figura 2.7** - Círculo de correlações dos comprimentos de onda em 420, 520 e 620 nm das amostras de sucos elaborados a partir da uva 'Isabel' submetida a aplicações de S-ABA na safra regular de 2011, safra fora de época de 2012, safra regular de 2012 e safra fora de época de 2013



## 2.4 CONCLUSÃO

A partir do estudo da aplicação do S-ABA, observou-se que este regulador não influenciou a capacidade antioxidante dos sucos integrais, elaborados a partir da uva do cultivar Isabel, já que a atividade antioxidante permaneceu a mesma, independente da época e intervalos de aplicação. Já os resultados de intensidade cromática mostraram que esta variável sofreu influencia do regulador de crescimento, havendo um aumento maior, quando a aplicação do S-ABA foi realizada em duas etapas, a 1ª aos 7 dias antes do *vérasion* e a 2ª aos 10 dias antes da colheita, sendo esta uma alternativa interessante e viável para a intensificação da cor dos sucos de uva 'Isabel' integral, pelo aumento das antocianinas predominantes do grupo malvidina, sem perda da atividade antioxidante.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos**: teoria e prática. Viçosa: UFV, 601p. 2011.
- BAN, T.; ISHIMARU, M.; KOBAYASHI, S.; SHIOZAKI, S.; GOTO-YAMAMOTO, N.; HORIUCHI, S. Abscisic acid and 2, 4-dichloroethoxyacetic acid affect the expression of anthocyanin biosynthetic pathway genes in 'Kyoho' grape berries. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Kent, v.78, p.586–589, 2003.
- BALINT, G.; REYNOLDS, A. G. Impact of exogenous abscisic acid on vine physiology and grape composition of Cabernet Sauvignon. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.64, p.74-87, 2013.
- BERLI, F. J.; FANZONE, M.; PICCOLI, P.; BOTTINI, R. Solar UV-B and ABA involved in phenol metabolism of *Vitis vinifera* L. increasing biosynthesis of berry skin polyphenol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.59, p.4874-4884, 2011.
- BORGES, R. S.; PRUDENCIO, S. H.; ROBERTO, S. R.; ASSIS, A. M. Avaliação sensorial de suco de uva cv. Isabel em cortes com diferentes cultivares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal. v. especial, p.584-591, 2011.
- BORGES, R. S.; SILVA, G. A.; ROBERTO, S. R.; ASSIS, A. M.; YAMAMOTO, L. Y. Phenolic compounds, favorable ox-redox activity and juice color of 'Concord' grapevine clones. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.161, p.188-192, 2013.
- BORS, W. et al. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, p. 343-355, Nov. 1990.
- BRASIL. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 4 jun. 2009.
- BRASIL, Instrução Normativa nº 24, de 30 de agosto de 2012, **Ministério da Agricultura**, Brasília, DF, 2012.
- CANTÍN, C. M. A.; FIDELIBUS, B. M. W.; CRISOSTO, C. H. Application of abscisic acid (ABA) at *véraison* advanced red color development and maintained postharvest quality of 'Crimson Seedless' grapes. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.46, p.237–241, 2007.
- CASTRO, P. R. C. Agroquímicos de controle hormonal na agricultura tropical. Piracicaba: **Divisão de Biblioteca**: Esalq-USP, 46p, 2006.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Derivados da Uva**: Período Janeiro de 2011. Disponível em:

<[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11\\_04\\_01\\_12\\_14\\_54\\_derivadosdauvaneiro2011.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_04_01_12_14_54_derivadosdauvaneiro2011.pdf)>. Acesso em: 12 fev. 2015.

COULTATE, T. P. **Alimentos**: a química de seus componentes. Porto Alegre: Artmed, 368p. 2004.

CRISTOFOLI, B. Influência do tempo de extração na composição e na razão isotópica  $^{18}O/^{16}O$  da água do suco de uva elaborado pelo método de Arraste de Vapor. 2007. 26 f. **Trabalho de conclusão de curso (Graduação)** - Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves, Bento Gonçalves, 2007.

DAVIES, C.; BOSS, P. K.; ROBINSON, S. P. Treatment of grape berries, a non climacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. **Plant Physiology**, Rockville, v.115, p.1155-1161, 1997.

DEIS, L.; CAVAGNARO, B.; BOTTINI, R.; WUILLOUD, R.; SILVA, M.F. Water deficit and exogenous ABA significantly affect grape and wine phenolic composition under in field and in-vitro conditions. **Journal of Plant Growth Regulator**, Verona, v.65, p.11-21, 2011.

DUARTE – ALMEIDA J. M.; SANTOS R. J.; GENOVESE M. I.; LAJOLO F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

FERRARA, G.; MAZZEO, A.; MATARESSE, A. M. S.; PACUCCI, C.; PACIFICO, A.; GAMBACORTA, G.; FACCIA, M.; TRANI, A.; GALLO, V.; CAFAGNA, I.; MASTRORILLI, P. Application of abscisic acid (S-ABA) to 'Crimson Seedless' grape berries in a Mediterranean climate: effects on color, chemical characteristics, metabolic profile, and S-ABA concentration, **Journal of Plant Growth Regulator**, Verona, v.32, p.491-505, 2013.

FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; TEISSEDRE, P. L. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 4, p. 890-894, Apr. 1995.

FREITAS, D.F. Variação dos compostos fenólicos e de cor dos vinhos de uvas (*Vitis vinifera*) tintas em diferentes ambientes. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

GAGNÉ, S. ABA initiates anthocyanin production in grape cell cultures. **Journal of Plant Growth Regulator**, Verona, v.30, p1-10, 2011.

GIRIBALDI, M.; HARTUNG, W.; SCHUBERT, A. The effects of abscisic acid on grape berry ripening are affected by the timing of treatment. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, Villenave d'Ornon, v.44, p.9-15, 2011.

GODINHO, M. S.; Raquel O. PEREIRA, R.O.; RIBEIRO, K. O.; SCHIMIDT, F.; OLIVEIRA, A. E. Classificação de refrigerantes através de análise de imagens e análise de componentes principais (PCA). **Quim. Nova**, v. 31, n. 6, 1485-1489, 2008.

GONZALEZ, R. C., WOODS, R. E. **Processamento de Imagens Digitais**. 1ª. ed. Edgard Blücher, 1992. 509p.

HAN, D.H.; LEE, S.M.; KIM, S.B. Effects of ABA and ethephon treatments on coloration and fruit quality in Kyoho grape. **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, Gyeonggi-do, v.37, p.416–420, 1996.

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

HIRATSUKA, S.; ONODERA, H.; KAWAI, Y.; KUBO, T.; ITOH, H.; WADA, R. ABA and sugar effects on anthocyanin formation in grape berry cultured in vitro. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.90, n.1-2, p.121-130, 2001.

**IBRAVIN**. INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO. Notícias. Versão eletrônica, abril, 2011. Disponível em: <[http://www.ibravin.org.br/int\\_noticias.php?id=705&tipo=N](http://www.ibravin.org.br/int_noticias.php?id=705&tipo=N)>. Acesso em: 12 fev. 2015.

**IBRAVIN**. INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO. Avaliação Setorial 2013. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/public/upload/statistics/1380742265.pdf>>. Acesso em: 16 fev. 2015.

**IBRAVIN**. INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO; **SEBRAE**. SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. Cartilha suco de uva. Nem tudo que tem uva é SUCO. Disponível em: <[http://www.sucodeuvadobrasil.com.br/legislacao/Cartilha\\_suco\\_de\\_uva.pdf](http://www.sucodeuvadobrasil.com.br/legislacao/Cartilha_suco_de_uva.pdf)>. Acesso em: 8 mai. 2015.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ – IAPAR. **Cartas climáticas**. Versão eletrônica, 2010. Disponível em: <<http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=677>> Acesso em: 14 fev. 2015.

JACKSON, R. S. **Wine Science**: principles and applications. 3rd ed. Burlington: Elsevier. 776p. 2008.

JEONG, S. T.; GOTO-YAMAMOTO, N.; KOBAYASHI, S.; ESAKA, M. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of and the expression of anthocyanin biosynthetic genes berry skins. **Plant Science**, Londres, v.167, p.247-252, 2004.

KATAOKA, A.; SUGIURA, N.; UTSUNOMIYA, T. Effect of abscisic acid and defoliation on anthocyanin accumulation in Kyoho grapes (*Vitis vinifera* L. x *V. labruscana* Bailey). **Vitis**, Santiago, v.2, p.325–332, 1982.

KOYAMA, K.; SADAMATSU, K.; GOTO-YAMAMOTO, N. Abscisic acid stimulated ripening and gene expression in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape. **Functional and Integrative Genomics**, Lisboa, v.10, p.367-381, 2010.

KOYAMA, R.; ASSIS, A. M. D.; YAMAMOTO, L. Y.; BORGES, W. F. S.; PRUDENCIO, S. H.; ROBERTO, S. R. Exogenous abscisic acid increases the anthocyanin concentration of berry and juice from 'Isabel' grapes (*Vitis labrusca* L.). **HortScience**, Alexandria, v. 49, p. 460-464, 2014.

LEE, J. C.; TOMANA, T. Physiological study on anthocyanin development in grapes. II. Effect of sucrose, abscisic acid and indoleacetic acid on the anthocyanin development in Kyoho grape (*Vitis labruscana*). **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, Gyeonggi-do, v.21, p.158–163, 1980.

MARZAROTTO, V. Suco de uva. In: VENTURINI FILHO, W. G. Bebidas não alcoólicas: **Ciência e tecnologia**. São Paulo: Blücher, p.359-385, 2010.

MAIA, J. D. G.; PEREIRA, G. E.; MONTEIRO, F. P.; SOUZA, R. T.; LAZZAROTTO, J. J.; OLIVEIRA, J. B.; RITSCHER, P. Novas cultivares brasileiras de uvas para elaboração de suco no semiárido brasileiro: desempenho agrônomo e qualidade do suco. **Circular Técnica**, 96, Bento Gonçalves: Embrapa, 2013. 24p.

MATSUSHIMA, J.; HIRATSUKA, S.; TANIGUCHI, N.; WADA, R.; SUZAKI, N. Anthocyanin accumulation and sugar content in the skin of grape cultivar Olympia treated with ABA. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v.58, p.551–555, 1989.

MELLO, L. M. R. Vitivinicultura brasileira: Panorama 2012. **Comunicado técnico**, 137. Bento Gonçalves: EMBRAPA, 5p. 2013.

MORI, K; SAITO, H.; GOTO-YAMAMOTO, N.; KITAYAMA, M.; KOBAYASHI, S.; SUGAYA, S.; GEMMA, H.; HASHIZUME, K. Effects of abscisic acid treatment and night temperatures on anthocyanin composition in Pinot noir grapes. **Vitis**, Santiago, v.44, n.4, p.161-165, 2005.

NICOLAS, P.; LECOURIEUX, D., KAPPEL, C.; CLUZET, S.; CRAMER, G.; DELROT, S.; LECOURIEUX F. The basic leucine zipper transcription factor ABSCISIC ACID RESPONSE ELEMENT-BINDING FACTOR2 is an important transcriptional regulator of abscisic acid-dependent grape berry ripening processes. **Plant Physiology**, Rockville, v.164, p.365-383, 2014.

NÓBREGA, J. A.; TREVIZAN, L.C.; GOMES, M. S.; KAMOGAWA, M. Y. Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico. **Revista Química Nova**, Vol. 31, n. 6, p.1577-1581, 2008.

OLIVEIRA, L. F. Uso de imagens digitais e ferramentas quimiométricas para identificação e determinação de Cr (VI) em solos contaminados. 2012. 72 f. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 2012.

OWEN, S. J.; LAFOND, M. D.; BOWEN, P.; BOGDANOFF, C.; USHER, K.; ABRAMS, S. R. Profiles of abscisic acid and its catabolites in developing Merlot grape (*Vitis vinifera*) berries. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.60, n.3, p.277-284, 2009.

PEGAS J. A. H. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de Caxias do Sul, Brasil, 2006.

PEPPI, M. C.; FIDELIBUS, M. W.; DOKOOZLIAN, N. Abscisic acid application timing and concentration affect firmness, pigmentation and color of 'Flame Seedless' grapes. **HortScience**, Alexandria, v.41, p.1440-1445, 2006.

PEPPI, M. C.; FIDELIBUS M. W.; DOKOOZLIAN N. Application timing and concentration of abscisic acid affect the quality of 'Redglobe' grapes. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v.82, p.304–310, 2007a.

PEPPI, M. C.; FIDELIBUS, M. W.; DOKOOZLIAN, N. Timing and concentration of abscisic acid applications affect the quality of 'Crimson Seedless' grapes. **International Journal of Fruit Science**, New York, v.7, n.4, p.71-83, 2007b.

PEYNAUD, E. **Enología Práctica: Conocimiento y elaboración del vino**. 2 edición. Madrid: Editora Mundi-Prensa. 406p. 1996.

PONTES, P. R. B. SANTIAGO, S.S.; SZABO, T. N.; TOLEDO, L. P.; GOLLUCKE, A. P. B. Atributos sensoriais e aceitação de sucos de uva comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30, n.2, p.313-318, 2010.

REBELLO, L. P. G.; LAGO-VANZELA, E. S.; BARCIA, M. T.; RAMOS, A. M.; STRINGHETA, P. C.; DA-SILVA, R.; CASTILLO-MUÑOZ, N.; GÓMEZ-ALONSO, S. HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Phenolic composition of the berry parts of hybrid grape cultivar BRS Violeta (BRS Rubra × IAC 1398-21) using HPLC–DAD–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v.54, p.354-366, Nov. 2013.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Handbook of Enology: The Chemistry of Wine. Stabilization and Treatments**. Inglaterra: John Wiley & Sons. v.2. 450p. 2006.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. Suco de uva. Brasília: **Embrapa**. Informação Tecnológica, 45p. 2007.

ROBERTO, S. R.; ASSIS, A. M.; YAMAMOTO, L. Y.; MIOTTO, L. C. V.; SATO, A. J.; KOYAMA, R.; GENTA, W. Application timing and concentration of abscisic acid improve color of 'Benitaka' table grape. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 142, p. 44-48, 2012.

ROBERTO, S. R.; ASSIS, A. M.; YAMAMOTO, L. Y.; MIOTTO, L. C. V.; KOYAMA, R.; SATO, A. J.; BORGES, R. D. S. Ethephon use and application timing of abscisic

acid for improving color of 'Rubi' table grape. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 7, p. 797-800, 2013.

ROBINSON, S. P.; DAVIES, C. Molecular biology of grape berry ripening. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v.6, p.175-188, 2000.

RUFINO M. S. M.; ALVES, R. E. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Comunicado Técnico 127. **Embrapa Uva e Vinho**. 1ª edição, 4p., 2007.

SANDHU, A. K.; GRAY, D. J.; LU, J.; GU, L.. Effects of exogenous abscisic acid on antioxidant capacities, anthocyanins, and flavonol contents of muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) skins. **Food Chemistry**, Oxford, v.126, p.982-988, 2011.

SATO, A.J.; SILVA, B. J.; SANTOS, C. E.; BERTOLUCCI, R. SANTOS, R.; CARIELO, M.; GUIRAUD, M. C.; FONSECA, I. C. B.; ROBERTO, S. R.. Fenologia e demanda térmica das videiras Isabel e Rubea sobre diferentes porta-enxertos na região norte do Paraná. **Semina. Ciências Agrárias**, v. 29, n.2, p.283-292, 2008.

SOUZA, L. A. C.; SPEHAR, C. R.; SANTOS, R. L. B. Análise de imagem para determinação do teor de saponina em quinoa. **Pesquisa agropecuária brasileira**. V.39, n.4, p.397-401, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 4ed. Porto Alegre: Artmed, 819 p. 2009.

TERRIER, N.; PONCET-LEGRAND, C.; CHEYNIER, V. Flavanols, flavonols and dihydroflavonols. In: MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C. **Wine chemistry and biochemistry**. New York: Springer, cap. 9B, p. 463-507 2009.

TOALDO, I. M. ; CRUZ, F. A. ; ALVES, T. L.; DE GOIS, J. S.;BORGES, D. L.G. ; CUNHA, H. P. ; DA SILVA, E. L. ; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Bioactive potential of *Vitis labrusca* L. grape juices from the Southern Region of Brazil: Phenolic and elemental composition and effect on lipid peroxidation in healthy subjects. **Food Chemistry**, v. 173, p. 527-535, 2015.

TONIETTO, J.; MANDELLI, F. Uvas Viníferas para Processamento em Regiões de Clima Temperado. Embrapa Uva e Vinho. Junho de 2003. Disponível em:<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 7 jan. 2015.

YAMAMOTO, L. Y. Composição fenólica das bagas e do suco integral de uva 'Isabel' tratada com ácido abscísico em diferentes épocas. **Tese de doutorado** – Universidade Estadual de Londrina. Londrina 22 de dezembro de 2014.

ZAHARIA, L. I.; WALKER-SIMMON, M. K.; RODRIGUEZ, C. N.; ABRAMS, S. R. Chemistry of Abscisic Acid, Abscisic Acid Catabolites and Analogs. **Journal of Plant Growth Regulator**, Verona, v.24, p.274-284, 2005.

## CONCLUSÃO GERAL

Através deste estudo foi possível traçar o perfil dos compostos fenólicos das cascas e sementes de uvas 'Isabel', ainda não descrito na literatura, para o cultivar de maior produção no Brasil, o mais utilizado na elaboração de sucos e vinhos de mesa. A quantificação e identificação dos compostos por HPLC-PDA-ESI-MS<sup>n</sup> indicaram que a antocianina presente em maior quantidade foi a malvidina 3-glicosídeo, tendo sido também encontrados níveis de malvidina 3,5-diglicosídeo, característica de cultivares *Vitis labrusca*. Dentre os flavan-3-ols, os monômeros de (+)-catequina e (-)-epicatequina apresentaram maiores proporções, enquanto, dentre os ácidos hidroxicinâmicos os níveis de ácido caftárico foram superiores.

As análises dos sucos integrais elaboradas a partir de uvas 'Isabel' que passaram por aplicação do S-ABA, indicaram que a atividade antioxidante não foi alterada, independente da época e intervalos de aplicações. Os resultados de intensidade cromática, entretanto, mostraram que houve influência significativa de

acordo com a época de maturação e os intervalos aplicações do regulador de crescimento S-ABA. Maiores aumentos na intensidade cromática foram verificados quando a aplicação foi feita em duas etapas, a 1ª aos 7 dias antes do *véraison* e a 2ª aos 10 dias antes da colheita. Portanto, esta é uma alternativa interessante e viável já que promoveu a intensificação da cor dos sucos produzidos a partir de uva 'Isabel', com uma melhor aceitação pelo consumidor, reduzindo a necessidade de cortes com outras uvas tintureiras, sem, contudo, apresentar perda da atividade antioxidante, parâmetro muito apreciado pelos consumidores.