



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Yara Paula de Oliveira Nishiyama

Composição fenólica das partes comestíveis das uvas
BRS Carmem e BRS Magna

São José do Rio Preto
2016

Yara Paula de Oliveira Nishiyama

Composição fenólica das partes comestíveis das uvas
BRS Carmem e BRS Magna

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^a Dr^a. Ellen Silva Lago Vanzela

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

Co-orientador: Prof Dr. Isidro Hermosín Gutiérrez

São José do Rio Preto
2016

Nishiyama, Yara Paula de Oliveira.

Composição fenólica das partes comestíveis das uvas BRS
Carmem e BRS Magna / Yara Paula de Oliveira Nishiyama. -- São José do Rio
Preto, 2016

111 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Ellen Silva Lago Vanzela

Corientador: Roberto da Silva

Corientador: Isidro Hermosín Gutiérrez

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Fenóis. 3. Uva – Brasil – Análise.
I. Lago-Vanzela, Ellen Silva. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.
III. Título.

CDU – 663.2

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Yara Paula de Oliveira Nishiyama

Composição fenólica das partes comestíveis das uvas BRS

Carmem e BRS Magna

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Ellen Silva Lago Vanzela
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Natália Soares Janzantti
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Paulo César Stringheta
UVF – Viçosa

São José do Rio Preto
17 de fevereiro de 2016

Dedico este trabalho ao meus pais e ao meu irmão, que são os
movedores da minha vida, e aos meus amigos que me acompanham
durante a minha jornada na terra.

Agradecimentos

Primeiramente à Deus, por ter me dado a opção dos melhores caminhos e a presença das melhores companhias.

Aos meus pais Celia e Julio por aceitarem a minha escolha de realizar mais esta etapa da minha vida (mesmo sendo muitas vezes difícil compreender a razão de tudo isto) e por sempre estarem presentes.

Ao meu irmão querido, Pedro, por mesmo longe sempre estar presente no meu coração (conte sempre comigo), apoiando-me e me incentivando a cada momento.

À toda minha família e amigos pela paciência, acolhimento; por me fazerem rir, e rirem das minhas palhaçadas. Mesmo que as vezes muito tempo distantes de vocês, vocês sempre me entenderam e sempre me escutaram com carinho (Gisele, saiba que você faz parte destes dois grupos).

À minha orientadora Profa. Dra. Ellen da Silva Lago Vanzela pela paciência em ler o que escrevi, por me orientar e me guiar nesta jornada, por me dar conselhos nos momentos em que precisei e me encorajar a cada conversa.

Aos professores co-orientadores Prof. Dr. Roberto da Silva e Prof. Dr. Isidro Hermosín Gutiérrez, também por me orientarem, terem paciência e ensinarem grande parte do que sei hoje.

Aos meus professores, desde o ensino fundamental até a graduação (Toninha, Otávio, Guiaqueto, Carlos, Expedito, Benício), por fazerem parte do meu crescimento como pessoa. Sempre me lembrarei de cada um de vocês.

Às minhas colegas de apartamento, de toda a minha jornada acadêmica até hoje, em especial à Milena, Elisa, Liara, Samara e Evelin, por me aguentarem, aguentarem meus desabafos, por me socorrem quando precisei e conviverem comigo nos bons e maus momentos.

A todos meus amigos do nosso laboratório, Carol, Taty e Tuany, que participaram desta conquista, lutaram e se divertiram comigo.

Aos amigos de aula e de outros laboratórios (Lu, Mari, Jeni, Tiago, Wellington, Erick, Raul, Pedro, Diego, ...) pelas conversas e ajuda durante a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista, campus de São José do Rio Preto pela formação profissional e disposição de recursos necessário para realização dos trabalhos.

Aos professores e todos os funcionários desta instituição, e em especial aos professores Natália, Cida, João Cláudio, Crispin, Roger, Vânia e Ana Lúcia, por também me orientarem e instruírem para meu

desenvolvimento profissional; e aos técnicos Ginaldo, Luís, Alana e Jesuíno, por me ajudarem sempre que precisei.

À Universidade de Castilla La Mancha (Espanha) e ao centro de investigação IVICAM por proporcionar a nossa equipe o uso de equipamentos mais sofisticados, e aos alunos Iasnaia e Maurício por me auxiliarem no trabalho.

Ao Prof. Fernando Zamora da Universidad Rovira i Virgili, Tarragona, e ao Prof. Dr. Ulrich Engelhardt da Universidade Técnica de Braunschweig, pelas doações de padrões utilizados nas análises.

À Teresa por me acompanhar na graduação, por me ajudar no meu crescimento acadêmico e sempre cuidar de mim quando precisei.

À Embrapa, principalmente à estação Experimental de Viticultura Tropical de Jales - SP, pelo fornecimento das matérias primas para realização deste trabalho, e em especial ao Reginaldo Teodoro de Souza.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À Universidade Estadual de Maringá por ter me dado a oportunidade de começar meus estudos na área e me introduzido no mundo acadêmico e no laboratório.

Aos meus amigos (todos mesmo) que fiz na UNESP e na UEM, por terem feito parte da minha vida, em especial a Camilla, Robson, Anuar, Márcio, Carla, Rafa, Rômulo. Sempre irá haver boas recordações.

À vida, por me permitir viver! Pois a caminhada é longa e cada passo que damos estaremos mais próximos das nossas conquistas.

Errar faz parte do desenvolvimento de qualquer ser humano...

Busque sempre a melhora do que se é hoje.

“Aprenda como se você fosse viver para sempre.

Viva como se você fosse morrer amanhã”

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

A composição qualitativa e quantitativa dos compostos fenólicos (CF) presentes nas partes comestíveis das uvas BRS Carmem e BRS Magna foi determinada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo acoplada à espectrometria de massas com sistema de ionização por eletronebulização e analisador de armadilha de íons (CLAE-DAD-IES-EM/EM). Com base nos resultados obtidos e, com auxílio de análise multivariada de componentes principais (ACP), foi possível identificar os CF que mais se destacam, devido serem majoritários ou minoritários: as antocianinas monoglicosiladas acetiladas derivadas da petunidina e malvidina foram os compostos marcadores da BRS Carmem inteira enquanto na BRS Magna foi a delphinidina diglicosilada cafeilada; no caso dos flavonóis, para ambas cultivares, os derivados da miricetina foram majoritários; para os derivados do ácido hidroxicinâmico (DAHC) verificou-se que a BRS Carmem inteira apresenta maior concentração do isômero do tipo *p*-cumárico enquanto que na BRS Magna, há maior concentração de ácido cutárico; há presença de estilbenos do tipo *trans*- e *cis*-piceido em ambas cultivares, porém, estas não mostraram ser ricas fontes destes compostos; e, os marcadores para os flavan-3-óis monômeros nas sementes da BRS Carmem e da BRS Magna foram os do tipo epicatequina e catequina, respectivamente. Quantitativamente, as cascas acumularam a maior parte dos CF, com diferenças nos perfis fenólicos encontrados entre as frutas inteiras, sementes e suas respectivas cascas. Pode-se observar que a BRS Carmem inteira apresentou concentração de CF, significativamente, maior quando comparado a BRS Magna, sendo que as antocianinas e os DAHC foram as classes de compostos que mais se destacaram.

Palavras-chave: Compostos fenólicos. BRS Carmem. BRS Magna.

ABSTRACT

The qualitative and quantitative composition of phenolic compounds (FC) present in the edible parts of BRS Carmen and BRS Magna grapes, determined using high-performance liquid chromatography with diode array detector coupled to mass spectrometry system electrospray ionization and ion trap analyzer (HPLC-DAD-ESI-MS/MS). Based on the results and using the method of principal component multivariate analysis (PCA), was possible identify the FC that stand out because they are majority or minority: acetylated monoglucosides anthocyanins derived from petunidin and malvidin were the main markers of BRS Carmem hole fruit while in BRS Magna was caffeoylated diglucoside of delphinidin; in the case of flavonoids for both varieties, the majority were derived from myricetin; for the hydroxycinnamic acid derivatives (HCAD) the BRS Carmen hole fruit showed higher concentration of the isomer p-coumaric type while the BRS Magna showed higher concentration of cutaric acid; It was also noted the occurrence of stilbene type trans- and cis-piceid, although this cultivars have not showed to be rich in these compounds; and the markers of flavan-3-ols monomers in the seeds of BRS Carmen and BRS Magna were the epicatechin and catechin types, respectively. Quantitatively, the seeds accumulated most of the CF, with differences in the phenolic profiles found for hole fruits, seeds and their respective seeds. It can be seen that the BRS Carmen hole fruit showed concentration of CF, significantly higher, compared with BRS Magna, thus anthocyanins and DAHC were the classes of compounds that stood out.

Keywords: Phenolic compounds. *Vitis-labrusca*. Hybrid grape. BRS Carmem. BRS Magna.

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Exemplo das antocianidinas (forma de cátion flavílio) mais comuns.....	24
Tabela 2. Estrutura dos flavonóis.....	28
Tabela 3. Estrutura dos flavan-3-óis.....	31
Tabela 4. Estrutura dos ácidos hidroxicinâmicos.....	34
Tabela 5. Características espectrais EM e EM/EM das antocianinas identificadas nas uvas BRS Carmem (frutas inteiras) e BRS Magna (frutas inteiras e cascas) por CLAE-DAD-IES-EM/EM (modo positivo de ionização), proporção molar (valor médio $\pm$ desvio padrão, $n = 3$) e concentração de diglicosiladas (como equivalente de malvidina-3,5-diglicosídeo), de monoglicosiladas (como equivalente de malvidina-3-glicosídeo) e de total (como equivalente de malvidina-3,5-diglicosídeo).....	53
Tabela 6. Características espectrais EM e EM/EM, proporção molar (valor médio $\pm$ desvio padrão, $n = 3$) dos flavonóis identificados nas uvas BRS Carmem e BRS Magna (fruta inteira e cascas) por CLAE-DAD-IES-EM/EM, perfil de flavonóis por tipo de aglicona e concentração total expresso em mg equivalente de quercetina/kg de uva.....	65
Tabela 7. Características espectrais EM e EM/EM, dos derivados de ácido hidroxicinâmico (DAHC) identificados nas uvas BRS Carmem e BRS Magna (fruta inteira e cascas isoladas) por CLAE-DAD-IES-EM/EM (modo negativo de ionização), proporção molar (valor médio $\pm$ desvio padrão, $n = 3$) e concentração total (como mg equivalentes de ácido caftárico).....	72
Tabela 8. Características espectrais de EM e EM/EM dos estilbenos identificados nas uvas BRS Carmem e BRS Magna (casca e semente) por CLAE-DAD-IES-EM/EM (modo negativo de ionização), concentração de cada composto (mg equivalentes de resveratrol/kg de uva), valor médio $\pm$ desvio padrão, $n = 2$ para as amostras da BRS Carmem e $n=3$ para BRS Magna.....	78

Tabela 9. Flavan-3-óis (monômeros e dímeros), e proantocianidinas (detalhadas em unidades terminais e de extensão), identificados nas cascas e sementes das uvas BRS Carmem e BRS Magna, por CLAE-DAD-IES-EM/EM (modo negativo de ionização), soma dos monômeros, dímeros, total de flavan-3-óis e porcentagem de proantocianidinas (valor médio $\pm$ desvio padrão, n = 2 para as BRS Carmem e n=3 para BRS Magna).....	82
Tabela 10. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das frutas inteiras (com sementes) das uvas BRS Carmem e BRS Magna.....	93

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Genealogia da cultivar BRS Carmem.....	19
Figura 2. Ilustração dos cachos das uvas BRS Carmem (a) e BRS Magna (b).....	20
Figura 3. Genealogia da cultivar BRS Magna.....	20
Figura 4. Principais compostos fenólicos presentes nas uvas.....	22
Figura 5. Estrutura básica dos flavonoides: 2-fenilbenzopirano (a) e 2-fenilbenzopirona (b).....	23
Figura 6. Estrutura de algumas antocianinas.....	26
Figura 7. Espectro UV-vis dos flavonóis.....	28
Figura 8. Exemplos de flavonol 3-O-glicosídeos.....	30
Figura 9. Formula estrutural das proantocianidinas.....	33
Figura 10. <i>Trans</i> -resveratrol e seus derivados.....	36
Figura 11. Sementes das cultivares BRS Carmem (11a) e BRS Magna (11b).....	42
Figura 12. Cromatogramas das antocianinas presentes nas uvas BRS Carmem (fruta inteira, a), BRS Magna (fruta inteira, b; e cascas, c), obtidos por CLAE-DAD a 520 nm (A identificação dos picos está apresentada na Tabela 5).....	54
Figura 13. Cromatogramas de íons extraídos (EIC) no modo de ionização positivo para os valores de m/z correspondentes as diferentes agliconas (303, dp; 287, cy; 317, pt; 301, pn; 331, mv). Exemplificado para as cascas da uva BRS Carmem.....	55
Figura 14. Análise de componentes principais (a) das amostras de fruta inteira de uvas BRS Carmem (CAR-FRU) e de BRS Magna (MAG-FRU), e das amostras de casca de uvas BRS Magna (MAG-CAS) e (b) da composição de antocianinas.....	62
Figura 15. Cromatogramas dos flavonóis presentes nas uvas BRS Carmem (cascas (a) e fruta inteira (b)), BRS Magna (cascas (c) e fruta inteira (d)), obtidos por CLAE-DAD a 360 nm (A identificação dos picos está apresentada na Tabela 6).....	66

Figura 16. Análise dos componentes principais (a) para as amostras de fruta inteira (FRU) e casca (CAS) das uvas BRS Carmem (CAR) e BRS Magna (MAG) e (b) da composição de flavonóis.....	70
Figura 17. Cromatogramas dos derivados do ácido hidroxicinâmico presentes nas uvas BRS Carmem (cascas (a) e fruta inteira (b)) e BRS Magna (cascas (c) e fruta inteira (d)), obtidos por CLAE-DAD a 320 nm (A identificação dos picos está apresentada na Tabela 7).....	73
Figura 18. Análise dos componentes principais (a) para as amostras de fruta inteira (FRU) e casca (CAS) das uvas BRS Carmem (CAR) e BRS Magna (MAG), e (b) da composição de derivados do ácido hidroxicinâmico.....	76
Figura 19. Cascas da uva BRS Carmem: Cromatogramas de íons extraídos por MRM para estilbenos (a); Cromatogramas de íons extraídos por MRM para, flavan-3-óis monómeros e proantocianidinas dímeras do tipo B antes (a) e depois (b) da reação de despolimerização com pirogalol.....	79
Figura 20. Cascas da uva BRS Magna: Cromatogramas de íons extraídos por MRM para estilbenos (a); Cromatogramas de íons extraídos por MRM para, flavan-3-óis monómeros e proantocianidinas dímeras do tipo B antes (a) e depois (b) da reação de despolimerização com pirogalol.....	80
Figura 21. Sementes da uva BRS Carmem: Cromatogramas de íons extraídos por MRM para, flavan-3-óis monómeros e proantocianidinas dímeras do tipo B antes (a) e depois (b) da reação de despolimerização com pirogalol.....	83
Figura 22. Sementes da uva BRS Magna: Cromatogramas de íons extraídos por MRM para, flavan-3-óis monómeros e proantocianidinas dímeras do tipo B antes (a) e depois (b) da reação de despolimerização com pirogalol.....	84
Figura 23. Análise dos componentes principais (a) para as amostras de cascas (CAS) e sementes (SEM) das uvas BRS Carmem (CAR) e BRS Magna (MAG), e (b) da composição de estilbenos, flavan-3-óis monômeros e dímeros e proantocianidinas.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

N	número do composto
ND	não detectado
ACP	análise dos componentes principais
CP	componente principal
CAR-FRU	amostra BRS Carmem fruta inteira
CAR-CAS	amostra BRS Carmem casca
MAG-FRU	amostra BRS Magna fruta inteira
MAG-CAS	amostra BRS Magna casca
cy	Cianidina
dp	Delfinidina
mv	Malvidina
pg	Pelargonidina
pn	Peonidina
pt	Petunidina
glc	Glicosídeo
gal	Galactosídeo
glcU	Glucuronídeo
diglc	Diglicosídeo
acglc	6"-acetil-glicosídeo
cmglc	6"- <i>p</i> -cumaril-glicosídeo
cfglc	6"-cafeil-glicosídeo
K	Kaempferol
Q	Quercetina
I	Isoramnetina
M	Miricetina
L	Laricitrina
S	Siringetina
C	(+)-catequina
EC	(-)-epicatequina

GC	(+)-galocatequina
EGC	(-)-epigalocatequina
CG	(-)-galato-3-catequina
ECG	(-)-galato-3-epicatequina
GCG	(+)-galato-3-galocatequina
EGCG	(-)-galato-3-epigalocatequina
term-	unidade terminal
ext-	unidade de extensão
CO ₂	dióxido de carbono
<i>m/z</i>	relação massa carga
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
IES	sistema de ionização por eletronebulização
EM	espectrometria de massas
EIC	Cromatogramas de íons extraídos
DAHC	derivados do ácido hidrocixinâmico
PA	Proantocianidina
MRM	monitoramento de reações múltiplas

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Panorama nacional de uvas.....	18
3.2 Principais compostos fenólicos presentes nas uvas.....	21
3.2.1 Antocianinas.....	23
3.2.2 Flavonóis.....	27
3.2.3 Flavan-3-óis e proantocianidinas.....	30
3.2.4 Derivados do ácido hidroxicinâmico.....	34
3.2.5. Estilbenos.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Reagentes químicos e padrões.....	37
4.2. Uvas.....	38
4.3 Preparo dos extratos fenólicos.....	39
4.4 Análises básicas.....	42
4.4.1 Determinação da concentração de compostos fenólicos totais.....	42
4.4.2 Determinação da atividade antioxidante.....	43
4.5 Identificação e quantificação de compostos fenólicos presentes nas uvas BRS Carmem e BRS Magna (fruta inteira, casca e semente) por CLAE-DAD-IES-EM ⁿ	43
4.5.1 Antocianinas, flavonóis e derivados do ácido hidroxicinâmico.....	44
4.5.2 Flavan-3-óis monômeros e dímeros, proantocianidinas e estilbenos.....	46
4.6 Análises Estatísticas.....	51

	Pág.
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	52
5.1 Identificação e quantificação por CLAE-DAD-IES-EM ⁿ dos compostos fenólicos presentes nas uvas BRS Carmem e BRS Magna.....	52
5.1.1 Antocianinas.....	52
5.1.2 Flavonóis.....	64
5.1.3 Derivados do ácido hidroxicinâmico.....	71
5.1.4 Estilbenos, flavan-3-óis e proantocianidinas.....	77
5.1.5 Determinação da concentração de composto fenólicos totais e atividade antioxidante das uvas BRS Carmem e BRS Magna.....	92
6 CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS.....	91
ANEXO	
Anexo 1. Curva Padrão do ácido gálico para quantificação dos compostos fenólicos totais por metodologia de Follin- Ciocateau.....	110
Anexo 2. Curva Padrão para quantificação da atividade antioxidante pela metodologia de DPPH.....	110
Anexo 3. Curva Padrão para quantificação da atividade antioxidante pela metodologia de FRAP.....	111

1 INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos são compostos químicos naturais em frutas, com destaque para as uvas. Além de alegações de propriedades funcionais, estão diretamente envolvidos com características sensoriais como cor, sabor e sensação de adstringência dos alimentos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; DOHADWALA; VITA, 2009; XIA et al., 2010; CHUANG; MCINTOSH, 2011; GEORGIEV; ANANGA; TSOLOVA, 2014).

A uva se enquadra entre as cinco frutas mais produzidas ao redor do mundo, 69,654 milhões de toneladas por ano (FAO, 2014). No Brasil, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) tem contribuído consideravelmente para o aumento da produção de uva ao desenvolver, por meio do melhoramento genético, novas cultivares como a BRS Carmem e BRS Magna que apresentam ciclos produtivos diferenciados, alta produtividade, além de características físico-químicas e sensoriais que agregam qualidade ao suco de uva, como sabor, alta concentração de compostos fenólicos e açúcares.

O objetivo do trabalho foi determinar por meio de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo acoplada à espectrometria de massas com sistema de ionização por eletronebulização e analisador de armadilha de íons (CLAE-DAD-IES-EMⁿ) o perfil fenólico (antocianinas, flavonóis, derivados do ácido hidroxicinâmico, estilbenos, flavan-3-óis monômeros e dímeros e proantocianidinas) das partes comestíveis das uvas BRS Carmem e BRS Magna, comparando os dados com outras cultivares híbridas e/ou típicas de *V. viníferas*. Além disso, foram determinadas, por métodos espectrofotométricos, a concentração de compostos fenólicos totais (por Follin-Ciocalteu) e a atividade antioxidante (por DPPH e FRAP) de ambas as cultivares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral foi determinar a composição fenólica das partes comestíveis das cultivares de uva BRS Carmem e BRS Magna utilizando CLAE-DAD-IES-EM-EMⁿ e comparar os resultados obtidos com outras uvas híbridas e *Vitis viníferas*. Além de um estudo comparativo entre estes perfis encontrados, utilizando análise multivariada de componentes principais, visando identificar as principais diferenças entre as cultivares brasileiras estudadas.

2.2 Objetivos específicos

i) Determinar a concentração de compostos fenólicos totais, bem como atividade antioxidante das uvas BRS Carmem e BRS Magna inteiras por espectrofotômetro;

ii) Determinar a composição fenólica detalhada (antocianinas, flavonóis, derivados do ácido hidroxicinâmico, estilbenos, flavan-3-óis monômeros e dímeros e proantocianidinas) das partes comestíveis das uvas BRS Carmem e BRS Magna empregando CLAE-DAD-IES-MS/MS.

iii) Realizar um estudo comparativo dos resultados referentes ao perfil fenólico bem como da concentração total das principais classes de compostos fenólicos utilizando análise de componentes principais a fim de verificar os componentes marcadores dentro de cada classe de compostos para cada parte de uva estudada.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Panorama nacional de uvas

No país, as primeiras variedades de uvas introduzidas foram as consideradas finas (*Vitis vinifera*), as quais foram cultivadas na Europa e trazidas pelos portugueses. Somente no século XIX, a viticultura brasileira foi consolidada por meio da introdução da uva híbrida Isabel (*V. vinifera* × *Vitis labrusca*), trazida pelos italianos. O primeiro ciclo de expansão da viticultura teve então como base o cultivo de uvas americanas, rústicas e adaptadas às condições edafoclimáticas locais. Em função desta trajetória, a vitivinicultura brasileira atual é caracterizada pela produção de uma diversidade de uvas finas (*V. vinifera*), americanas (*V. labrusca* e outras espécies) e híbridas primárias e secundárias destinadas tanto para consumo *in natura* quanto para o processamento que demandam necessidades diferenciadas de cultivo em cada região produtora (CAMARGO; MAIA; RITSCHER, 2010).

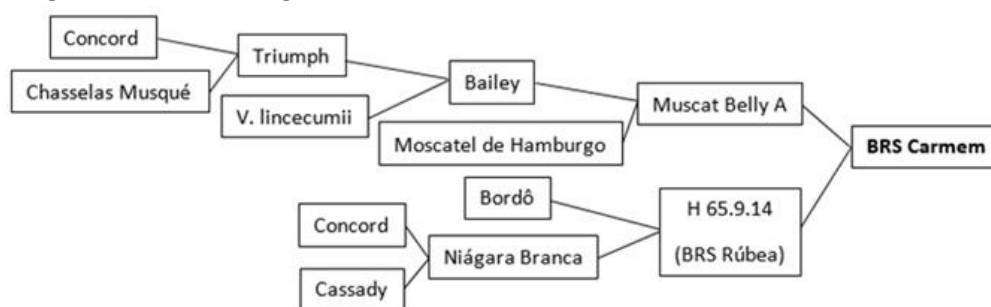
De acordo com a FAO (2014), entre 2000 e 2013, o crescimento na produção de uva, no Brasil, foi de 40,51%, especialmente as destinadas ao processamento. No Brasil em 2015, sua produção foi estimada em 1.467.148 toneladas (IBGE, 2015). Na elaboração de sucos, as variedades comumente utilizadas como matéria prima, no Brasil, são Isabel, Concord e Bordô todas *Vitis labrusca*. Para obter um produto final atrativo sensorialmente (cor, aroma e sabor), muitas vezes, torna-se necessário realizar uma mistura dos sucos obtidos das três cultivares (CAMARGO; MAIA; RITSCHER, 2010).

Nos últimos anos, a Estação Experimental de Viticultura Tropical da Embrapa, de Jales, São Paulo, em parceria com a UNESP, Campus de São José do Rio Preto, São Paulo, e empresas interessadas no crescimento deste setor, têm unido esforços para instruir e incentivar os viticultores na forma mais adequada de inserirem estas novas cultivares em suas propriedades visando o cultivo, produção e processamento.

Dentre estas novas cultivares, a BRS Violeta (BRS Rúbea x IAC 1398-21) apresenta expressivo concentrações de compostos fenólicos (REBELLO et al., 2013; BARCIA et al., 2014) e se mostra como matéria-prima promissora para elaboração de sucos prontos para consumo (CAMARGO; MAIA; NACHTIGAL, 2005; LIMA, 2014), sucos desidratados (TAVARES et al., 2014) e vinhos tintos jovens (LAGO-VANZELA et al., 2013, 2014). Há outras cultivares de uva, também desenvolvidas pela Embrapa, com potencial para elaboração de produtos derivados, que demandam por novos estudos. Entre estas pode-se citar as cultivares BRS Carmem e BRS Magna.

A uva BRS Carmem é resultante do cruzamento entre a Muscat Belly A e H 65.9.14 (BRS Rúbea) (**Figura 1**), sendo lançada como alternativa para a ampliação do período de processamento e melhoria da qualidade do suco de uva brasileiro produzido com as cultivares tradicionais, especialmente com relação a cor e o rendimento industrial (CAMARGO; MAIA; RITSCHER, 2008).

Figura 1. Genealogia da cultivar BRS Carmem.

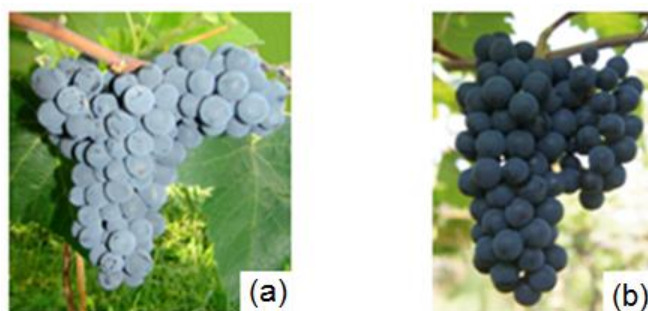


Fonte: CAMARGO; MAIA; RITSCHER (2008).

Esta cultivar possui sabor agradável, típico de *V. labrusca*, com teor de açúcar em torno de 19 °Brix, acidez total e pH de, 70 meq por L e 3,60, respectivamente. Os cachos da BRS Carmem (**Figura 2a**) apresentam bagas de tamanho médio (17 mm x 19 mm), forma ligeiramente elíptica, cor preto-azulada, casca grossa e resistente, polpa incolor, ligeiramente firme e sementes com 6,20 g/100 sementes, sendo

que cada baga apresenta em torno de 4 sementes (CAMARGO; MAIA; RITSCHER, 2008).

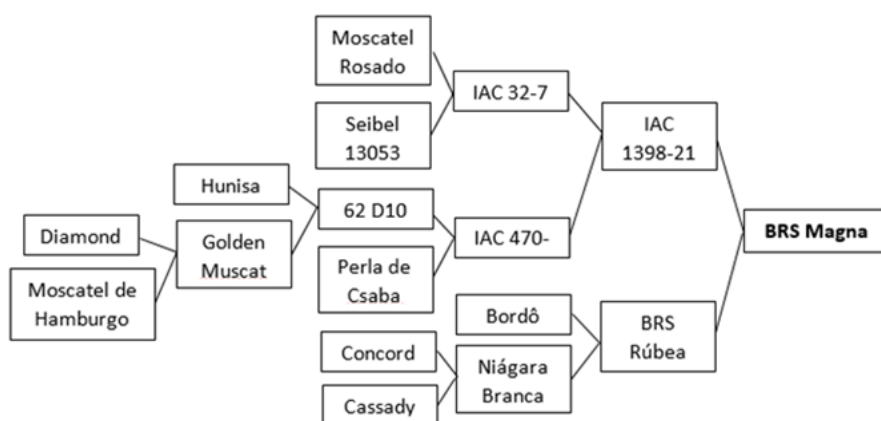
Figura 2. Ilustração dos cachos das uvas BRS Carmem (a) e BRS Magna (b).



Fonte: CAMARGO; MAIA; RITSCHER (2008) e RITSCHER et al. (2012).

Já a BRS Magna (**Figura 2b**), obtida pelo cruzamento BRS Rúbea x IAC 1398-21 (Traviú) (**Figura 3**), também foi desenvolvida para atender as mesmas necessidades descritas para a cultivar BRS Carmem, apresentando ciclo intermediário e ampla adaptação climática (RITSCHER et al., 2012).

Figura 3. Genealogia da cultivar BRS Magna.



Fonte: RITSCHER et al. (2012).

Colhida no mês de fevereiro, em plena maturação, apresenta sabor de framboesa agradável, típico de *V. labrusca*, com bagas de tamanho

médio (18 mm x 20 mm), esféricas, de cor preto-azulada, cascas de espessura média, polpa macia apresentando pigmentação de intensidade fraca e sementes com 2,8 g/100 sementes, sendo que cada baga apresenta em torno de 2 sementes. Esta cultivar apresenta contendo teor de açúcar em torno de 17 - 19 °Brix, acidez total de 90 meq por L e pH na faixa de 3,60. A uva BRS Magna, devido a suas características, também pode ser utilizada para a elaboração de suco varietal ou para cortes com outras cultivares (RITSCHER et al., 2012).

Na região Noroeste do Estado de São Paulo, considerada a maior produtora de uvas na entressafra do país, com a colaboração da Estação Experimental da Embrapa localizada em Jales, vitivinicultores vem desempenhando papel fundamental durante processo de desenvolvimento e adaptação das novas cultivares as regiões tropicais, testando as seleções avançadas em condições reais de produção. Os produtores desta região estão interessados em investir na elaboração de produtos derivados de uva para aumentar a renda familiar.

Desta forma, o estudo do perfil qualitativo e quantitativo dos compostos fenólicos presentes nas novas cultivares citadas pode ser um marco inicial para avaliar sua aplicabilidade como matéria prima no desenvolvimento de diferenciados produtos de interesse para os produtores rurais bem como para a indústria alimentícia.

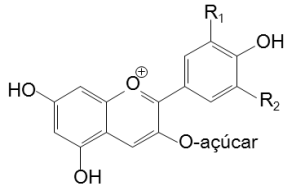
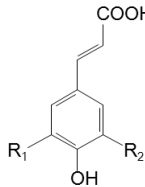
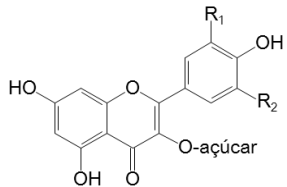
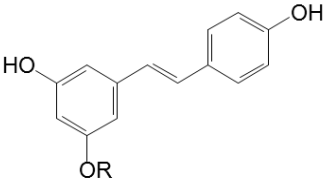
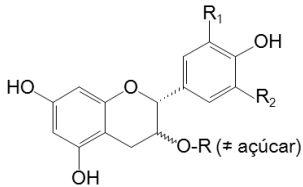
3.2 Principais compostos fenólicos presentes nas uvas

Os compostos fenólicos englobam desde moléculas simples até aquelas com elevado grau de polimerização (STALICAS, 2007), sendo comumente classificados como flavonoides e não-flavonoides (**Figura 4**).

O primeiro grupo é composto pelas antocianinas, flavonóis e flavan-3-óis e estão presentes, principalmente, nas cascas das uvas, mas podem ocorrer ocasionalmente na polpa. Estes apresentam estrutura química descrita como C6-C3-C6, constituída de dois anéis fenólicos 'A' e

'B', ligados por um centro pirano (heterociclo contendo oxigênio) anel 'C', sendo que os átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila adjacentes (*orto*-difenois) estão localizados em várias posições dos anéis 'A', 'B' e 'C' (SILVA et al., 2010).

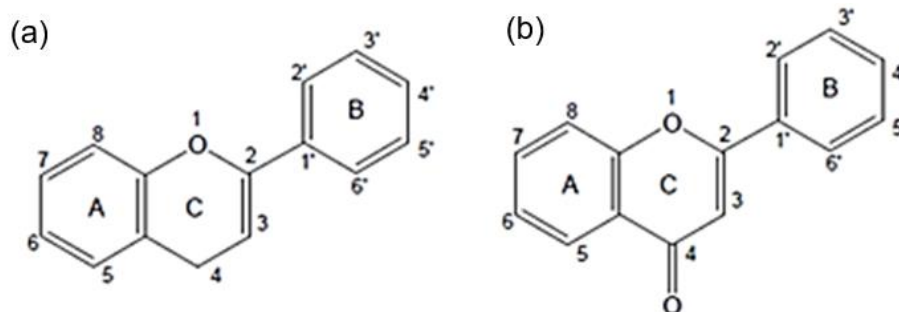
Figura 4. Principais compostos fenólicos presentes nas uvas.

Flavonoides	Não - Flavonoides
<i>Antocianinas</i> 	<i>Derivados do ácido hidroxicinâmico</i> 
<i>Flavonóis</i> 	<i>Estilbenos</i> 
<i>Flavan-3-óis (Taninos)</i> 	

Fonte: LAGO-VANZELA (2011).

Dependendo do estado de oxidação do anel central 'C', os flavonoides podem ser do tipo 2-fenilbenzopirano (**Figura 5a**) ou do tipo 2-fenilbenzopirona (**Figura 5b**) (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006).

Figura 5. Estrutura básica dos flavonoides: 2-fenilbenzopirano (a) e 2-fenilbenzopirona (b).



Fonte: ANDERSEN; JORDHEIM (2006).

Já no grupo dos compostos fenólicos não flavonoides pode-se destacar os derivados do ácido hidroxicinâmico e os estilbenos (com destaque para o resveratrol) os quais estão presentes, principalmente, na casca e na semente das uvas (JACKSON, 1994; LAGO-VANZELA, 2011).

A grande diversidade das cultivares brasileiras resulta em uvas e derivados com diferentes características, tanto de sabor quanto de coloração, o que certamente está associado com a concentração e o perfil dos compostos fenólicos de cada cultivar (LAGO-VANZELA, 2011). Sabe-se também que tanto o perfil qualitativo quanto o quantitativo destes compostos nas uvas variam conforme a espécie e condições de cultivo de cada cultivar (DOWNEY et. al., 2006).

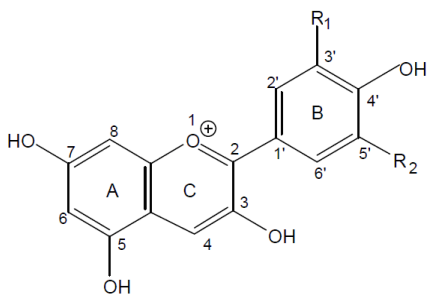
3.2.1 Antocianinas

As antocianinas são pigmentos naturais com estruturas fenólicas variadas encontradas abundantemente na natureza (VOLP et al., 2008). Estas estão presentes, principalmente, nas cascas e nas três ou quatro primeiras camadas das células hipodérmicas, em escala subcelular, nos vacúolos celulares das uvas de cascas tintas (LAGO-VANZELA et al., 2015), sendo que também se encontram em menor proporção, na polpa de algumas cultivares tal como a BRS Violeta (CAMARGO; MAIA;

NACHTIGAL, 2005), BRS Magna (RITSCHER et al., 2012) e a Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b).

Por pertencerem ao grupo dos flavonoides, estes compostos constituem-se de dois anéis fenólicos A e B e um anel pirano heterocíclico C, sendo esta estrutura responsável pelo cromóforo de absorção de luz que confere a coloração atrativa às uvas, com nuances de cores entre vermelho e púrpura. Estes compostos apresentam agliconas, denominadas antocianidinas, que diferem entre si pelo número e posição dos grupos hidroxilas e/ou metoxilas na formação da sua estrutura. Dentre as 23 antocianidinas conhecidas, apenas cinco delas são mais frequentemente encontradas nos alimentos, sendo estas a cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina (**Tabela 1**) (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Tabela 1. Exemplo das antocianidinas (forma de cátion flavílio) mais comuns.

Estrutura básica da aglicona	Antocianidinas	Grupos substituintes
	Pelargonidina (Pg)	$R_1 = R_2 = H$
	Cianidina (Cy)	$R_1 = OH; R_2 = H$
	Peonidina (Pn)	$R_1 = OCH_3; R_2 = H$
	Delphinidina (Dp)	$R_1 = R_2 = OH$
	Petunidina (Pt)	$R_1 = OH; R_2 = OCH_3$
	Malvidina (Mv)	$R_1 = R_2 = OCH_3$

Fonte: LAGO-VANZELA (2011).

Embora não seja dominante, já foi encontrado em algumas uvas viníferas (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b) e não viníferas (WANG; RACE; SHRIKHANDE, 2003), antocianinas derivadas da pelargonidina.

Estas estruturas se encontram envolvidas em vários sistemas de equilíbrio quando em solução aquosa, como em um sistema de hidratação, de troca de prótons (equilíbrio ácido-base) e de abertura do

anel pirano. Em meio muito ácido ($\text{pH} < 1,5 - 2,0$), as antocianinas se encontram, predominantemente, na forma com carga positiva e se denominam como cátion flavílio (BROUILLARD, 1982).

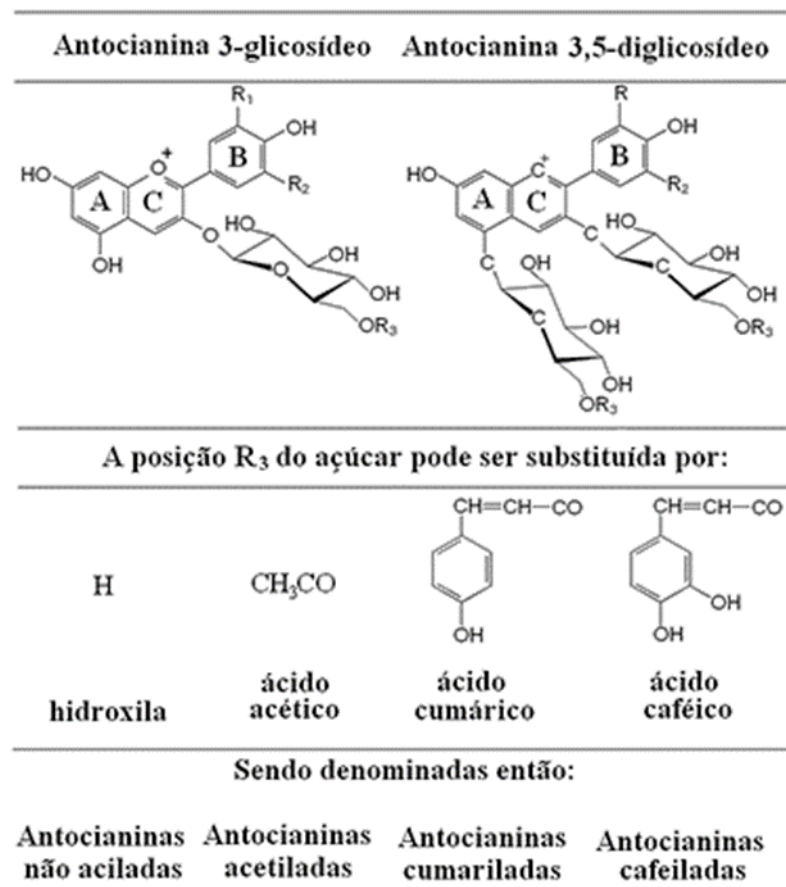
A deficiência em elétrons do núcleo flavílio das antocianinas é o que faz com que estas moléculas sejam altamente reativas, sendo encontradas na natureza ligadas a uma ou mais moléculas de açúcar (glicose, arabinose, ramnose, galactose, etc ou di- e trissacarídeos constituídos por estes açúcares). A glicose é o açúcar que se encontra majoritariamente ligado às antocianidinas, e com maior frequência nas posições C-3 do anel C e C-5 do anel A e, com raras exceções, podem estar ligados a posição C-7 do anel A (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009a).

A presença de açúcares ligados às posições 3, 7 e 5' do anel B das antocianidinas é mais raro devido a impedimentos estéricos dificultarem a glicosilação nestas posições (BROUILLARD, 1982).

As antocianinas podem ser classificadas como mono-, di- e triglicosídeos de acordo com o número de glicoses ligadas à antocianidina. Há casos em que estes açúcares estão esterificados com ácidos orgânicos ligados no carbono C-6 da glicose (BROUILLARD, 1982), os quais os mais comuns são o ácido acético, ácido *p*-cumárico, ácido caféico, entre outros (**Figura 6**).

As antocianinas não esterificadas são denominadas de antocianinas não aciladas, já as esterificadas são denominadas como aciladas e podem estar ligadas a um ou mais ácidos fenólicos, sendo antocianinas mono- e poliaciladas, respectivamente, e podem apresentar denominações diferenciadas de acordo com o substituinte da molécula de açúcar (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006).

A concentração de antocianinas totais, bem como de compostos fenólicos totais, nas uvas varia de acordo com a espécie, variedade/cultivar, maturidade e condições climáticas (MALACRIDA; MOTTA, 2005).

Figura 6. Estrutura de algumas antocianinas.

Fonte: LAGO-VANZELA et al. (2015) modificada.

Deve-se destacar que há diferenças qualitativas marcantes entre as antocianinas presentes em uvas viníferas e não-viníferas (espécies americanas e seus híbridos). As antocianinas 3-monoglicosiladas são, praticamente, o único tipo de antocianinas encontradas em variedades *V. vinífera*, enquanto que em variedades não viníferas, e em variedades/cultivares híbridas, também são encontradas antocianidinas 3,5-diglicosiladas, as vezes chegando a ser o tipo de antocianina predominante (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b). Esta diferença estrutural das antocianinas exerce influência marcante sobre sua cor e estabilidade durante o processamento (LAGO-VANZELA et al., 2014).

As altas proporções das antocianinas diglicosiladas cumariladas detectadas nas uvas e, posteriormente, nos vinhos BRS Violeta foram

consideradas como um fator de estabilidade intrínseca da sua cor vermelha, pois o grupo *p*-cumaril das antocianinas pode participar na formação de ambos os complexos de copigmentação inter- e intramoleculares contribuindo, assim, para melhorar a estabilidade das suas antocianinas (BROUILLARD; CHASSAING; FOUGEROUSSE, 2003; LAGO-VANZELA et al, 2013, 2014).

O interesse nas antocianinas, além da sua propriedade de coloração, também está relacionado devido a seus possíveis benefícios a saúde, como a atuação como antioxidantes, prevenindo doenças neurais, cardiovasculares, câncer, diabetes, inflamações, dentre outras doenças (KOŃCZAK; ZHANG, 2004; NICHENAMETLA et al., 2006; YOUSUF et al., 2015). O metabolismo bioquímico das antocianinas está envolvido com estes efeitos benéficos e no futuro pode fornecer alvos potenciais e estratégias terapêuticas para a melhoria de uma ampla variedade de doenças. Além disso, metabolitos específicos das antocianinas contribuem para a atividade biológica *in vivo* (LI et al., 2015)

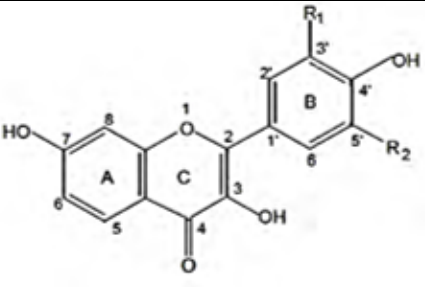
3.2.2 Flavonóis

Os flavonóis possuem estrutura básica semelhante as antocianidinas (C6-C3-C6), porém, sua característica principal está na presença dos grupos carbonilo e hidroxilo no anel C (LAGO-VANZELA, 2011). Castillo-Munõz et al. (2007) demonstraram que para as uvas tintas há a ocorrência de seis estruturas de flavonóis: kaempferol, quercetina, isoramnetina, miricetina, laricitrina e siringetina (**Tabela 2**).

Incolores ou de coloração amarela clara (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009a) estão localizados, principalmente, nas cascas das uvas, mas podem também ser encontrados em menores quantidades na polpa (LAGO-VANZELA et al., 2011b). Estes compostos estão envolvidos com a blindagem da fruta contra os raios UV devido à sua absorção nas regiões

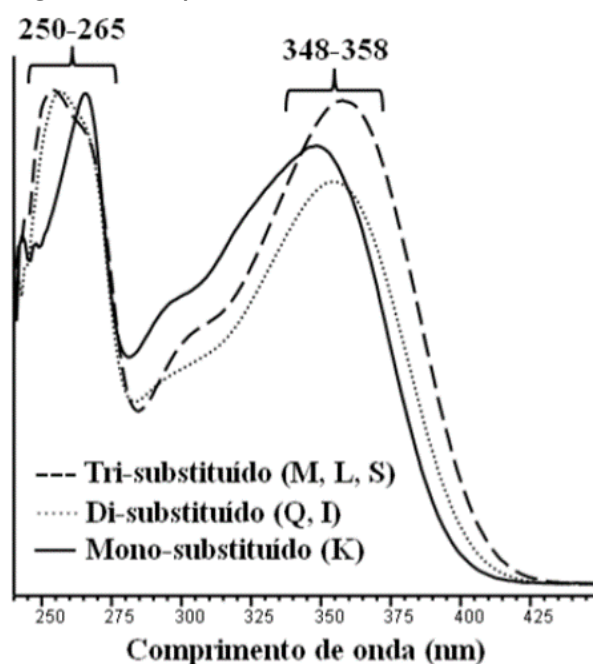
espectrais UV-B e UV-A (MATTIVI et al, 2006), com faixa de comprimento de onda entre 250-400 nm (**Figura 7**).

Tabela 2. Estrutura dos flavonóis.

Estrutura básica da aglicona	Flavonóis agliconas	Grupos substituintes
	Kaempferol (K)	$R_1 = R_2 = H$
	Quercetina (Q)	$R_1 = OH; R_2 = H$
	Isoramnetina (I)	$R_1 = OCH_3; R_2 = H$
	Miricetina (M)	$R_1 = R_2 = OH$
	Laricitrina (L)	$R_1 = OCH_3; R_2 = OH$
	Siringetina (S)	$R_1 = R_2 = OCH_3$

Fonte: LAGO-VANZELA (2011).

Figura 7. Espectro UV-vis dos flavonóis.



Fonte: LAGO-VANZELA et al. (2015).

Assim, sua biossíntese depende da incidência de luz sobre esta (DOWNEY et al., 2006) fazendo com que haja diferença de composição entre cachos e dentro de um mesmo cacho (quando se analisa uma parte mais exposta ou sombreada) de uma mesma variedade de uva (PRICE et

al., 1995). Em vinhos, são importantes na estabilização das antocianinas através da copigmentação (HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ et al., 2013).

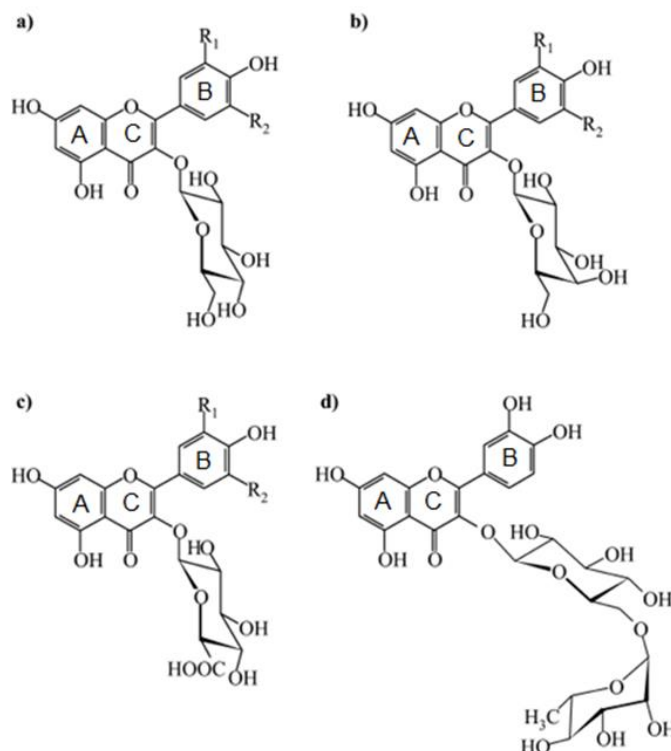
De acordo com Lago-Vanzela et al. (2015), estes compostos são encontrados nas uvas principalmente na forma de 3-O-glicosídeos, e em menor grau as agliconas estão ligadas às galactosídeo e glucuronídeos. Enquanto que as correspondentes agliconas livres podem ser encontradas em vinhos como resultado da hidrólise ácida que ocorre durante seu processamento. Este grau de hidrólise pode ser dependente da estrutura do flavonol e também do tipo de açúcar unido a aglicona. A glicose é o açúcar mais comum ligado à posição C-3 do anel C da aglicona, mas galactose e ácido glucurônico também têm sido relatados (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2007, 2009a).

Alguns autores enfatizam que as variedades glicosiladas de miricetina e de isoramnetina ocorrem, especificamente, em uvas tintas (**Figura 8**) (CHEYNIER; RIGAUD, 1986). Entretanto a literatura apresenta a detecção da isoramnetina-3-glicosídeo em variedades de uvas brancas (RODRIGUEZ-MONTEALEGRE et al., 2006).

Dentre os diversos estudos encontrados na literatura sobre este tema encontram-se alegações quanto ao efeito destes compostos na proteção contra doenças patogênicas, contra vários tipos de câncer (TSIMPLOULI et al., 2012), propriedades antibacteriana (URZUA; ECHEVERRIA; ESPINOZA, 2012) e redução da incidência de doenças cardiovasculares (PEREZ-VIZCAINO; DUARTE, 2010).

Por isto, alguns estudos recentes estão contribuindo significativamente para o conhecimento sobre estes compostos nas uvas (LAGO-VANZELA et al., 2011b; REBELLO et al. 2013; BARCIA et al., 2014; LECCE et al., 2014) e seus derivados, como sucos (ABE et al., 2007; TOALDO et al., 2015) e vinhos (MULERO et al., 2015; VALLVERDÚ-QUERALT et al., 2015).

Figura 8. Exemplos de flavonol 3-O-glicosídeos.

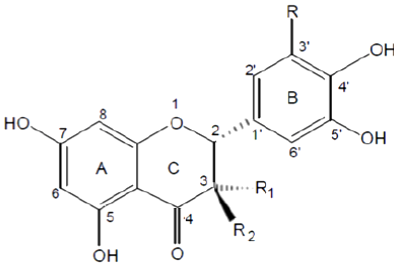


a) flavonol 3-O-glicosídeos; b) flavonol 3-O-galactosídeos; c) flavonol 3-O-glucuronídeos; d) rutina (quercetina 3-O-(6''-ramnosil)-glicosídeo). Estruturas flavonoides de acordo com a substituição no anel B. Fonte: CASTILLO-MUÑOZ et al. (2009b).

3.2.3 Flavan-3-óis e proantocianidinas

Os flavan-3-óis são encontrados, principalmente, nas sementes, cascas (TERRIER; PONCET-LEGRAND; CHEYNIER, 2009) e engaços das uvas e apresentam como unidades funcionais as estruturas monoméricas de 2-fenilbenzopiranos (C6-C2-C6) (**Tabela 3**) (RICARDO-DA-SILVA et al., 1991). Este é o grupo de compostos fenólicos mais complexo encontrado nas uvas e em vinhos, pois agrupam não somente moléculas mais simples, considerados monómeros de estrutura definida (como por exemplo a (+)-catequina, mas também moléculas mais complexa de estrutura não definida, que vem sendo denominados “taninos condensados”.

Tabela 3. Estrutura dos flavan-3-óis.

Estrutura básica da aglicona	Flavanóis agliconas	Grupos substituintes
	C	$R_1 = \text{OH}; R = R_2 = \text{H}$
	EC	$R = R_1 = \text{H}; R_2 = \text{OH}$
	ECG	$R = R_1 = \text{H}; R_2 = \text{O-G}$
	GC	$R = R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}$
	EGC	$R = R_2 = \text{OH}; R_1 = \text{H}$
	GCG	$R = \text{OH}; R_1 = \text{H}; R_2 = \text{O-G}$
	EGCG	$R = \text{OH}; R_1 = \text{O-G}; R_2 = \text{H}$

C, (+)-catequina; EC, (-)-epicatequina; ECG, (-)-galato-3-epicatequina; GC, (+)-galocatequina; EGC, (-)-epigalocatequina; GCG, (+)-galato-3-galocatequina; EGCG, (-)-galato-3-epigalocatequina.

Fonte: LAGO-VANZELA (2011).

Os flavan-3-óis monoméricos (+)-catequina e seu isômero (-)-epicatequina são os principais compostos presentes nas uvas (HASLAM, 1980), podendo estar em parte esterificados pelo ácido gálico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$), normalmente, pelo do carbono 3 (RICARDO-DA-SILVA et al., 1991).

As proantocianidinas, também conhecidas como taninos condensados, englobam a associação de várias unidades monoméricas de catequina ou epicatequina, dependendo da quantidade de vezes que esta unidade básica se repete, podendo ser proantocianidinas dímeras, trímeras, oligoméricas (até cinco unidades) ou poliméricas (acima de cinco unidades) (ADAMS, 2006). Estas unidades encontram-se unidas, principalmente, através de ligações interflavan nas posições C4-C8 ou C4-C6, e fazem parte dos principais compostos fenólicos presentes em muitos tecidos vegetais incluindo as uvas, da quais as sementes são consideradas uma das fontes mais ricas nestes compostos (ZHANG et al., 2015).

As variações estruturais destes compostos ocorrem devido ao número de monômeros ligados, posição de ocorrência das ligações, padrão de oxigenação nos anéis A e B da unidade e estereoquímica dos substituintes do anel C (TERRIER; PONCET-LEGRAND; CHEYNIER,

2009). Dependendo das antocianidinas liberadas, no caso da uva, especialmente cianidina e em menor proporção delphinidina, as moléculas precursoras recebem o nome de procianidinas (constituídas de (+)-catequina e (-)-epicatequina) e prodelfinidinas (constituídas de (+)-galocatequina e (-)-epigalocatequina), respectivamente (PRIEUR et al., 1994).

As procianidinas e as prodelfinidinas recebem esta denominação pois se submetidas à hidrólise ácida pode ocorrer então a formação de moléculas de cianidina ou delphinidina, respectivamente (GOMÉZ-PLAZA, 2008). As procianidinas são predominantes nas sementes das uvas, enquanto nas cascas são encontradas tanto procianidinas como prodelfinidinas (TERRIER; PONCET-LEGRAND; CHEYNIER, 2009).

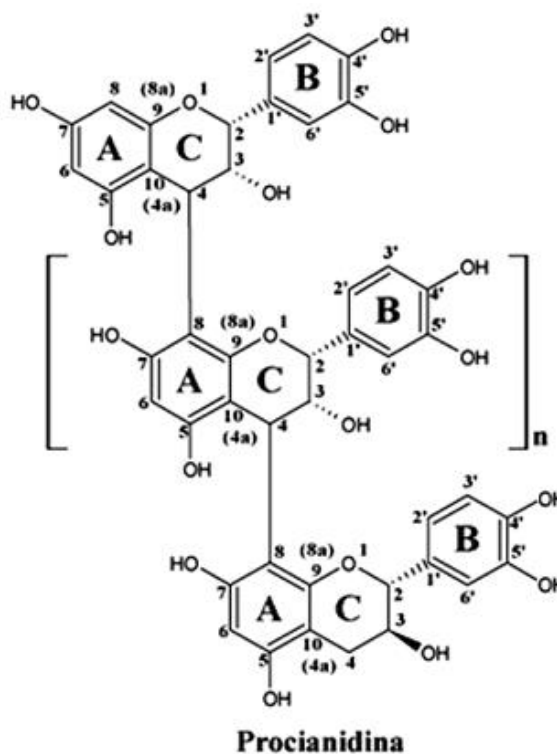
As procianidinas dímeras (**Figura 9**) são classificadas de acordo com o seu tipo de ligação interflavanólica, sendo divididas em dois grupos: A e B, onde as procianidinas do tipo B ($C_{13}H_{26}O_{12}$) são resultantes da condensação das unidades flavan-3-óis através de uma ligação entre o carbono 4 do anel C com o carbono 6 ou 8 do anel A. Os compostos formados pelas ligações C4-C8 compõem a série das procianidinas B1, B2, B3 e B4, enquanto os compostos formados pelas ligações C4-C6 compõem a série das procianidinas B5, B6, B7 e B8 (LAGO-VANZELA, 2011).

Além disso, as procianidinas dímeras são as primeiras a serem detectadas nas sementes enquanto nas cascas e engaços aparecem em diferentes concentrações; já na polpa, pequenas quantidades das proantocianidinas do tipo B1 e B4 são identificadas (TERRIER; PONCET-LEGRAND; CHEYNIER, 2009).

Os principais flavan-3-óis encontrados nas uvas são as proantocianidinas polimerizadas, constituídas por um elevado número de unidades monoméricas, unidas tanto na posição terminal quanto na posição superior, sendo a quantidade, grau e estrutura de polimerização

alterada de acordo com sua localização nas diferentes partes das uvas (MONAGAS; BARTOLOMÉ; GÓMEZ-CORDOVÉS, 2005).

Figura 9. Forma estrutural da proantocianidinas.



Fonte: QUEIROZ; MORAIS; NASCIMENTO (2002), adaptado.

As proantocianidinas possuem interesse nutricional e biológico por serem considerados potenciais antioxidantes (MANACH; MAZUR; SCALBERT, 2005; SÁ et al., 2014) devido à presença de um grupo catecol no anel B capaz de prontamente doar hidrogénio (elétron) para estabilizar uma espécie de radicais (WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004). Sua capacidade de remover radicais (SÁ et al., 2014) irá depender de sua estrutura e grau de polimerização (ZHANG et al., 2015). As proantocianidinas das cascas têm, normalmente, maior grau de polimerização (mDP) e uma menor porcentagem de subunidades de

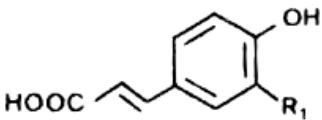
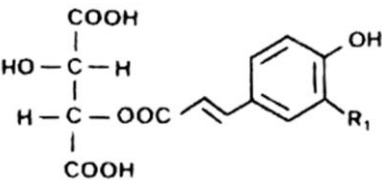
galoilação do que aqueles provenientes das sementes (CHEYNIER et al, 1997; MOUTOUNET et al., 1996).

Além disso, estudos sugerem que estes compostos possuem efeito cardioprotetor (KRUGER et al., 2014), antimicrobiano e antifúngico e, podem ser utilizados em processos de cura de feridas auxiliando a formação de uma camada protetora sobre os tecidos epiteliais lesionados (MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005).

3.2.4 Derivados do ácido hidroxicinâmico

Os derivados do ácido hidroxicinâmico fazem parte dos compostos fenólicos não flavonoides, e estão entre os principais ácidos presentes nas uvas. Encontram-se tanto nas cascas como na polpa das uvas, e geralmente, na forma de ésteres tartáricos, tais como o ácido caftárico e ácido cutárico (**Tabela 4**).

Tabela 4. Estrutura dos ácidos hidroxicinâmicos.

Estrutura básica	Ácido hidroxicinâmico	Grupos substituintes
	<i>p</i> -cumárico	R1 = H
	Caféico	R1 = OH
	Ferrúlico	R1 = OCH ₃
	<i>p</i> -cutárico	R1 = H
	Caftárico	R1 = OH
	Fertárico	R1 = OCH ₃

Fonte: Adaptado de MEYER et al. (1998).

Os derivados do ácido hidroxicinâmico são compostos por um anel benzênico ligado a uma ramificação de três carbonos (C6-C3), com um ácido carboxílico (BEER et al., 2002). Nas posições do R₁, R₂, R₃ e R₄ (localizadas no anel benzênico da molécula) podem, ou não, estar ligados grupos hidroxilas (-OH) ou metoxilas (-OCH₃), formando assim os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferrúlico, cutárico, caftárico ou fertárico.

Estes compostos são sintetizados pela rota dos fenilpropanóides, desempenhando papéis diferentes na fisiologia e propriedades das plantas, correlacionados com a síntese de proteínas, alelopatia e fotossíntese. Além disto, apresentam efeitos biológicos nos seres humanos, como funções antioxidantes, inibição de distúrbios cardiovasculares e neurológicas, redução do desenvolvimento de câncer e de doenças como Alzheimer e Parkinson (RUIZ et al., 2015).

3.2.5. Estilbenos

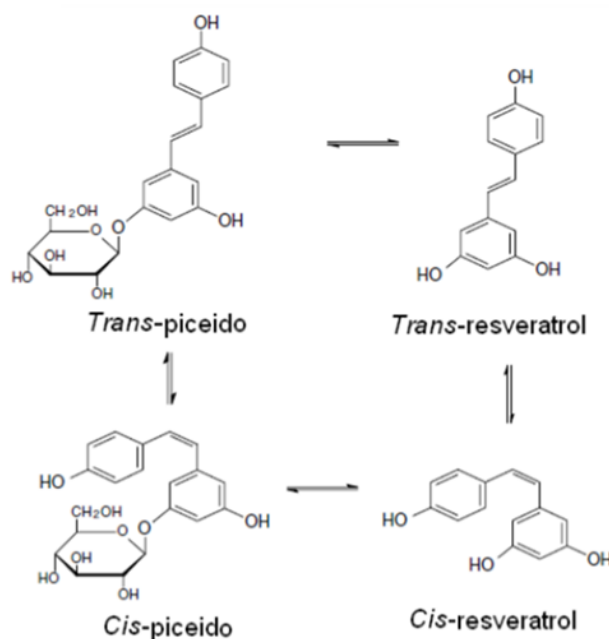
Os estilbenos são sintetizados em várias espécies vegetais, incluindo a *Vitis vinifera* L.. Dentre os principais compostos pertencentes a esta classe dos não flavonoides destacam-se o resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno), o piceido (*trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno-3-O-β-D-glicosídeo) e a astringina (3'-hidróxi-*trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno-3-O-β-D-glicosídeo) (BAVARESCO et al., 2007).

O resveratrol possui estrutura baseada no 1,2-difeniletileno e, como as fitoalexinas (compostos secundários antibacterianos) pode ser sintetizado, principalmente, nas cascas das uvas como respostas ao estresse causado por infecção com fungos, dano mecânico ou irradiação por luz ultravioleta (LAGO-VANZELA et al., 2015). Desta maneira, pode ser encontrado em uvas (SINGH; LIU; AHMAD, 2014), sucos (FREITAS et al., 2014) e vinhos (LACHENMEIER et al., 2014).

Este composto existe como isômero *trans*, considerada sua forma natural, ou como isômero *cis*, quando hidrolisado (sob luz ultravioleta).

Nas uvas, encontra-se unido a uma molécula de glicose através de um grupo fenol na posição 3. O composto 3-O-glicósideo de resveratrol também é conhecido pelos nomes de piceido e polidatina, e também podem estar nas formas *cis* e *trans* (**Figura 10**) (LAGO-VANZELA, 2011).

Figura 10. *Trans*-resveratrol e seus derivados.



Fonte: LAGO-VANZELA (2011).

O piceatanol é um homólogo superior do resveratrol, porém com um grupo OH adicional na posição 3" e seu 3-O-glicosídeo é chamado de astringina. A presença do grupo OH faz com que estes compostos (piceatanol e astringina) apresentem máximos de absorção UV a 302 e 321 nm, respectivamente (PÜSSA et al., 2006), diferentes do resveratrol, que possui absorção a 306 e 316 nm (ROMERO-PÉREZ, 1996).

Há evidências de que estes compostos possuem várias propriedades biológicas na saúde humana, tais como prevenir ou retardar o aparecimento de câncer, doenças cardíacas, diabetes, inflamação patológica, infecção viral, entre outras (BAUR; SINCLAIR, 2006; FERNÁNDEZ-MARÍN et al., 2013).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Padrões químicos

Todos os solventes utilizados possuíam grau cromatográfico (> 99%), bem como todos os padrões químicos eram de grau analítico (> 95%) e a água ultrapura (sistema Milli-Q). Foram utilizados os seguintes padrões da Phytolab (Vestenbergsgreuth, Alemanha): malvidina-3-glicosídeo, malvidina-3,5-diglicosídeo, peonidina 3,5-diglicosídeo, ácido *p*-cumárico, ácido *trans*-caftárico, *trans*-piceido, (-)-epigallocatequina e (-)-galocatequina. Os seguintes padrões comerciais da Extrasynthese (Genay, França): cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3,5-diglicosídeo, procianidina B1 e B2, quercetina, kaempferol, isorametina, miricetina, siringetina, os 3-glicosídeos de mirecitina, quercetina, kaempferol, isoramnetina, siringetina e os 3-galactosídeos de quercetina, kaempferol, miricetina e isoramnetina, (-)-galocatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-catequina-3-galato; Da Sigma Aldrich (Tres Cantos, Madrid, Espanha): ácido gálico, ácido cafeico, *trans*-resveratrol, (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epicatequina-3-galato e (-)-galocatequina-3-galato. Doação do padrão de procianidina B4 e de outros padrões de flavonóis não comerciais (miricetina-3-glicosídeo, quercetina-3-glucurosídeo e laricitrina-3-glicosídeo) que podem ter sido isolados a partir da casca da uva Petit Verdot usando metodologia descrita por Castillo-Muñoz et al. (2009). Os isômeros *trans* de resveratrol e piceido (resveratrol-3-glicosídeo) foram transformados nos seus respectivos isômeros *cis* utilizando irradiação UV (366 nm de luz durante 5 minutos em ampolas de quartzo) em solução metanólica de 25% dos seus respectivos isômeros *trans*.

Todos os padrões químicos foram utilizados para a identificação dos compostos, na construção das curvas de calibração cobrindo as faixas de concentrações esperadas. A determinação da concentração

total das principais classes de compostos (em mg do padrão equivalente por kg de uva) foi realizada como base nas curvas de calibração construídas com os compostos mais representativos de cada família de compostos fenólicos. Quando o padrão não estava disponível, a quantificação foi realizada usando a curva de calibração do composto mais similar.

Deste modo, as concentrações totais de antocianinas foram expressas em mg equivalente de malvidina-3,5-diglicosídeo, bem como foram apresentados os somatórios de monoglicosiladas, em mg equivalente de malvidina-3-glicosídeo e, de diglicosiladas, expressos em mg equivalente de malvidina-3,5-diglicosídeo; a concentração total de flavonóis foi expresso em mg equivalente de quercetina-3-glicosídeo.

Cada flavonol glicosídeo e suas agliconas livres identificados com seus respectivos padrões, o de derivados do ácido hidroxicinâmico em mg equivalente de ácido caftárico; o de flavan-3-óis, bem como a somatória dos seus monômeros e dos seus dímeros, em mg equivalente de (+)-catequina; o de proantocianidinas em mg equivalente de (+)-catequina; e, o de estilbenos em mg equivalente de resveratrol-3-glicosídeo.

Além disso, os flavan-3-óis individuais foram quantificados com seus respectivos padrões: mg equivalente de (+)-catequina, de (-)-epicatequina, de (-)-galocatequina, de (-)-epigalocatequina, de (-)-catequina-3-galato, de (-)-epicatequina-3-galato, procianidinas dos tipos B1, B2 e B4 por kg de fruta. Por fim, os estilbenos foram quantificados utilizando os isômeros *cis* e *trans* do resveratrol-3-glicosídeo.

4.2. Uvas

Lotes representativos das cultivares de uvas BRS Carmem e BRS Magna, da safra do ano de 2014, foram doadas pela Estação Experimental de Viticultura Tropical da Embrapa, da cidade de Jales, São Paulo, Brasil, localizado em 20°15'08" S e 50°33'29" O, 500 m acima do

nível do mar (referido datum WGS84, World Geodetic System 1984). Para o transporte, as frutas foram acondicionadas em caixas plásticas e levadas até o Laboratório de Processamento de Frutas e Hortaliças da Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

No laboratório, as bagas que apresentaram algum tipo de imperfeição, como rachaduras ou podridão, foram separadas do engaço e desprezadas. Os cachos selecionados foram misturados manualmente para obtenção de um lote homogêneo e armazenados sob congelamento ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) até o momento das análises.

As características físico-químicas foram determinadas segundo a AOAC (2005), obtendo para a uva BRS Carmem: umidade, $74,39\% \pm 0,16$; pH, $3,56 \pm 0,29$; acidez titulável total, $0,82\text{ g} \pm 0,10$ de ácido tartárico por 100 g de uva; e, sólidos solúveis totais, $19,50\text{ }^{\circ}\text{Brix} \pm 0,00$; enquanto que para a uva BRS Magna foram de: umidade, $73,69\% \pm 1,55$; pH, $3,80 \pm 0,06$; acidez titulável total, $0,86\text{ g} \pm 0,04$ de ácido tartárico por 100 g de uva; sólidos solúveis totais, $19,50\text{ }^{\circ}\text{Brix} \pm 0,00$.

As uvas BRS Carmem e BRS Magna apresentaram tamanho e massa médios por baga, respectivamente, de $13,6 \times 15,5\text{ mm}$ e $2,28\text{ g} \pm 0,31$ e de $14,3 \times 17,1\text{ mm}$ e $2,89\text{ g} \pm 0,71$. Além disso, as proporções de polpa, casca e semente correspondentes a uma baga de cada cultivar foram de 66,9%, 28,8% e 4,3% para a BRS Carmem, e de 67%, 30,0% e 3,0% para a BRS Magna.

4.3 Preparo dos extratos fenólicos

Para a determinação do perfil qualitativo e quantitativo dos compostos fenólicos presentes nas frutas inteiras, cascas e sementes das cultivares de uva BRS Carmem e BRS Magna, realizou-se a extração dos compostos de interesse, utilizando metodologia descrita por Lago-Vanzela et al. (2011a, b) com modificações.

No caso das uvas inteiras (com sementes), 100 g de baga de cada cultivar, em triplicata, foram pesadas, homogeneizadas, com auxílio de mixer, com 100 mL de solução contendo metanol: ácido fórmico (97:3, v/v) e, expostas a banho de ultrassom por 10 minutos. Visando a extração exaustiva dos compostos fenólicos contidos nas uvas, as amostras foram centrifugadas (Modelo CR-G111 series, Hitachi) a 9400 g por 5 °C durante 10 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram reservados sob refrigeração (± 7 °C) e os precipitados foram submetidos a mais duas extrações consecutivas com 50 mL de solução contendo metanol, água e ácido fórmico (50:48,5:1,5, v/v/v), seguindo procedimento descrito anteriormente, os sobrenadantes das centrifugações de cada repetição foram unidos obtendo-se ao final três extratos referentes a cada repetição da fruta inteira para cada cultivar.

Para as cascas, cada 100 g de bagas de cada cultivar, em triplicata, foram pesadas e, posteriormente, tiveram suas cascas removidas manualmente, com o auxílio de facas de aço inoxidável. As porções de cascas isoladas foram então pesadas, homogeneizadas, com o auxílio de mixer, com 50 mL de solução contendo metanol, água e ácido fórmico (50:48,5:1,5, v/v/v) e, expostas a banho de ultrassom por 10 minutos. As amostras foram então centrifugadas (Modelo CR-G111 series, Hitachi) a 9400 g por 5 °C durante 10 minutos, os sobrenadantes obtidos foram reservados sob refrigeração (± 7 °C) e, os precipitados foram submetidos a mais duas extrações com o mesmo solvente seguindo o procedimento anterior, os sobrenadantes das centrifugações de cada repetição foram unidos obtendo-se ao final três extratos referentes a cada repetição da fruta inteira para cada cultivar.

Os extratos obtidos para as frutas inteiras e cascas, para cada cultivar, foram submetidos à rotoevaporação (Modelo Hei-Vap Advantage, Heidolph) a 35 °C para retirada do metanol, liofilizados (Modelo Modulyo D Freeze Dryer, da Thermo Electron Corporation) e pesados. Para a determinação da composição fenólica detalhada das uvas BRS Carmem e

BRS Magna utilizando CLAE-DAD-IES-EMⁿ, uma parte dos extratos liofilizados obtidos foram acondicionados em frascos de vidro âmbar, adequadamente, lacrados e enviados para o Laboratório de Investigación em Enología da Universidade de Castilla La-Mancha - UCLM (Ciudad Real, Espanha), onde foram realizadas as análises. O restante dos extratos foi acondicionado em frascos de vidro âmbar adequadamente lacrado e, congelado a -80 °C, para posterior realização das análises de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.

Nesta universidade, alíquotas de 0,3 g dos extratos liofilizados referentes as uvas inteiras foram ressuspensos em 5 mL de solução de HCl 0,1N enquanto alíquotas de 0,45 g dos extratos liofilizados referentes as cascas das uvas foram ressuspensos em 7,5 mL de solução de HCl 0,1N.

Para as sementes da BRS Carmem (**Figura 11a**) e BRS Magna (**Figura 11b**), amostras de bagas de cada cultivar (entre 50 e 70 g), em triplicata, foram pesadas e suas sementes foram isoladas com auxílio de faca de aço inoxidável (cortando-se as bagas ao meio para facilitar a remoção das sementes).

Figura 11. Sementes das cultivares BRS Carmem (11a) e BRS Magna (11b).



Fonte: imagem obtida pela autora.

As sementes foram então limpas com papel toalha, pesadas, deixadas secar por 24 horas a temperatura ambiente e, embaladas a

vácuo para envio ao Laboratório de Investigación em Enologia (Espanha). Neste Laboratório, cada 2 g de sementes referentes a cada cultivar, em triplicata, foram pesadas, homogeneizadas, com auxílio de mixer e, então efetuou-se a extração das sementes seguindo os mesmos procedimentos descritos para as cascas das uvas. No caso das sementes, não foi necessário realizar a liofilização.

Visando evitar oxidação excessiva das amostras de polpa das uvas, as análises para determinação na composição qualitativa e quantitativa das antocianinas da BRS Magna foram realizadas nas cascas e nas frutas inteiras.

4.4 Análises básicas

Para a realização das análises espectrofotométricas, as amostras liofilizadas foram redissolvidas e padronizadas em balão volumétrico de 100 mL, utilizando 90 mL de solução de HCl 0,1N e água destilada para completar o volume. O espectrômetro utilizado foi da marca Molecular Devices, modelo Spectra max plus 384.

4.4.1 Determinação da concentração de compostos fenólicos totais

A determinação da concentração de compostos fenólicos totais (CFT) das frutas inteiras foram realizadas pelo método espectrofotométrico de Follin-Ciocauteau, de acordo com Ough e Amerine (1988), com concentrações obtidas através da curva padrão obtida para o ácido gálico (**Anexo 1**), com faixa de linearidade de 25-500 mg/L de ácido gálico e resultados expressos em mg equivalente de ácido gálico por kg de uva.

4.4.2 Determinação da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante (AA) das amostras foi realizada por meio do método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERST, 1995) e pelo método de FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) (BENZIE; STRAIN, 1996), com concentrações obtidas através da curva padrão obtida para o Trolox (**Anexo 2**), com faixa de linearidade de 0-0,560 mM e 205-725 μ M de Trolox para o DPPH e FRAP, respectivamente. Para ambas as metodologias os resultados foram expressos em mmol de equivalentes de Trolox por kg de uva.

4.5 Identificação e quantificação de compostos fenólicos presentes nas uvas BRS Carmem e BRS Magna (fruta inteira, casca e semente) por CLAE-DAD-IES-EMⁿ

Antocianinas e compostos fenólicos não antociânicos presentes nas uvas foram separadamente analisados de acordo com metodologia descrita por Rebello et al. (2013).

A separação, identificação e quantificação das antocianinas, flavonóis e derivados do ácido hidroxicinâmico nas uvas BRS Carmem e BRS Magna (fruta inteira, casca e semente) foram realizadas utilizando sistema cromatográfico composto por cromatógrafo Agilent 1100 Series (Agilent, Alemanha) equipado com detector de arranjo de diodos (Modelo G1315B, Agilent, Alemanha) e acoplado a um analisador de armadilha de íons (LC/MSD Trap VL, G2445C VL) por sistema de ionização por eletronebulização (IES-EMⁿ).

Utilizou-se coluna cromatográfica de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18 (2,1 $\times$ 150 mm; partícula de 3,5 μ m, Agilent, Alemanha) termostatizada a 40 °C, com uma taxa de fluxo de 0,19 mL por minuto.

Para a separação, identificação e quantificação dos flavan-3-óis monômeros, procianidinas dímeras do tipo B e proantocianidinas presentes nas amostras de casca e semente das uvas BRS Carmem e BRS Magna foi utilizado sistema cromatográfico composto por cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent 1200 Series (Agilent, Alemanha) equipado com detector de arranjo de diodos (Agilent, Alemanha) e acoplado ao analisador de massas do tipo híbrido quadrupolo-armadilha linear de íons (AB Sciex 3200 Q TRAP, Applied Biosystems) por sistema de ionização por eletronebulização (IES-EMⁿ).

Utilizou-se coluna cromatográfica de fase reversa Eclipse XDB-C18 (2,1 × 150 mm; partícula de 3,5 µm, Agilent, Alemanha) termostaticada a 16 °C, com uma taxa de fluxo de 0,10 mL por minuto.

4.5.1 Antocianinas, flavonóis e derivados do ácido hidroxicinâmico

Para a determinação do perfil qualitativo e quantitativo das antocianinas, alíquotas dos extratos ressuspensos obtidos das amostras foram diluídas (1:1, para fruta inteira e 1:2 para casca, v/v) em solução de HCl 0,1N, filtradas (0,20 µm, membrana de poliéster, Chromafil PET 20/25, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) diretamente em *vial* cromatográfico e injetadas (10 µL) na coluna cromatográfica.

Os solventes (Sol.) utilizados na fase móvel para análise de antocianinas foram: Sol. A, acetonitrila/água/ácido fórmico, 3:88,5:8,5, v/v/v; e, Sol. B, acetonitrila/água/ácido fórmico, 50:41,5:8,5, v/v/v; enquanto o gradiente linear para estes solventes foi: zero minuto, 94% A e 6% B; 10 minutos, 70% A e 30% B; 30 minutos, 50% A e 50% B; 34 minutos, 100% B; 36 minutos, 100% B; 42 minutos, 96% A e 4% B; e, 50 minutos, 96% A e 4% B.

Já para a análise de flavonóis e derivados do ácido hidroxicinâmico (DAHC), alíquotas (3 mL) de cada extrato obtido das amostras, em triplicata, foram submetida a extração em fase sólida com auxílio de

cartucho Bond Elute Plexa PCX (Agilent; 6 cm³, 500 mg de adsorvente), que combina uma mistura de adsorvente de fase reversa e troca catiônica, com o intuito de obter um extrato livre de antocianinas, que poderiam interferir notoriamente na separação cromatográfica e identificação dos compostos de interesse, particularmente, os flavonóis (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009a).

Os cartuchos foram previamente condicionados com 5 mL de metanol e 5 mL de água. Após eluição das amostras e lavagem dos cartuchos com 5 mL de solução de HCl 0,1N seguido de 5 mL de água, as frações dos extratos livres das antocianinas foram eluídas com 3 vezes de 5 mL de metanol. Os eluatos foram secos em rotoevaporador (35 °C) e redissolvidos em 1 mL de solução aquosa contendo 20% de metanol.

Os extratos foram então filtrados (0,20 µm, membrana de poliéster, Chromafil PET 20/25, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) diretamente em *vial* cromatográfico e injetados (20 µL) em mesmo sistema cromatográfico usado para a análise de antocianinas, mas agora os solventes (Sol.) utilizados na fase móvel foram: Sol. A, acetonitrila/água/ácido fórmico, 3:88,5:8,5, v/v/v; e, Sol. B, acetonitrila/água/ácido fórmico, 50:41,5:8,5, v/v/v; e, Sol. C, metanol/água/ácido fórmico, 90:1,5:8,5, v/v/v. O gradiente linear dos solventes utilizados foram: zero minuto, 98% A e 2% B; 8 minutos, 96% A e 4% B; 37 minutos, 70% A, 17% B e 13% C; 51 minutos, 50% A, 30% B e 20% C; 51,5 minutos, 30% A, 40% B e 30% C; 56 minutos, 50% B e 50% C; 57 minutos, 50% B e 50% C; e, 64 minutos, 96% de A e 4% de B.

Para a identificação, um analisador de armadilha de íons (íon trap) IES-EM/EM foi usado no modo positivo (para determinação das antocianinas) e no modo negativo (para determinação de flavonóis e derivados do ácido hidroxicinâmico) de acordo com os seguintes parâmetros descritos por Rebello et al. (2013): gás de secagem, N₂, 8 L/min; temperatura de secagem, 325 °C; nebulizador, N₂, 50 psi; parâmetros de ionização e fragmentação foram otimizados através da

infusão direta de soluções padrão apropriadas (malvidina-3-glicosídeo e malvidina-3,5-diglicosídeo no modo de ionização positivo; quercetina-3-glicosídeo e ácido caftárico no modo de ionização negativo, respectivamente para flavonóis e DAHC); faixa de scan, 50-1200 *m/z*.

A identificação foi, principalmente, baseada nos dados de espectroscópicos UV-vis e EM/EM obtidos de padrões originais, ou descobertas anteriores (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009a; LAGO-VANZELA et al., 2011a, b; REBELLO et al., 2013). Para a quantificação, os compostos obtidos nos cromatogramas-DAD foram extraídos a 520 nm (antocianinas), 360 nm (flavonóis) e 320 nm (derivados do ácido hidroxicinâmico). As análises foram realizadas em triplicata.

4.5.2 Flavan-3-óis monômeros e dímeros, proantocianidinas e estilbenos

A estratégia usada para analisar este grupo complexo de compostos fenólicos consistiu em:

- i) numa primeira etapa, separar os compostos individualmente por CLAE e identificar utilizando o analisador de massas com ionização por *eletrospray*, bem como quantifica-los utilizando o tipo de varredura do analisador por monitoramento de reações múltiplas (MRM), bem como os padrões disponíveis. Assim foi possível identificar os flavan-3-óis monômeros (C, EC, GC, EGC, CG, ECG, GCG, EGCG) e alguns dímeros (proantocianidinas tipo B, como PB1, PB2 e PB 4);
- ii) por outro lado, avaliar as características estruturais por meio de todos aqueles flavan-3-óis que não eram monômeros, isto é, desde dímeros, trímeros, oligômeros até polímeros. Para tanto, utilizou-se uma reação de despolimerização assistida com um reagente nucleófilo (pirogalol) que captura as unidades liberadas. Nesta despolimerização das proantocianinas, liberam-se para cada composto “unidades terminais” como flavan-3-óis monômeros e, o restante em “unidades de extensão”,

no qual se encontram os derivados pirogalol de cada um dos flavan-3-óis monômeros que foram sendo liberados das proantocianidinas, a medida que ocorreu a despolimerização, tais etapas serão melhor descritas a seguir.

Para a análise dos flavan-3-óis monômeros, procianidinas dímeras do tipo B e proantocianidinas presentes nas amostras de casca e semente das uvas BRS Carmem e BRS Magna, alíquotas de 2 mL de cada extrato foram misturadas com 12 mL de água para possibilitar a realização de extração em fase sólida com cartucho SPE-C18 (Waters® Sep-Pak Plus, 820 mg de adsorvente), que foi previamente condicionado com 5 mL de metanol e 5 mL de água.

Após a eluição de cada extrato diluído, em triplicata, pelo cartucho, este último foi seco sob pressão reduzida e 15 mL de metanol seguido de 5 mL de acetato de etila foram eluídos para recuperar os compostos fenólicos de interesse adsorvidos. O eluato foi recolhido, o solvente evaporado com o auxílio de rotoevaporador (35 °C) (Modelo Hei-Vap Advantage, Heidolph Research Made Easy,) e, o resíduo dissolvido em metanol (2 mL).

Cada 0,25 mL dos extratos, previamente submetidos a extração em fase sólida, foi diluído com 4,75 mL de solução contendo água e ácido fórmico (98,5:1,5, v/v) diretamente em *vial* cromatográfico e injetado (10 µL) na coluna cromatográfica.

A informação estrutural das proantocianidinas foi obtida pelo método de despolimerização por catálise ácida induzida por pirogalol (BORDIGA et al., 2013). Para tanto, 0,50 mL da solução de pirogalol, composta por 100 g/L de pirogalol e 20 g/L ácido ascórbico em solução metanólica contendo HCl 0,3N foi adicionado de 0,25 mL de cada extrato, previamente submetido a extração em fase sólida e, então a mistura foi mantida a 30 °C por 40 minutos. Após finalizada a reação foram adicionados a cada mistura 2,25 mL de acetado de sódio 67 mM e 2 mL

de água, sendo então as amostras preparadas para etapa de injeção no cromatógrafo.

As amostras (antes e depois da reação de despolimerização por catalise-ácida) foram injetadas (10 µL) no cromatógrafo utilizando a seguinte fase móvel: Sol. A, água/metanol/ácido fórmico, 97:2:1, v/v/v e Sol. B, metanol. O gradiente linear do solvente B foi: zero minuto, 5%; 2 minutos, 5%; 25 minutos, 30%; 40 minutos, 55%; 50 minutos, 65%; 55 minutos, 95%; 65 minutos, 95%; 70 minutos, 5%; e, 80 minutos, 5%.

Para identificação dos compostos citados foi utilizado o sistema de varredura IES-EM/EM operado no modo de ionização negativo, sendo utilizado uma combinação de experimentos de -EEM (referentes aos íons moleculares, condições EM) e de -EPI (referentes aos íons produtos, condições EM/EM). Já para a quantificação foi utilizado modo de aquisição por monitoramento de reações múltiplas (MRM, condições EM/EM), as condições do analisador de massas para ambos os tipos de varredura empregados são similares as relatadas por Rebello et al. (2013).

Para a identificação e a quantificação dos estilbenos (*trans* e *cis* isômeros do resveratrol e piceido) foram obtidos os cromatogramas de íons extraídos por MRM, após seleção das seguintes massas cargas (*m/z*) de transição características: 389-227 para o isômero piceido e, 227-185 para os isômeros do resveratrol.

Para a identificação e a quantificação dos diversos flavan-3-óis, foram utilizados os seguintes padrões de monômeros: (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-galocatequina, (-)-catequina-3-galato, e (-)-epicatequina-3-galato. Assim como foram usados os seguintes padrões de dímeros: procianidinas B1, B2 e B4, usando (+)-catequina como padrão externo.

Obtiveram-se, primeiramente, os fatores de resposta de cada um dos compostos anteriores com relação ao padrão de (+)-catequina, por injeção conjunta; depois, em cada série de análises, o padrão externo de

(+)-catequina foi sendo injetado no início e final de cada série para realizar a correção de desvios que se produzem dependendo do nível de resposta do detector de massas.

A concentração total de proantocianidinas poliméricas foi expressa em equivalente de (+)-catequina. Os resultados da análise estrutural para os principais tipos de flavan-3-óis presentes nas cascas e sementes das cultivares estudadas foram obtidos após realização dos seguintes cálculos:

- *Grau médio de polimerização (mDP)*, por meio da Equação 1:

$$mDP = \frac{\text{Unidades terminais (mM)} + \text{unidades de extensão (mM)}}{\text{unidades terminais (mM)}} \quad (\text{Equação 1})$$

- *Porcentagem de galoilação (gal)*, por meio da Equação 2:

$$\% \text{ gal} = 100 \times \frac{\Sigma \text{ galatos em unidades terminais e de extensão}}{\text{unidades terminais (mM)} + \text{unidades de extensão (mM)}} \quad (\text{Equação 2})$$

Para esta porcentagem contribuem todas as unidades integrantes das proantocianidinas (como unidades de extensão e terminais) que contém uma ligação éster 3-galato, que englobam os compostos (-)-catequina-3-galato (CG) e (-)-epicatequina-3-galato (ECG).

- *Somatório das unidades de extensão*, por meio da equação 3:

$$\text{Unidades de extensão} = \Sigma \text{ monoméricas pirogaloiladas} \quad (\text{Equação 3})$$

- *Somatório das unidades terminais*, por meio da Equação 4:

$$\text{Unidades terminais} = \Sigma \text{ monômeros após a reação} - \Sigma \text{ monômeros iniciais}$$

(Equação 4)

- *Porcentagens de unidades terminais e de extensão apresentadas por tipo de flavan-3-óis*, por meio das Equações 5 e 6:

$$\% \text{ unidade terminal N} = 100 \times \frac{\text{unidade terminal (N)}(\text{mM})}{\Sigma \text{ unidades terminais (mM)}}$$

(Equação 5)

$$\% \text{ unidade extensão P} = 100 \times \frac{\text{unidade de extensão (P)}(\text{mM})}{\Sigma \text{ unidades de extensão (mM)}}$$

(Equação 6)

Podendo as unidades de extensão e/ou terminais serem expressas em função dos seguintes flavan-3-óis: (+)-catequina (C), (-)-catequina-3-galato (CG), (-)-catequina-3-galato (EC), (-)-galocatequina (GC), (-)-epicatequina-3-galato (ECG) e (-)-epigalocatequina (EGC). Sendo N, as derivações de C, EC, GC, EGC, CG ou ECG para as unidades terminais; e P, as derivações de C, EC, GC, EGC e CG para as de extensão.

- *Porcentagem de prodelfinidinas*, por meio da Equação 7:

$$\% \text{ prodelfinidinas} = 100 \times \frac{\Sigma (\text{GC} + \text{EGC} + \text{EGCG}) \text{ terminais e pirogaloiladas}}{\text{unidades terminais (mM)} + \text{unidades de extensão (mM)}}$$

(Equação 7)

Para esta porcentagem compreendem todas as unidades integrantes das proantocianidinas (como unidades de extensão e terminais) que contém um anel B do tipo trissubstituído, pelo qual denomina-se prodelfinidina, dada em função de que ao despolimerizar-se a proantocianidina, em meio ácido, se origina a delfinidina. Para estas características são englobados os seguintes compostos: galocatequina (GC) e (-)-epigalocatequina (EGC).

4.6 Análises Estatísticas

Uma análise univariada de test T de Student foi realizada para permitir verificar diferenças na porcentagem molar de cada composto fenólico bem como nas concentrações totais das classes de compostos fenólicos (antocianinas, flavonóis, derivados do ácido hidroxicinâmico, estilbenos, flavan-3-óis monômeros e dímeros e proantocianidinas) estudados entre as amostras de BRS Carmem e BRS Magna referentes as uvas inteiras, cascas e sementes, enquanto uma análise multivariada (análise de componentes principais - ACP) de cada classe de compostos para as mesmas amostras foi realizada para reduzir o número de variáveis bem como a detecção de “outlier”, tendências e uma visão global do estudo.

Para a construção dos gráficos foram escolhidos os componentes principais (PCs) que permitiram uma melhor separação entre as amostras das partes comestíveis das uvas BRS Carmem e BRS Magna. No texto foram consideradas as variáveis (compostos fenólicos de cada classe química, bem como as concentrações totais referentes a cada classe) mais correlacionadas com cada componente principal (CP) (“Rotated Component Matrix”, $> 0,08$), portanto após o nome do composto fenólico foi descrito, em parênteses, sua sigla seguida pelo valor “Rotated Component Matrix”. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico IBM SPSS Sytatics (SPSS Inc., IBM), versão 20.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Identificação e quantificação por CLAE-DAD-IES-EMⁿ dos compostos fenólicos presentes nas uvas BRS Carmem e BRS Magna

5.1.1 Antocianinas

A BRS Magna é uma uva tintureira e por isto apresenta antocianinas tanto na casca como na polpa, enquanto a BRS Carmem apresenta antocianinas apenas na casca.

Os íons moleculares e íons produtos gerados com o IES-EM/EM e as proporções molares referentes a cada antocianina identificada estão apresentadas na **Tabela 5**. A identificação das antocianinas foi baseada, principalmente, na comparação entre as características espectrais de íon molecular e dos íons produtos gerados com IES-EM/EM, acoplado a DAD UV-Vis para valores máximos de comprimento de onda das amostras, com aqueles obtidos com os padrões autênticos ou previamente relatados na literatura (LAGO-VANZELA et al., 2011b; CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b; REBELLO et al., 2013).

Detectou-se um total de 26 e 24 antocianinas nas frutas inteiras de BRS Carmem e BRS Magna, respectivamente, enquanto que nas cascas da uva BRS Magna foram detectadas 23 antocianinas. Os cromatogramas obtidos para as antocianinas (frutas inteiras da BRS Carmem e BRS Magna e as cascas da BRS Magna) estão apresentados na **Figura 12**, onde os números dos compostos dos cromatogramas estão correlacionados com os da **Tabela 5**.

Na **Figura 13** pode-se observar os cromatogramas de íons extraídos no modo de ionização positivo para os valores de m/z correspondentes as diferentes agliconas, exemplificando para as cascas da cultivar BRS Carmem.

Tabela 5. Características espectrais EM e EM/EM das antocianinas identificadas nas uvas BRS Carmem (frutas inteiras) e BRS Magna (frutas inteiras e cascas) por CLAE-DAD-IES-EM/EM (modo positivo de ionização), proporção molar (valor médio $\pm$ desvio padrão, $n = 3$) e concentração de diglicosiladas (como equivalente de malvidina-3,5-diglicosídeo), de monoglicosiladas (como equivalente de malvidina-3-glicosídeo) e de total (como equivalente de malvidina-3,5-diglicosídeo).

N	Íon molecular; Íons produtos (m/z)	Denominação ¹	Proporção Molar (%)		
			BRS Carmem Fruta inteira	BRS Magna Fruta inteira	BRS Magna Casca
1	627; 465, 303	dp-3,5-diglc	27,52A $\pm$ 4,68	14,91Ba $\pm$ 0,30	14,75a $\pm$ 0,41
2	611; 449, 287	cy-3,5-diglc	1,77A $\pm$ 0,49	1,37Aa $\pm$ 0,07	1,33a $\pm$ 0,16
3	641; 479, 317	pt-3,5-diglc	14,00A $\pm$ 1,65	10,15Ba $\pm$ 0,20	10,69a $\pm$ 0,76
4	625; 463, 301	pn-3,5-diglc	2,83A $\pm$ 0,70	2,02Aa $\pm$ 0,03	2,14a $\pm$ 0,31
5	655; 493, 331	mv-3,5-diglc	13,47A $\pm$ 1,52	12,40Aa $\pm$ 0,21	13,08a $\pm$ 1,41
6	667; 505, 463, 301	pn-3-acglc-5-glc	0,16A $\pm$ 0,04	0,09Bb $\pm$ 0,02	1,04a $\pm$ 0,25
7	697; 535, 493, 331	mv-3-acglc-5-glc	0,64A $\pm$ 0,28	0,22Aa $\pm$ 0,02	0,35a $\pm$ 0,11
8	773; 611, 465, 303	dp-3-cmglc-5-glc	25,34B $\pm$ 1,39	37,97Aa $\pm$ 0,74	36,49a $\pm$ 2,52
9	757; 595, 449, 287	cy-3-cmglc-5-glc	1,72B $\pm$ 0,34	3,02Aa $\pm$ 0,09	2,71b $\pm$ 0,02
10	787; 625, 479, 317	pt-3-cmglc-5-glc	4,40B $\pm$ 0,62	8,22Aa $\pm$ 0,49	8,73a $\pm$ 0,80
11	771; 609, 463, 301	pn-3-cmglc-5-glc	1,30A $\pm$ 0,65	1,16Aa $\pm$ 0,03	1,04a $\pm$ 0,10
12	801; 639, 493, 331	mv-3-cmglc-5-glc	6,53A $\pm$ 2,49	7,81Aa $\pm$ 0,13	7,37a $\pm$ 0,35
13	789; 627, 465, 303	dp-3-cfglc-5-glc	0,33B $\pm$ 0,10	0,65Aa $\pm$ 0,12	0,30b $\pm$ 0,04
14	465; 303	dp-3-glc	32,37A $\pm$ 4,00	20,57Ba $\pm$ 0,53	20,25a $\pm$ 1,50
15	449; 287	cy-3-glc	4,01A $\pm$ 0,28	3,49Ba $\pm$ 0,15	1,96b $\pm$ 0,49
16	479; 317	pt-3-glc	6,33A $\pm$ 0,94	5,00Ab $\pm$ 0,58	7,08a $\pm$ 0,29
17	463; 301	pn-3-glc	1,58A $\pm$ 0,77	0,40Aa $\pm$ 0,15	0,51a $\pm$ 0,11
18	493; 331	mv-3-glc	3,26A $\pm$ 1,24	1,23Ab $\pm$ 0,62	2,62a $\pm$ 0,27
19	507; 465,303	dp-3-acglc	2,19A $\pm$ 0,37	0,83B $\pm$ 0,03	ND
20	521; 479, 317	pt-3-acglc	1,25 $\pm$ 0,29	ND	ND
21	535; 493, 331	mv-3-acglc	0,78 $\pm$ 0,31	ND	ND
22	611; 303	dp-3-cmglc	40,06B $\pm$ 1,94	61,26Aa $\pm$ 0,73	59,82a $\pm$ 2,49
23	595; 287	cy-3-cmglc	1,83B $\pm$ 0,19	2,75Aa $\pm$ 0,09	2,68a $\pm$ 0,17
24	625; 317	pt-3-cmglc	4,19A $\pm$ 0,45	3,44Ab $\pm$ 0,22	4,12a $\pm$ 0,12
25	609; 301	pn-3-cmglc	0,52A $\pm$ 0,25	0,26Aa $\pm$ 0,01	0,20b $\pm$ 0,02
26	639; 331	mv-3-cmglc	1,65A $\pm$ 0,63	0,78Aa $\pm$ 0,03	0,76a $\pm$ 0,04
Diglicosiladas (mg mv-3,5-diglc/kg uva)			3739,48A $\pm$ 776,47	3977,78Aa $\pm$ 213,32	3657,21a $\pm$ 404,61
Monoglicosiladas (mg mv-3-glc/kg uva)			1202,71A $\pm$ 145,09	754,52Ba $\pm$ 38,52	642,94a $\pm$ 93,63
Ratio 3,5-diglc/3-glc			3,09B $\pm$ 0,29	5,27Aa $\pm$ 0,11	5,71a $\pm$ 0,29
Total (mg mv-3,5-diglc/kg uva)			5337,40A $\pm$ 965,11	4980,23Aa $\pm$ 261,55	4511,42a $\pm$ 524,11

N, número do composto.¹Denominação, Abreviação da nomenclatura: dp, delphinidina; cy, cianidina; pt, petunidina; pn, peonidina; mv, malvidina; glc, glicosídeo; diglc, diglicosídeo; acglc, 6"-acetil-glicosídeo; cmglc, 6"-p-cumaril-glicosídeo; cfglc, 6"-cafeil-glicosídeo. ND, não detectado. As proporções molares estão calculadas separadamente para as antocianinas monoglicosiladas e diglicosiladas, totalizando cada grupo 100%. A, B: letras maiúsculas iguais na mesma para fruta inteira indicam que não há diferença estatística, com nível de significância de 0,05. a, b: letras minúsculas iguais na mesma linha para fruta inteira e casca da mesma uva (BRS Carmem e BRS Magna) indicam que não há diferença estatística, com nível de significância de 0,05.

Figura 12. Cromatogramas das antocianinas presentes nas uvas BRS Carmem (fruta inteira, a), BRS Magna (fruta inteira, b; e cascas, c), obtidos por CLAE-DAD a 520 nm (A identificação dos picos está apresentada na Tabela 5).

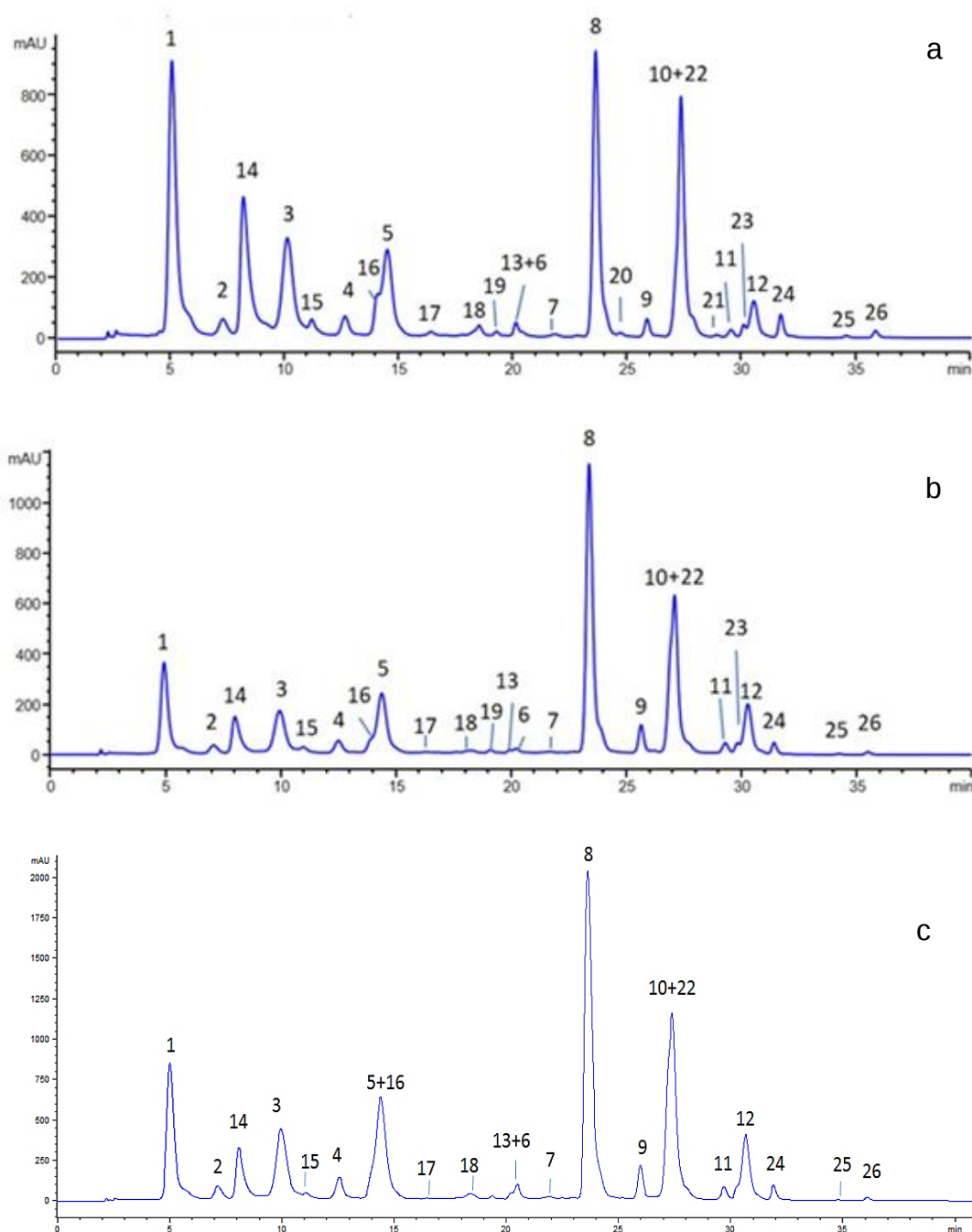
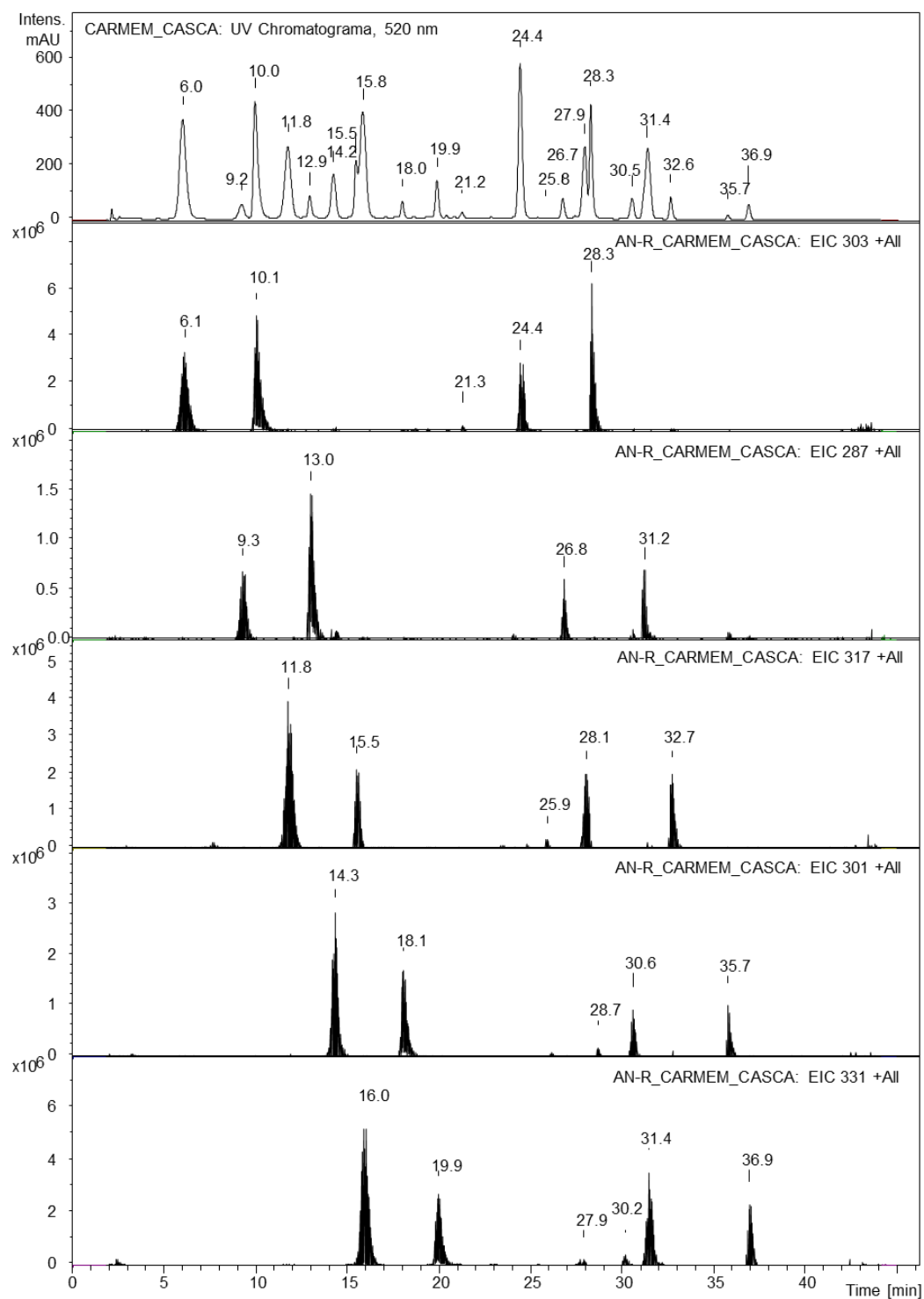


Figura 13. Cromatogramas de íons extraídos (EIC) no modo de ionização positivo para os valores de m/z correspondentes as diferentes agliconas (303, dp; 287, cy; 317, pt; 301, pn; 331, mv). Exemplificado para as cascas da uva BRS Carmem.



Pela **Figura 13** é possível observar os seguintes padrões de fragmentação:

- i) para antocianinas monoglicosiladas não aciladas: presença de íon molecular ($[M]^+$) de m/z 465, 449, 479, 463 e 493 para os respectivos derivados da dp, cy, pt, pn e mv e um único íon produto de m/z 303, 287, 317, 301 e 331, respectivamente, gerado a partir da perda de uma unidade de hexose ($[M-162]^+$), assumida como glicose;
- ii) antocianinas diglicosiladas não aciladas: presença de íon molecular ($[M]^+$) de m/z de 627, 611, 641, 625 e 655 para os respectivos derivados da dp, cy, pt, pn e mv e dois íons produtos produzidos pela perda independente e consecutiva de duas unidades de glicose ($[M-162]^+$ e $[M-162-162]^+$) ligadas na posição C-3 e C-5 dos anéis C e A, respectivamente, das referidas antocianidinas;
- iii) derivados *p*-cumarilados das antocianinas monoglicosiladas e diglicosiladas: presença de íon molecular ($[M]^+$) de m/z 611, 595, 625, 609 e 639 e 773, 757, 787, 771 e 801, respectivamente, compatível com as estruturas das antocianidinas dp, cy, pt, pn e mv, além de um íon produto de m/z 303, 287, 317, 301 e 331, no caso das monoméricas, decorrente da perda do glicosídeo ligado ao grupo cumaril ($[M-308]^+$) na posição C-3 no anel C das antocianidinas. No caso das antocianinas diglicosiladas, há a visualização de três íons produtos, gerados em função da perda independente e consecutiva da glicose ligada na posição C5 do anel A ($[M-162]^+$) e, do resíduo *p*-cumaril-glicosídeo ligado na posição C-3 do anel C ($[M-308]^+$).

Um perfil de antocianinas complexo foi observado devido a presença das cinco principais antocianidinas (agliconas), a saber, delphinidina (dp), cianidina (cy), peonidina (pn), petunidina (pt) e malvidina (mv), com diferenciados padrões de substituição. Não há evidências cromatográficas (uso de padrão autêntico), nem evidência de espectro de massa, da ocorrência de antocianinas derivadas da pelargonidina nas cultivares estudadas.

Resultado similar foi relatado por Lago-Vanzela et al. (2011b) para a uva Bordô (*Vitis labrusca*), por Fraige et al. (2014) para a uva híbrida IAC 138-22 (Syrah x Seibel 11342), também conhecida como Máximo, e por Rebello et al. (2013) para as partes comestíveis da uva BRS Violeta (BRS Rubea x IAC 1398-21). Por outro lado, alguns estudos já relataram a presença desta antocianina monoglicosilada em uva Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera*) (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b), bem como na sua forma diglicosilada na uva *Vitis amurensis* (ZHAO; DUAN; WANG, 2010).

Nas amostras estudadas (frutas inteiras da BRS Carmem e BRS Magna e cascas da BRS Magna) há presença tanto de antocianinas monoglicosiladas quanto diglicosiladas, sendo as diglicosiladas predominantes. Os resultados apresentados corroboram com a genealogia das uvas, apresentada pela Embrapa (CAMARGO; MAIA; RITSCHER, 2010; RITSCHER et al., 2012), uma vez que grande contribuição na hibridização destas cultivares é dada por uvas não viníferas, e estas apresentam predominância de antocianinas diglicosiladas.

Outras cultivares estudadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Processamento de Frutas e Hortaliças da Universidade Estadual Paulista, campus de São José do Rio Preto, em parceria com Universidad de Castilla-La Mancha, Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada, na Espanha, apresentaram resultados similares. Para exemplificar, pode-se citar a cultivar tintureira BRS Violeta (BRS Rúbea x IAC 1398-21), no qual há predominância de antocianinas diglicosiladas tanto nas cascas (90%) quanto na polpa (99%) (REBELLO et al., 2013) e para a uva Bordô, com 90% de antocianinas diglicosiladas nas cascas (LAGO-VANZELA et al., 2011b).

Fraige et al. (2014) também relataram a presença tanto de antocianinas diglicosiladas como de monoglicosiladas na uva Máximo. Em contraste, antocianinas de uvas viníferas (*Vitis vinifera*) e suas híbridas primárias (interespecies) são derivadas quase exclusivamente de

antocianinas monoglicosiladas, como malvidina-3-glicosídeo e seus derivados (principalmente derivados acetilados e *p*-cumarilados) majoritários (HERMOSÍN-GUTIÉRREZ; GARCÍA-ROMERO, 2004; LAGO-VANZELA et al., 2011b).

A ocorrência de antocianinas diglicosiladas é um indicador de origem usado para distinguir uvas viníferas das não viníferas e seus produtos (OIV, 2011). Nas uvas estudadas, comparativamente com outras uvas híbridas como a BRS Violeta (REBELLO et al., 2013) e a Bordô (LAGO-VANZELA et al., 2011b), a proporção de antocianinas monoglicosiladas totais foi maior, sendo de aproximadamente 30% para a BRS Carmem e 20% para a BRS Magna enquanto que para as uvas citadas observou-se, aproximadamente, 10%.

Para todas as amostras, detectou-se as 5 principais antocianinas monoglicosiladas e diglicosiladas derivadas da dp, cy, pt, pn e mv, tanto na forma não aciladas quanto *p*-cumarilada. Tanto para a BRS Carmem quanto para as amostras de BRS Magna encontraram-se as antocianinas diglicosiladas acetiladas derivadas da peonidina e malvidina e a antocianina diglicosilada cafeilada derivada da delfinidina. Deve-se destacar que nos espectros EM/EM destas amostras, é possível observar a perda de um fragmento neutro de glicosídeo ligado à um grupo acetil (204 u) ou de um glicosídeo ligado à um grupo cafeil (324 u), gerando os íons produtos apresentados na Tabela 5 para as antocianinas acetiladas (Compostos 6 e 7) e cafeilada encontradas (Composto 13), respectivamente. Já para as antocianinas monoglicosiladas acetiladas, foi identificado a presença das derivadas da delfinidina, petunidina e malvidina na uva BRS Carmem (Compostos 19, 20 e 21), enquanto apenas a antocianina derivada da delfinidina foi encontrada na amostra de uva inteira da BRS Magna.

De maneira geral, há maior proporção de derivados acilados da delfinidina nas amostras, sobretudo os derivados *p*-cumarilados, tanto na forma diglicosilada quanto na forma monoglicosilada. Rebello et al.

(2013), ao determinar o perfil qualitativo e quantitativo de antocianinas presentes nas partes comestíveis da uva BRS Violeta (BRS Rubra × IAC 1398-21) observaram também predomínio dos derivados *p*-cumarilados da delphinidina diglicosilada. Por outro lado, a literatura demonstra que algumas uvas não-viníferas apresentam predominância de malvidina diglicosilada e os resultados quantitativos são comumente expressos em malvidina-3,5-diglicosídeo (MUÑOZ-ESPADA et al., 2004). Em contraste, malvidina-3-glicosídeo e seus derivados, principalmente acetilados e *p*-cumarilados são as antocianinas majoritárias de uvas viníferas (HERMOSÍN-GUTIÉRREZ; GARCÍA-ROMERO, 2004).

A antocianina monoglicosilada acetilada derivada da delphinidina (dp-3-acglc) foi encontrada apenas na amostra de BRS Magna inteira, o que sugere que este composto está presente apenas na polpa da BRS Magna (**Tabela 5**). É possível observar que as antocianinas monoglicosiladas acetiladas derivadas da petunidina (pt-3-acglc) e da malvidina (mv-3-acglc) foram detectadas apenas na BRS Carmem. Assim, estes compostos podem ser usados como marcadores para diferenciar estas duas cultivares.

Comparando os resultados quantitativos entre as duas cultivares é possível observar que a BRS Magna apresenta uma proporção de antocianinas diglicosiladas superior a de monoglicosiladas. Ao expressar os resultados da concentração de antocianinas totais em diglicosilada (mv-3,5-diglicosiladas), já que são as majoritárias em ambas as frutas, observa-se que as concentrações totais não apresentaram diferença significativa. Embora estes resultados sejam preliminares, já que as análises foram realizadas com amostras de uma única safra e os desvios padrões tenham sido altos, observa-se, para as duas cultivares estudadas, concentrações de antocianinas (mg/kg, como malvidina-3,5-diglicosídeo) elevados e dentro da faixa relatada para cultivares híbridas como a Colobel e a Lomanto (concentrações médios de 4210-6030 mg/kg), porém, superiores aos relatados para outras uvas, tal como

Concord (*Vitis labrusca*), Marechal Foch (*Vitis rupestris* e *Vitis vinífera*) e Norton (*Vitis aestivalis*), que apresentaram concentrações entre 1116 e 2750 mg/kg (MUÑOZ-ESPADA et al., 2004); Niágara Rosada (*Vitis labrusca*) (ABE et al., 2007) e Bordô (*Vitis labrusca*) (ABE et al., 2007; LAGO-VANZELA et al., 2011b) que apresentaram concentrações entre 146 e 3779 mg/kg; Muscadine (*Vitis rotundifolia*) com concentração entre 468 e 738 mg/kg como cianidina equivalente, que corresponde a 112 a 177 mg/kg de equivalente de malvidina-3,5-diglicosídeo (HUANG et al., 2009), bem como da uva BRS Violeta com concentração total de antocianinas de 3949 mg/kg (REBELLO et al., 2013).

Comparando a concentração de antocianinas totais das cascas da uva BRS Magna com a relatada para as cascas da uva BRS Violeta, observa-se que a concentração (mg/kg, como malvidina-3,5-diglicosídeo) presente nas cascas da BRS Magna (4511) foi superior ao da BRS Violeta (3932) (REBELLO et al., 2013). No entanto, deve-se ressaltar que as amostras de uvas utilizadas para a comparação descrita anteriormente não correspondem a mesma safra e, por conseguinte, as mesmas condições climáticas de cultivo, fatores estes que influenciam marcadamente na concentração total de antocianinas nas frutas.

Estudos do grupo de pesquisa do Laboratório de Processamento de Frutas e Hortaliças da Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto, já constataram que quando BRS Magna e BRS Violeta foram coletadas na mesma região e safra, a concentração total de antocianina das uvas da BRS Magna foi inferior ao apresentado por Tavares et al. (2015) para a uva BRS Violeta.

Avaliando a concentração de antocianinas totais presentes nas cascas e fruta inteira de BRS Magna, pode-se observar que as cascas corresponderam a aproximadamente 91% da concentração encontrada nas frutas inteiras. Este resultado está dentro da faixa encontrada para outras cultivares tintureiras como a Garnacha (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b) e a BRS Violeta (LAGO-VANZELA et al., 2013), que

apresentaram, respectivamente, 79-81% e mais que 99% de antocianinas nas cascas em comparação com a polpa.

Uma análise multivariada de componentes principais foi realizada para mostrar as principais diferenças qualitativas (% molar das antocianinas individuais), bem como as quantitativas (concentração de monoglicosiladas e de diglicosiladas, além do total expresso em diglicosiladas, que são as majoritárias) entre as antocianinas presentes nas BRS Carmem e BRS Magna (fruta inteira), bem como entre as antocianinas presentes nas amostras de BRS Magna (fruta inteira e casca).

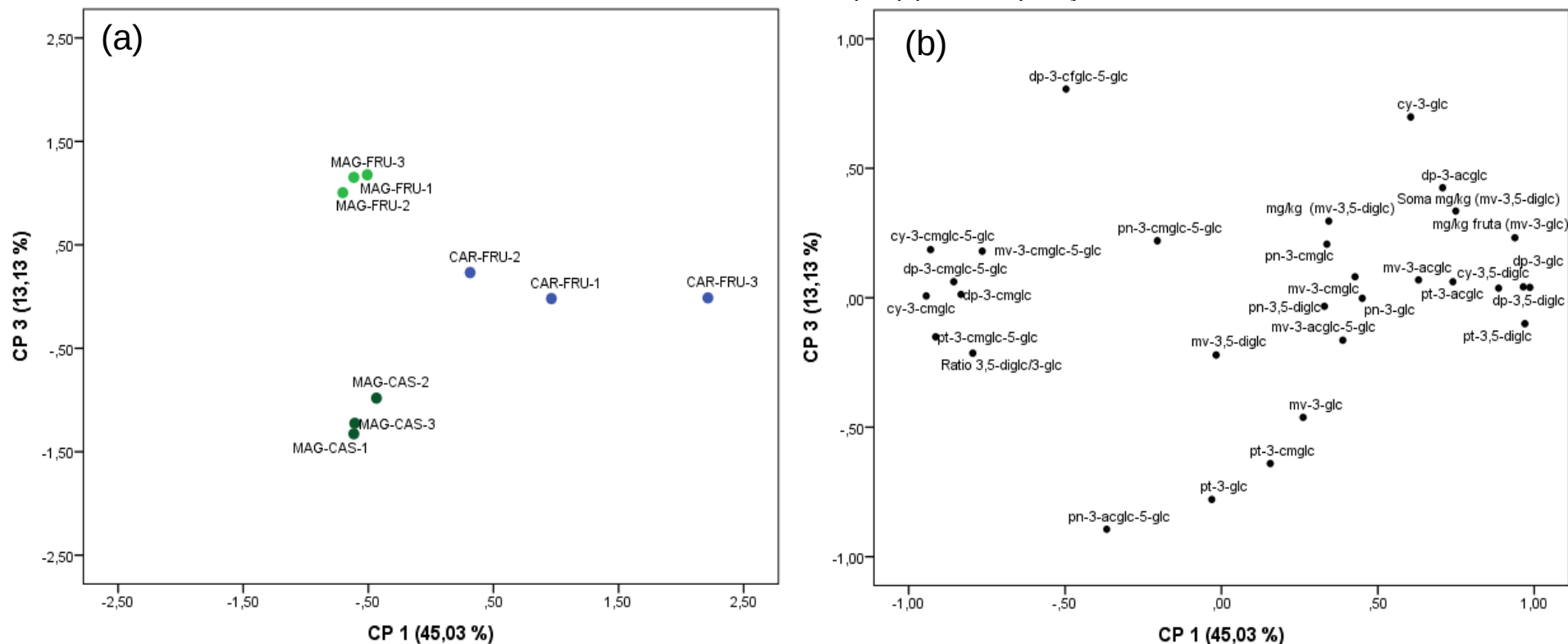
O componente principal 1 (CP-1) apresentou porcentagem de variância de 45,03%, o 2 (CP-2) de 35,99% e o 3 (CP-3) de 13,13%, sendo que a melhor diferenciação entre as amostras foi obtida ao representa-las no plano formado pelo CP-1 e CP-3, sendo que juntos apresentaram uma explicação de 58,16% da variação.

A **Figura 14a** mostra o gráfico das amostras de BRS Carmem e BRS Magna, sendo que no CP-1 foi possível diferenciar as amostras de fruta inteira das duas cultivares, BRS Magna da BRS Carmem, enquanto o CP-3 permitiu diferenciar as amostras de uva inteira da BRS Magna das suas referentes cascas.

A uva BRS Carmem foi alocada no lado positivo do CP-1 e CP-3 enquanto a uva BRS Magna (inteira) foi alocada no lado negativo do CP-1 e positivo do CP-3 e as amostras referentes a suas cascas foram alocadas no lado negativo do CP-1 e CP-3. As amostras ficaram alocadas próximas as variáveis (compostos químicos) que as caracterizam.

Ao analisar a **Figura 14b**, o lado positivo do CP-1 foi carregado principalmente pelos compostos: delphinidina monoglicosilada (dp-3-glc, 0,96) e diglicosiladas derivadas da delphinidina (dp-3,5-diglc, 0,99), da cianidina (cy-3,5-diglc, 0,89) e da petunidina (pt-3,5-diglc, 0,97), além da somatória das antocianinas monoglicosiladas (mg/kg fruta (3-glc), 0,94).

Figura 14. Análise de componentes principais (a) das amostras de fruta inteira de uvas BRS Carmem (CAR-FRU) e de BRS Magna (MAG-FRU), e das amostras de casca de uvas BRS Magna (MAG-CAS) e (b) da composição de antocianinas.



Abreviação: dp, delphinidina; cy, cianidina; pt, petunidina; pn, peonidina; mv, malvidina; glc, glicosídeo; diglc, diglicosídeo; acglc, 6"-acetil-glicosídeo; cmglc, 6"-*p*-cumaril-glicosídeo; cfglc, 6"-cafeil-glicosídeo; soma mg/kg, somatório em mg por kg de antocianinas monoglicosiladas ou diglicosiladas; *Ratio* 3,5-diglc/3-glc, relação entre antocianinas diglicosiladas e monoglicosiladas.

O lado negativo do CP-1 foi carregado por algumas antocianinas *p*-cumariladas tanto na forma monoglicosilada (cy-3-cmglc, -0,94; dp-3-cmglc, -0,83) quanto na forma diglicosilada (pt-3-cmglc-5-glc, -0,91; cy-3-cmglc-5-glc, -0,93; dp-3-cmglc-5-glc, -0,86). O lado positivo do CP 3 foi carregado pelo composto cafeilado derivado da delfinidina diglicosilada (dp-3-cfglc-5-glc, 0,81), enquanto o lado negativo do CP-3 pela peonidina diglicosilada acetilada (pn-3-acglc-5-glc, -0,89).

As amostras de BRS Carmem (inteira), quando comparada as amostras de BRS Magna (inteira), apresentaram maior concentração de antocianinas monoglicosiladas (somatória de 3-glc), evidenciando maior proporção da delfinidina (dp-3-glc) e de derivados não acilados de 3,5-diglicosídeos, em particular dos de delfinidina (dp-3,5-diglc), petunidina (pt-3,5-diglc) e cianidina (cy-3,5-diglc) e, menores quantidades de algumas antocianinas *p*-cumariladas (cy-3-cmglc, dp-3-cmglc, pt-3-cmglc-5-glc, cy-3-cmglc-5-glc, dp-3-cmglc-5-glc). Com relação as amostras de BRS Magna (inteira e cascas) foi possível observar, para ambas, maiores proporções de algumas antocianinas *p*-cumariladas (pt-3-cmglc-5-glc, cy-3-cmglc, cy-3-cmglc-5-glc, dp-3-cmglc e dp-3-cmglc-5-glc). Vale ressaltar que para a BRS Magna a antocianina diglicosilada cafeilada derivada da delfinidina (dp-3-cfglc-5-glc) foi o principal marcador das amostras da fruta inteira enquanto que a antocianina diglicosilada acetilada derivada da peonidina (pn-3-acglc-5-glc) foi o principal marcador das amostras de casca.

As diferenças encontradas na composição de antocianinas da fruta inteira com a casca da BRS Magna se explicam pelo fato desta cultivar ser tintureira, ou seja, apresentar antocianinas tanto nas cascas quanto na polpa. Com isto, a presença da dp-3-acglc na fruta inteira e sua ausência na casca inferi que este composto se encontra presente somente na polpa desta cultivar, sendo indicado como marcador desta parte comestível da uva. Diante do apresentado, os resultados da Análise de Componentes Principais (ACP) confirmaram e complementaram os resultados apresentados na **Tabela 5**.

5.1.2 Flavonóis

Os flavonóis estão normalmente presentes tanto nas cascas quanto na polpa das uvas. Observa-se no presente trabalho, predominância destes compostos nas cascas das BRS Carmem e BRS Magna. Além disto, pelos resultados médios apresentados na **Tabela 6**, pode-se verificar que a fruta inteira da uva BRS Magna apresentou maior concentração total de flavonóis (436,84 mg Q-3-glc/kg uva) quando comparado com a fruta inteira da BRS Carmem (397,66 mg Q-3-glc/kg uva). Os cromatogramas obtidos para flavonóis (frutas inteiras e as cascas) estão apresentados na **Figura 15**, onde os números dos compostos dos cromatogramas estão correlacionados com os da **Tabela 6**.

No caso da BRS Carmem, 98,52% da concentração total de flavonóis está presente nas cascas, resultado este muito similar ao da uva Bordô, descrito por Lago-Vanzela et al. (2011b), que também tem ausência de antocianinas na polpa. Já para a BRS Magna, os flavonóis se encontram tanto nas cascas como na polpa, embora de forma mais abundante na casca (62,05% do total). Este resultado foi coerente com o fato de que esta cultivar é tintureira e os mecanismos que produzem a ativação da biossíntese de suas antocianinas na polpa da uva também ativam a de flavonóis, já que compartilham grande parte da rota biossintética (CASTILLO-MUÑOZ, 2009). Resultados similares com relação a proporção de flavonóis nas cascas e polpa de uvas tintureiras são descritas na literatura para as uvas Garnacha tinorera (*V. vinifera*) (CASTILLO-MUÑOZ, 2009) e BRS Violeta (*V. labrusca*) (Rebello et al., 2013).

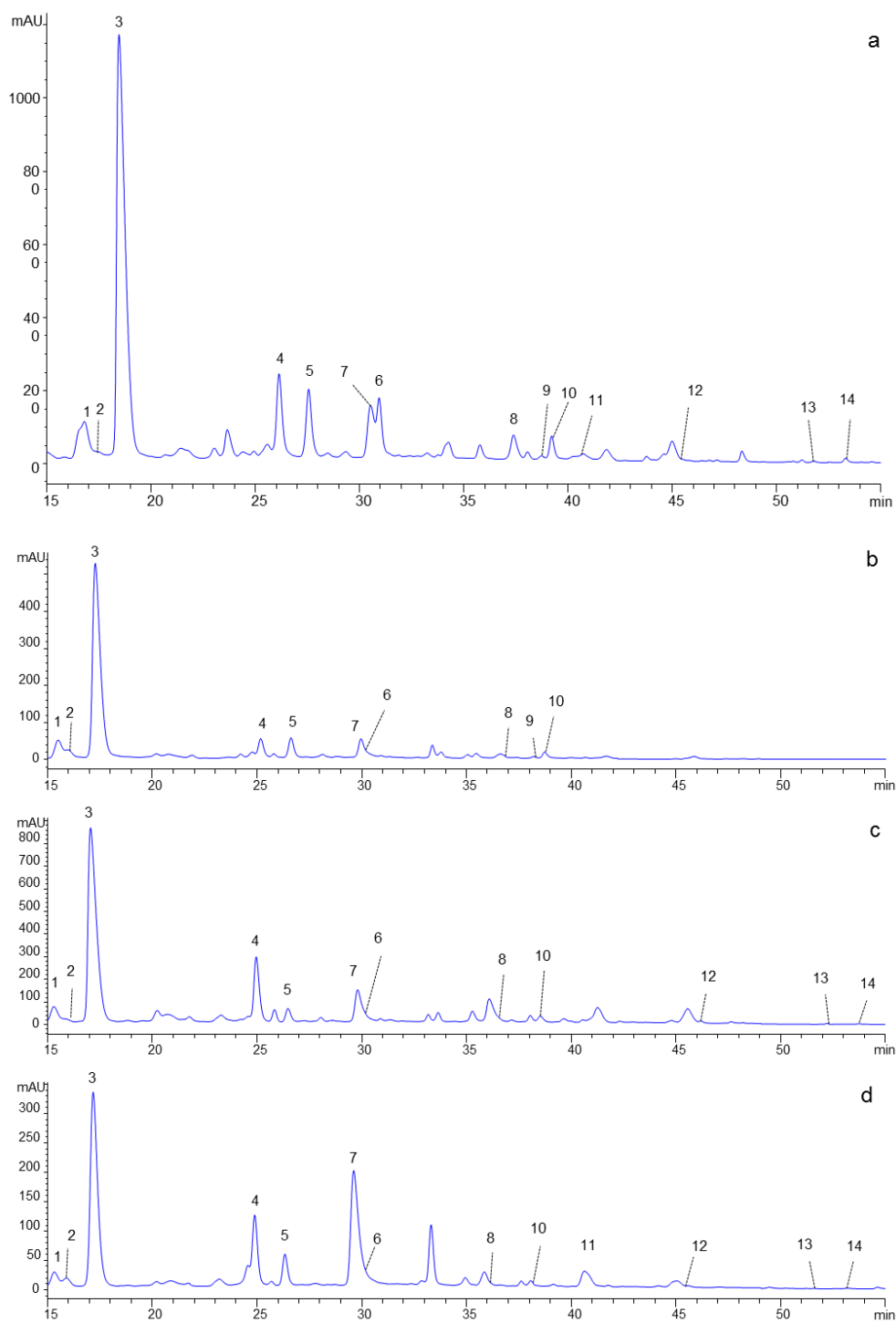
Quantitativamente, as cascas da uva BRS Carmem apresentaram maior concentração de flavonóis totais (391,77 mg Q-3-glc/kg uva, ou 844,33 μ mol Q-glc/kg uva) que os determinados nas cascas da BRS Magna (271,08 mg Q-3-glc/kg uva, ou 584,22 μ mol Q-glc/kg uva).

Tabela 6. Características espectrais EM e EM/EM, proporção molar (valor médio $\pm$ desvio padrão, $n = 3$) dos flavonóis identificados nas uvas BRS Carmem e BRS Magna (fruta inteira e cascas) por CLAE-DAD-IES-EM/EM, perfil de flavonóis por tipo de aglicona e concentração total expresso em mg equivalente de quercetina/kg de uva.

N	Íon pseudo-molecular; Íons produtos (m/z)	Denom. ¹	Proporção Molar (%)			
			BRS Carmem	BRS Carmem	BRS Magna	BRS Magna
			Fruta inteira	Casca	Fruta inteira	Casca
1	493; 317	M-glcU	5,56aA $\pm$ 1,05	4,60a $\pm$ 0,48	3,04bA $\pm$ 1,21	6,20a $\pm$ 0,97
2	479; 317	M-gal	2,51aA $\pm$ 0,32	1,19b $\pm$ 0,18	2,62aA $\pm$ 0,63	1,46a $\pm$ 0,52
3	479; 317	M-glc	73,19aA $\pm$ 1,31	60,32b $\pm$ 7,21	44,19bB $\pm$ 4,39	60,79a $\pm$ 5,29
4	477; 301	Q-glcU	4,93aA $\pm$ 0,96	5,29a $\pm$ 1,73	7,95aA $\pm$ 2,68	14,11a $\pm$ 2,92
5	463; 301	Q-glc	4,63aA $\pm$ 0,40	4,43a $\pm$ 1,33	3,19aB $\pm$ 0,56	3,50a $\pm$ 1,01
6	493; 331	L-glc	5,71bA $\pm$ 0,87	9,04a $\pm$ 1,06	4,65aA $\pm$ 0,58	5,11a $\pm$ 0,61
7	317; 317	M livre	1,32bB $\pm$ 0,22	9,57a $\pm$ 5,42	29,53aA $\pm$ 1,73	6,37b $\pm$ 2,75
8	477; 315	I-glc	0,08aA $\pm$ 0,04	0,10a $\pm$ 0,06	0,04aA $\pm$ 0,01	0,04a $\pm$ 0,01
9	507; 345	S-gal	0,41a $\pm$ 0,04	0,27b $\pm$ 0,06	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
10	507; 345	S-glc	1,67aA $\pm$ 0,15	1,81a $\pm$ 0,39	0,73bB $\pm$ 0,09	1,02a $\pm$ 0,21
11	301; 301	Q livre	0,00 $\pm$ 0,00	1,47 $\pm$ 0,81	2,87 $\pm$ 1,16	0,00 $\pm$ 0,00
12	331; 331	L livre	0,00 $\pm$ 0,00	0,51 $\pm$ 0,17	0,47a $\pm$ 0,11	0,72a $\pm$ 0,27
13	315; 315	I livre	0,00 $\pm$ 0,00	0,34 $\pm$ 0,32	0,14a $\pm$ 0,05	0,14a $\pm$ 0,04
14	345; 345	S livre	0,00 $\pm$ 0,00	1,06 $\pm$ 0,65	0,59a $\pm$ 0,07	0,54a $\pm$ 0,19
		Q-tipo	9,55aA $\pm$ 1,35	11,20a $\pm$ 3,24	14,01aA $\pm$ 4,10	17,61a $\pm$ 3,91
		L-tipo	5,71bA $\pm$ 0,87	9,55a $\pm$ 1,23	5,12aA $\pm$ 0,62	5,83a $\pm$ 0,84
		M-tipo	82,58aA $\pm$ 2,40	75,68a $\pm$ 4,88	79,37aA $\pm$ 3,39	74,81a $\pm$ 2,68
		I-tipo	0,08aA $\pm$ 0,04	0,44a $\pm$ 0,37	0,18aA $\pm$ 0,06	0,18a $\pm$ 0,04
		S-tipo	2,08aA $\pm$ 0,15	3,13a $\pm$ 0,90	1,32aB $\pm$ 0,16	1,56a $\pm$ 0,37
Total (mg Q-3-glc/kg uva)			397,66aA $\pm$ 71,47	391,77a $\pm$ 69,24	436,84aA $\pm$ 23,64	271,08b $\pm$ 33,63

N, número do composto. ¹, denominação: M-miricitina, L-laricitrina, Q-quercetina, I-isoramnetina, S-siringetina e Q-3-glc-quercetina glicosilada. a, b: letras minúsculas iguais na mesma linha para fruta inteira e casca da mesma uva (BRS Carmem e BRS Magna) indicam que não diferem estatisticamente, com nível de significância de 0,05. A, B: letras maiúsculas iguais na mesma linha para fruta inteira (BRS Carmem e BRS Magna) indicam que não diferem estatisticamente, com nível de significância de 0,05.

Figura 15. Cromatogramas dos flavonóis presentes nas uvas BRS Carmem (cascas (a) e fruta inteira (b)), BRS Magna (cascas (c) e fruta inteira (d)), obtidos por CLAE-DAD a 360 nm (A identificação dos picos está apresentada na Tabela 6).



Ambas as uvas apontaram valores superiores aos relatados para outras uvas, como para as cascas da uva BRS Violeta (153,4 mg/kg uva) (REBELLO et al., 2013); para as cascas da uva Bordô (152,88 $\mu\text{mol/kg}$ uva) (LAGO-VANZELA et al., 2011b); e para variedades de uvas *V. viníferas*, que apresentaram uma faixa de 129 – 346 $\mu\text{mol/kg}$ uva (CASTILLO-MUNÓZ et al., 2007). Também é possível inferir que a polpa da BRS Magna apresenta quantidades superiores de flavonóis em relação a BRS Carmem.

Os flavonóis que foram detectados e identificados nas duas cultivares incluem cinco agliconas, com o seguinte padrão de substituição no anel B: quercetina (Q; 2 x OH), isoramnetina (I; 1 x OH, 1 x OCH₃), miricetina (M; 3 x OH), laricitina (L; 2 x OH, 1 x OCH₃) e siringetina (S; 1 x OH, 2 x OCH₃). Não foi encontrado nenhum flavonol derivado do kaempferol, o qual é o primeiro composto formado na rota biossintética dos flavonóis e que logo se transforma em outros compostos (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b). O mesmo foi relatado por Rebello et al. (2013), não detectando a presença deste composto em BRS Violeta e, ao contrário do apresentado para a Bordô (LAGO-VAZELA et al. 2011b) e para as uvas viníferas Tempranillo, Syrah, Petit Verdot, Merlot, Carbernet Sauvignon, Garnacha, Garnacha Tintorera, nas quais há porcentagens entre 1,80 – 6,34% (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2007).

Para ambas cultivares foram encontrados os derivados 3-glicosídeo da miricetina, quercetina, laricitrina, isoramnetina e siringetina. O derivado 3-galactosídeo da miricetina também foi relatado em ambas as cultivares, já o da siringetina foi encontrado apenas na uva BRS Carmem.

A identificação destes compostos foi baseada nos seus sinais EM/EM correspondentes aos íons pseudomoleculares ($[M-H]^+$) de m/z de 479 para os derivados do flavonol do tipo miricetina, 463 para os derivados do flavonol tipo quercetina (Q-tipo), 493 para o do tipo laricitrina (L-tipo), 477 para o do tipo isoramnetina (I-tipo) e 507 para o do tipo siringetina (S-tipo). Os íons produtos detectados de m/z 317, 301, 331, 315 e 345, respectivamente, para os flavonóis tipo -M, -Q, -L, -I, e -S, foram gerados pela perda de um

fragmento hexose ($[(M-162)-H]^-$) para ambos derivados 3-galactosídeo (gal) e 3-glicosídeo (glc).

O espectro UV-vis dos diferentes derivados (3-glc e 3-gal) do mesmo flavonol aglicona são praticamente idênticos. Assim, os derivados 3-galactosídeo e 3-glicosídeo da miricetina e da siringetina foram distinguidos devido o fato de os derivados 3-galactosídeo dos flavonóis aglicona sempre eluem antes de seus respectivos derivados 3-glicosídeos sob condições cromatográficas em que foi usada coluna de fase reversa (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b). Já no caso dos compostos derivados do 3-glucuronídeo da miricetina e quercetina, observa-se a presença de um íon pseudomolecular ($[M-H]^-$) de m/z de 493 e 477, respectivamente, e íons produtos de m/z de 317 e 301 respectivamente, devido a característica perda de um fragmento neutro de 176 u correspondente a molécula do ácido glucurônico.

Observou-se pelos resultados apresentados na **Tabela 6** que, provavelmente, durante a extração e processamento das amostras ocorreu a formação de artefatos que foram evidenciados pela presença de agliconas livres. Assim, para possibilitar a comparação dos resultados obtidos, os dados de porcentagem molar referentes aos flavonóis individuais identificados foram recalculados em forma de perfil de flavonóis por tipo de aglicona, isto é, em: M-tipo, Q-tipo, L-tipo, I-tipo e S-tipo.

Todas as amostras apresentaram maiores teores do flavonol do tipo miricetina, fazendo parte destes os derivados 3-glicosídeo, 3-galactosídeo e 3-glucuronídeo. Além de, da maior para a menor concentração, os flavonóis do tipo quercetina, laricitrina, siringetina e isoramnetina. Este mesmo perfil foi apresentado para as cascas e para as polpas da uva Bordô (LAGO-VANZELA et al., 2011b), mas esta também apresentou kaempferol-3-glc, com porcentagens inferiores da isoramnetina. Também para as cascas da uva BRS Violeta (REBELLO et al., 2013) foi apresentado tal perfil, porém com a ausência de isoramnetina. No entanto, perfil diferente foi mostrado para as uvas viníferas Tempranillo, Syrah, Petit Verdot, Merlot, Carbernet

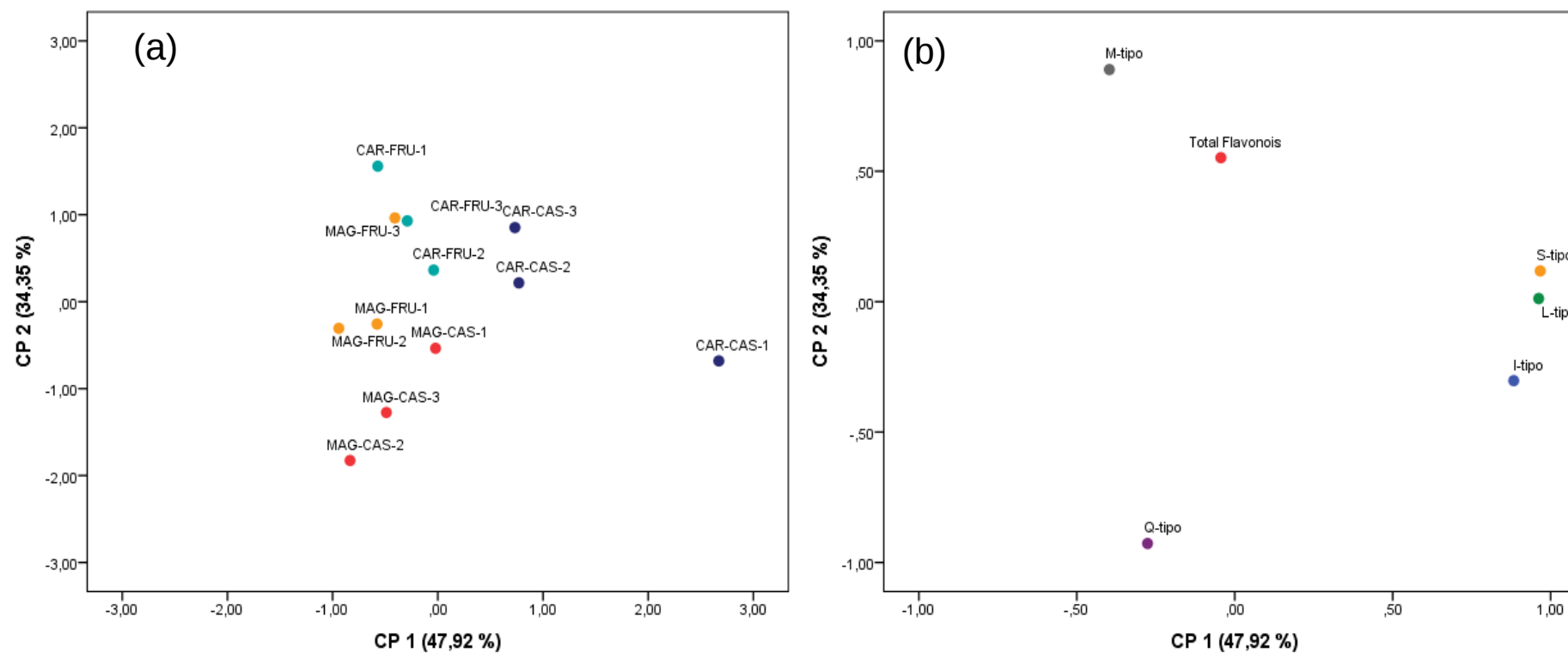
Sauvignon, Garnacha, Garnacha Tintorera (CASTILLO-MUNÓZ et al., 2007), nas quais o principal flavonol encontrado foi do tipo quercetina, seguido da miricetina e ainda foi verificado a presença do tipo kaempferol.

Uma análise de componentes principais foi realizada para mostrar as principais diferenças entre os flavonóis presentes nas cultivares de uvas BRS Carmem e BRS Magna (frutas inteiras) bem como entre as partes (frutas inteiras e cascas) de cada cultivar analisadas. Os componentes principais 1 (CP-1) e 2 (CP-2) explicaram 47,92% e 34,35%, respectivamente, da variação, totalizando 82,26%. A **Figura 16a** mostra o gráfico das amostras de BRS Carmem e BRS Magna, sendo que no CP-1 foi possível diferenciar as amostras analisadas de BRS Carmem, isto é, fruta inteira da casca enquanto que o CP-2 foi possível diferenciar as amostras de fruta inteira de BRS Carmem e de BRS Magna, com exceção de uma repetição desta última (MAG-FRU-3).

As amostras de BRS Carmem inteira foram alocadas no lado negativo do CP-1 e positivo do CP-2 enquanto as amostras de BRS Magna inteira foram alocadas no lado negativo do CP-2. Já as amostras referentes as cascas da BRS Carmem foram alocadas no lado positivo do CP-1 enquanto as amostras referentes as cascas da BRS Magna foram alocadas no lado negativo do CP-1 e CP-2. Na **Figura 16b** foi possível observar que: o lado positivo do CP-1 foi carregado, principalmente, pelos flavonóis do tipo laricitrina (L-tipo, 0,96), sirinetina (S-tipo, 0,97) e isoramnetina (I-tipo, 0,88); o lado positivo do CP-2 foi carregado pelos flavonóis do tipo miricetina (M-tipo, 0,89); e, o lado negativo do CP-2 pelos flavonóis do tipo quercetina (Q-tipo, -0,93).

Portanto, as amostras de BRS Carmem inteira apresentaram maiores concentrações de flavonóis do tipo miricetina quando comparado as amostras de BRS Magna (inteira). Além disso, as amostras referentes as cascas de BRS Carmem apresentaram maiores concentrações de flavonóis do tipo laricitina, sirinetina e isoramnetina enquanto as amostras de BRS Magna, de flavonol do tipo quercetina.

Figura 16. Análise dos componentes principais (a) para as amostras de fruta inteira (FRU) e casca (CAS) das uvas BRS Carmem (CAR) e BRS Magna (MAG) e (b) da composição de flavonóis.



Abreviação: Q, Quercetina; I, Isoramnetina; M, Miricetina; L, Laricitrina; S, Siringetina; Total flavonóis, concentração total de flavonóis.

5.1.3 Derivados do ácido hidroxicinâmico

Com relação a análise quantitativa, observa-se que a uva BRS Carmem apresenta concentração total de derivados do ácido hidroxicinâmico (DAHC) superior ao encontrado nas uvas inteiras da BRS Magna (2544,73 $\mu\text{mol/kg}$ de uva vs. 498,22 $\mu\text{mol/kg}$ de uva, respectivamente), bem como quando comparado a outras uvas viníferas como a Garnacha que apresentou concentração entre 689 – 799 $\mu\text{mol/kg}$ de uva (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b) e não viníferas como a uva Bordô com 483 $\mu\text{mol/kg}$ de uva (LAGO-VANZELA et al., 2011b), e a uva híbrida BRS Violeta, com 429 $\mu\text{mol/kg}$ de uva (REBELLO et al., 2013). Estes resultados demonstram que a uva BRS Carmem é uma fonte importante desta classe de compostos fenólicos.

Observa-se para a uva BRS Magna que os DAHC se concentraram, predominantemente, nas cascas, sendo estes resultados similares aos encontrados para a uva BRS Violeta (REBELLO et al., 2013), no qual a polpa contribuiu com apenas 1,5% da concentração total de DAHC presente na fruta. Já no caso da uva BRS Carmem, a distribuição dos DAHC foi mais equilibrada, encontrando aproximadamente 45% da concentração total presente nas cascas e o restante poderíamos inferir, a partir dos resultados obtidos para a fruta inteira, que se apresenta na polpa.

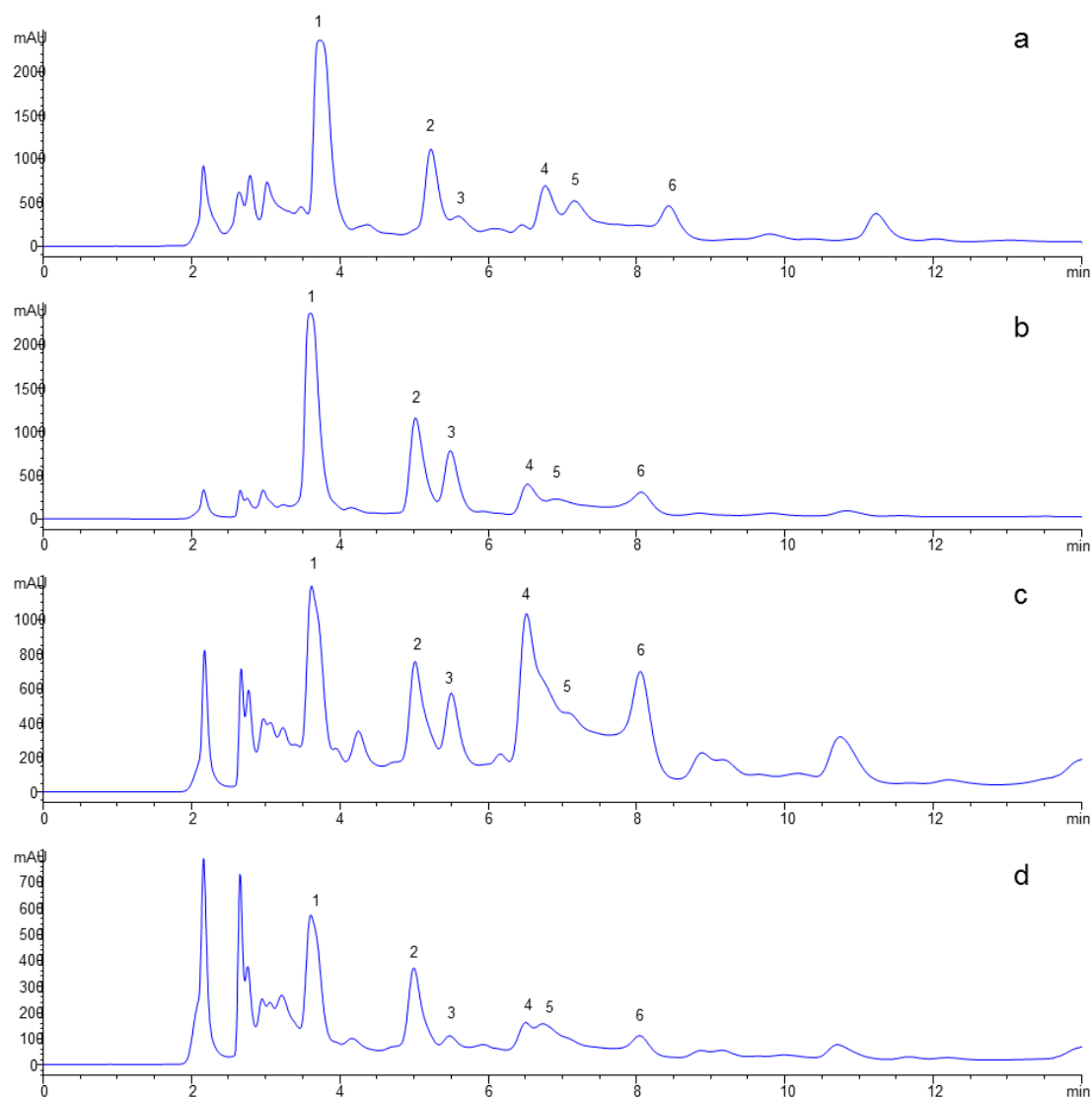
A identificação destes compostos foi realizada com o auxílio dos respectivos cromatogramas de íons extraídos (EIC), no modo de ionização negativo, observados no espectro EM/EM (**Tabela 7**), e foram confirmados pelos seus espectros obtidos no UV-Vis-DAD (dados não disponíveis) e por dados disponíveis na literatura (LAGO-VANZELA et al., 2011b; REBELLO et al., 2013). Os cromatogramas obtidos para os derivados do ácido hidroxicinâmico (frutas inteiras e cascas) estão apresentados na **Figura 17**, no qual os números dos compostos presentes nos cromatogramas estão correlacionados com os da **Tabela 7**.

Tabela 7. Características espectrais EM e EM/EM, dos derivados de ácido hidroxicinâmico (DAHC) identificados nas uvas BRS Carmem e BRS Magna (fruta inteira e cascas isoladas) por CLAE-DAD-IES-EM/EM (modo negativo de ionização), proporção molar (valor médio $\pm$ desvio padrão, $n = 3$) e concentração total (como mg equivalentes de ácido caftárico).

N	Íon pseudomolecular; íon produto (m/z)	Derivados do Ácido Hidroxicinâmico	Proporção Molar (%)			
			BRS Carmem Fruta inteira	BRS Carmem Casca	BRS Magna Fruta inteira	BRS Magna Casca
1	311; 179, 149, 135	ác. <i>trans</i> -caftárico	53,36Aa $\pm$ 2,15	50,76a $\pm$ 3,41	43,45Ba $\pm$ 3,79	28,61b $\pm$ 3,43
2	295; 163, 149, 119	ác. <i>trans</i> -cutárico	18,94Aa $\pm$ 2,00	21,27a $\pm$ 5,46	30,08Ba $\pm$ 4,75	23,78a $\pm$ 5,39
3	325; 163, 145	glc-cumarico-1	14,61Aa $\pm$ 1,30	6,96a $\pm$ 5,20	3,65Bb $\pm$ 1,54	9,22a $\pm$ 2,45
4	325; 163, 145	glc-cumarico-2	6,16Aa $\pm$ 0,60	8,26a $\pm$ 2,07	7,18Ab $\pm$ 1,39	16,99a $\pm$ 4,38
5	325; 193, 149	ác. <i>trans</i> -fertárico	1,89Ab $\pm$ 0,33	7,05a $\pm$ 0,47	7,15Aa $\pm$ 4,51	6,88a $\pm$ 0,98
6	325; 163, 145	glc-cumarico-3	5,04Ba $\pm$ 1,08	5,70a $\pm$ 1,11	8,49Aa $\pm$ 1,66	14,52a $\pm$ 3,47
Total (mg de ác. caftárico/kg de uva)			794,54Aa $\pm$ 67,70	359,95b $\pm$ 189,05	155,65Ba $\pm$ 38,02	186,10a $\pm$ 40,70

N, número do composto. a, b: letras minúsculas iguais na mesma linha indicam para fruta inteira e casca da mesma uva (BRS Carmem e BRS Magna) indicam que não há diferença estatística, com nível de significância de 0,05. A, B: letras maiúsculas iguais na mesma linha para a fruta inteira das uvas BRS Carmem e BRS Magna indicam que não há diferença estatística, com nível de significância de 0,05.

Figura 17. Cromatogramas dos derivados do ácido hidroxicinâmico presentes nas uvas BRS Carmem (cascas (a) e fruta inteira (b)) e BRS Magna (cascas (c) e fruta inteira (d)), obtidos por CLAE-DAD a 320 nm (A identificação dos picos está apresentada na Tabela 7).



A distribuição da concentração molar para os ácidos *trans*-caftárico, *trans*-cutárico e *trans*-fertárico para a fruta inteira e cascas das cultivares estudadas se assemelha aos resultados encontrados por Castillo-Muñoz et al. (2009b) para a uva Garnacha, porém para esta uva não foram relatados os isômeros do éster 1''-glicosídeo cumárico.

Para todas as amostras, o DAHC majoritário foi o ácido *trans*-caftárico, seguido pelo ácido *trans*-cutário e os isômeros do éster 1"-glicosídeo cumárico (glc-cumarico 2 e 3) que estavam presentes em maiores concentrações nas cascas, exceto o glc-cumarico 1. Já o ácido *trans*-fertárico está presente em maiores concentrações nas cascas para BRS Carmem quando comparando com os resultados apresentados para a BRS Magna.

Os derivados do tipo caftárico, do tipo *p*-cutárico e do tipo fertárico apresentaram íons pseudomoleculares $[M-H]^-$ de m/z 311, 295 e 325 e íons produtos derivados da perda da parte do ácido tartárico (132 u) e com formação do íon do ácido hidroxicinâmico ionizado correspondente de m/z 135, 119 e 149, devido à perda do dióxido de carbono (CO_2 ; 44 u) a partir do ácido hidroxicinâmico ionizado anteriormente formado, bem como apresentaram um íon produto em comum (m/z 149) em função da perda da parte do ácido hidroxicinâmico. Além disso, detectou-se três compostos do tipo cumárico que foram denominados como ésteres 1"-glicosídeo (glc-cumárico-1, 2 e 3, **Tabela 7**), principalmente baseados no íon produto de m/z 145, responsável pela perda de uma molécula de glicose ($[(M-180)-H]^-$).

Deve-se destacar que estes compostos apresentam características espectrais similares, o que leva a inferir que são isômeros. As possibilidades de isomerização podem estar relacionadas com a configuração da dupla ligação unida na porção hidroxicinamol (isômeros *cis* e *trans*), a posição de esterificação na molécula de glicose (isômeros posicionais), ou ainda a natureza da hexose (isômeros de hexose). A ocorrência de ésteres de ácido hidroxicinâmico e de hexoses não é geralmente relatada, especialmente entre variedades *V. vinifera* e seus vinhos, porém já foram relatadas na uva BRS Violeta (REBELLO et al., 2013) e na uva Bordô (LAGO-VANZELA et al., 2011b).

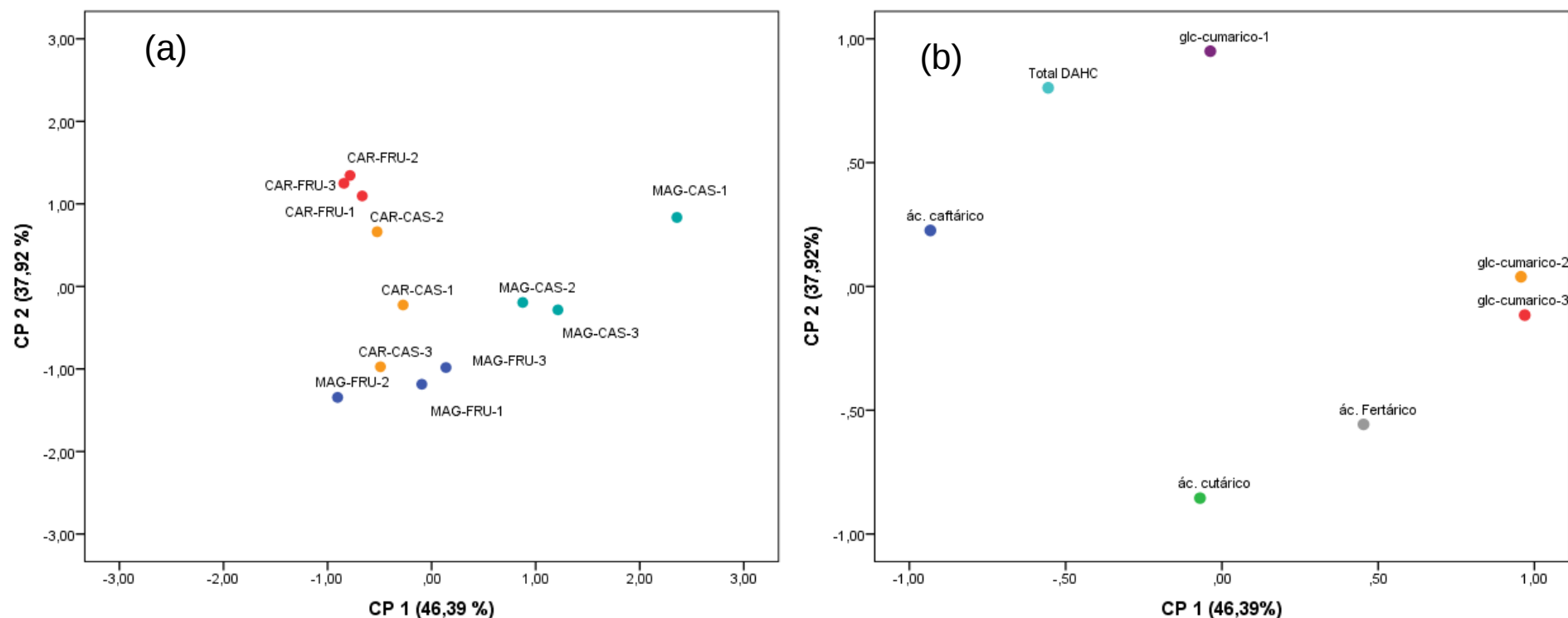
Tal como no caso das antocianinas e dos flavonóis, uma análise de componentes principais foi realizada para mostrar as principais diferenças

entre os derivados do ácido hidroxicinâmico presentes nas cultivares de uvas BRS Carmem e BRS Magna (fruta inteira) bem como entre as partes (fruta inteira e casca) de cada cultivar analisada. Os componentes principais 1 (CP-1) e 2 (CP-2) explicaram 84,31% da variação.

A **Figura 18a** mostra o gráfico das amostras de BRS Carmem e BRS Magna. No CP-1 foi possível diferenciar as amostras de BRS Magna (inteira e cascas), enquanto no CP-2 foi possível diferenciar as amostras de fruta inteira das cultivares BRS Magna e BRS Carmem, e entre as partes (inteira e casca) da cultivar BRS Carmem, com exceção de uma repetição da casca (CAR-CAS-2). As amostras de BRS Carmem inteira foram alocadas no lado negativo do CP-1 e positivo do CP-2, enquanto suas respectivas amostras de cascas foram alocadas no lado negativo do CP-1. Já as amostras de BRS Magna inteira foram alocadas no lado negativo do CP-2 e as amostras de BRS Magna casca foram no lado positivo do CP-1.

Ao analisar a **Figura 18b**, o lado positivo do CP-1 foi carregado por dois isômeros do éster glicosídeo tipo *p*-cumárico (glc-cumarico-3, 0,97; e glc-cumárico-2, 0,96) enquanto o lado negativo do CP-1 foi carregado pelo ácido caftárico (ác. caftárico, -0,93). Já o lado positivo do CP-2 foi carregado pelo isômero do éster glicosídeo tipo *p*-cumárico (glc-cumarico-1, 0,95) e pela concentração total de derivados do ácido hidroxicinâmico (Total DAHC, 0,80) enquanto o lado negativo do CP-2 foi carregado pelo ácido cutárico (ác. cutárico, -0,85). Pode-se inferir, portanto, que as amostras de BRS Carmem inteira apresentaram maior concentração do isômero do éster glicosídeo do tipo *p*-cumárico (glc-cumarico-1), bem como da concentração total dos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos (Total DAHC), enquanto as suas cascas apresentaram maior concentração de ácido caftárico. Já a BRS Magna inteira apresentou maior concentração de ácido cutárico enquanto suas respectivas cascas foram marcadas por dois isômeros ésteres glicosídeos do tipo *p*-cumárico (glc-cumarico-2 e glc-cumarico-3).

Figura 18. Análise dos componentes principais (a) para as amostras de fruta inteira (FRU) e casca (CAS) das uvas BRS Carmem (CAR) e BRS Magna (MAG), e (b) da composição de derivados do ácido hidroxicinâmico.



Abreviação: HACD, derivados do ácido hidróxicinâmico; glc, glicosídeo; glc-cumárico, éster glicosídeo do isômero tipo *p*-cumárico; ác. ácido; Total DAHC, concentração total de derivados do ácido hidroxicinâmico.

5.1.4 Estilbenos, flavan-3-óis e proantocianidinas

As características espectrais (íon pseudomolecular e íons produtos com IES-EM/EM) e concentração dos estilbenos identificados estão presentes na **Tabela 8**. Nas **Figuras 19a** e **20a** encontram-se os cromatogramas de íons extraídos por MRM referentes aos estilbenos presentes nas cascas das uvas BRS Carmem e BRS Magna, respectivamente.

No presente trabalho foram encontradas as formas *cis* e *trans* do composto conhecido como piceído, os quais são compostos derivados do *trans*-resveratrol (LAGO-VANZELA et al., 2015). Estes resultados foram similares ao relatado para a uva BRS Violeta, no qual foram encontrados nas cascas os dois isômeros do piceído em concentração de 0,058 mg equivalentes de resveratrol por kg de uva para o isômero *trans*-piceído e 0,080 mg equivalentes de resveratrol por kg de uva para o *cis*-piceído (REBELLO et al., 2013).

O estilbeno majoritariamente encontrado nas amostras foi o *trans*-piceído ($m/z = 389$), sendo a maior concentração referente as cascas. Estes valores de estilbenos são relativamente menores quando comparados com o descrito para outras cultivares de uvas não-viníferas, como a Bôrdó, que apresentou valores de 10,91 mg de resveratrol/kg (LAGO-VANZELA et al., 2011).

De acordo com a classificação proposta por Gatto et al. (2008), para cultivares de uvas *V. viníferas*, ambas as cultivares estudadas podem ser consideradas baixas produtoras de resveratrol por apresentarem valores abaixo de 1,8 mg/kg, dependendo de dados adicionais para mais amostras de diferentes vinhedos e safras sucessivas.

O padrão de fragmentação observado no espectro EM/EM para estes compostos foi a presença de íon pseudomolecular ($[M-H]^-$) de m/z de 389 e um íon produto de m/z 227 gerado a partir da perda neutra de

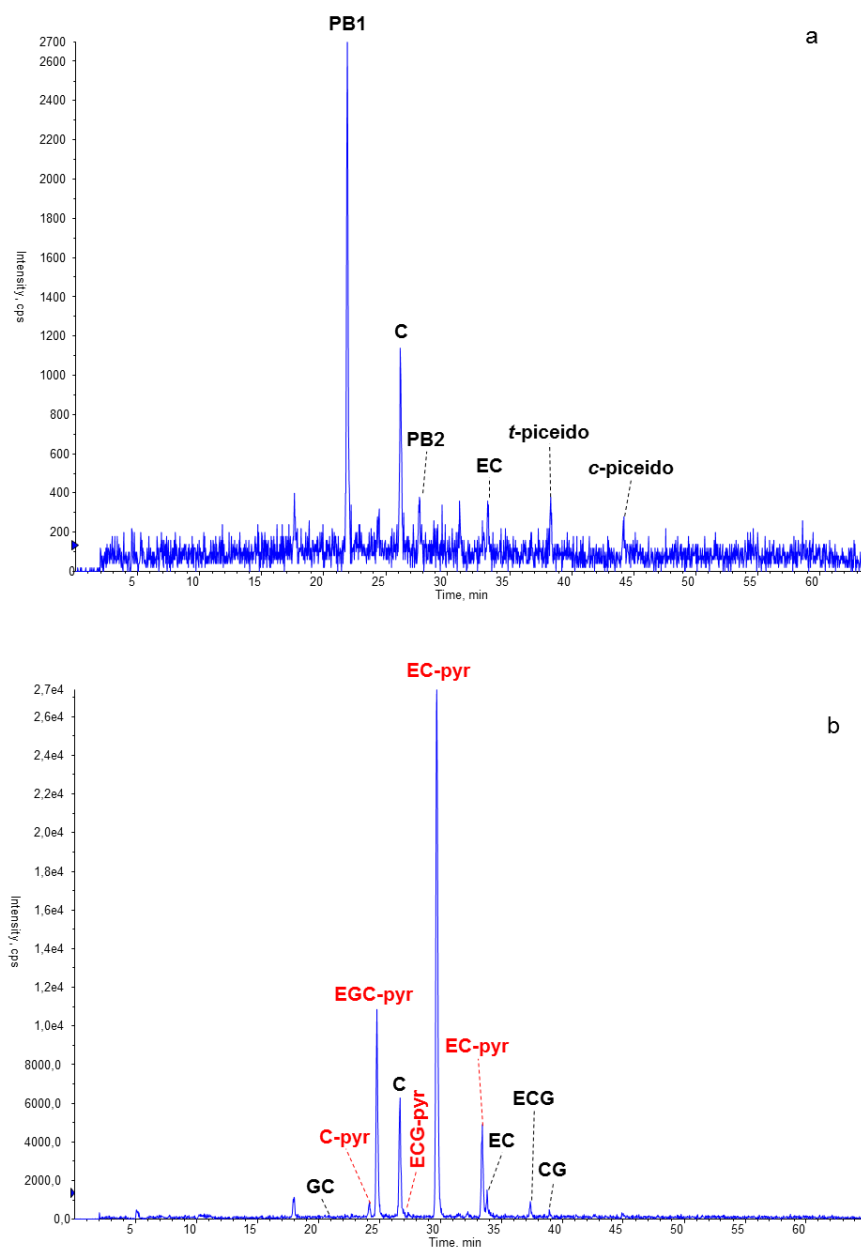
uma unidade de glicose desidratada (162 u). Tais compostos foram diferenciados e identificados em função do tempo de retenção na coluna cromatográfica por diferenciação de suas formas estruturais, sendo que a forma do composto do tipo *trans*- faz com que este tipo de isômero seja identificado antes do seu respectivo isômero *cis*-, mesmo que ambos possuam a mesma *m/z*.

Tabela 8. Características espectrais de EM e EM/EM dos estilbenos identificados nas uvas BRS Carmem e BRS Magna (casca e semente) por CLAE-DAD-IES-EM/EM (modo negativo de ionização), concentração de cada composto (mg equivalentes de resveratrol/kg de uva), valor médio $\pm$ desvio padrão, $n = 2$ para as amostras da BRS Carmem e $n=3$ para BRS Magna.

Íon pseudomolecular; íon produto (m/z)	Estilbeno	BRS Carmem	BRS Carmem	BRS Magna	BRS Magna
		Casca	Semente	Casca	Semente
389; 227	<i>trans</i> - piceido	0,08aA $\pm$ 0,02	0,01bA $\pm$ 0,00	0,50aA $\pm$ 0,27	0,00bB $\pm$ 0,00
389; 227	<i>cis</i> - piceido	0,02aB $\pm$ 0,00	0,00bA $\pm$ 0,00	0,16aA $\pm$ 0,01	0,00bA $\pm$ 0,00
Total (mg 3-glc-resv/kg de uva)		0,10aA $\pm$ 0,02	0,01bA $\pm$ 0,00	0,66aA $\pm$ 0,28	0,00bB $\pm$ 0,00

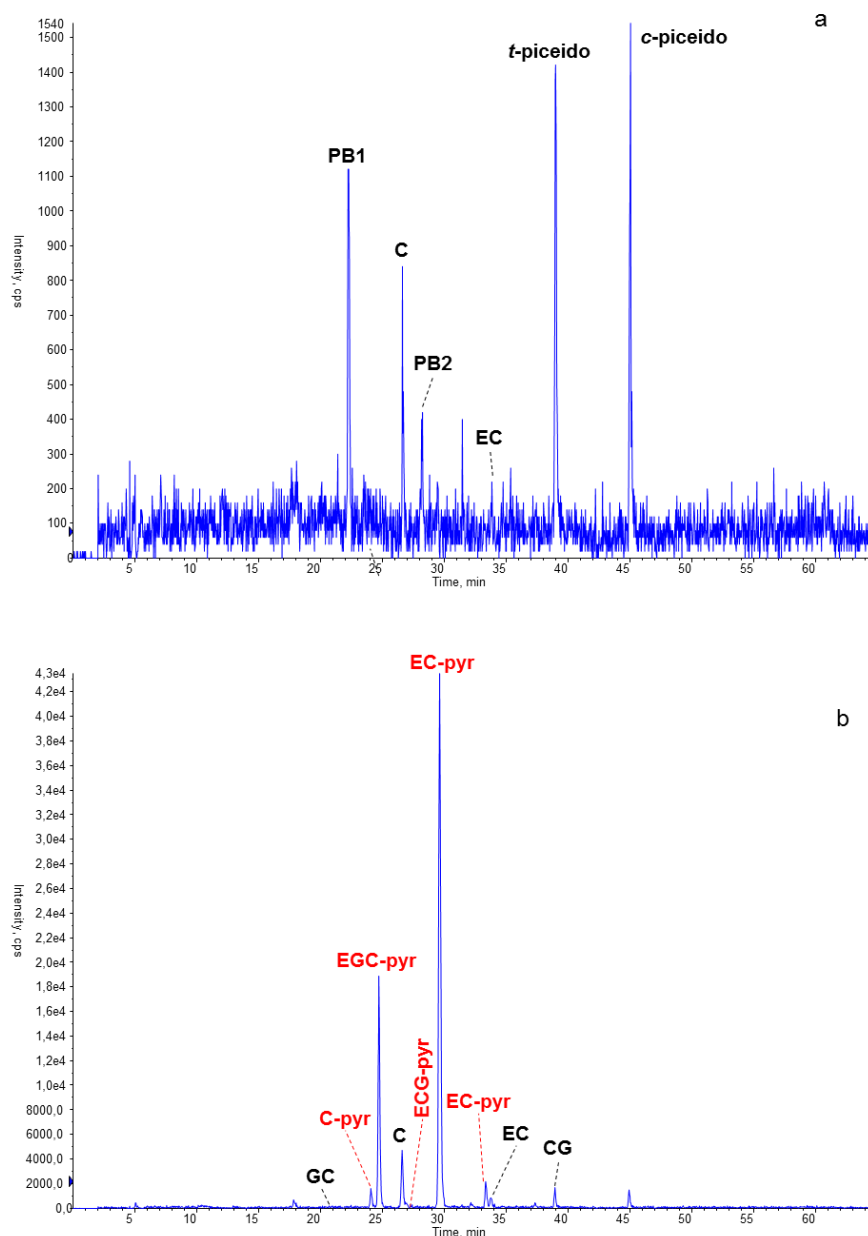
A, B: letras maiúsculas iguais na mesma linha para as partes da uva (casca ou semente) da BRS Carmem e BRS Magna indicam que não há diferença estatística, com nível de significância de 0,05. a, b: letras minúsculas iguais na mesma linha para casca e semente da mesma uva (BRS Carmem e BRS Magna) indicam que não há diferença estatística, com nível de significância de 0,05.

Figura 19. Cascas da uva BRS Carmem: Cromatogramas de íons extraídos por MRM para estilbenos (a); Cromatogramas de íons extraídos por MRM para, flavan-3-óis monómeros e proantocianidinas dímeras do tipo B antes (a) e depois (b) da reação de despolimerização com pirogalol.



Estilbenos: *t*- e *c*- piceido, forma *trans*- e *cis*-pideido. Flavan-3-óis monómeros: C, catequina; EC, epicatequina; GC, galatocatequina; CG, galato de catequina; EGC, epigalatocatequina; ECG, galato de epicatequina. Proantocianidinas dímeras tipo B: PB1 e PB2, proantocianidinas do tipo B1 e B2. Pyr, derivados formados após reação com pirogalol das unidades de extensão da proantocianidina.

Figura 20. Cascas da uva BRS Magna: Cromatogramas de íons extraídos por MRM para estilbenos (a); Cromatogramas de íons extraídos por MRM para, flavan-3-óis monómeros e proantocianidinas dímeras do tipo B antes (a) e depois (b) da reação de despolimerização com pirogalol.



Estilbenos: *t*- e *c*- piceido, forma *trans*- e *cis*-pideido. Flavan-3-óis monómeros: C, catequina; EC, epicatequina; GC, galatocatequina; CG, galato de catequina; EGC, epigalatocatequina; ECG, galato de epicatequina. Proantocianidinas dímeras tipo B: PB1 e PB2, proantocianidinas do tipo B1 e B2. Pyr, derivados formados após reação com pirogalol das unidades de extensão da proantocianidina.

Na **Tabela 9** encontram-se a quantificação dos flavan-3-óis monômeros e dímeros individuais, às somas dos flavan-3-óis monômeros e dímeros, assim como a concentração total de proantocianidinas, todos expressos em mg de catequina por kg de uva.

Nas **Figuras 19a e 21a** encontram-se os cromatogramas de íons extraídos por MRM dos flavan-3-óis e proantocianidinas presentes na cascas e sementes, respectivamente, da uva BRS Carmem antes da reação com pirogalol enquanto nas **Figuras 19b e 21b** estão os respectivos cromatogramas após a reação com pirogalol. Nas **Figuras 20a e 22a** encontram-se os cromatogramas de íons extraídos por MRM dos flavan-3-óis e proantocianidinas presentes na cascas e sementes, respectivamente, da uva BRS Magna antes da reação com pirogalol enquanto nas **Figuras 20b e 22b** estão os respectivos cromatogramas após a reação com pirogalol.

Seis flavan-3-óis monômeros e três dímeros (B-tipo) foram encontrados nas diferentes partes (cascas e sementes) das uvas BRS Carmem e BRS Magna. Uma comparação estatística entre os resultados obtidos das partes (cascas e sementes) analisadas de cada cultivar, bem como os resultados obtidos das cascas e das sementes entre as cultivares foi realizada. Observou-se que para todas as amostras de ambas as cultivares, o monômero de flavan-3-ol encontrado em maior concentração foi correspondente a (+)-catequina.

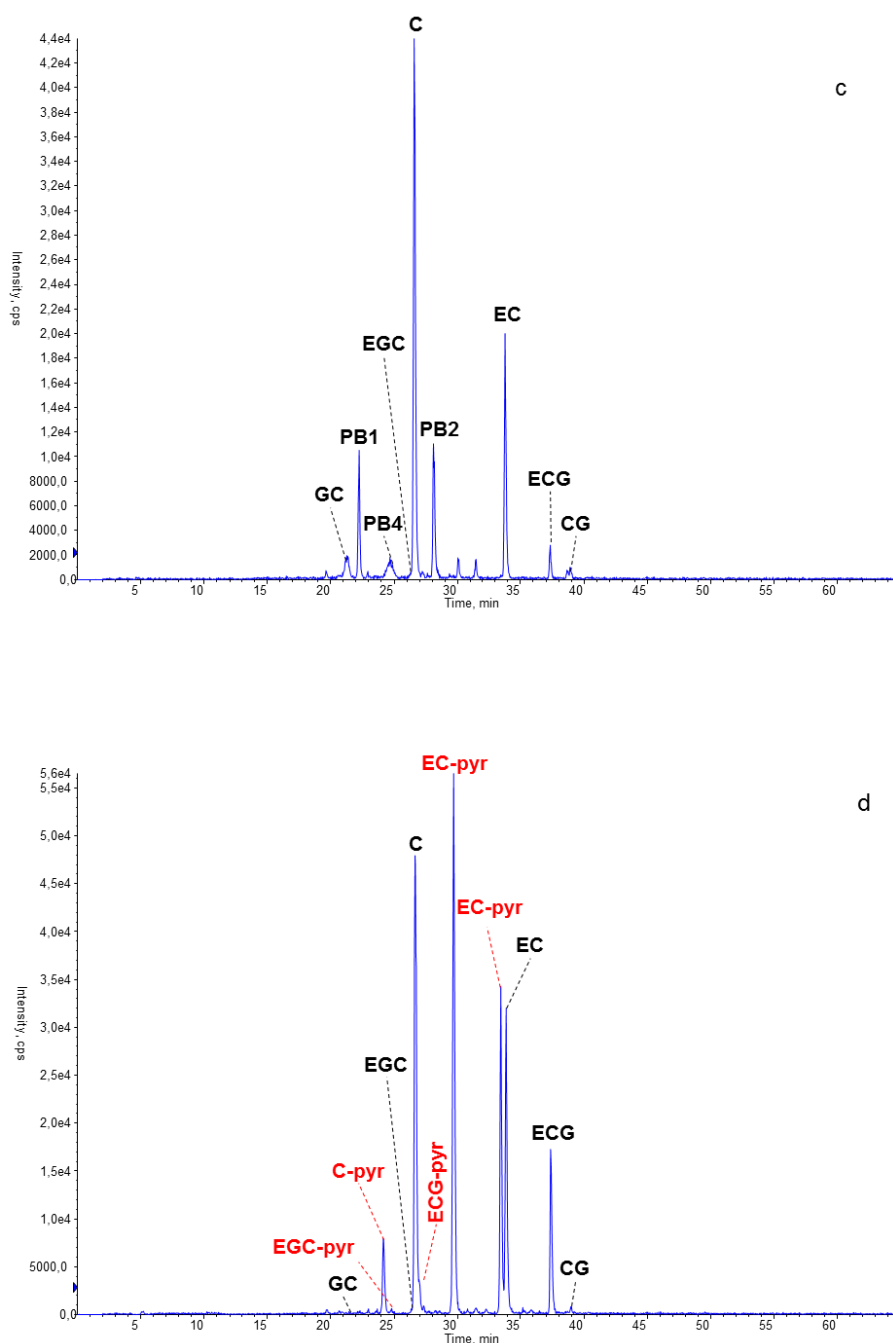
No caso dos flavan-3-óis dímeros, para as amostras de cascas da BRS Magna o dímero majoritário foi o PB1 enquanto que o PB4 foi relatado em maiores concentrações nas cascas da BRS Carmem e nas sementes de ambas as cultivares. Já a soma conjunta de flavan-3-óis monômeros e dímeros foi maior para as amostras de sementes de ambas as cultivares ($12,76 \pm 0,29$ e $15,00 \pm 1,47$ mg eq. de catequina/kg de uva, para a BRS Carmem e BRS Magna, respectivamente).

Tabela 9. Flavan-3-óis (monômeros e dímeros), e proantocianidinas (detalhadas em unidades terminais e de extensão), identificados nas cascas e sementes das uvas BRS Carmem e BRS Magna, por CLAE-DAD-IES-EM/EM (modo negativo de ionização), soma dos monômeros, dímeros, total de flavan-3-óis e porcentagem de proantocianidinas (valor médio $\pm$ desvio padrão, n = 2 para as BRS Carmem e n=3 para BRS Magna).

Denominação ¹	mg de cada composto/kg de uva* e porcentagem molar (%)**			
	BRS Carmem Casca	BRS Carmem Semente	BRS Magna Casca	BRS Magna Semente
C*	3,37bA $\pm$ 0,59	8,34aA $\pm$ 0,21	1,56bB $\pm$ 0,59	11,08aA $\pm$ 1,30
EC*	0,82bA $\pm$ 0,02	2,78aA $\pm$ 0,17	0,32bB $\pm$ 0,09	2,10aB $\pm$ 0,10
GC*	1,03aA $\pm$ 0,11	0,01bA $\pm$ 0,00	0,31aB $\pm$ 0,12	0,01bA $\pm$ 0,00
EGC*	1,17aA $\pm$ 0,06	0,03bA $\pm$ 0,01	0,40aB $\pm$ 0,12	0,03bA $\pm$ 0,00
CG*	0,00bA $\pm$ 0,00	0,01aA $\pm$ 0,00	0,00A $\pm$ 0,00	0,00B $\pm$ 0,00
ECG*	0,10aA $\pm$ 0,08	0,12aA $\pm$ 0,00	0,05aA $\pm$ 0,02	0,02aB $\pm$ 0,00
Soma monômeros (mg eq. C/kg uva)	6,34bA $\pm$ 0,79	11,24aA $\pm$ 0,38	2,59bB $\pm$ 0,90	13,22aA $\pm$ 1,39
PB1*	0,46bA $\pm$ 0,03	1,04aB $\pm$ 0,15	1,54aA $\pm$ 0,97	1,50aA $\pm$ 0,03
PB2*	0,46aA $\pm$ 0,03	0,17bB $\pm$ 0,01	0,16aB $\pm$ 0,07	0,21aA $\pm$ 0,02
PB4*	1,00bA $\pm$ 0,06	1,82aA $\pm$ 0,04	0,47bA $\pm$ 0,34	1,83aA $\pm$ 0,18
Soma dímeros (PB) (mg eq. C/kg uva)	3,98aA $\pm$ 0,05	1,52bA $\pm$ 0,09	1,09aB $\pm$ 0,68	1,78aA $\pm$ 0,11
Total (mg eq. C/kg uva)	10,32aA $\pm$ 0,85	12,76aA $\pm$ 0,29	3,68bB $\pm$ 1,50	15,00aA $\pm$ 1,47
PA (mg de C/kg de uva)	204,36aA $\pm$ 0,20	28,40bA $\pm$ 3,09	160,66aA $\pm$ 29,60	26,94bA $\pm$ 2,14
mDP	5,93aB $\pm$ 0,21	3,06bA $\pm$ 0,19	11,18aA $\pm$ 1,11	6,71aA $\pm$ 2,61
% Galoilação**	1,92bA $\pm$ 0,09	8,1aA $\pm$ 0,77	0,62bB $\pm$ 0,03	6,40aA $\pm$ 0,84
% Prodefinidinas**	23,97aA $\pm$ 0,84	0,59bA $\pm$ 0,05	21,70aB $\pm$ 2,58	0,91bA $\pm$ 0,14
% C-term**	60,28aB $\pm$ 1,14	48,13aA $\pm$ 7,33	62,39aA $\pm$ 0,26	24,14bA $\pm$ 20,25
% EC-term**	11,56bB $\pm$ 0,24	41,56aA $\pm$ 5,58	14,23bA $\pm$ 0,42	61,58aA $\pm$ 15,01
% GC-term**	13,40aA $\pm$ 0,29	0,17bA $\pm$ 0,12	9,45aB $\pm$ 0,41	0,33bA $\pm$ 0,11
% EGC-term**	13,21aA $\pm$ 0,44	0,37bA $\pm$ 0,04	12,89aA $\pm$ 0,54	0,75bA $\pm$ 0,77
% CG-term**	0,00bA $\pm$ 0,00	0,04aA $\pm$ 0,01	0,00aA $\pm$ 0,00	0,05aA $\pm$ 0,05
% ECG-term**	1,54bA $\pm$ 0,17	9,73aA $\pm$ 1,81	1,04bA $\pm$ 0,25	13,14aA $\pm$ 5,70
% C-ext**	0,58aB $\pm$ 0,10	5,01aA $\pm$ 5,90	1,56bA $\pm$ 0,24	11,37aA $\pm$ 1,49
% EC-ext**	73,98aA $\pm$ 1,39	86,95aA $\pm$ 5,61	76,22bA $\pm$ 3,00	82,38aA $\pm$ 1,96
% GC-ext**	0,47aA $\pm$ 0,08	0,05bA $\pm$ 0,00	0,43aA $\pm$ 0,01	0,04bA $\pm$ 0,02
% EGC-ext**	22,97aA $\pm$ 1,22	0,56bB $\pm$ 0,04	21,21aA $\pm$ 2,76	0,87bA $\pm$ 0,02
% CG-ext**	1,99bA $\pm$ 0,15	7,43aA $\pm$ 0,33	0,58bB $\pm$ 0,03	5,33aB $\pm$ 0,46

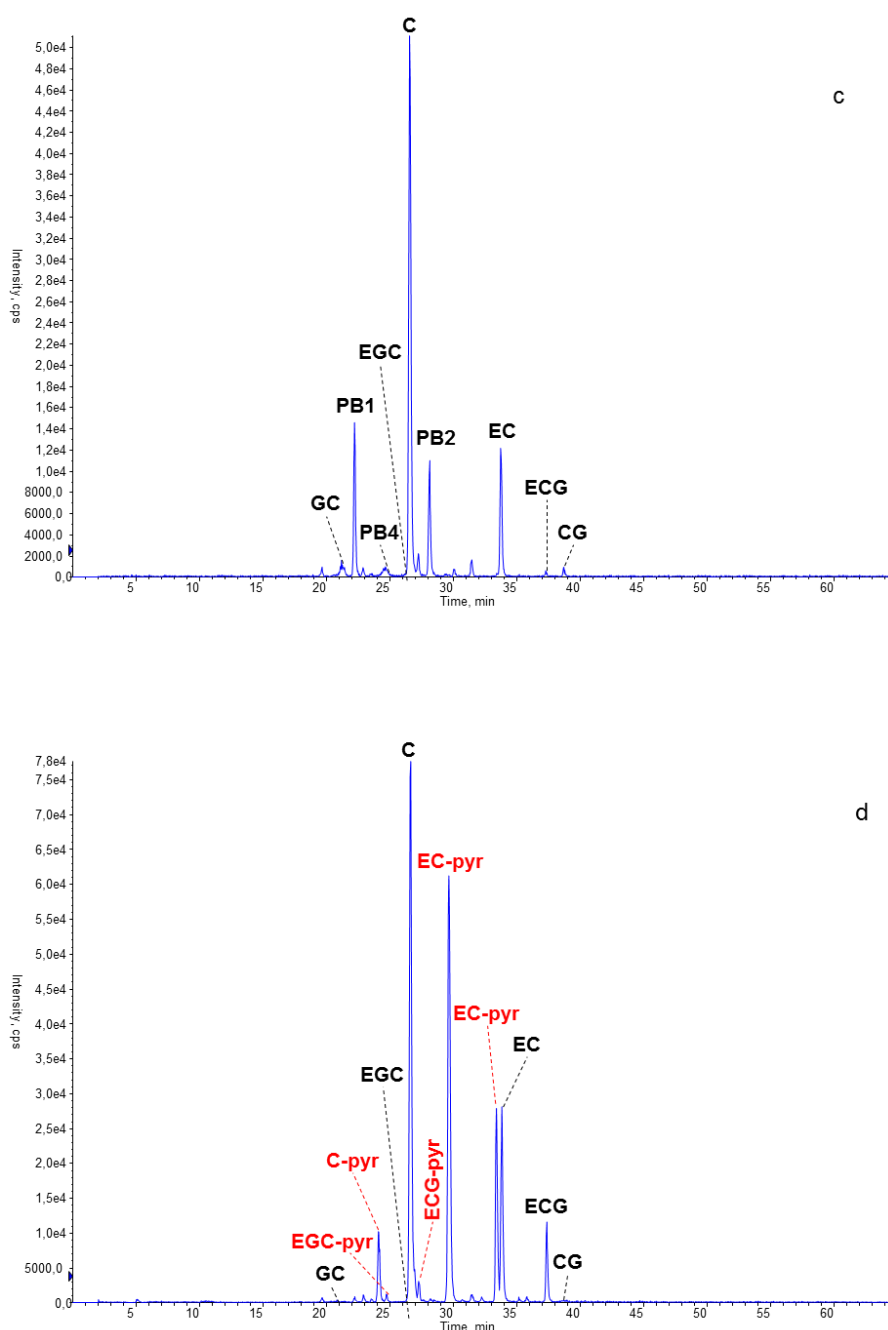
¹Abreviações: C, catequina; EC, epicatequina; GC, galatocatequina; EGC, epigalocatequina; CG, galato de catequina; ECG, galato de epicatequina; PB1, PB2 e PB4, proantocianidinas do tipo B1, B2 e B4; PA, proantocianidinas totais; -term, unidade terminal; -ext, unidade de extensão. *, quantificado com seus respectivos padrões; **, dados em porcentagem molar, sendo as unidades terminais e de extensão mostradas separadamente totalizando 100% cada. A, B: letras maiúsculas iguais na mesma linha para as partes da uva (casca ou semente) da BRS Carmem e BRS Magna indicam que não há diferença estatística, com nível de significância de 0,05. a, b: letras minúsculas iguais na mesma linha para casca e semente da mesma uva (BRS Carmem e BRS Magna) indicam que não há diferença estatística, com nível de significância de 0,05.

Figura 21. Sementes da uva BRS Carmem: Cromatogramas de íons extraídos por MRM para, flavan-3-óis monómeros e proantocianidinas dímeras do tipo B antes (a) e depois (b) da reação de despolimerização com pirogalol.



Flavan-3-óis monómeros: C, catequina; EC, epicatequina; GC, galatocatequina; CG, galato de catequina; EGC, epigalocatequina; ECG, galato de epicatequina. Proantocianidinas dímeras tipo B: PB1 e PB2, proantocianidinas do tipo B1 e B2. Pyr, derivados formados após reação com pirogalol das unidades de extensão da proantocianidina.

Figura 22. Sementes da uva BRS Magna: Cromatogramas de íons extraídos por MRM para, flavan-3-óis monómeros e proantocianidinas dímeras do tipo B antes (a) e depois (b) da reação de despolimerização com pirogalol.



Flavan-3-óis monómeros: C, catequina; EC, epicatequina; GC, galatocatequina; CG, galato de catequina; EGC, epigalatocatequina; ECG, galato de epicatequina. Proantocianidinas dímeras tipo B: PB1 e PB2, proantocianidinas do tipo B1 e B2. Pyr, derivados formados após reação com pirogalol das unidades de extensão da proantocianidina.

Ao realizar a comparação entre os resultados da soma de monômeros e dímeros entre as cultivares pode-se observar que os valores mais altos da soma dos monômeros foram relatados para as amostras de sementes de ambas as cultivares (não havendo diferença estatística entre estas). No caso das amostras referentes às cascas das cultivares, a BRS Carmem apresentou maior valor médio quando comparado ao obtido pela BRS Magna.

Já para soma dos dímeros, no caso da BRS Carmem, o maior valor médio foi encontrado para as amostras de cascas quanto comparado com as amostras de sementes; enquanto que para a BRS Magna, não se observou diferença significativa entre os valores médios encontrados nas amostras de cascas e sementes.

Comparando-se os resultados da soma de dímeros entre as cultivares, nota-se que as amostras de cascas da BRS Carmem apresentaram maiores valores quando comparado as amostras de cascas da BRS Magna. Por outro lado, os valores encontrados para as amostras de sementes da BRS Carmem não apresentaram diferença estatística dos encontrados para as amostras de sementes da BRS Magna.

Com isto, a soma conjunta de flavan-3-óis monômeros e dímeros para as amostras de cascas de BRS Magna ($3,68 \pm 1,50$ mg eq. C/kg de uva) foi inferior, quando comparado com suas respectivas sementes ($15,00 \pm 1,47$ mg eq. C/kg de uva) e também quanto as amostras de cascas de BRS Carmem ($10,32 \pm 0,85$ mg eq. C/kg de uva); as sementes da BRS Magna, por outro lado, apresentaram maior concentração do que as sementes da BRS Carmem ($12,76 \pm 0,29$ mg eq. C/kg de uva).

No caso da BRS Carmem, maior concentração destes compostos também foi relatado nas sementes quando comparado às suas cascas. A uva híbrida BRS Violeta, estudada por Rebello et al. (2013), também apresentou maior concentração de flavan-3-óis monômeros e dímeros na semente (346 mg eq C/kg uva) do que nas cascas (8,6 mg eq C/kg uva),

sendo os resultados superiores aos obtidos para as cultivares estudadas neste trabalho.

Para caracterização estrutural foi calculado o grau de polimerização das proantocianidinas, bem como a porcentagem de galoilação e de prodelfinidinas. As prodelfinidinas são proantocianidinas que contem unidades de GC e/ou EGC, e que em meio ácido e/ou alcoólico liberam a antocianidina delfinidina, do contrário seriam procianidinas.

Para realização dos cálculos descritos no item 4.5.2 para % de galoilação e de prodelfinidinas, só foram levados em conta as unidades de CG e ECG (para a % galoilação) e as unidades de GC e EGC (para a % prodelfinidina) que foram liberadas durante a despolimerização da proantocianidinas e não as que já existiam na forma livre (como monômero), antes da despolimerização da proantocianidina.

Na **Tabela 9** estão apresentados os valores correspondentes à concentração total das proantocianidinas (PA), expressa em mg de catequina por kg de uva; o grau de polimerização (mDP) em valor adimensional; e, os valores de porcentagem de galoilação, de prodelfinidinas e de cada uma das unidades terminais (-term) e de extensão (-ext).

Não foram encontrados na literatura, para uvas viníferas, resultados similares com os obtidos para as uvas BRS Carmem e BRS Magna. As variedades estudadas apresentam maiores concentrações nas cascas ($204,36 \pm 0,20$ e $160,66 \pm 29,60$, BRS Carmem e BRS Magna respectivamente), quando comparado as suas correspondentes sementes ($28,40 \pm 3,09$ e $26,94 \pm 2,14$ mg de C/kg de uva, respectivamente para BRS Carmem e BRS Magna), porém as concentrações encontradas nas sementes são significativamente diferentes as das cascas.

Para a BRS Violeta (REBELLO et al., 2013), assim como encontrado para as cultivares estudadas, relatou-se maiores concentrações nas cascas do que nas sementes (673 ± 229 mg/kg uva

vs. 479 ± 53 mg/kg de uva), porém estes resultados não foram diferentes significativamente, sendo a concentração encontrada para as sementes similar aos encontrados para as *V. viníferas*.

Quando se comparam as cultivares, observa-se que a porcentagem de prodelfinidinas foi maior para a BRS Carmem ($25,02 \pm 0,93\%$). Quando foi realizada a comparação entre as cascas e sementes das cultivares, os menores valores, para ambas as cultivares, foram encontrados para as sementes. Quanto as porcentagens das unidades terminais e de extensão para as proantocianidinas, notou-se que os valores encontrados para as unidades terminais foram menores para as amostras de sementes da BRS Carmem do que para suas cascas, exceto pelo derivado do galato de epicatequina (% ECG-term). Os valores das unidades de extensão foram maiores, exceto pelo derivado do galato de catequina (% CG-ext) e do epigallocatequina (% EGC-ext).

Ao contrário, a BRS Magna apresentou três derivados de unidades terminais com maiores proporções nas amostras de cascas em relação as amostras correspondentes as suas sementes: epicatequina (% EC-term), galato de catequina (% CG-term) e galato de epicatequina (% ECG-term); e para as unidades de extensão as amostras de cascas apresentaram maiores porcentagens de galocatequina (% GC-ext) e de epigallocatequina (% EGC-ext).

Pode-se inferir por meio das análises dos resultados que as unidades terminais e de extensão majoritárias em todas as amostras foram dos derivados de catequina (% C-term) e epicatequina (% EC-ext), respectivamente. Resultado similar foi relatado por Rebello et al. (2013), para a uva BRS Violeta, porém para esta foi encontrada maior proporção da unidade terminal de catequina (% C-term) na semente do que na casca, ao contrário do encontrado nas amostras estudadas.

Os pares de transição (m/z) monitorados por varredura utilizando o monitoramento de reações múltiplas (MRM) e os compostos que foram quantificados em função desta seleção dos pares de transição estão

descritos a seguir: (+)-catequina e (-)-epicatequina (289-245); procianidinas B1 e B2 (577 – 425 e 577 – 407); (-)-epigallocatequina e (-)-galocatequina (305 – 221 e 305 – 219); (-)-epicatequina 3-galato (441-289); e (-)-galocatequina 3-galato (457 – 331 e 457 – 305).

Além disto, para o MRM de transição dos flavan-3-óis monoméricos (unidades terminais de proantocianidinas) os seguintes pares de m/z também foram selecionados, correspondendo aos adutos de pirogalol das unidades de extensão das proantocianidinas: adutos de (+)-catequina e (-)-epicatequina (413 – 287); aduto de (-)-epigallocatequina (429 – 303 e 429 – 261); e aduto (-)-epicatequina 3-galato (565 – 413).

Vale ressaltar que esta metodologia de análise tem algumas limitações, sendo a mais importante com relação ao fato de que só é possível avaliar as características estruturais das proantocianidinas que apresentam uma ligação do tipo B (ligação interflavan, que são as únicas que se rompem com a reação de despolimerização). Portanto, uma proantocianidina do tipo A (com ligação éter) não pode ser analisada por esta metodologia, já que simplesmente não se despolimeriza, pois a ligação éster não se rompe nestas condições.

Pode também ocorrer nas uvas proantocianinas mistas, em que há presença tanto de ligação interflavan (tipo B) como ligação éter (tipo A). Assim, estes compostos se despolimerizam parcialmente, rompendo apenas a ligação tipo B. No caso dos pigmentos poliméricos, as proantocianidinas se unem a uma antocianina e esta por sua vez bloqueia a reação de despolimerização. No entanto, a formação de taninos mais complexos ou mesmo a degradação das proantocianidinas pode ocorrer principalmente após o processamento, o que não se aplica neste caso.

Uma análise de componentes principais foi realizada, conjuntamente, para mostrar as principais diferenças entre três classes de compostos (estilbenos, flavonóis monômeros e dímeros, e proantocianidinas) presentes nas cascas e sementes das cultivares BRS Carmem e BRS Magna, bem como entre as cultivares.

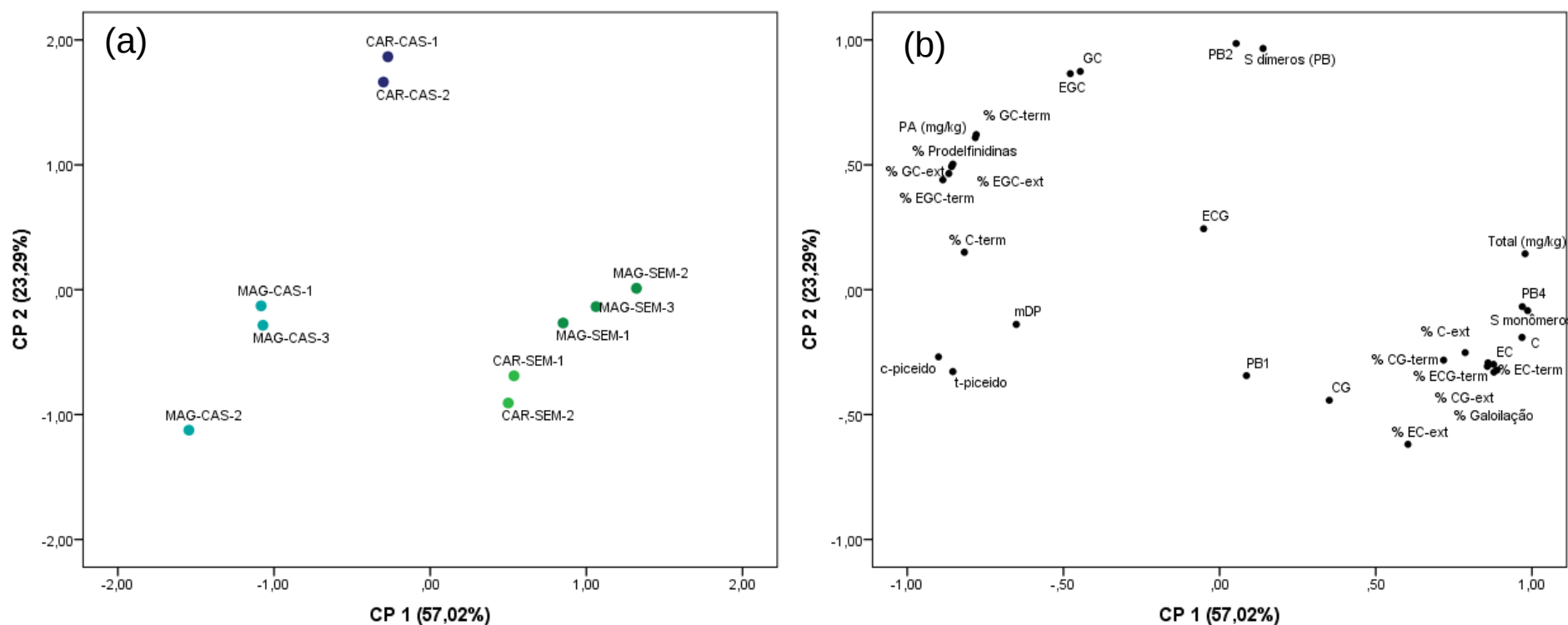
Para análise destas classes de compostos foram utilizadas as seguintes variáveis: estilbenos (expressos em mg de cada composto por kg de fruta), flavan-3-óis monômeros e dímeros (expressos em mg de cada composto por kg de fruta), somatório expresso separadamente dos flavan-3-óis monômeros e dímeros, bem como da soma total de flavan-3-óis monômeros e dímeros (mg equivalentes de catequina por kg de fruta), concentração total em proantociandinas (expresso em mg de catequina por kg de fruta), bem como dados das características estruturais das proantocianidinas, a saber, média do grau de polimerização, porcentagem de galoilação, porcentagem de prodelfinidinas, porcentagem de unidades de extensão e terminais específicas para cada tipo de flavan-3-óis (%) referentes as amostras de cascas e sementes das uvas BRS Carmem e BRS Magna.

O componente principal 1 (CP-1) apresentou porcentagem de explicação de variância de 57,02%, o 2 (CP-2) de 23,29% e o 3 (CP-3) de 11,09%; sendo que a melhor diferenciação entre as amostras foi obtida ao representa-las no plano formado pelo CP-1 e CP-2, os quais juntos explicaram uma porcentagem de variância de 80,31%.

A **Figura 23a** mostra o gráfico das amostras de BRS Carmem e BRS Magna, sendo que no CP-1 foi possível diferenciar as amostras de cascas e sementes da cultivar BRS Magna estudada, enquanto no CP-2 foi possível diferenciar as amostras de cascas de BRS Carmem com relação as suas respectivas amostras de semente bem como em relação as amostras de cascas de BRS Magna.

Não foi possível diferenciar as amostras de semente de BRS Carmem e BRS Magna. As amostras de semente de BRS Carmem e BRS Magna foram alocadas no lado positivo do CP-1 e negativo do CP-2 (exceto por uma amostra de BRS Magna semente, MAG-SEM-2), enquanto as cascas de BRS Magna foram alocadas no lado negativo do CP-1 e do CP-2 enquanto as cascas da BRS Carmem estão no lado negativo do CP-1 e positivo do CP-2.

Figura 23. Análise dos componentes principais (a) para as amostras de cascas (CAS) e sementes (SEM) das uvas BRS Carmem (CAR) e BRS Magna (MAG), e (b) da composição de estilbenos, flavan-3-óis monômeros e dímeros e proantocianidinas.



Abreviação: PA, proantocianidinas totais; C, catequina, EC, epicatequina; ECG, galato de epicatequina; EGC, epigalocatequina; GC, galocatequina; CG, galato de catequina; PB1, proantocianidina do tipo B1; PB2, proantocianidina do tipo B2; PB4, proantocianidina do tipo B4; -term, unidade terminal; -ext, unidade de extensão; T, total; S, soma; mono, monômeros; galoil, galoilação; c-, *cis*; t-, *trans*.

Para facilitar a visualização das diferenças observadas na **Figura 23**, a discussão a seguir foi realizada em relação a cada classe química avaliada, segundo a análise quanti e qualitativa (**Tabelas 8 e 9**). Para a classe dos estilbenos, os compostos *trans*-piceído (*t*-piceído, -0,85) e *cis*-piceído (*c*-piceído, -0,90) foram carregados no lado negativo do CP-1 (**Figura 23b**). Portanto, os estilbenos estiveram presentes em maiores proporções nas amostras de BRS Magna casca, tanto do *cis*-piceído quanto do *trans*-piceído (**Figura 23b**).

Para a classe dos flavan-3-óis (monômeros e dímeros) e das proantocianidinas, pela Figura 15b, é possível verificar que o lado positivo do CP-1 foi carregado pelos flavan-3-óis monômeros de catequina (C, 0,97) e epicatequina (EC, 0,88) e, pela soma dos flavan-3-óis monômeros (S monômeros, 0,99), bem como pelo dímero procianidina tipo B4 (PB 4, 0,97) e para o total de flavan-3-óis (Total (mg/kg), 0,98). Com relação a caracterização estrutural das proantocianidinas (PA), as quais fazem parte da composição dos flavan-3-óis dímeros, o lado positivo do CP-1 foi carregado pela porcentagem de galoilação (% galoilação, 0,88), porcentagem de unidade de extensão do tipo galato de catequina (% CG-ext, 0,86), porcentagem de unidades terminais do tipo epicatequina (% EC-term, 0,89) e do tipo galato de epicatequina (% ECG-term, 0,86). Já o lado negativo foi carregado pela porcentagem de prodelfinidina (% Prodelfinidinas, -0,85), porcentagem de unidades de extensão do tipo galato catequina (% GC-ext, -0,87) e do tipo epigalatocatequina (% EGC-ext, -0,86), porcentagem de unidades terminais do tipo catequina (% C-term, -0,82) e do tipo epigalocatequina (% EGC-term, -0,87).

O lado positivo do CP-2 foi carregado pelos flavan-3-óis monômeros galato de catequina (GC, 0,87) e epigalocatequina (EGC, 0,87), bem como pelo dímero proantocianidina do tipo B2 (PB 2, 0,99) e pela soma dos dímeros (S dímeros, 0,97).

As amostras correspondentes as sementes de BRS Carmem não se diferenciaram das amostras de semente da BRS Magna, porém

analisando os resultados da **Tabela 9** juntamente com a **Figura 23** verifica-se que as sementes da BRS Carmem apresentaram maior concentração do flavan-3-ol monômero do tipo epicatequina (EC), bem como maior porcentagem de galoilação (% Galoilação) e de unidade de extensão do tipo galato de catequina (% CG-ext).

Já para as amostras de semente da BRS Magna pode-se notar maiores proporções da soma dos monômeros (S monômeros), do flavan-3-ol monômero do tipo catequina (C), da somatória total de flavan-3-óis expresso em mg equivalentes de catequina por kg de uva (Total (mg/kg)) e das unidades terminais do tipo epicatequina (% EC-term) e do tipo galato de epicatequina (% ECG-term). Além disto, ambas as amostras de sementes das cultivares apresentaram concentrações mais significativas do flavonol dímero (procianidina) do tipo B4 (PB4) em relação as amostras de cascas.

Pode-se inferir, a partir da **Figura 23**, que as amostras de cascas de BRS Carmem apresentaram maior concentração dos flavan-3-óis monômeros do tipo epigalocatequina (EGC) e do tipo galocatequina (GC), da somatória de dímeros (S dímeros) e de uma procianidina do tipo B2 (PB2), sendo também componentes característicos nestas amostras de cascas (porém em menor quantidade) o teor de prodelfinidinas (% Prodelfinidinas), das porcentagens das unidades de extensão do tipo epigalocatequina (% EGC-term), e das de extensão do tipo galato de catequina (% CG-ext) e de epigalatocatequina (% EGC-ext). Já as amostras de BRS Magna referentes as cascas apresentaram maiores concentrações apenas da unidade terminal do tipo catequina (% C-term).

5.1.5 Determinação da concentração de composto fenólicos totais e atividade antioxidante das uvas BRS Carmem e BRS Magna

De acordo com a **Tabela 10** é possível observar que a concentração de compostos fenólicos totais determinado para a BRS

Carmem foi significativamente ($p>0,05$) superior ao da BRS Magna, e que provavelmente refletiu positivamente nas atividades antioxidantes determinados tanto pela metodologia de DPPH como FRAP.

Tabela 10. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das frutas inteiras (com sementes) das uvas BRS Carmem e BRS Magna.

Determinações	BRS Carmem	BRS Magna
Compostos Fenólicos Totais (mg eq de ácido gálico/kg de uva)	4229,59a±76,68	2243,23b±111,19
DPPH (mmol de trolox/kg de uva)	23,09a±2,43	15,38a±0,51
FRAP (mmol de trolox/kg de uva)	55,29a±2,43	43,80b±0,24

a, b: letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que as amostras de fruta inteira das uvas BRS Carmem ou BRS Magna não diferem estatisticamente, com nível de significância de 0,05.

Comparando os dados do presente estudo com os disponíveis na literatura observar-se que ambas uvas híbridas brasileiras estudadas apresentaram maiores concentrações de compostos fenólicos totais comparativamente, com relação a uva Bordô ($1130,0 \pm 105,0$ mg ác. gálico/kg uva) apresentada por Lago-Vanzela et al. (2011b). Além disso, a BRS Carmem mostrou maior concentração quando comparada com outras uvas viníferas (731 – 3486 mg ác. gálico/kg uva), estudadas por Katalinic et al. (2010). Após utilizar a uva BRS Magna para elaboração de vinho, Lima et al. (2014) revelaram que o produto apresentou uma concentração de compostos fenólicos de 2097 ± 66 mg eq de ác. gálico por litro de vinho. Com relação aos resultados de atividade antioxidante, pode-se observar pela **Tabela 10** que os valores determinados de atividade antioxidante tanto para BRS Carmem como para BRS Magna foram menores quando comparados ao relatado nas cascas da uva Bordô

($37,60 \pm 1,0$ mmol de trolox por kg de uva) (LAGO-VANZELA et al., 2011b). Provavelmente, haja compostos fenólicos específicos presentes na uva Bordô que apresentam elevada atividade antioxidante, contribuindo para este resultado. Por outro lado, Castilhos et al. (2015), após elaborarem vinhos a partir das uvas Bordô e BRS Carmem, observaram-se valores próximos de atividade antioxidante após o processo (7,74 e 7,06 mmol/L de trolox eq, respectivamente).

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos verificou-se que especificamente para a classe das antocianinas, a majoritária para ambas as cultivares foi a delfinidina seguida pelos seus derivados. Para as frutas inteiras, a BRS Carmem foi marcada pelas antocianinas minoritárias monoglicosiladas acetiladas derivadas da petunidina e malvidina, enquanto a BRS Magna foi marcada pela minoritária delfinidina diglicosilada cafeilada. Nas cascas da BRS Magna, por outro lado, a antocianina diglicosila acetilada derivada da peonidina foi o principal marcador.

Quanto aos flavonóis, a miricetina foi a majoritária para ambas as cultivares, com os flavonóis minoritários do tipo quercitina, laricitina, siringetina e isoramnetina os marcadores para as amostras de cascas. Para os DAHC, a BRS Carmem apresentou concentração total elevada e, significativamente, maior que a encontrada para BRS Magna, mostrando-se fonte importante destes compostos. Verificou-se também que a BRS Carmem apresentou maior concentração do isômero do tipo *p*-cumárico, enquanto suas cascas foram marcadas pelo ácido caftárico. A presença do isômero do tipo *p*-cumárico é considerada uma vantagem em relação ao ácido cafeico e seus derivados por ser mais estável frente a oxidação. A fruta inteira da BRS Magna foi marcada pelo ácido cutárico e suas cascas por dois isômeros do tipo *p*-cumárico.

Ambas as cultivares não mostraram ser ricas fontes de estilbenos. Observou-se maiores concentrações de flavan-3-óis totais nas sementes de ambas as cultivares, com proantocianidinas presentes majoritariamente nas cascas de ambas as cultivares. A BRS Carmem apresentou concentração, significativamente, maior de compostos fenólicos totais, bem como atividade antioxidante mais elevada em relação a BRS Magna.

De forma geral, as duas cultivares apresentam perfis de compostos fenólicos interessantes e concentrações destes compostos elevadas que

incentivam seu uso como matéria-prima para a elaboração de diferenciados produtos alimentícios. Em particular, a alta concentração de antocianinas em ambas cultivares permitiria obter produtos com coloração vermelha intensa, além de apresentarem maior estabilidade devido a predominância de antocianinas diglicosiladas e, em sua grande maioria, na forma cumarilada, dois fatores que aumentam a estabilidade das antocianinas.

REFERÊNCIAS

ABE, L. T. et al. 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.

ADAMS, D. O. Phenolics and ripening in grape berries. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 57, p. 249-256, 2006.

ANDERSEN, O. M.; JORDHEIM, M. The anthocyanins. In: _____; MARKHAM, K.R., (Ed.). **Flavonoids chemistry, biochemistry and applications**, CRC Press, Boca Raton, p. 471-551, 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, **Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists**. 18 ed. Gaithersburg, 2005.

BARCIA, M. T. et al. Phenolic composition of grape and winemaking by-products of brazilian hybrid cultivars BRS Violeta and BRS Lorena. **Food Chemistry**, London, v. 159, p. 95-105, 2014.

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature Reviews-Drug Discovery**, London, v. 5, p. 493-506, 2006.

BAVARESCO, L. et al. Role of the variety and some environmental factors on grape stilbenes. **Vitis-Journal of Grapevine Research**, Siebeldingen, v. 46, n. 2, p. 57-61, 2007.

BEER, D. et al. Phenolic compounds: a review of their possible role as in vivo antioxidants of wine. **South African Journal for Enology and Viticulture**, Stellenbosch, v. 23, n. 2, p. 48-61, 2002.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. **Analytical biochemistry**, Philadelphia, v. 239, p. 70-76, 1996.

BORDIGA, M. et al. Pyrogallol: an alternative trapping agent in proanthocyanidins analysis. **Food Analytical Methods**, New York, v. 6, p. 148-156, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel wissenschaft und technologie = Science et technologie alimentaire**, Amsterdam, v. 28, p. 25-30, 1995.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanin. In: MARKAKIS, P. Anthocyanin as food colors. **London**: Academic Press, New York, p. 1-40, 1982.

BROUILLARD, R.; CHASSAING, S.; FOUGEROUSSE, A. Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long? **Phytochemistry**, New York, v. 64, n. 7, p. 179-1186, 2003.

BURDA, S.; OLEZSEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonols. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, London, v. 49, p. 2774-2779, 2001.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; NACHTIGAL, J. C. BRS Violeta: nova cultivar de uva para suco e vinho de mesa. **Comunicado Técnico [da] EMBRAPA**, Bento Gonçalves, n. 63, p. 1-8, 2005.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; NACHTIGAL, J. C. BRS Carmem: nova cultivar de uva tardia para suco. **Comunicado Técnico [da] EMBRAPA**, Bento Gonçalves, n. 84, p. 1-8, 2008.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; RITSCHER, P. S. **Embrapa uva e vinho**: novas cultivares brasileiras de uva. Bento Gonçalves, Embrapa Uva e Vinho, 2010.

CASTAÑEDA-OVANDO, A. et al. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, London, v. 113, n. 4, p. 859-871, 2009.

CASTILHOS, M. B. M. et al. Pre-drying and submerged cap winemaking: effects on polyphenolic compounds and sensory descriptors. Part II: BRS Carmem and Bordô (*Vitis labrusca* L.). **Food Research International**, Barking, v. 76, p. 697-708, 2015.

CASTILLO-MUÑOZ, N. et al. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 992-1002, 2007.

CASTILLO-MUÑOZ, N. et al. Flavonol 3-O-glycosides series of *Vitis vinifera* Cv. Petit Verdot red wine grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 209-219, 2009a.

CASTILLO-MUÑOZ, N. et al. Red-color related phenolic composition of Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes and red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 7883-7891, 2009b.

CHEYNIER, V. RIGAUD, J. HPLC separation and characterization of flavonols in the skins of *Vitis vinífera* var. Cinsault. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 37, p. 248-252, 1986.

CHEYNIER, V. et al. The structures of tannins in grapes and wines and their interactions with proteins. In: T. R. Watkins (Ed.). **Wine: Nutritional and therapeutic benefits**, Washington American Chemical Society, Washington, 1997. p. 81–93 (Proceedings of ACS symposium series, 661).

CHUANG, C.; MCINTOSH, M. K. Potential mechanisms by which polyphenol - rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 31, p. 155-176, 2011.

DOHADWALA, M. M.; VITA, J. A. Grapes and cardiovascular disease. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 139, n. 9, p. 1788S-1793S, 2009.

DOWNEY, M. O.; DOKOOZLIAN, N. K.; KRSTIC M. P. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 57, n. 3, p. 257-268, 2006.

FERNÁNDEZ-MARÍN, M. I. et al. Terroir and variety: two key factors for obtaining stilbene-enriched grapes. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 31, p.191-198, 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Important notice**. Rome, 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/default.aspx>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

FRAIGE, K.; PEREIRA-FILHO, E. R.; CARRILHO, E. Fingerprinting of anthocyanins from grapes produced in Brazil using HPLC–DAD–MS and exploratory analysis by principal component analysis. **Food Chemistry**, London, v. 145, p. 395-403, 2014.

GATTO, P. et al. Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 11773-11785, 2008.

GEORGIEV, V.; ANANGA, A.; TSOLOVA, V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. **Nutrients**, Basel, v. 6, n. 1, p. 391-415, 2014.

GOMÉZ-PLAZA, E. et al. Studies on the anthocyanin profile of *Vitis Vinifera* intraspecific hybrids (Monastrell X Cabernet Sauvignon). **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 227, n. 2, p. 479-484, 2008.

HASLAM, E. In vino veritas: oligometric procyanidins and the ageing of red wines. **Phytochemistry**, New York, v. 19, p. 2577-2582, 1980.

HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; GARCÍA-ROMERO, E. Antocianos de variedades tintas cultivadas en La Mancha: perfiles varietales característicos de la uva y de los vinos monovarietales, y evolución durante la maduración de la baya. **Alimentaria**, Madrid, n. 352, p. 127-139, 2004.

HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. et al. Flavonol Profiles for grape and wine authentication. In: EBELE R. E.; TAKEOKA, G.; WINTERHALTER, P. **Progress in Authentication of food and wine**, Washington, American Chemical Society, 2011. p. 113-129. (ACS Symposium Series, 1081)

HUANG, Z. et al. Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC-ESI-MS. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 42, p. 819-824, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2015. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo/lspa_201501.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2015.

JACKSON, R. S. **Wine Science**: principais and aplications. New York: Academic Press, San Diego, 1994.

KATALINIC, V. et al. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). **Food Chemistry**, London, v. 119, p. 715-723, 2010.

KRUGER, M. J. et al. Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. **Food Research International**, Barking, v. 59, p. 41-52, 2014.

LACHENMEIER, D. K. et al. Can resveratrol in wine protect against the carcinogenicity of ethanol? A probabilistic dose-response assessment. **International Journal of Cancer = Journal International du Cancer**, New York, v. 134, p. 144-153, 2014.

LAGO-VANZELA, E. S. **Estudos bioquímicos, físico-químicos e tecnológicos de uvas paulistas**. Tese de Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto, SP. 185 p. 2011.

LAGO-VANZELA, E. S. et al. Phenolic composition of the brazilian seedless table grape varieties BRS Clara and BRS Morena. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, p. 8314-8323, 2011a.

LAGO-VANZELA, E. S. et al. 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**, Easton, v. 59, p. 13136-13146, 2011b.

LAGO-VANZELA, E. S. et al. 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**, Barking, v. 54, p. 33-43, 2013.

LAGO-VANZELA, E. S. et al. Aging of red wines made from hybrid grape cv. BRS Violeta: Effects of accelerated aging conditions on phenolic composition, color and antioxidant activity. **Food Research International**, Barking, v. 56, p. 182-189, 2014.

LAGO-VANZELA, E. S. et al. Compostos responsáveis pela cor e aromas dos vinhos. In: DA-SILVA, R.; LAGO-VANZELA, E. S.; BAFFI, M. A. In: **Uvas e vinhos: química, bioquímica e microbiologia**. São Paulo, Ed. Senac, Editora UNESP, 2015. p. 83-103.

LECCE, G. et al. Phenolic profiling of the skin, pulp and seeds of Albariño grapes using hybrid quadrupole time-of-flight and triple-quadrupole mass spectrometry. **Food Chemistry**, London, v. 145, p. 874-882, 2014.

LIMA, M. S. **Caracterização química de sucos produzidos em escala industrial com novas variedades brasileiras de uvas cultivadas no nordeste do Brasil**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, RS. 155 p. 2014.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005.

MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinion in Lipidology**, London, v. 16, p. 77-84, 2005.

MATTIVI, F. et al. Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 7692-77702, 2006.

MONAGAS, M.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 45, n. 2, p. 85-118, 2005.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MOUTOUNET, M. et al. Caractérisation structurale des tanins de la baie de raisin. Quelques exemples de l'incidence du cépage, du terroir et du mode de conduite de la vigne (proanthocianine). **Bulletin OIV**, Dijon, p. 433-443, 1996.

MULERO, J. G. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of red wine made from grapes treated with different fungicides. **Food Chemistry**, London, v. 180, p. 25-31, 2015.

MUÑOZ-ESPADA, A. C. et al. Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch grapes and wines. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 22, p. 6779-6786, 2004.

ORGANISATION INTERNATIONALE DE LA VIGNE ET DU VIN. Compendium of international methods of analysis. Dijon, 2011, v. 1. Disponível em: <<http://www.oiv.int/oiv/info/frpublicationoiv#analysevin>>. Acesso em 18 nov. 2014.

OUGH C.S.; AMERINE M.A. Acidity and individual acids. In **Methods for analysis of musts and wine**. New York: John Wiley & Sons, 2nd ed., 1988. p. 50-70.

PEREZ-VIZCAINO, F.; DUARTE, J. Flavonols and cardiovascular disease. **Molecular Aspects of Medicine**, Elmsford, v. 31, p. 478-494, 2010.

PRICE, S. F. et al. 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, 1995.

PRIEUR, C. et al. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. **Phytochemistry**, New York, v. 36, p. 781-784, 1994.

REBELLO, L. P. G. et al. 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**, Barking, v. 54, p. 354-366, 2013.

RIBÉREAU-GAYON, P. et al; Phenolic compounds. In: RIBÉREAU-GAYON P. GLORIES, Y. MAUJEAN, A. DUBOURDIEU, D. **Handbook of Enology**. Bordeaux: John Wiley & Sons, 2006.

RICARDO-DA-SILVA, J. M. et al. Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 1, p. 111-125, 1991.

RODRIGUEZ-MONTEALEGRE, et al. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v.37, p. 248-252, 2006.

RITSCHER, P. et al. ‘BRS MAGNA’ nova cultivar de uva para suco com ampla adaptação climática. **Comunicado Técnico [da] EMBRAPA**, Bento Gonçalves, n. 125, p. 1-12, 2012.

ROMERO-PÉREZ et al. Resveratrol and Piceid as varietal markers of white wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 8, p. 8314-8323, 1996.

RUIZ, A. et al. Hydroxycinnamic acids and flavonols in native edible berries of south Patagonia. **Food Chemistry**, London, v. 167, p. 84-90, 2015.

SÁ, M. et al. Extraction yields and anti-oxidant activity of proanthocyanidins from different parts of grape pomace: effect of mechanical treatments. **Phytochemical Analysis**, Published online in Wiley Online Library, v. 25, p. 134-140, 2014.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

STALICAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 18, p. 3268-3295, 2007.

TAI, Z. et al. Flavonol glycosides of *Pseudodrynaria coronans* and their antioxidant activity. **Chemistry of Natural Compounds**, New York, v. 48, p. 221-224, 2012.

TAVARES, I. M. C. et al. Suco de uva BRS Cora desidratado: Caracterização da espuma visando secagem em leito de espuma, In: Congresso de iniciação científica [da UNESP], n. 26, data, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - Instituto de biociencias, letras e ciências exatas. **XXVI Congresso de iniciação científica**. São José do Rio Preto, 2014.

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, 2009. cap. 9B, p. 463-507.

TOALDO, I. M. et al. 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**, London, v. 173, p. 527-535, 2015.

TSIMPLOULI C., et al. *In vitro* activity of dietary flavonol congeners against human cancer cell lines. **European Journal of Nutrition**, Heidelberg, v. 51, p. 181-190, 2012.

URZUA, A.; ECHEVERRIA, J.; ESPINOZA, J. Lipophilicity and antibacterial activity of flavonols: antibacterial activity of resinous exudates of *Haplopappus litoralis*, *H. chrysantemifolius* and *H. scrobiculatus*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v. 11, p. 369-376, 2012.

VALLVERDÚ-QUERALT, A. et al. Identification of phenolic compounds in red wine extract samples and zebrafish embryos by HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. **Food Chemistry**, London, v. 181, p. 146-151, 2015.

VOLP, A. C. P. et al. Flavonoids anthocyanins: characteristics and properties in nutrition and health. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica = Brazilian Journal of Clinical Nutrition = Revista Brasileira de Nutricion Clinica**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 141-149, 2008.

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

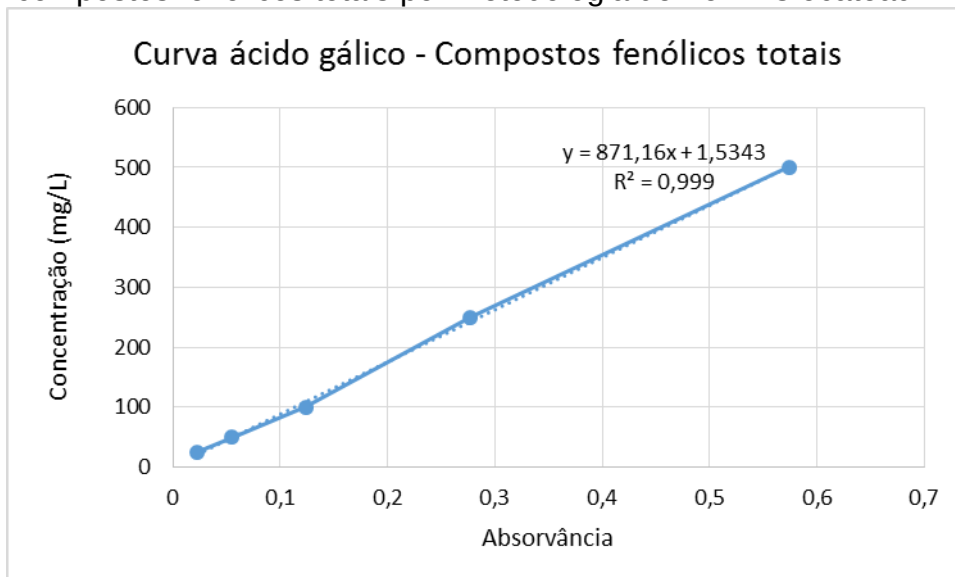
WILLIAMS, J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Serial review: flavonoids and isoflavones (phytoestrogens): absorption, metabolism, and bioactivity. **Free Radical Biology & Medicine**, USA, v. 36, n. 7, p. 838-849, 2004.

XIA, E. et al. Biological activities of polyphenols from grapes. **International Journal Molecular Sciences**, Basel, v. 11, p. 622-646, 2010.

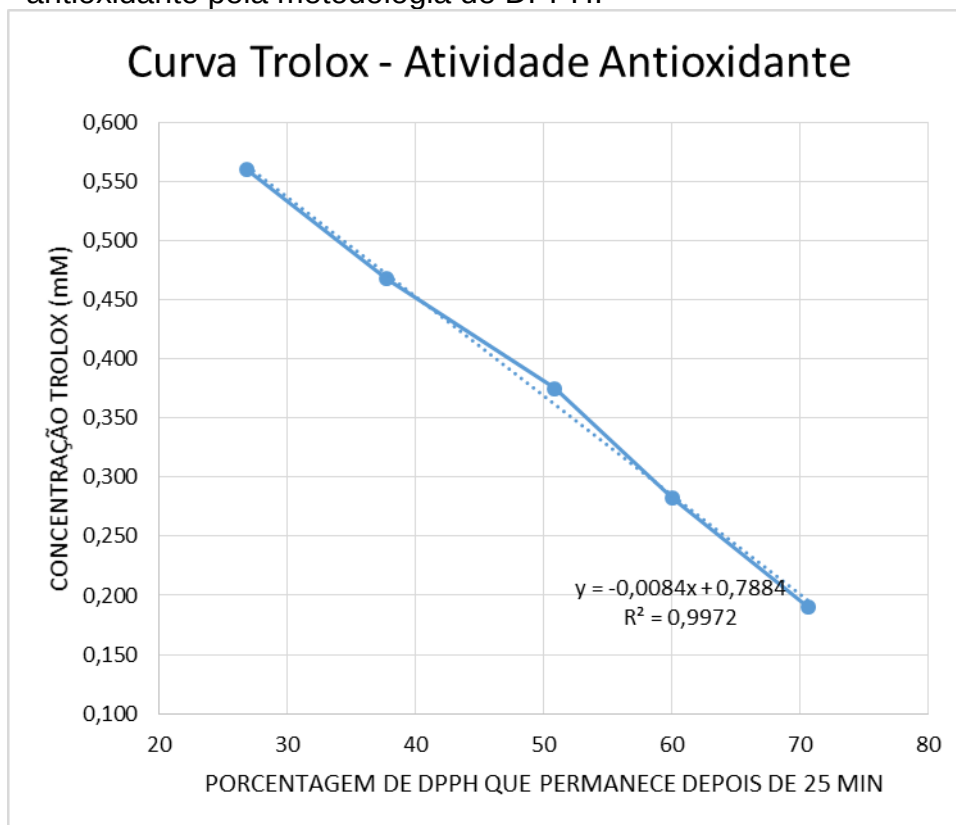
ZHAO, Q.; DUAN, C.; WANG, J. Anthocyanins profile of grape berries of *Vitis amurensis*, its hybrids and their wines. **International Journal Molecular Sciences**, Basel, v. 11, n. 5, p. 2212-2228, 2010.

ANEXO

Anexo 1. Curva Padrão do ácido gálico para quantificação dos compostos fenólicos totais por metodologia de Follin-Ciocateau.



Anexo 2. Curva Padrão para quantificação da atividade antioxidante pela metodologia de DPPH.



ANEXO

Anexo 3. Curva Padrão para quantificação da atividade antioxidante pela metodologia de FRAP.

