



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

ELLEN SILVA LAGO VANZELA

**ESTUDOS BIOQUÍMICOS, FÍSICO-QUÍMICOS E  
TECNOLÓGICOS DE UVAS PAULISTAS**

**Orientador:** Prof. Dr. Roberto da Silva

Universidade Estadual Paulista – UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brasil

**Co-orientador:** Prof. Dr. Isidro Herмосín Gutiérrez

Universidad de Castilla-La Mancha – UCLM, Ciudad Real, Espanha

São José do Rio Preto, SP, Brasil  
Maio/2011

**ELLEN SILVA LAGO VANZELA****Estudos bioquímicos, físico-químicos e tecnológicos de uvas paulistas**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de 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, SP, Brasil

**Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Roberto da Silva,  
UNESP – São José do Rio Preto, SP  
Professor Titular Doutor  
Orientador

---

Prof. Dr. José Antônio Gomes Vieira  
Professor Assistente Doutor  
UNESP – São José do Rio Preto, SP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Neuza Jorge  
Professora Adjunto Doutora  
UNESP – São José do Rio Preto, SP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Teixeira Godoy  
Professora Associada Doutora  
UNICAMP – Campinas, SP

---

Prof. Dr. Afonso Mota Ramos  
Professor Associado III Doutor  
UFV – Viçosa, MG

São José do Rio Preto, 27 de maio de 2011

Lago-Vanzela, Ellen Silva.

Estudos bioquímicos, físico-químicos e tecnológicos de uvas paulistas / Ellen Silva Lago Vanzela. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.

211 f.: il. ; 30 cm.

Orientador: Roberto da Silva

Co-orientador: Isidro Herмосín Gutiérrez

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Uva – Bioquímica. 3. Uva – Físico-química. 4. Uva – Tecnologia. 5. Uva – São Paulo (Estado). I. Da Silva, Roberto. II. Herмосín-Gutiérrez, Isidro. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU - 634.8

*“Existe satisfação em meramente observar o mundo, mas essa satisfação pode ser aprofundada quando a visão da mente consegue penetrar na superfície das coisas para enxergar as conexões existentes.”*

*Peter William Atlins, 1940*

*O trabalho foi árduo porém visa apenas abrir os olhos para a pesquisa e não mostrar o mundo.*

*“Pois a Ciência é sempre uma busca, jamais um descobrimento real.*

*É uma viagem, nunca uma chegada.”*

*Karl Popper*

*Dedico este trabalho à minha família: meus pais, Yara e José, minhas irmãs Thais e Cíntia, todos meus sobrinhos e meu esposo Zé Paulo por todo amor e apoio*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, luz de minha vida, presença constante em todos os momentos de dificuldades e de vitórias em minha vida

A Nossa Senhora, que sempre intercedeu junto ao Pai por todas minhas preces

Ao meu amado esposo José Paulo, pelo apoio, confiança e por adaptar o percurso de sua vida em função das minhas oportunidades

Aos meus pais Yara e José e às minhas irmãs Cintia e Thais, pelo apoio, amor e incentivo. Vocês foram fundamentais para conclusão deste trabalho

Aos meus cunhados Carlos e Adenis por todo apoio e caronas

Aos meus sobrinhos Gabriel, Carlos, Isabella, Júlia, Pedro, Enzo e Henri bem como aos meus primos Caio e Vitor que alegram-me e fazem a vida parecer mais simples

Aos meus sogros João e Dulce bem como a minha prima Vandice por todo apoio e cuidados com o Fidel

Aos meus tios Joana, Maurício, Ana e Dorival por todo apoio

Ao meu primo Paulo por todo apoio durante meu período de estágio no exterior e pela colaboração para a construção das figuras da Tese

A todos os componentes do “Beco” pela descontração nas tardes de domingo.

Aos meus queridos amigos Natália, Milla, Fabiana, Andréia, Carolina, Dani, Márcia e Marcelo, pela amizade, tolerância e por toda a ajuda. Muitos de vocês já fazem falta no laboratório.

Às minhas amigas Márcia, Ana Lúcia, Tássia, Ariane, Gisele, Cristiane, Larissa, Bárbara, Amanda e Carolina, pelas conversas diárias e pelos bons momentos compartilhados que sempre me confortaram principalmente nos momentos finais para conclusão da Tese.

A todos os amigos de laboratório e da UNESP pela amizade, pelo incentivo e pelos bons momentos compartilhados

Ao Prof. Dr. Roberto da Silva, pela orientação, amizade, confiança e oportunidades. Um grande exemplo de pesquisador a ser seguido...quem sabe um dia chego lá....

A Profa. Eleni Gomes, pelo apoio e por todo esforço em elevar a qualidade da pesquisa desenvolvida no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica Aplicada

Al Prof. Dr. Isidro Herмосín Gutiérrez por la oportunidad, la paciencia, apoyo y orientación. Su conocimiento y la enseñanza contribuyeron en gran medida para la calidad de mi trabajo

Ao Prof. Dr. Maurício Boscolo por todo apoio.

A la Profa. Dora por la ayuda y a Beatriz y principalmente a Noélia por toda la ayuda, amistad y por los momentos compartidos

Al Prof. Dr. Esteban García Romero del Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha por el gran apoyo y contribución

A los profesores y a todos las personas que trabajan en la Universidad de Castilla-La Mancha por los buenos momentos compartidos durante mi estancia en España

A la Profa. Dra. María Arévalo Villena por su confianza y apoyo, así como a su madre Maria Asunción y María Luisa por los grandes momentos compartidos. Mis tias.....muy guapas

Às alunas de iniciação científica Fernanda, Sara, Camila e Patrícia, pela troca de experiências e conhecimentos

Ao técnico do Departamento de Engenharia de Alimentos Ginaldo Vieira dos Santos pela amizade e colaboração, bem como aos técnicos Newton e João Jesuíno por toda ajuda durante o desenvolvimento do meu trabalho

Aos pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves) Dr. Umberto Almeida Camargo e Dra. Rosemeire de Lellis Naves pela parceria e colaboração

Aos produtores de Jales Sebatião e Neusa Santin pela parceria e troca de conhecimentos, bem como Antônio Gomes Vieira pelo apoio e carinho. Precisamos hoje e sempre no mundo de pessoas verdadeiramente a todos os produtores de uvas que auxiliaram para o desenvolvimento deste trabalho

A Empresa Novozyme pela doação dos preparados enzimáticos utilizados.

Ao Prof. Dr. José Antônio Gomes Vieira, pelo apoio e carinho. Precisamos hoje e sempre no mundo de pessoas verdadeiramente dignas e bondosas assim.

Ao Prof. Dr. Hamilton Cabral, pela participação na banca de qualificação.

Aos membros da banca, pela contribuição para melhoria da qualidade deste trabalho

À UNESP, pela oportunidade de realização do curso de doutorado e a Universidad de Castilla-La Mancha pela realização do estágio

À CAPES, pela bolsa de doutorado no país e pela bolsa de estágio no exterior.

**MUITO OBRIGADA**  
**MUCHAS GRACIAS**

## RESUMO GERAL

O conhecimento qualitativo e quantitativo dos compostos bioativos presentes nas uvas produzidas no Estado de São Paulo é de fundamental importância para elevar a qualidade dos produtos a um patamar internacional. A composição fenólica detalhada (antocianinas, flavonóis, derivados dos ácidos hidroxicinâmicos, estilbenos e flavan-3-óis) das partes comestíveis (polpa e casca) das uvas de mesa apirênicas (BRS Clara e BRS Morena) e da uva Bordô, produzidas na região do Noroeste Paulista, foi identificada e quantificada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de arranjo de diodos acoplada à espectrometria de massas por sistema de ionização por eletronebulização (CLAE-DAD-IES-EM/EM). Este trabalho também determinou o teor de fenólicos totais e a capacidade antioxidante destas uvas, bem como objetivou estudar as polifenol oxidases (PPO) endógenas associadas aos processos de deterioração das uvas de mesa apirênicas e, avaliar o efeito da pectinase produzida pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 sobre o teor de compostos fenólicos na extração de suco de uva Bordô. O conteúdo de fenólicos totais da uva Bordô foi de 1130 mg/kg (como equivalentes de ácido gálico, GAE), principalmente situados nas cascas, onde também encontrou-se alto teor de antocianinas, em grande parte, como 3,5-diglicosídeos, de flavonóis e de derivados de ácido hidroxicinâmico (HCAD). A miricetina 3-glicosídeo apresentou-se como componente principal dos flavonóis enquanto os HCAD derivaram principalmente do ácido caféico. O teor de flavan-3-óis da casca apresentou-se um pouco mais baixo que o normalmente relatado em variedades *Vitis vinifera*. A uva Bordô pode ser considerada uma fonte importante de resveratrol e de outros compostos com capacidade antioxidante (37,6 mmol/kg, como equivalentes de Trolox). Já a composição fenólica qualitativa das uvas BRS Clara e BRS Morena não diferiu muito da relatada por variedades *Vitis vinifera*, com teores importantes dos compostos analisados nas cascas de ambas as uvas. Diferenças qualitativas e quantitativas entre os compostos presentes nas cascas e na polpa da uva BRS Morena, principalmente com relação ao perfil de antocianinas e flavonóis, foram encontradas. Em contraste, o perfil de flavonóis encontrado para as cascas e polpa da uva BRS Clara são muito similares e com altos conteúdos quando comparado aos apresentados por diversas castas de uva verde ou branca. Os altos conteúdos de fenólicos totais das uvas BRS Morena e BRS Clara (1008 e 577 mg GAE/kg, respectivamente) também suportaram os seus altos valores de capacidade antioxidante (39,62 e 15,93 mmol/kg como equivalentes de Trolox, respectivamente). A BRS Morena pode ser considerada ainda uma importante fonte de resveratrol.

A PPO ativa e latente presente nas uvas BRS Clara e BRS Morena foram extraídas usando detergente Triton-X-100 (ativa) e Triton-X-114 (latente), e suas atividades de catecolase foram caracterizadas. As PPO extraídas com Triton-X-110 exibiram máxima atividade a pH 6,0 e na temperatura de 25°C. Acima de 30°C, um declínio gradual das atividades foi notado, com completa inativação a 60°C. As PPO extraídas com Triton-X-114 foram ativadas com 0,2% de SDS, e exibiram máximas atividades a pH 5,5 e na temperatura de 30°C, sendo estáveis até temperatura de 60°C. O efeito de preparado enzimático pectinolítico produzido pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 sobre o teor de fenólicos totais, teor de metanol e cor de sucos de uvas foi estudado. A introdução de tratamento enzimático a etapa de maceração das uvas Bordô, durante 1 hora, resultou em sucos com boas características cromáticas e teor de fenólicos superiores (1637, 21 mg GAE/L) aos encontrados em suco elaborado de forma convencional (1422,59 mg GAE/L) e, muito próximo ao apresentado por suco obtido por tratamento enzimático das uvas com preparado comercial (1682,10 mg GAE/L). Além disso, os teores de metanol dos sucos elaborados foram inferiores a 200 mg/L. Estes resultados incentivam novos estudos que viabilizem a obtenção de preparado enzimático produzido por este fungo passível de ser oferecido comercialmente às indústrias processadoras de uva.



## ABSTRACT

The qualitative and quantitative knowledge of the bioactive compounds present in grapes produced in the State of Sao Paulo is very important to the process of raising the quality of the state's products to an international level. The detailed phenolic composition (anthocyanins, flavonols, hydroxycinnamic acid derivatives, stilbenes and flavan-3-ols) of the edible parts (flesh and skin) of the Bordô grape and seedless table grapes (BRS Morena and BRS Clara), produced in the Northwest region of State, was identified using high performance liquid chromatography with a diode array detector coupled with mass spectrometry through an electrospray ionization system (HPLC-DAD-ESI-MS/MS). This study also determined total phenolic content and antioxidant capacity of these grapes, as well as the endogenous polyphenol oxidases (PPO) associated with the processes of decay of seedless table grapes. This study also evaluated the effect of pectinase produced by the fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 on the total phenolic content during the extraction of grape juices from the Bordô. Total phenolic content of the Bordô grape was 1130 mg/kg (as gallic acid equivalents - GAE), and was mainly located in the skins, where there was also high content of anthocyanins, which were largely found as 3,5-diglucosides, as well as of the flavonols and hydroxycinnamic acid derivatives (HCAD). Myricetin 3-glucoside was found to be the main compound of the flavonols, while the HCAD mainly derived from caffeic acid. The flavan-3-ol contents of the skins were lower than those that are usually reported for *V. vinifera* grape varieties. The Bordô grape can be considered an important source of resveratrol and other compounds with antioxidant capacity (37.6 mmol/kg, as Trolox equivalents). The qualitative phenolic composition of BRS Clara and BRS Morena grapes did not differ from those found in cases of *Vitis vinifera* grape varieties, with significant levels of analyzed compounds mainly in skins for both grape varieties. Qualitative differences between the phenolic compounds present in the skin and flesh of the BRS Morena grape, especially with regard to the anthocyanin and flavonol profiles, were found. In contrast, the flavonol profiles found in the skin and flesh of the BRS Clara grape were very similar, and their contents were considered high when compared to the contents provided by different varieties of green or white grapes. The high contents of phenolic compounds in BRS Morena and BRS Clara grapes (1008 and 577 mg GAE/kg, respectively) were consistent with the equally high antioxidant capacity values (39.62 and 15.93 mmol/kg, as Trolox equivalents, respectively). The BRS Morena grape can also be considered an important source of resveratrol.

Active and latent PPO from *BRS Clara* and *BRS Morena* seedless grapes were extracted using the nonionic detergents Triton-X-100 (active) and Triton-X-114 (latent), and their catecholase activities were characterized. The PPO extracted using Triton-X-110 exhibited maximum activities at pH 6.0 and at 25°C. Above 30°C, a gradual decline in activities was noted, with complete inactivation at 60°C. The PPO from grapes extracted with Triton-X-114 was activated with 0.2% SDS, and exhibited maximum activities at pH 5.5 and at 30°C. It was stable until the temperature reached 60°C. The effect of pectinolytic enzyme preparation produced by the fungus *Thermomucor referrals seudaticae*-N31 on the content of total phenolics, on the content of methanol and on the color of grape juice was studied. The introduction of enzyme treatment through a step that involves soaking for 1 hour resulted in products with good color characteristics and higher phenolic content (1637.21 mg GAE/L) than those found in conventionally prepared juice (1422.59 mg GAE/L) and that were very similar to those presented by the juice obtained through the enzymatic treatment of commercially prepared grapes (1682.10 mg GAE/L). Furthermore, the concentrations of methanol in the juice that was produced were less than 200 mg/L. These results encourage further studies that will enable enzyme preparation produced by this fungus that can be offered commercially to grape-processing industries.

## LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. COMPOSTOS FENÓLICOS EM UVAS E VINHOS:  
PROPRIEDADES QUÍMICAS E FUNÇÕES BIOLÓGICAS (PARTE I)

<b>Figura 1.</b> Organização estrutural do cacho da uva (GOMES, 2006).....	32
<b>Figura 2.</b> Organização estrutural da baga de uva.....	33
<b>Figura 3.</b> Estrutura básica dos flavonóides: 2-fenilbenzopirano (A) e 2-fenilbenzopirona (B) (HUBER, 2007).....	36
<b>Figura 4.</b> Estrutura de algumas antocianinas derivadas da uva.....	38
<b>Figura 5.</b> Espectros de absorção de diferentes antocianinas em meio ácido (pH < 2): (A) 3-monoglicosídeos (comprimento de absorção de onda aumenta com o aumento dos substituintes do anel B) (CASTILLO-MUNOZ et al., 2009a); (B) monoglicosídeo (glc) x diglicosídeo (diglc), 3-monoglicosídeo (linha grande tracejada) e 3,5-diglicosídeo (linha sólida); diglicosídeos acetilados (3-acglc-5glc) x cumarilados (3-acglc-5-glc), malvidina-3-acetilglicosídeo-5-glicosídeo (linha pequena tracejada) e malvidina-3-(p-cumaril)-glicosídeo-5-glicosídeo (linha pontilhada).....	40
<b>Figura 6.</b> Espectro UV-vis de flavonóis.....	43
<b>Figura 7.</b> Estrutura dos flavonóis encontrados em uvas <i>Vitis vinifera</i> : (A) Flavonol-3-O-glicosídeo, (B) Flavonol-3-O-galactosídeo, (C) Flavonol-O-glucuronídeo, (D) Quercetina-3-O-(“6-ranmosil)-glicosídeo (rutina) (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b).....	44
<b>Figura 8.</b> Exemplos de procianidina dímeras (Tipo A e Tipo B) e trímera (Tipo C).	46
<b>Figura 9.</b> Procianidinas poliméricas predominantes nas uvas.....	47
<b>Figura 10.</b> Estruturas químicas de piranoantocianinas de vinho derivadas da malvidina-3-glicosídeo: (A) piranoantocianinas do tipo vitisina (R <sub>1</sub> = COOH, Vitisina A; R <sub>1</sub> = H, Vitisina B); (B) piranoantocianinas do tipo hidroxifenil (R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = H, malvidina-3-glicosídeo-4-vinilfenol; R <sub>2</sub> = H e R <sub>3</sub> = OH, malvidina-3-glicosídeo-4-vinilcatecol ou Pinotina A; R <sub>2</sub> = H e R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub> , malvidina-3-glicosídeo-4-vinilguaiacol) (RENTZSCH; SCHWARZ; WINTERHALTER, 2007)...	49
<b>Figura 11.</b> Trans-resveratrol e seus derivados (POUR NIKFARDJAM; LÁSZLO; DIETRICH, 2006).....	51

<b>Figura 12.</b> Homólogos do resveratrol: piceatanol e seu 3- <i>O</i> -glicosídeo (astringina)...	51
<b>Figura 13.</b> Derivado 2- <i>C</i> -glicosídeo do trans-resveratrol.....	51
<b>Figura 14.</b> Derivados dímeros do resveratrol. Especificamente para o palidol são conhecidos os derivados 3-glicosídeo (R= glicosil; R' = H) e 3,3'-diglicosídeo (R = R' = glicosil).....	52
<b>Figura 15.</b> Tetrâmero do resveratrol (hopeafenol).....	52
<b>Figura 16.</b> Características estruturais básicas de um flavonóide com propriedades bioativas (adaptada de BEER et al., 2002). I, estrutura 3',4'-catecol; II, dupla ligação (C2-C3) conjugada com a função 4-oxo; III, grupos hidroxilas na posição 3 e 5 com função oxo.....	55

## CAPÍTULO 2. COMPOSTOS FENÓLICOS EM UVAS E VINHOS: PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOQUÍMICAS E QUALIDADE TECNOLÓGICA (PARTE II)

<b>Figura 1.</b> Localização dos compostos fenólicos e das enzimas oxidativas (PPO e POD) em uma típica célula de planta.....	73
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de catálise da catecolase e da cresolase.....	75
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de oxidação enzimática dos flavonóides de uva (adaptada de POURCEL et al., 2007).....	77
<b>Figura 4.</b> Esquema de oxidação enzimático do ácido caftárico presente nos vinhos....	80
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de oxidação química do vinho catalizada por metais (adaptada de Elias et al., 2007).....	84
<b>Figura 6.</b> Mecanismo proposto para formação da Vitisina A (FULCRAND et al., 1998).....	87

## CAPÍTULO 3. PHENOLIC COMPOSITION OF THE EDIBLE PARTS (FLESH AND SKIN) OF BORDÔ GRAPE (*V. LABRUSCA*) USING HPLC-DAD-ESI-MS/MS

<b>Figure 1.</b> Bordô grape ( <i>Vitis labrusca</i> ).....	100
<b>Figure 2.</b> General structures of the phenolic compound classes identified in Bordô grapes: anthocyanidin 3,5-diglucosides (A); anthocyanidin 3-glucosides (B); flavan-3-ol monomers (C); flavan-3-ol dimmers or B-type procyanidins (D); flavonol 3-.....	106

glycosides (E); hydroxycinnamic acid derivatives (F); and resveratrol-type stilbenes (G).....

- Figure 3.** Bordô grape anthocyanins: DAD-chromatogram at 520 nm (A); extracted ion chromatograms (EIC) in positive ionization mode at the  $m/z$  values corresponding to the different anthocyanidin-type product ions (+EPI, MS/MS conditions): malvidin (B), peonidin (D), delphinidin (E), cyanidin (F), and petunidin (G); EIC of +EPI at the  $m/z$  values of the expected same molecular ion (+EMS, MS conditions) corresponding to the cis and trans isomers of mv-3-cmglc-5-glc (C). For peak assignation see **Table 1**..... 107
- Figure 4.** HPLC-DAD chromatogram (detection at 360 nm) of grape skin (A) and flesh (B) flavonols of Bordô grape. For peak assignation see **Table 2**..... 115
- Figure 5.** Bordô grape flavonols. Extracted ion chromatograms (EIC) in negative ionization mode at the  $m/z$  values corresponding to the expected molecular ions (-EMS, MS conditions) corresponding to: 3-galactoside and 3-glucoside of myricetin (A); myricetin 3-glucuronide and laricitrin 3-glucoside (B); syringetin 3-glucoside (C); rutin or quercetin 3-rutinoside (D); 3-galactoside and 3-glucoside of quercetin (E); quercetin 3-glucuronide and isorhamnetin 3-glucoside (F); and kaempferol 3-glucoside (G). Peak numbers as in **Table 2**..... 118
- Figure 6.** Bordô grape hydroxycinnamic acid derivatives. DAD-Chromatogram at 320 nm of grape flesh extract (A), and extracted ion chromatograms (EIC) in negative ionization mode at the  $m/z$  values corresponding to the expected product ions (-EPI, MS/MS conditions) corresponding to the different hydroxycinnamic-type derivatives: caffeic-type derivatives, common product ion at  $m/z$  179 (B); *p*-coumaric-type derivatives, common product ion at  $m/z$  163 (C); ferulic-type derivatives, common product ion at  $m/z$  193 (D). Peak numbers as in **Table 3**..... 120
- Figure 7.** Bordô grape resveratrol derivatives. DAD-Chromatogram at 320 nm of grape skin extract (A), and extracted ion chromatograms (EIC) in negative ionization mode at the  $m/z$  values (227) corresponding to the expected product ions (-EPI, MS/MS conditions) corresponding to the different resveratrol derivatives (B). Peak numbers as in **Table 3**..... 123

## CAPÍTULO 4. PHENOLIC COMPOSITION OF THE BRAZILIAN SEEDLESS TABLE GRAPE VARIETIES BRS CLARA AND BRS MORENA

<b>Figure 1.</b> Brazilian seedless grapes: BRS Morena (A) e BRS Clara (B) .....	132
<b>Figure 2.</b> Anthocyanin chromatographic profile (DAD at 520 nm) of BRS Morena grape skin (A) and flesh (B). Peak numbering as in <b>Table 1</b> .....	142
<b>Figure 3.</b> Flavonol chromatographic profile (DAD at 360 nm) of BRS Morena grape skin (A) and flesh (B) and BRS Clara grape skin (C) and flesh (D). Peak numbering as in <b>Table 2</b> .....	148

## CAPÍTULO 5. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LATENT AND ACTIVE POLYPHENOLOXIDASE IN BRS CLARA (CNPUV 154-147 X CENTENNIAL SEEDLESS) AND BRS MORENA (MARROO SEEDLESS X CENTENNIAL SEEDLESS) SEEDLESS TABLE GRAPES

<b>Figure 1.</b> Steps for obtaining PPO in latent from the BRS Morena grape using two-phase aqueous micellar systems with Triton-X-114 as a surfactant.....	166
<b>Figure 2.</b> Grape PPO extraction. (Positive control: sodium phosphate buffer; ascorbic acid; EDTA, PVP, NaCl and Triton-X-100). Negative control: 0.2-M sodium phosphate buffer (pH 6.5). (Other points on the y-axis represent the extracting solutions described without the indicated reagent).....	170
<b>Figure 3.</b> Solubilization of the grape BRS Morena with the detergent Triton-X-114 followed by temperature-induced phase separation: supernatant (A); detergent-rich phase (B); clear, detergent-poor supernatant phase (C).....	172
<b>Figure 4.</b> Effect of SDS concentration on PPO activities of BRS Clara (●) and BRS Morena (◆).....	173
<b>Figure 5.</b> Effect of pH on PPO activity of BRS Clara (a) and BRS Morena (b) grapes in a 0.2-M sodium acetate buffer (pH 3.0 – 5.5) and a 0.2-M sodium phosphate buffer (pH 6.0 – 8.0) with 0.25 % SDS (●) and without 0.25 % SDS (◆). Degree of activation at different pHs (o).....	174
<b>Figure 6.</b> Electrophoresis in polyacrylamide gel containing SDS (SDS-PAGE) at 12% concentration. Column 1: molecular weight markers: β galactosidase, 116 kDa, BSA, 66.2 kDa, ovalbumin, 45 kDa, lactate dehydrogenase, 35 kDa; Bsp981 Reaser,	176

25 kDa,  $\beta$ -lactoglobulin, 18.4 kDa; Columns 2 and 4: enzymatic extracts of BRS Morena and BRS Clara obtained with Triton-X-100; Columns 3 and 5: enzymatic extracts of BRS Morena and BRS Clara obtained with Triton-X-114; Columns 6 and 7: Native-PAGE, for the enzymatic extract of BRS Morena and BRS Clara obtained with Triton-X-114. Arrows indicate PPO enzymes of the grapes.....

<b>Figure 7.</b> Effect of pH on activity (●) and stability (◆) of BRS Clara PPO extracted using Triton-X-100 (A) and Triton-X-114 (B).....	177
<b>Figure 8.</b> Effect of pH on activity (●) and stability (◆) of BRS Morena PPO extracted using Triton-X-100 (A) and Triton-X-114 (B).....	178
<b>Figure 9.</b> Effect of temperature on activity (●) and stability (◆) of BRS Clara PPO extracted using Triton-X-100 (A) and Triton-X-114 (B).....	179
<b>Figure 10.</b> Effect of temperature on activity (●) and stability (◆) of BRS Morena PPO extracted using Triton-X-100 (A) and Triton-X-114 (B).....	180

## **CAPÍTULO 6. EFEITO DE PECTINASE DE *THERMOMUCOR INDICAE-SEUDATICA*E N31 SOBRE O TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS NA EXTRAÇÃO DO SUCO**

<b>Figura 1.</b> Comparação entre a atividade residual de PPO (■) e POD (●) de uva Bordô usando diferentes tempos de branqueamento a vapor.....	189
<b>Figura 2.</b> Teor de fenólicos totais e de metanol dos sucos elaborados com uva branqueada e uvas branqueadas tratadas enzimaticamente com os preparados enzimáticos PEC-N31 e Vinoxym Ventage FCE, por diferentes tempos.....	192
<b>Figura 3.</b> Índice de cor e coloração T dos sucos elaborados com uva branqueada (controle, sem adição de enzimas) e uvas branqueadas tratadas enzimaticamente com os preparados enzimáticos PEC-N31 e Vinoxym Ventage FCE, por diferentes tempos.....	193



## LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO 1. COMPOSTOS FENÓLICOS EM UVAS E VINHOS: PROPRIEDADES QUÍMICAS E FUNÇÕES BIOLÓGICAS (PARTE I)

<b>Tabela 1.</b> Antocianidinas (forma de cátion flavílio) mais comuns presentes nas uvas.	37
<b>Tabela 2.</b> Estrutura dos flavonóis encontrados nas uvas.....	42
<b>Tabela 3.</b> Exemplos de flavan-3-óis presentes nas uvas: C: (+)-catequina; E: (-)-epicatequina; ECG: (-)-galato-3-epicatequina; GC: (+)-galocatequina; EGC: (-)-epigalocatequina; GCG: (+)-galato-3-galocatequina; EGCG: (-)-galato-3-epigalocatequina. *G: ácido gálico.....	45
<b>Tabela 4.</b> Padrão de substituição dos ácidos fenólicos.....	48

CAPÍTULO 3. PHENOLIC COMPOSITION OF THE EDIBLE PARTS (FLESH AND SKIN) OF BORDÔ GRAPE (*V. LABRUSCA*) USING HPLC-DAD-ESI-MS/MS

<b>Table 1.</b> Chromatographic, UV-vis and mass spectral characteristics of the anthocyanins identified in Bordô grape by HPLC-DAD-ESI-MS/MS (positive ionization mode), and molar proportions (mean value $\pm$ standard deviation, n = 3). Peak numbers as in <b>Figure 1</b> .....	108
<b>Table 2.</b> Chromatographic, UV-vis and mass spectral characteristics of the flavonols identified in Bordô grape by HPLC-DAD-ESI-MS/MS (negative ionization mode), and molar proportions (mean value $\pm$ standard deviation) of each individual flavonol in both parts of fruit (skin and flesh). Peak numbers as in <b>Figure 2</b> .....	114
<b>Table 3.</b> Chromatographic, UV-vis and mass spectral characteristics of the hydroxycinnamic acid derivatives (HCAD) and stilbenes (resveratrol and its 3-glucoside, piceid) identified in Bordô grape by HPLC-DAD-ESI-MS/MS (negative ionization mode), molar proportions of each individual HCAD, total content of HCAD, and stilbene concentrations (mg/kg) in both parts of fruit (skin and flesh; mean value $\pm$ standard deviation). Peak numbers as in <b>Figure 6</b> .....	121
<b>Table 4.</b> Monomeric flavan-3-ol and dimer B-type procyanidin content (MV $\pm$ SD, mg/kg grape) and proanthocyanidin characterization (molar % of each of the extension and terminal units of monomeric flavan-3-ols) of Bordô grape skin.....	124



## CAPÍTULO 4. PHENOLIC COMPOSITION OF THE BRAZILIAN SEEDLESS TABLE GRAPE VARIETIES BRS CLARA AND BRS MORENA

<b>Table 1.</b> Data for the identification of the anthocyanins in the BRS Morena grape using HPLC-DAD-ESI-MS/MS (positive ionization mode), and molar proportions (mean value $\pm$ standard deviation, n = 3) of each anthocyanin in the two parts of grape. Peak numbers as in <b>Figure 1</b> .....	143
<b>Table 2.</b> Data for the identification of the flavonols in the BRS Morena and BRS Clara grapes using HPLC-ESI-MS/MS (negative ionization mode), and molar proportions (mean value $\pm$ standard deviation) of each flavonol in both parts of grape (skin and flesh). Peak numbers as in <b>Figure 3</b> .....	147
<b>Table 3.</b> Data for the identification of the hydroxycinnamic acid derivatives (HCAD) and stilbenes (resveratrol and its 3-glucoside, piceid) in the BRS Morena and BRS Clara grapes using HPLC-ESI-MS/MS (negative ionization mode), and molar proportions of each HCAD, total content of HCAD, and stilbene concentrations (mg/kg) in both parts of the grapes (skin and flesh; mean value $\pm$ standard deviation).....	150
<b>Table 4.</b> Monomeric flavan-3-ol and dimer B-type procyanidin content (MV $\pm$ SD, mg/kg grape) in the skin of BRS Morena and BRS Clara grapes.....	152
<b>Table 5.</b> Structural characterization of the skin proanthocyanidins (MV $\pm$ SD: mDP, mean degree of polymerization; % galloylation, % of 3-gallate units; % prodelphinidin, % of epigallocatechin units; and % of each of the flavan-3-ol monomers as extension and terminal units) of BRS Morena and BRS Clara grapes...	153
<b>Table 6.</b> Total phenolic content (mg/kg, as gallic acid equivalents) and antioxidant capacity (mmol/kg, as Trolox equivalents) of BRS Morena and BRS Clara grape skin and flesh.....	155

## CAPÍTULO 5. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LATENT AND ACTIVE POLYPHENOLOXIDASE IN BRS CLARA (CNPUV 154-147 X CENTENNIAL SEEDLESS) AND BRS MORENA (MARROO SEEDLESS X CENTENNIAL SEEDLESS) SEEDLESS TABLE GRAPES

<b>Table 1.</b> Fractionations of total PPO enzymes from BRS Morena and BRS Clara*....	172
--	-----

<b>Table 2.</b> Comparison between the activities of membrane-bound PPO grapes (BRS and BRS Morena Clara) and the percentage of phenolics*.....	175
---	-----

**CAPÍTULO 6. EFEITO DE PECTINASE DE *THERMOMUCOR INDICAE-SEUDATICAE* N31 SOBRE O TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS NA EXTRAÇÃO DO SUCO**

<b>Tabela 1.</b> Características químicas e bioquímicas parcial da uva Bordô*.....	196
<b>Tabela 2.</b> Características cromáticas dos mostos das uvas <i>in natura</i> e previamente branqueadas por diferentes tempos.....	198
<b>Tabela 3.</b> Atividade enzimática das principais enzimas pectinolíticas*.....	199
<b>Tabela 4.</b> Análises físico-químicas dos sucos de uva*.....	202

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>cy</b>	cianidina
<b>dp</b>	delfinidina
<b>mv</b>	malvidina
<b>pg</b>	pelargonidina
<b>pn</b>	peonidina
<b>pt</b>	petunidina
<b>glc</b>	glicosídeo
<b>diglc</b>	diglicosídeo
<b>acglc</b>	acetil-glicosídeo
<b>cmglc</b>	cumaril-glicosídeo
<b>K</b>	kaempferol
<b>Q</b>	quercetina
<b>I</b>	isoramnetina
<b>M</b>	miricetina
<b>L</b>	laricitrina
<b>S</b>	siringetina
<b>C</b>	(+)-catequina
<b>E</b>	(-)-epicatequina
<b>ECG</b>	(-)-galato-3-epicatequina
<b>GC</b>	(+)-galocatequina
<b>EGC</b>	(-)-epigalocatequina
<b>GCG</b>	(+)-galato-3-galocatequina
<b>EGCG</b>	(-)-galato-3-epigalocatequina
<b>PPO</b>	polifenoloxidase
<b>POD</b>	peroxidase
<b>SDS</b>	detergente iônico dodecil sulfato de sódio
<b>L-DOPA</b>	L-3,4-dihidroxifenilalanina
<b>GRP</b>	grape reaction product
<b>GSH</b>	glutathiona reduzida
<b>SO<sub>2</sub></b>	dióxido de enxofre

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO 1. COMPOSTOS FENÓLICOS EM UVAS E VINHOS: PROPRIEDADES QUÍMICAS E FUNÇÕES BIOLÓGICAS (PARTE I).....</b>	<b>27</b>
RESUMO.....	28
ABSTRACT.....	28
1. INTRODUÇÃO.....	29
2. PANORAMA DA PRODUÇÃO DE UVAS E DERIVADOS NO BRASIL.....	29
3. ASPECTOS GERAIS DAS UVAS, SUCOS E VINHOS.....	31
3.1 Uvas.....	31
3.2 Vinhos.....	33
3.3 Sucos.....	34
4. ESTRUTURA QUÍMICA DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NAS UVAS E PRODUTOS DERIVADOS.....	36
4.1 Flavonóides.....	36
4.1.1 Antocianinas.....	36
4.1.2 Flavonóis.....	42
4.1.3 Flavan-3-óis.....	44
4.2 Não Flavonóides.....	48
4.2.1 Ácidos fenólicos.....	48
4.2.2 Estilbenos.....	50
5. COMPOSTOS FENÓLICOS: ESTRUTURA QUÍMICA E SUA RELAÇÃO COM A ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	53
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
<b>CAPÍTULO 2. COMPOSTOS FENÓLICOS EM UVAS E VINHOS: PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOQUÍMICAS E QUALIDADE TECNOLÓGICA (PARTE II).....</b>	<b>70</b>
RESUMO.....	71
ABSTRACT.....	71

1. INTRODUÇÃO.....	72
2. OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NAS UVAS <i>IN NATURA</i> .....	72
3. REAÇÕES QUÍMICAS E ENZIMÁTICAS NOS PRODUTOS DERIVADOS DA UVA (SUCOS E VINHOS).....	79
3.1. Oxidação de origem enzimática.....	79
3.2. Reações de hidrólise enzimática.....	82
3.3. Oxidação de origem não enzimática.....	84
3.4. Evolução da cor do vinho.....	85
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	87
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

**CAPÍTULO 3. PHENOLIC COMPOSITION OF THE EDIBLE PARTS (FLESH  
AND SKIN) OF BORDÔ GRAPE (*V. LABRUSCA*) USING HPLC-DAD-ESI-  
MS/MS.....**

ABSTRACT.....	96
1. INTRODUCTION.....	97
2. MATERIALS AND METHODS.....	98
2.1 Chemicals.....	99
2.2 Grapes.....	100
2.3 Sample preparation.....	101
2.4 Total phenolic content and antioxidant capacity.....	102
2.5 HPLC-DAD-ESI-MS/MS Identification of Bordô grape phenolic compounds...	102
2.6 HPLC-DAD Quantification of Bordô grape phenolic compounds.....	104
2.7 Identification and quantification of Bordô grape skin flavan-3-ols using Multiple Reaction Monitoring HPLC-ESI-MS/MS.....	104
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	105
3.1 Anthocyanins.....	105
3.2 Flavonols.....	113
3.3 Hydroxycinnamic acid derivatives (HCAD) and stilbenes.....	119
3.4 Flavan-3-ols.....	123
3.5 Total phenolic content and antioxidant capacity.....	125
4. CONCLUSION.....	126

5. ACKNOWLEDGMENTS.....	127
6. REFERENCES.....	127

**CAPÍTULO 4. PHENOLIC COMPOSITION OF THE BRAZILIAN SEEDLESS TABLE GRAPE VARIETIES BRS CLARA AND BRS MORENA.....** 132

ABSTRACT.....	133
---------------	-----

1. INTRODUCTION.....	134
----------------------	-----

2. MATERIALS AND METHODS.....	135
-------------------------------	-----

2.1 Chemicals.....	135
--------------------	-----

2.2 Grapes.....	135
-----------------	-----

2.3 Sample preparation.....	136
-----------------------------	-----

2.4 Total phenolic content and antioxidant capacity.....	137
--	-----

2.5 HPLC-DAD-ESI-MS/MS identification of the grapes' phenolic compounds....	138
---	-----

2.6 HPLC-DAD quantification of grape phenolic compounds.....	139
--	-----

2.7 Identification and quantification of grape skin flavan-3-ols using Multiple Reaction Monitoring HPLC-ESI-MS/MS.....	139
---	-----

3. RESULTS AND DISCUSSION.....	141
--------------------------------	-----

3.1 Anthocyanins.....	141
-----------------------	-----

3.2 Flavonols.....	145
--------------------	-----

3.3 Hydroxycinnamic acid derivatives (HCAD) and stilbenes.....	149
--	-----

3.4 Flavan-3-ols.....	152
-----------------------	-----

3.5 Total phenolic content and antioxidant capacity.....	154
--	-----

4. CONCLUSION.....	156
--------------------	-----

5. ACKNOWLEDGMENTS.....	156
-------------------------	-----

6. REFERENCES.....	156
--------------------	-----

**CAPÍTULO 5. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LATENT AND ACTIVE POLYPHENOLOXIDASE IN BRS CLARA (CNPUV 154-147 X CENTENNIAL SEEDLESS) AND BRS MORENA (MARROO SEEDLESS X CENTENNIAL SEEDLESS) SEEDLESS TABLE GRAPES.....** 161

ABSTRACT.....	162
---------------	-----

1. INTRODUCTION.....	163
----------------------	-----

2. MATERIALS AND METHODS.....	164
-------------------------------	-----

2.1 Grapes.....	164
2.2 Study of enzymatic extraction protocol.....	165
2.2.1 Extraction of PPO from grapes in their active form.....	165
2.2.2 Extraction of PPO from grapes in their latent form.....	166
2.3 Enzyme activities.....	166
2.4 Determination of total proteins.....	167
2.5 Determination of phenolic compounds present in the enzyme extract.....	167
2.6 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis.....	167
2.7 Native-Page gel electrophoresis.....	168
2.8 Effects of pH and temperature on enzyme activity.....	168
2.9 Effects of pH and temperature on enzyme stability.....	168
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	169
3.1 Study of enzymatic extraction protocol for the PPO enzymes of the grapes...	169
3.2 PPO physical-chemical characterization.....	176
4. CONCLUSION.....	180
5. ACKNOWLEDGMENTS.....	181
6. REFERENCES.....	181

**CAPÍTULO 6. EFEITO DE PECTINASE DE *THERMOMUCOR INDICAE-SEUDATICA*E N31 SOBRE O TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS NA EXTRAÇÃO DO SUCO.....**

RESUMO.....	187
ABSTRACT.....	187
1. INTRODUÇÃO.....	188
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	189
2.1 Produção do preparado enzimático experimental.....	189
2.2 Atividade das principais pectinases presentes no preparado enzimático PEC-N31.....	189
2.3 Análises físico-químicas e bioquímicas parciais da matéria-prima.....	190
2.3.1 Análises físico-químicas.....	191
2.3.2 Análises bioquímicas.....	191

2.4 Branqueamento a vapor das uvas.....	192
2.4.1 <i>Análises de cor</i> .....	193
2.4.2 <i>Determinação do teor de metanol</i> .....	193
2.5 Elaboração dos sucos.....	194
2.6 Efeito do preparado enzimático PEC-N31 sobre o teor de fenólicos totais, teor de metanol e cor durante extração de suco.....	194
2.7 Análises físico-químicas dos sucos produzidos.....	195
2.8 Análise estatística.....	195
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	195
3.1 Caracterização físico-química e bioquímica parcial da uva.....	195
3.2 Branqueamento das uvas como pré-tratamento para elaboração de suco.....	196
3.3 Efeito do preparado enzimático PEC-N31 sobre os compostos fenólicos durante extração do suco.....	198
3.4 Padrões de identidade e qualidade dos sucos.....	202
4. CONCLUSÃO.....	202
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	203
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	207
<b>ANEXO</b> . Especificação do preparado enzimático comercial Vinoxym Vintage FCE.....	208



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os compostos fenólicos são uma classe de compostos naturais amplamente distribuídos em todas as plantas, onde desempenham importantes atividades fisiológicas. Nas frutas e produtos derivados, estes compostos estão diretamente envolvidos nas características sensoriais como cor, sabor, amargor e sensação de adstringência e são reconhecidos como componentes promotores da saúde humana.

As uvas e os produtos derivados, especialmente sucos e vinhos tintos, são considerados uma das mais importantes formas de incorporar polifenóis na dieta. A grande diversidade entre as variedades resulta em uvas e produtos com diferentes características, tanto de sabor quanto de coloração, o que certamente está associado com o conteúdo e o perfil dos polifenólicos. A maior parte dos dados disponíveis na literatura sobre a composição fenólica nestes produtos é proveniente dos tradicionais países produtores de vinhos da Europa no qual são admitidos apenas produtos originários de uvas viníferas (*Vitis vinifera*). Em contraste, cultivares de uvas americanas e híbridas, às vezes complexas, envolvendo várias espécies americanas e também *Vitis vinifera* representam mais do que 85% do volume de uvas processadas no Brasil.

No estado de São Paulo, a expressiva produção de uvas (177.538 toneladas/ano) destina-se basicamente ao consumo *in natura*. Observa-se, contudo, que nos últimos quatro anos ocorreu uma queda na produção (aproximadamente 8%) devido tanto a fatores climáticos desfavoráveis, a crise econômica mundial em 2009, como pelo plantio de novas cultivares menos produtivas, como as uvas sem sementes (apirênicas), que vem despertando o interesse dos consumidores. Além disso, houve um aumento na área plantada com uvas destinadas ao processamento, decorrente de um esforço conjunto de várias instituições que objetivam revitalizar a vitivinicultura no Estado. Essa iniciativa é muito importante para o crescimento econômico do Estado, uma vez que mais de 50% do consumo de vinho do Brasil está em São Paulo e a demanda por sucos de uva integral tem aumentado substancialmente, tanto no mercado interno quanto externo, devido ao apelo de produto saudável. Esta atividade econômica tem gerado muitos empregos e garantido a sustentabilidade tanto de pequenas propriedades quanto de grandes empreendimentos focados na produção de vinhos e sucos de uvas integrais.

O conhecimento qualitativo e quantitativo dos compostos bioativos presentes nas uvas brasileiras é de fundamental importância para colocar a qualidade dos produtos em um patamar internacional. Além disso, o avanço do conhecimento das técnicas de processamento

associado ao atendimento das demandas do mercado por novos produtos que agreguem às características nutricionais básicas, com fatores de benefícios à saúde, pode contribuir para o crescimento deste setor. O laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada IBILCE-UNESP, de São José do Rio Preto, SP, sob coordenação do Prof. Roberto da Silva e da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eleni Gomes, juntamente com grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Isidro Hermosín Gutiérrez da Universidade de Castilla La Mancha – UCLM (Ciudad Real, Espanha), que é um renomado especialista na área de enologia e com expressiva experiência em análise de compostos fenólicos presentes em uvas e vinhos, estão empenhados em auxiliar neste sentido.

Assim, este estudo objetivou a caracterização fenólica de uvas de mesa apirênicas e destinada ao processamento, cultivadas na região do Noroeste Paulista. Além disso, foram realizados estudos sobre as características das polifenol oxidases endógenas associadas aos processos de deterioração das uvas de mesa apirênicas; bem como foi avaliado o efeito de pectinase de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 sobre o teor de compostos fenólicos na extração de suco de uva integral.

Os resultados obtidos foram organizados em seis capítulos para melhor distribuição e entendimento dos assuntos abordados.

No Capítulo 1, é apresentada uma revisão sobre as características químicas dos compostos bioativos presentes nas uvas e nos produtos derivados, bem como um entendimento atual sobre a influência destas estruturas sobre a habilidade dos mesmos em promover a saúde.

No Capítulo 2, uma discussão dos principais processos bioquímicos e químicos de uvas e produtos derivados foi apresentada.

A caracterização fenólica da uva Bordô (*Vitis labrusca*) bem como das uvas apirênicas BRS Clara (*CNPUV 154-147 x Centennial Seedless*) e BRS Morena (*Marroo Seedless x Centennial Seedless*) foram apresentadas nos Capítulos 3 e 4, respectivamente.

Como os compostos fenólicos são muito suscetíveis a processos oxidativos enzimáticos que alteram as características nutricionais e organolépticas das frutas, as caracterizações bioquímicas parciais das polifenol oxidases presentes nas uvas apirênicas foram caracterizadas na forma ativa e latente no Capítulo 5.

Finalmente, para melhoria dos sucos elaborados com a uva Bordô quanto ao aspecto nutricional, um tratamento térmico associado a outro enzimático também foi realizado no Capítulo 6. O efeito de pectinase produzida pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 sobre o teor de compostos fenólicos na extração do suco foi testado.

# **CAPÍTULO 1**

## **COMPOSTOS FENÓLICOS EM UVAS E VINHOS: PROPRIEDADES QUÍMICAS E FUNÇÕES BIOLÓGICAS (PARTE I)**

# COMPOSTOS FENÓLICOS EM UVAS E VINHOS: PROPRIEDADES QUÍMICAS E FUNÇÕES BIOLÓGICAS (PARTE I)

Ellen Silva LAGO-VANZELA <sup>a</sup>, Eleni GOMES <sup>b</sup>; Isidro HERMOSÍN-GUTIÉRREZ<sup>c</sup>;  
Roberto DA-SILVA<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, <sup>b</sup>Departamento de Biologia;  
<sup>d</sup>Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.  
<sup>c</sup>Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada, Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola, Universidad de Castilla-La Mancha, 13071 Ciudad Real, Spain.

## RESUMO

A uva é uma das frutas mais consumidas no mundo, tanto na forma *in natura*, como na forma processada e também se destaca como fonte de compostos fenólicos antioxidantes importantes em termos de saúde humana. Levando em consideração inúmeros estudos que especulam a relação entre a estrutura química e sua capacidade antioxidante, este artigo revisa as características químicas dos compostos bioativos e apresenta um entendimento da influência destas estruturas sobre a habilidade em agir como seqüestrante de radicais livres, quelante de íons metálicos e efeito atenuante em espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, associadas com patologias crônicas e degenerativas.

## ABSTRACT

The grape is one of the most widely consumed fruits in the world, both *in natura*, and in processed forms. It also stands out as a source of antioxidant phenolic compounds that are important to human health. After taking into account numerous studies that examine the relationship between chemical structures and antioxidant capacity, this article reviews the chemical characteristics of bioactive compounds and presents findings on the way in which these structures act as free radical scavengers and redox active metal chelators, as well as their abilities to attenuate the effects of reactive oxygen and nitrogen species, which are associated with chronic and degenerative diseases.

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos e estudos de intervenção apontaram uma relação inversa entre a ingestão de frutas e hortaliças, com a incidência de doenças degenerativas, como o câncer e as doenças cardiovasculares. Há fortes evidências de que a ação sinérgica de diversos constituintes bioativos presentes nestes alimentos, tais como vitamina C, vitamina E, carotenóides e flavonóides, seja responsável por estes benefícios à saúde. Está bem estabelecido e amplamente aceito que o consumo de uvas e produtos derivados constitui uma das mais importantes formas de incorporar flavonóides, e outros compostos não flavonóides, à dieta humana. Resultados de pesquisas sugerem que muitos destes compostos são ótimos antioxidantes capazes de seqüestrar radicais livres, quelar íons metálicos com atividade redox e atenuar outros processos envolvidos com espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, associadas com patologias crônicas e degenerativas.

Nos últimos 20 anos um número considerável de estudos *in vitro* gerou informações consistentes de que a atividade antioxidante de vários compostos fenólicos originários das plantas (flavonóides e não flavonóides) bem como seus metabólitos depende, a princípio, do arranjo de grupos funcionais sobre a estrutura nuclear. As evidências suportam que o número, posição e tipo de substituintes da molécula são determinantes na capacidade antioxidante de um composto. A constatação *in vivo* das atividades biológicas benéficas à saúde requer ainda extensivos estudos, uma vez que estes compostos são, muitas vezes, metabolizados em grande extensão *in vivo* não correspondendo fielmente às formas bioativas encontradas inicialmente nas plantas.

Nessa perspectiva, este artigo revisa as características químicas dos compostos bioativos presentes nas uvas e apresenta um entendimento atual, porém não conclusivo, sobre a influência destas estruturas sobre a habilidade dos mesmos em promover a saúde.

## 2. PANORAMA DA PRODUÇÃO DE UVAS E DERIVADOS NO BRASIL

A videira é uma planta pertencente à família das *Vitaceae*, gênero *Vitis* e subgênero *Euvitis*, que corresponde a maior parte das vinhas cultivadas no mundo. Dentre elas destacam-se o ramo Euro-Asiático que contém a *Vitis vinifera* L., conhecida como produtora de uvas finas, e o ramo Americano que constitui a base para a obtenção de porta-enxertos utilizados na viticultura (BOULTON et al., 1995).

Esta cultura corresponde a uma das mais antigas do mundo e foi introduzida no Brasil no século XVI no atual estado de São Paulo. No Rio Grande do Sul, os primeiros vinhedos de *Vitis vinifera* foram implantados pela missão jesuítica no século XVII e as uvas americanas somente foram introduzidas nas primeiras décadas do século XIX. Neste período, surgiram as doenças fúngicas que dizimaram a viticultura colonial. Apenas cultivares resistentes às doenças, com destaque para a Isabel (*Vitis labrusca*), passaram a ser plantadas nas diversas regiões do país e tornaram-se a base do desenvolvimento da viticultura comercial nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul (CATALUÑA, 1998; PROTAS; CAMARGO; MELO, 2008). Este panorama modificou-se somente a partir do início do século XX com a reintrodução de variedades viníferas que então se difundiram principalmente na região Sul do país (CATALUÑA, 1998; PROTAS; CAMARGO; MELO, 2008). Nas outras regiões, principalmente as de clima tropical, a viticultura foi efetivamente desenvolvida a partir da década de 1960 com o plantio de vinhedos comerciais de uva de mesa (CAMARGO, 2003). Estes fatos históricos associados à extensa área de vinhedos no país resultaram em uma viticultura muito diversificada e complexa, no qual se pode encontrar vários centros produtivos de uva, cada um com sua realidade climática, fundiária, tecnológica, humana e mercadológica (PROTAS; CAMARGO; MELO, 2008).

Aproximadamente 50% da produção de uva no país são destinadas ao processamento na forma de sucos e vinhos, com plantio em regiões emergentes do Brasil, que abrangem desde o Rio Grande do Sul até as regiões Sudeste e Nordeste, passando por pólos de importância crescente nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso e Goiás. Os sucos de frutas tem sido incorporados ao cotidiano das pessoas devido em grande parte a redução de preço e praticidade de consumo (MAIA et al., 2009), o que constitui um nicho de mercado economicamente importante para a viticultura nacional (BARBOSA, 2010). Devido à crescente importância atribuída aos flavonóides nos últimos anos, decorrente de suas ações relacionadas à prevenção de doenças degenerativas, maior apelo comercial tem sido dado aos sucos integrais naturais (IBRAVIN, 2010). Os avanços agrícolas associados à divulgação dos efeitos benéficos atribuídos ao consumo comedido de vinho também têm resultado em um maior interesse do consumidor brasileiro pelo produto.

Em decorrência, o setor vitivinícola tem grande potencial de crescimento, mas deve-se observar que o país apresenta uma característica atípica em relação aos países tradicionalmente produtores de vinhos da Europa como França, Itália, Espanha, Portugal e Alemanha. Nestes, o cultivo de uva é praticamente restrito às uvas *Vitis vinifera*, uma vez que

a legislação europeia apenas permite a elaboração de vinhos a partir desta espécie e/ou de seus híbridos primários (cruzamento entre *Vitis viniferas*) (CATALUÑA, 1998).

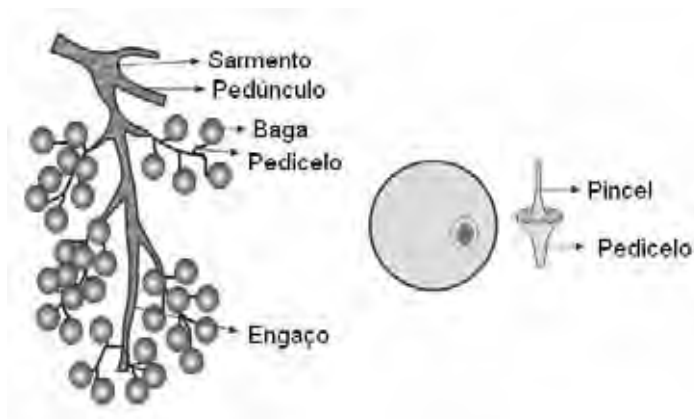
No Brasil, a maior parte dos vinhos produzidos é originária de uvas americanas (como *Vitis labrusca* e *Vitis bourquina*) e híbridas complexas. Não sendo de longa maturação, estes produtos apresentam preços acessíveis e atendem ao paladar de consumidores específicos de cada região (GUERRA et al., 2009). Todavia, vinhos finos de *Vitis vinifera*, elaborados a partir de viníferas tintas *Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, *Cabernet Franc* e *Tannat* e, de viníferas brancas *Moscato*, *Riesling Itálico*, *Trebbiano* e *Chardonnay*, já estão sendo produzidos por vinícolas brasileiras e começam a ganhar espaço no mercado internacional. O Instituto Brasileiro de Vinho (IBRAVIN) projeta que a participação dos vinhos finos em relação ao total dos vinhos produzidos no país deve passar dos atuais 18% para 80% até 2025, sendo as uvas híbridas, ou americanas, destinadas mais a produção de vinho de mesa e sucos (BARBOSA, 2010). Além disso, o Brasil vem se destacando mundialmente como produtor, consumidor e exportador de espumantes. Ao contrário do segmento de vinhos finos, no qual os estrangeiros representam 80% das vendas, nos espumantes o domínio é nacional, com apenas 20% do mercado representado pelos importados. Além das uvas viníferas, como *Shiraz* e *Cabernet Sauvignon*, produtores estão elaborando este produto a partir da uva Niágara, o que possibilita agregar valor e diversificar a renda.

O crescente interesse dos brasileiros pela bebida faz as vinícolas nacionais investirem para atender ao consumo potencial. O IBRAVIN estima um crescimento de 15% ao ano, com um movimento de mais de 20 milhões de garrafas anualmente (FREITAS, 2011). Para tanto, o investimento em recursos tecnológicos, com foco na melhoria da qualidade do produto, é imprescindível para favorecer a competitividade e sustentabilidade do setor vitivinícola brasileiro (BARBOSA, 2010).

### **3. ASPECTOS GERAIS DAS UVAS, SUCOS E VINHOS**

#### **3.1 Uvas**

A uva constitui-se de uma parte herbácea chamada de engaço cuja extremidade é chamada de pedicelo (canal de transporte de elementos nutritivos) e outra parte carnosa denominada de baga, que está ligada ao engaço pelo pedicelo. O feixe que fica preso ao pedicelo, quando se destaca a baga, é chamado de pincel (**Figura 1**) (BOULTON, 1995).



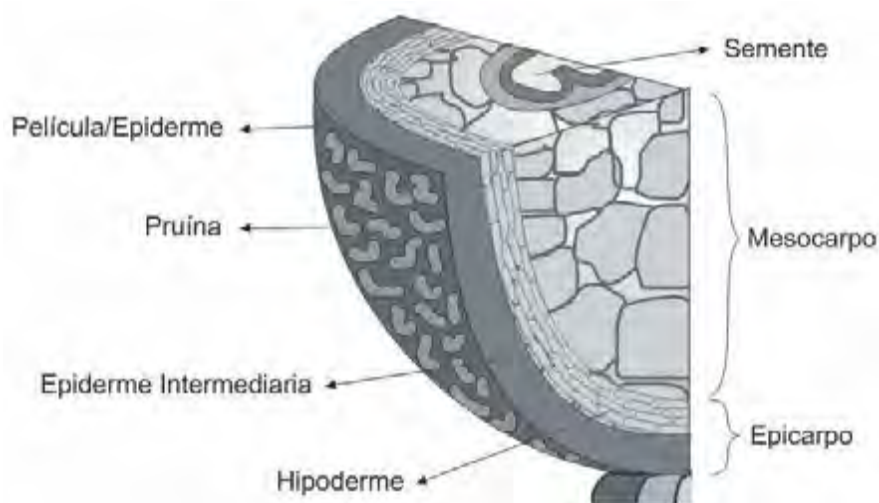
**Figura 1.** Organização estrutural do cacho da uva (GOMES, 2006).

O engaço é rico em água, resinas, minerais e taninos adstringentes e, devido a esta composição, é normalmente separado da baga antes do processamento da fruta para não causar excesso de adstringência e sabor desagradável ao produto final. Embora a proporção de componentes da baga possa variar dependendo da variedade da uva, grau de maturação e produtividade por planta, em geral apresenta a seguinte composição (% em peso úmido): 70 a 85, de água; 12 a 15, açúcares redutores; 0,4 a 1,3, ácidos orgânicos; 0,3 a 0,5, substâncias minerais; 0,03 a 0,17 compostos nitrogenados e outros componentes que aparecem em quantidades mínimas. Em uvas pirênicas, as sementes ocupam geralmente de 4 a 13% do peso total da baga e, de acordo com a fecundação, são encontradas em número variável (1 a 4). A polpa representa, em média, de 74 a 88% do peso úmido total da baga, contribuindo significativamente para o rendimento do mosto, enquanto a casca corresponde de 8 a 13% do peso úmido total (BOULTON, 1995).

A casca é o envoltório protetor composto por três camadas sobrepostas: a camada externa (cutícula ou epiderme), a epiderme intermediária, com uma ou duas camadas e a camada interna, a hipoderme (**Figura 2**). A epiderme é formada por uma camada de ácidos graxos hidroxilados chamada cutina que por sua vez é recoberta com uma camada fina de ceras hidrofóbicas, a pruína. A camada de pruína tem a função de proteger as células da baga contra os efeitos do calor e umidade, e também de evitar a penetração de microrganismos no interior da baga. A hipoderme é a região da casca onde se encontram a maioria dos compostos fenólicos das uvas tintas (LECAS; BRILLOUET, 1994).

A síntese e distribuição dos compostos fenólicos de cada espécie vegetal são determinadas por sistemas intrínsecos de enzimas geneticamente controlados (KUHNAU, 1976). Por outro lado, as quantidades encontradas são fortemente influenciadas por fatores extrínsecos como estação do ano (clima), incidência de radiação UV, composição do solo.





**Figura 2.** Organização estrutural da baga de uva.

Em geral, os compostos fenólicos encontrados nas uvas podem ser divididos em dois grandes grupos:

- flavonóides: localizados principalmente na casca, mas também na polpa, entre os quais destacam-se as antocianinas, os flavonóis e os flavan-3-óis;
- não flavonóides: encontrados principalmente na casca e semente, compreendendo os ácidos fenólicos, benzóicos e cinâmicos, além de outros derivados fenólicos, como os estilbenos, com destaque para o resveratrol (JACKSON, 1994).

De acordo com a coloração, as bagas podem ser denominadas: brancas ou verdes, rosadas e tintas ou negras, com grandes variações de tons. Entre os compostos que contribuem para a coloração das uvas estão os flavonóides, metabólitos secundários sintetizados pelas plantas (POURCEL et al., 2007).

### 3.2 Vinhos

A legislação brasileira vigente define que “vinho de mesa de viníferas” é o produto elaborado exclusivamente com uvas das variedades *Vitis vinífera* enquanto o “vinho de mesa de americanas” ou “vinho comum” é definido como o produto elaborado com uvas do grupo das uvas americanas e/ou híbridas, podendo conter em sua composição, vinhos de variedades viníferas. É considerada uma bebida obtida da fermentação alcoólica completa ou parcial da uva fresca, esmagada ou não, ou do mosto de uvas sãs, frescas e maduras, com um conteúdo de álcool adquirido de no mínimo 7% em volume (v/v a 20°C) e outros produtos da fermentação alcoólica (BRASIL, 1988).

O componente majoritário do vinho é a água com 75 a 90% e esta variação de 15% deve-se pelos compostos que constitui a chamada fração minoritária do vinho, entre os quais se incluem os compostos fenólicos, ácidos orgânicos, alcoóis superiores, sais minerais, ésteres, glicerol, aminoácidos, entre outros. Embora estes compostos estejam presentes em baixas concentrações são capazes de conferir aos vinhos características muito importantes e diferenciadas de um produto para outro. O segundo maior constituinte é o álcool etílico que, de acordo com o tipo de vinho, varia entre 8 e 13%, podendo as vezes ser maior. O terceiro componente no vinho seco é o açúcar. O seu conteúdo em peso seco no vinho tipo seco é geralmente menor que 2 g/L enquanto em vinho botrytizado doce, por exemplo, o açúcar pode chegar a cerca de 200 g/L, em virtude do uso de vindimas intencionalmente tardias, tal como a *Sauternes* da França. Neste caso, um ciclo climático apropriado, suficientemente úmido seguido por um período seco, propicia a infecção das uvas (conhecida como podridão nobre) por um fungo denominado *Botrytis cinérea*, que dá nome ao vinho. O *Botrytis* torna a casca da uva permeável para que ocorra a rápida perda de água e, em consequência, haja uma concentração do açúcar em aproximadamente 30% ou mais. O processamento destas bagas intencionalmente murchas resulta na produção de vinhos mais doces após a fermentação (BOULTON et al., 1995).

Os compostos fenólicos responsáveis em grande parte pela coloração dos vinhos ocorrem nos tintos em teores significativamente maiores (1000-4000 mg/L) que nos brancos (200-300 mg/L). Nos vinhos tintos, os compostos predominantes são os ácidos fenólicos, resveratrol, flavonóis, flavanóis, procianidinas (taninos) e antocianinas (500-900 mg/L) (DREOSTI, 2000; HOLLMAN; ARTS, 2000; ROBARDS; ANTOLOVICH, 1997). Estes compostos além de contribuírem para a qualidade organoléptica dos vinhos (cor, aroma e sabor) e participarem dos fenômenos de turvamento, constituem o principal reservatório de substâncias autooxidáveis que protegem os vinhos contra fenômenos de oxidação (PERES, 2007).

### 3.3 Sucos

A lei brasileira define suco de uva como uma bebida não fermentada, não alcoólica, obtida da parte comestível da uva sã, fresca e madura que resulta em produto com coloração, aroma e sabor característicos da fruta de origem, podendo ainda ser classificado da seguinte forma (BRASIL, 1997):

- suco integral: comercializado na sua concentração natural e sem adição de açúcar;
- suco desidratado: produto sob o estado sólido, obtido pela desidratação do suco integral;

- suco reconstituído: produto obtido pela diluição do suco concentrado ou desidratado, até a concentração original do suco integral ou ao teor de sólidos solúveis totais mínimo estabelecido nos respectivos padrões de identidade e qualidade (BRASIL, 2000). Além destes, o mercado atual conta com as classes de sucos convencionais e orgânicos.

A composição química dos sucos depende inicialmente da variedade de uva utilizada no processo, bem como de sua forma de cultivo e do seu adequado estágio de maturação, que deve apresentar uma relação equilibrada entre açúcar, expresso em sólidos solúveis totais, e acidez, expressa em ácido tartárico. Além disso, as uvas devem apresentar um bom rendimento em mosto, aroma e sabor agradáveis, bem como alto teor de compostos fenólicos (MARZAROTTO, 2005). Os sucos de uva produzidos em países com tradição na fabricação de vinho são elaborados com uvas *Vitis vinifera*. Estas uvas normalmente perdem o frescor e passam a apresentar gosto de cozido e falta de aroma quando exposta a tratamentos térmicos. As variedades de *Vitis labrusca* e seus híbridos constituem a base da produção de suco de uva no Brasil devido as suas ótimas características organolépticas. Estas variedades apresentam a vantagem de manter seu refrescante sabor mesmo quando exposta ao calor durante as etapas de processamento (MARZAROTTO, 2005). As principais variedades utilizadas na produção de suco no Brasil são Concord, Isabel, Niágara, Bordô e Jacquez e esta escolha é marcadamente influenciada pelo hábito e paladar particular de cada região do país (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998; RIZZON; MIELE, 1995).

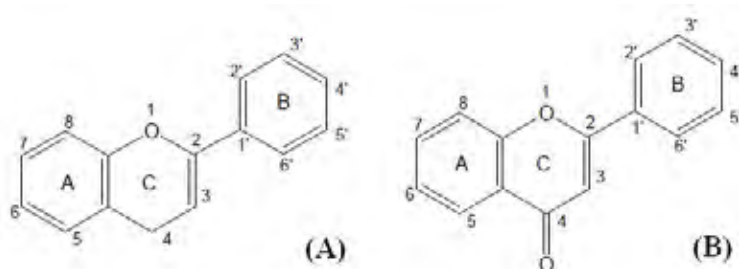
O suco de uva é considerado uma fonte importante de compostos fenólicos e as discrepantes variações nos teores de compostos fenólicos presentes nos sucos disponíveis no mercado também são decorrentes das diferenças inerentes de cada espécie e dos diferentes tratamentos a que são submetidos durante a produção do suco. Dentre os tratamentos destacam-se o tipo de extração, o tempo de contato entre o mosto e as partes sólidas da uva (casca e sementes), o tipo e intensidade da prensagem, o tratamento térmico, o tratamento enzimático, a adição de dióxido de enxofre e/ou a de ácido tartárico (MALACRIDA; MOTA, 2005). Para obtenção de um produto de qualidade, atualmente produtores artesanais e industriais buscam otimizar os processos tecnológicos de forma a extrair os compostos característico do suco, com o mínimo de prejuízos aos compostos bioativos de interesse, e assegurar a conservação do suco até o momento do consumo sem a necessidade da adição de conservantes (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). Nestes produtos, sua preservação fundamenta-se no princípio de esterilização a alta temperatura e tempo curto associado a um envase asséptico. Entretanto, o uso combinado de métodos físicos e químicos é também permitido como alternativa de conservação dos sucos (BRASIL, 1997). Os agentes químicos

mais utilizados para esta finalidade são o ácido sórbico e o dióxido de enxofre proveniente da dissociação do bissulfito ou metabissulfito de sódio ou potássio (MAIA et al., 2009).

#### 4. ESTRUTURA QUÍMICA DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NAS UVAS E PRODUTOS DERIVADOS

##### 4.1 Flavonóides

A estrutura dos flavonóides é baseada no esqueleto de 15 carbonos, caracterizado por dois anéis aromáticos interligados por uma cadeia de três átomos de carbono, que formam um heterociclo oxigenado (C6-C3-C6). Dependendo do estado de oxidação do anel central C os flavonóides podem ser do tipo 2-fenilbenzopirano (**Figura 3A**) ou do tipo 2-fenilbenzopirona (**Figura 3B**) (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006). Em condições ácidas, duas bandas de absorção são características dos flavonóides: a primeira (Banda I) com máximo de absorção entre 300 e 550 nm, presumidamente resultante do anel B da molécula e a segunda (Banda II) com máximo de absorção entre 240 e 285, supostamente resultante do anel A da molécula (ROBARDS; ANTOLOVICH, 1997).



**Figura 3.** Estrutura básica dos flavonóides: 2-fenilbenzopirano (A) e 2-fenilbenzopirona (B) (HUBER, 2007).

##### 4.1.1 Antocianinas

As antocianinas estão presentes principalmente nas cascas e nas três ou quatro primeiras camadas das células hipodérmicas, em escala subcelular, nos vacúolos celulares das uvas de castas tintas (BROUILLARD, 1982; PINELO; ARNOUS; MEYER, 2006) e, em menor proporção, na polpa de algumas variedades (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b; SANTIAGO et al., 2008). A estrutura básica destes compostos é a aglicona, denominada antocianidina, e constitui-se de dois anéis fenólicos A e B e um anel pirano heterocíclico C (**Tabela 1**). Esta estrutura forma o cromóforo de absorção de luz que confere a coloração

atrativa às uvas, com nuances de cores entre vermelho e azul (HARBORNE; WILLIAMS, 1995). Na literatura já foram mencionadas 23 antocianidinas que diferem entre si pelo número e posição dos grupos hidroxilas e/ou metoxilas, porém apenas seis delas são mais frequentemente encontradas nos alimentos: cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina, malvidina e pelargonidina (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

**Tabela 1.** Antocianidinas (forma de cátion flavílio) mais comuns presentes nas uvas.

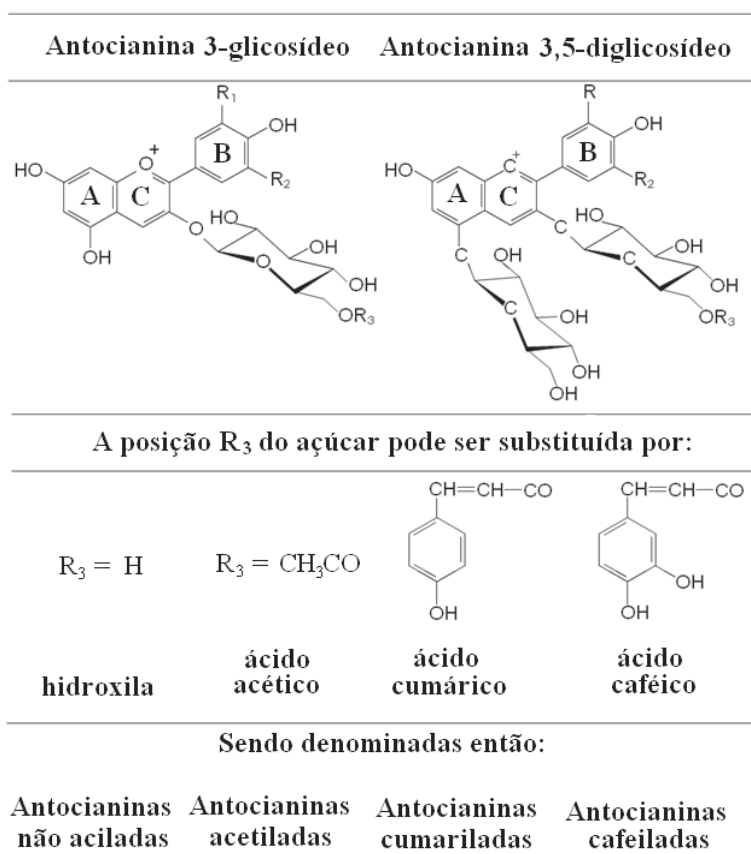
Estrutura básica da aglicona	Antocianidinas	Grupos substituintes
	Cianidina (Cy)	$R_1 = OH; R_2 = H$
	Delphinidina (Dp)	$R_1 = R_2 = OH$
	Malvidina (Mv)	$R_1 = OCH_3; R_2 = OCH_3$
	Pelargonidina (Pg)	$R_1 = R_2 = H$
	Peonidina (Pn)	$R_1 = OCH_3; R_2 = H$
	Petunidina (Pt)	$R_1 = OH; R_2 = OCH_3$

Nas uvas há predominância das cinco primeiras antocianidinas citadas, porém, em algumas uvas de variedades não viníferas (WANG; RACE; SHRIKHANDE, 2003) e na variedade Garnacha Tintorera (*Vitis Vinifera*) (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b) também foram encontradas pequenas quantidades de antocianinas derivadas da pelargonidina. Embora esta antocianina não seja predominante em uvas, é frequentemente encontrada em outras frutas tais como morango (CRESPO et al., 2010), açaí e acerola (ROSSO et al., 2008).

A deficiência eletrônica do cátion flavílio produz a elevada reatividade das agliconas livres, de tal maneira que na natureza encontram-se unidas a uma ou mais moléculas de açúcar (glicose, arabinose, ramnose, galactose, etc ou di- e trissacarídeos constituídos por estes açúcares) por meio de uniões hemiacetálicas (BROUILLARD, 1982). De acordo com o número de açúcares ligados a antocianidina, as antocianinas formadas podem ser classificadas como mono-, di- e triglicosídeos (MAZZA; MINIATI, 1993). A glicose é o açúcar majoritário unido às antocianidinas das uvas e as posições mais frequentes de união entre estas moléculas são a C-3 do anel C e a C-5 do anel A (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b) e, com raras exceções, estão ligados a posição C-7 do anel A (**Figura 4**) (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2010b). 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).

Em muitos casos, os açúcares das antocianinas estão esterificados com ácidos orgânicos, os quais estão, normalmente, ligados ao carbono 6 da molécula de açúcar (BROUILLARD, 1982). Dentre os ácidos orgânicos mais comumente encontrados estão o ácido acético, ácido *p*-cumárico, ácido caféico, entre outros. Assim sendo, as antocianinas não esterificadas são denominadas antocianinas não aciladas, enquanto as esterificadas com um ou mais ácidos fenólicos são denominadas antocianinas monoaciladas e poliaciladas, respectivamente, podendo apresentar denominações diferenciadas de acordo com o ácido ligado à molécula de açúcar (**Figura 4**) (ANDERSEN; JORDHEIM, 2006).



**Figura 4.** Estrutura de algumas antocianinas derivadas da uva.

Nas antocianinas, o comprimento de onda de absorção no espectro de luz visível é alterado pelo número de substituintes presentes no anel B e, em menor proporção, pelo tipo dos mesmos. Desta maneira, à medida que aumenta o número de substituintes no anel B, há um deslocamento da Banda I para comprimentos de onda entre 8 a 12 nm maiores. Como forma de exemplificação, as antocianidinas trissubstituídas (Delfinidina - Dp, Petunidina - Pt e

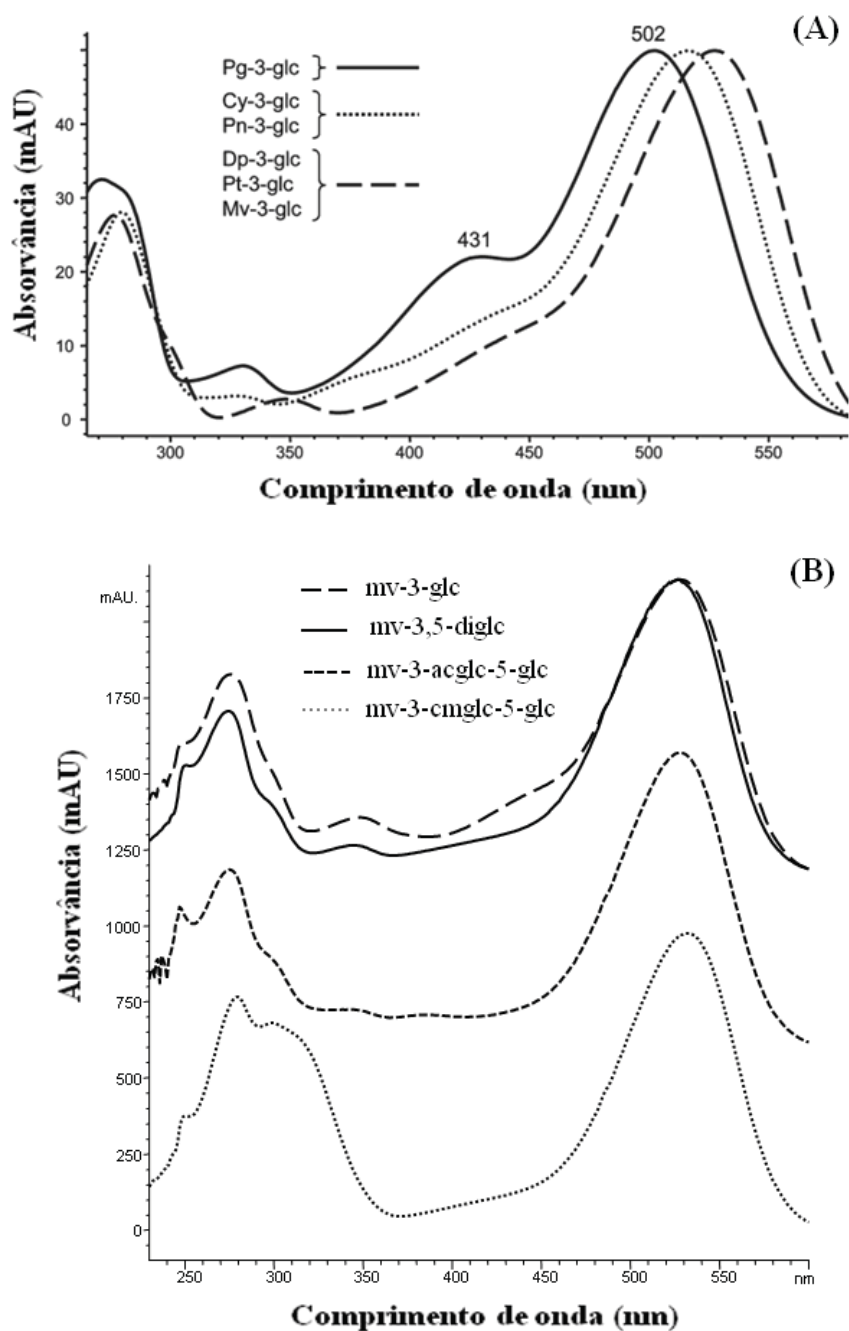
Malvidina - Mv) originam antocianinas com máximo de absorção na região do visível a valores aproximadamente 10 nm maiores do que as correspondentes antocianinas com antocianidinas dissubstituídas (Cianidina - Cy e Peonidina - Pn) (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2010b). Os monoglicosídeos que não contêm substituição (Pelargonidina - Pg) apresentam o menor comprimento de onda (502 nm) (**Figura 5A**).

Estas alterações nos comprimentos de onda explicam as modificações na cor da molécula. Em geral, o aumento da hidroxilação induz a um deslocamento da cor vermelha para a azul (Pelargonidina → Cianidina → Delfinidina), que é comprovado por um deslocamento batocrômico no comprimento de onda máximo de absorção do espectro do pigmento. Por outro lado, o aumento do grau de metoxilação (Peonidina → Petunidina → Malvidina) reverte esta tendência, conduzindo a colorações tendendo ao vermelho ou violeta (CARREÑO; MARTÍNEZ, 1995; FREITAS; MATEUS, 2006).

O grau e posição da glicosilação no anel B também exercem profunda influência na coloração das antocianinas. A coloração é alterada devido a um deslocamento hipsocrômico do máximo de absorção visível de aproximadamente 10 nm com relação à aglicona correspondente. No entanto, este deslocamento é maior quando há a transformação da aglicona em monoglicosídeo do que quando há a transformação de mono- para diglicosídeo e assim sucessivamente. A posição da glicosilação também afeta outras zonas do espectro no visível de tal maneira que auxilia na identificação das antocianinas mono- e diglicosiladas: as antocianinas 3-monoglicosídeos apresentam um ombro na região de 440 nm característico que está ausente nas 3,5-diglicosídeos (**Figura 5B**). Por outro lado, o tipo de açúcar normalmente não interfere no espectro UV-Vis das antocianinas (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2010b; DURST; WROLSTAD, 2010).

A esterificação dos açúcares também influencia marcadamente na cor das antocianinas. Delgado-Vargas; Jiménez; Paredes-López (2000) demonstraram que em pH acima de 4, a acilação pode produzir uma banda de absorção no ultra-violeta maior que a observada nas antocianinas não aciladas, nas mesmas condições de pH, na região entre 310 e 320 nm (BAUBLIS; SPOMER; BERBER-JIMENEZ, 1995). No entanto, deve-se ressaltar que os derivados acetilados das antocianinas apresentam espectros UV-vis em meio ácido (pH < 2, predominando a forma de cátion flavílio) praticamente iguais aos derivados não acetilados (malvidina-3-glicosídeo (mv-3-glc) e malvidina-3,5-diglicosídeo (mv-3,5diglc), respectivamente, **Figura 5B**) das antocianinas. Em contrapartida, as antocianinas cumariladas e cafeiladas podem apresentar um novo ombro ou máximo de absorvância correspondente ao resíduo de cumaril ou cafeil (**Figura 5B**).





**Figura 5.** Espectros de absorção de diferentes antocianinas em meio ácido ( $\text{pH} < 2$ ): (A) 3-monoglicosídeos (comprimento de absorção de onda aumenta com o aumento dos substituintes do anel B) (CASTILLO-MUNOZ et al., 2009a); (B) monoglicosídeo (glc) x diglicosídeo (diglc), 3-monoglicosídeo (linha grande tracejada) e 3,5-diglicosídeo (linha sólida); diglicosídeos acetilados (3-acglc-5glc) x cumarilados (3-acglc-5-glc), malvidina-3-acetilglicosídeo-5-glicosídeo (linha pequena tracejada) e malvidina-3-(*p*-cumaril)-glicosídeo-5-glicosídeo (linha pontilhada).



No caso das antocianinas cumariladas, o resíduo cumaril pode estar nas configurações isoméricas trans (majoritária) ou cis (minoritária), o que origina algumas alterações no espectro UV-vis, sobretudo no ombro UV devido ao resíduo de cumaril, tal como a diminuição no valor de comprimento de onda no caso dos isômeros cis (NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010). Deve-se ressaltar que as diferentes cores exibidas pelas uvas dependem não somente das diferenças estruturais mas do pH do fluido vacuolar da célula vegetal (MOSKOWITZ; HRAZDINA, 1981) ou meio onde estão presentes, da concentração das antocianinas, da presença de outros pigmentos, bem como de outros fatores como temperatura, luz, presença de copigmentos, íons metálicos, enzimas, ácido ascórbico e açúcares (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LOPEZ, 2003). Alguns estudos sugerem que a copigmentação das antocianinas com outros compostos (copigmentos) seja um dos principais mecanismos de estabilização da cor nas plantas, incluindo as frutas (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

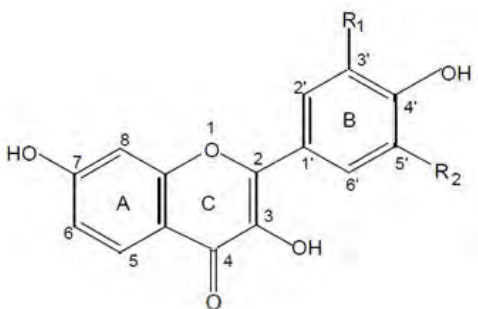
Diversas pesquisas são focadas na determinação da composição e do conteúdo de antocianinas presentes nas uvas (ABE et al., 2007; CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b; GOMÉZ-PLAZA et al., 2008; GUERRERO et al., 2009; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ; GARCÍA-ROMERO, 2004; KIRALP; TOPPARE, 2006; LIANG et al., 2008; POMAR; NOVO; MASA, 2005) e nos vinhos (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ; LORENZO; ESPINOSA, 2005; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ; GARCÍA-ROMERO, 2004; NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010).

Diferenças qualitativas marcantes entre as antocianinas das uvas de *Vitis vinifera* e as uvas americanas e híbridas são relatadas na literatura. Nas uvas de *Vitis vinifera* e nos vinhos correspondentes são identificadas predominantemente as antocianinas monoglicosiladas, enquanto a presença de antocianinas diglicosiladas é característica dominante das espécies americanas e híbridas (BAUBLIS; SPOMER; BERBER-JIMENEZ, 1995; HRAZDINA, 1975). Baseados nestes dados e com uso de equipamentos avançados, foi possível detectar adulterações (utilização de uvas americanas ou híbridas) em vinhos europeus, que são produzidos exclusivamente por *Vitis vinifera*. Isto se deve ao fato de que os pigmentos das uvas são transferidos parcialmente para os vinhos durante sua elaboração e, conseqüentemente, todo vinho varietal apresenta um perfil de antocianinas típico e característico derivado da fruta original que torna-se sua ‘impressão digital’ (ARAZARENA et al., 2000; BERENTE et al., 2000; GARCÍA-BENEYTEZ; REVILLA; CABELLO, 2002; NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010).

### 4.1.2 Flavonóis

A estrutura básica destes compostos é semelhante a das antocianidinas (C6-C3-C6), porém com a presença característica dos grupos carbonílico e hidroxílico no anel C. Castillo-Muñoz et al. (2007) demonstraram que a ocorrência de flavonóis nas cultivares de castas tintas é representada por seis estruturas (kaempferol, quercetina, isoramnetina, miricetina, laricitrina e siringetina) glicosiladas (**Tabela 2**).

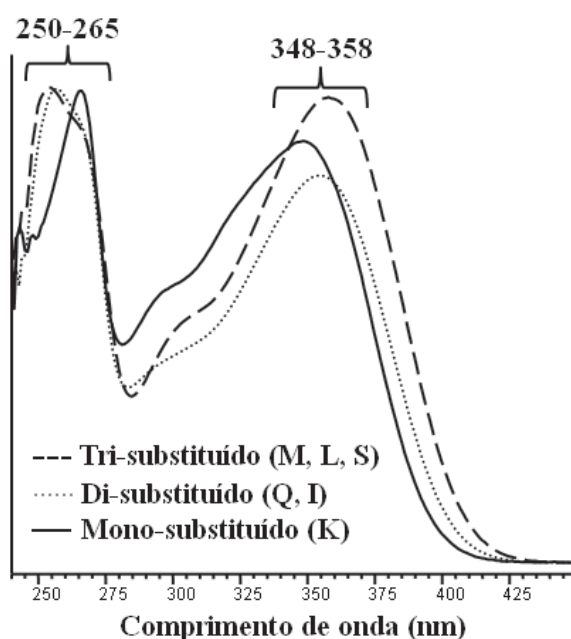
**Tabela 2.** Estrutura dos flavonóis encontrados nas uvas.

Estrutura básica da aglicona	Flavonóis agliconas	Grupos substituintes
	Kaempferol (K)	R1 = R2 = H
	Quercetina (Q)	R1 = OH; R2 = H
	Isoramnetina (I)	R1 = OCH <sub>3</sub> ; R2 = H
	Miricetina (M)	R1 = R2 = OH
	Laricitrina (L)	R1 = OCH <sub>3</sub> ; R2 = OH
	Siringetina (S)	R1 = R2 = OCH <sub>3</sub>

Embora alguns trabalhos descrevam que a presença de flavonóis do tipo isoramnetina e miricetina seja exclusiva de uvas tintas, a ocorrência destes compostos, isolados ou em conjunto, já foi descrita em uvas brancas por alguns autores (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2010a; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ et al., 2010; MATTIVI et al., 2006; RODRÍGUEZ-MONTEALEGRE et al., 2006). Além disso, alguns estudos demonstraram a presença de miricetina em cultivares de uvas brancas não viníferas (*Vitis rotundifolia*) bem como nos vinhos elaborados a partir delas (PASTRANA-BONILLA et al., 2003; TALCOTT; LEE, 2002). De forma geral, o flavonol predominante nas cultivares de *Vitis vinifera* é a quercetina e miricetina enquanto que nas cultivares de *Vitis labrusca* é a quercetina (JACKSON, 1994).

Incolores ou de coloração amarela clara, os flavonóis se acumulam nas cascas de uvas de castas tintas e brancas (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009a, 2010a) e apresentam a função de proteção contra à radiação UV, devido a sua forte absorbância nesta faixa específica de comprimento de onda (250-400 nm) (**Figura 6**). Como sua síntese é estimulada pela luz, muitas vezes, a diferença de composição entre cachos de uma mesma variedade de uva é devido aos frutos expostos a maior quantidade de luz tenderam a uma síntese mais pronunciada destes compostos (PRICE et al., 1995). Estes compostos são encontrados nas uvas apenas na forma de 3-*O*-glicosídeos, enquanto que as correspondentes agliconas livres

podem ser encontradas em vinhos, como resultado da hidrólise ácida que ocorre durante a elaboração e envelhecimento dos vinhos. O 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). Além disso, quercetina tem sido sugerida ocorrer nas uvas como 3-*O*-(6''-ramnosil)-glicosídeo (denominado rutina), 3-*O*-glicosilgalactose e 3-*O*-glicosilxilósídeo (CHEYNIER; MOUTOUNET; SARNI-MANCHADO, 2003).

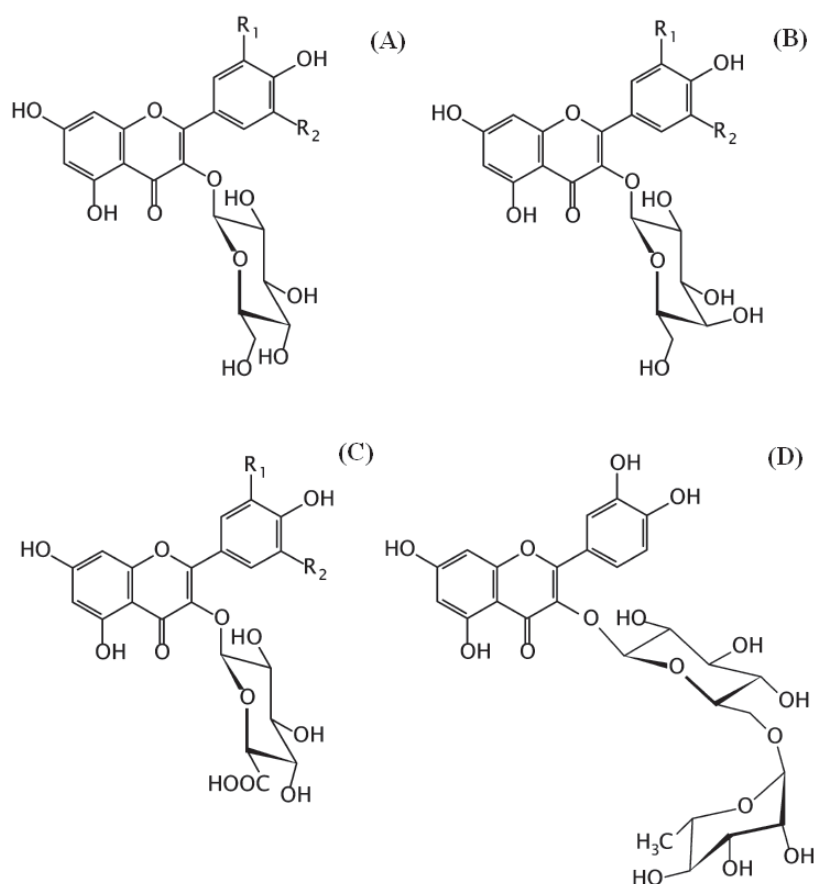


**Figura 6.** Espectro UV-vis de flavonóis.

Recentemente foi demonstrado que as formas glicosiladas dos flavonóis de uvas *Vitis vinifera* correspondem a série completa dos 3-*O*-glicosídeos, 3-*O*-galactosídeos e 3-*O*-glucuronídeos de kaempferol, quercetina, isoramnetina, miricetina, laricitrina e siringetina no caso de variedades tintas (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009a), e somente de kaempferol, quercetina e isoramnetina no caso das variedades brancas (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2010a) (**Figura 7**). Em ambos os casos, a rutina, um flavonol glicosídeo que já foi sugerido como maioritário em uvas e vinhos, é na realidade um flavonol muito minoritário na uva que, além disso, mostra uma tendência muito forte a hidrolizar-se, gerando quercetina livre nos vinhos (JEFFERY; PARKER; SMITH, 2008).

De forma geral, os flavonóis contribuem diretamente para a cor dos vinhos brancos e, em vinhos tintos, apesar de sua coloração ser mascarada pelas antocianinas, estão fortemente envolvidos nos fenômenos de copigmentação (BOULTON, 2001; SCHWARZ et al., 2005).

Além disso, contribuem para a capacidade antioxidante das frutas, incluindo as uvas e seus produtos derivados (BURDA; OLEZSEK, 2001). Alguns estudos recentes estão contribuindo significativamente para o conhecimento sobre estes compostos nas uvas (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2007, 2009a, 2010a) bem como em outras frutas (HOFFMANN-RIBANI; HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2009).



**Figura 7.** Estrutura dos flavonóis encontrados em uvas *Vitis vinifera*: (A) Flavonol-3-O-glicosídeo, (B) Flavonol-3-O-galactosídeo, (C) Flavonol-O-glucuronídeo, (D) Quercetina-3-O-(“6-ranmosil)-glicosídeo (rutina) (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b).

#### 4.1.3 Flavan-3-óis

Os flavan-3-óis são compostos encontrados em maior quantidade nas sementes e nos engaços das uvas e apresentam como unidades fundamentais as estruturas monoméricas de 2-fenilbenzopiranos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>). A (+)-catequina e seu isômero (-)-epicatequina são os principais flavan-3-óis monoméricos presentes nas uvas (HASLAM, 1980), podendo estar em parte esterificados pelo ácido gálico (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>), normalmente ao nível do carbono 3 (**Tabela 3**)

(RICARDO-DA-SILVA et al., 1991). Estes compostos são responsáveis, em grande parte, pelo sabor e adstringência de vinhos e sucos (ABE et al., 2007).

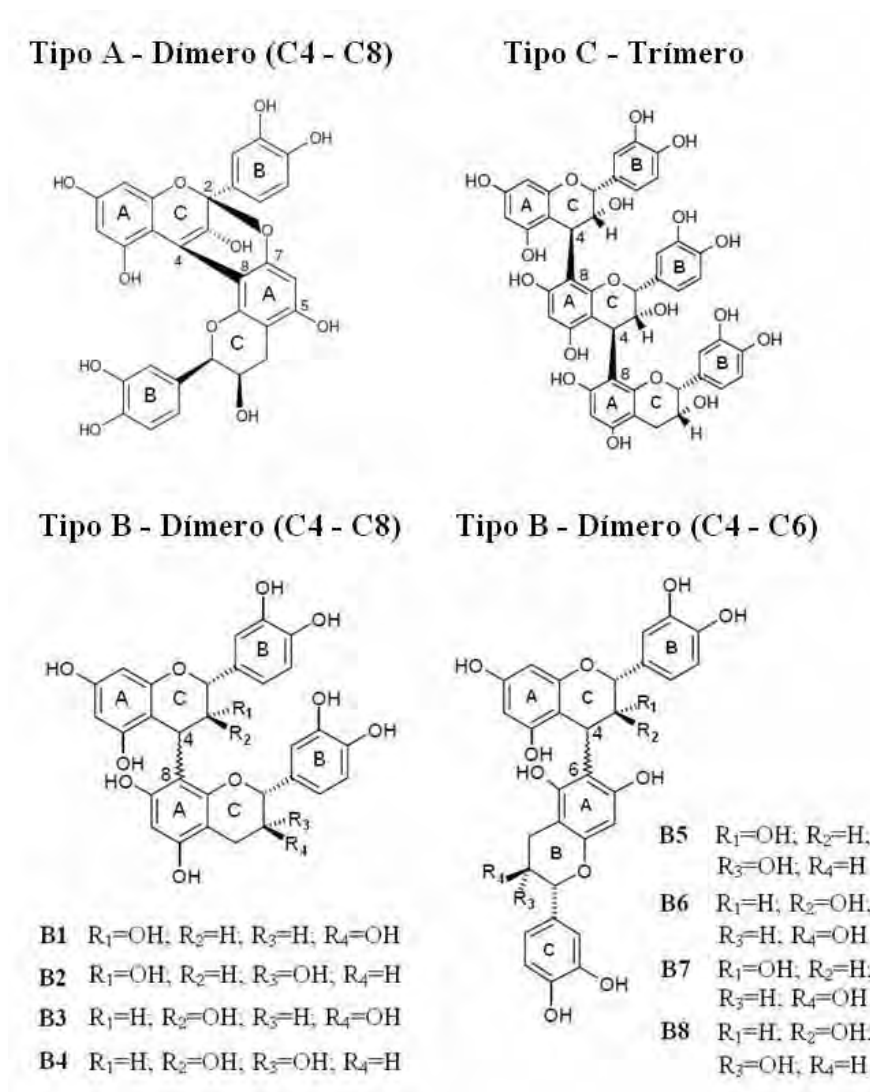
**Tabela 3.** Exemplos de flavan-3-óis presentes nas uvas: C: (+)-catequina; E: (-)-epicatequina; ECG: (-)-galato-3-epicatequina; GC: (+)-galocatequina; EGC: (-)-epigalocatequina; GCG: (+)-galato-3-galocatequina; EGCG: (-)-galato-3-epigalocatequina. \*G: ácido gálico.

Estrutura básica da aglicona	Flavanóis agliconas	Grupos substituintes*
	C	R = H; R <sub>1</sub> = OH; R <sub>2</sub> = H
	E	R = H; R <sub>1</sub> = H; R <sub>2</sub> = OH
	ECG	R = H; R <sub>1</sub> = H; R <sub>2</sub> = O-G
	GC	R = OH; R <sub>1</sub> = OH; R <sub>2</sub> = H
	EGC	R = OH; R <sub>1</sub> = H; R <sub>2</sub> = OH
	GCG	R = OH; R <sub>1</sub> = H; R <sub>2</sub> = O-G
	EGCG	R = OH; R <sub>1</sub> = O-G; R <sub>2</sub> = H

A associação de várias unidades monoméricas de catequinas ou epicatequinas são denominadas proantocianidinas ou taninos condensados. Dependendo do número de vezes que esta unidade básica se repete, as proantocianidinas podem ser dímeras, trímeras, oligoméricas (até 5 unidades) ou poliméricas (acima de 5 unidades). As variações estruturais 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).

As proantocianidinas podem liberar antocianidinas quando aquecidas em meio fortemente ácido e alcoólico, mediante a ruptura das ligações entre as unidades monoméricas (PORTER, 1992; RIBÉREAU-GAYON et al., 2003). 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. As procianidinas são os flavan-3-óis predominantes nas sementes das uvas (PRIEUR et al., 1994), enquanto nas cascas são encontradas tanto procianidinas como prodelfinidinas (SOUQUET et al., 1996). As procianidinas dímeras são classificadas de acordo com o seu tipo de ligação interflavanólica e dividem-se em dois grupos: A e B. As do

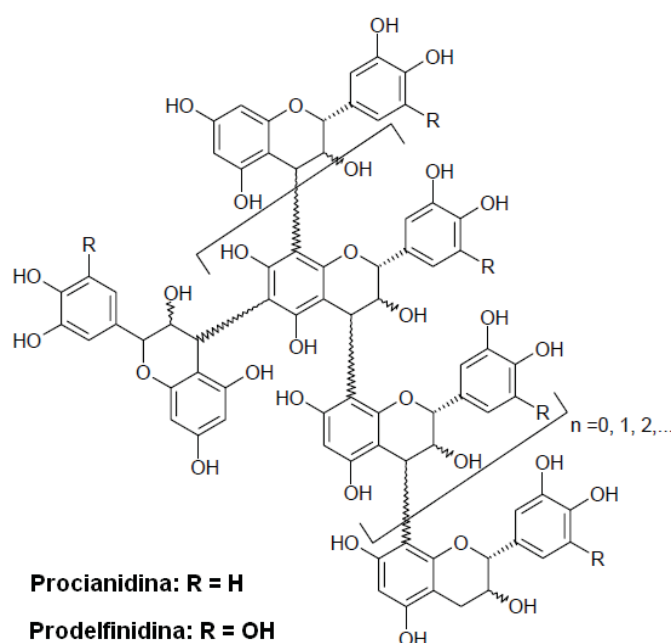
tipo A ( $C_{30}H_{24}O_{12}$ ) possuem uniões interflavanas C4-C8 ou C4-C6 e uma ligação éter entre os carbonos C-5 ou C-7 da unidade terminal (anel A) com o carbono C-2 da unidade superior (anel C) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Exemplos de procianidina dímeras (Tipo A e Tipo B) e trímera (Tipo C).

As procianidinas do tipo B ( $C_{30}H_{26}O_{12}$ ) são resultantes da condensação das unidades flavan-3-óis através de uma ligação entre o carbono 4 do monômero superior (anel C) com o carbono 6 ou 8 da unidade inferior (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 (**Figura 8**). Já as procianidinas trímeras são classificadas em tipo C (resultante de uniões interflavanas correspondentes ao tipo B dos dímeros) (**Figura 8**) e tipo D (que possuem uma ligação interflavano do tipo B e outra do tipo A) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003).

As formas poliméricas (**Figura 9**) são os flavan-3-óis principais nas uvas e são constituídos por um número elevado de unidades monoméricas, unidas tanto na posição terminal quanto na posição superior. A quantidade, estrutura e grau de polimerização das proantocianidinas presentes nas uvas diferem de acordo com sua localização nas diferentes partes das uvas (MONAGAS; BARTOLOMÉ; GÓMEZ-CORDOVÉS, 2005). Os taninos estão normalmente associados à evolução da cor e a qualidade organoléptica dos sucos e vinhos, principalmente com relação à adstringência e o amargor (HASLAM, 1974; RICARDO-DA-SILVA et al., 1991). A capacidade de interagir com as proteínas salivares, formando complexos estáveis que provocam a diminuição da lubrificação do palato, causa a sensação de secura e constrição, que é conhecida como adstringência (BATE-SMITH, 1973; HASLAM; LILLEY, 1988).



**Figura 9.** Procianidinas poliméricas predominantes nas uvas.

Diversas reações químicas ocorrem entre as antocianinas e taninos extraídos durante a maceração, estabilização e evolução dos vinhos, formando um grande número de compostos incolores ou coloridos. As reações mais importantes são a condensação indireta flavanol-antocianina, a polimerização indireta flavanol-flavanol, ambas intermediadas por acetaldeído, a condensação direta flavanol-antocianina, a oxidação não enzimática dos flavan-3-óis e a degradação das antocianinas, resultando na formação de novos pigmentos com propriedades cromáticas diferentes dos compostos originais da fruta que influenciam marcadamente na qualidade dos sucos e vinhos (DALLAS; RICARDO-DA-SILVA; LAUREANO, 1996 a, b).



## 4.2 Não Flavonóides

### 4.2.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos principalmente presentes nas uvas são os ácidos hidroxibenzóicos (C6-C1) e os ácidos hidroxicinâmicos (C6-C3), sendo os primeiros encontrados nas cascas e representados geralmente pelo ácido gálico, formando ésteres (galatos) com os flavan-3-óis; e os segundos, predominantemente encontrados na forma de ésteres tartáricos, tais como o ácido caftárico e ácido cutárico, tanto na casca como na polpa da uva (**Tabela 4**) (BEER et al., 2002; JACKSON, 1994). Os ácidos hidroxicinâmicos são considerados o maior constituinte da polpa (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003) e embora sejam encontrados em baixas concentrações, representam um dos principais compostos fenólicos presentes em uvas brancas (SINGLETON, 1992).

**Tabela 4.** Padrão de substituição dos ácidos fenólicos.

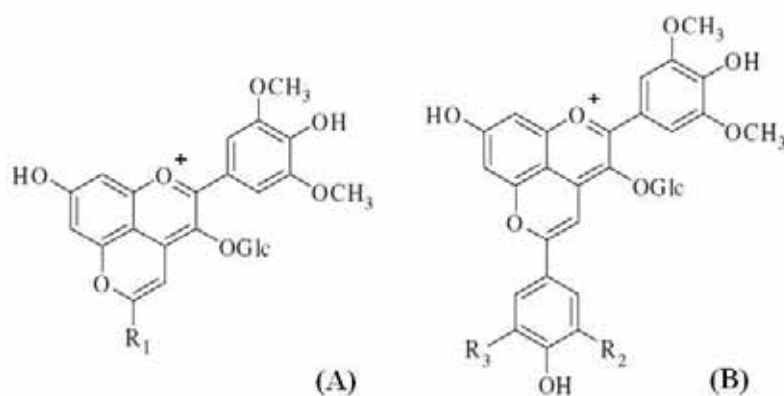
Compostos	Substituintes				
<b>Ácido hidroxibenzóico</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
Ácido gálico	H	OH	OH	OH	H
<b>Ácido hidroxicinâmico</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
ácido <i>p</i> -cumárico	H	H	OH	H	H
ácido caféico	H	OH	OH	H	H
ácido ferrúlico	H	O-CH <sub>3</sub>	OH	H	H
ácido sinápico	H	O-CH <sub>3</sub>	OH	O-CH <sub>3</sub>	H

Durante o processo de vinificação, os ésteres tartáricos dos ácidos hidroxicinâmicos podem sofrer hidrólise, liberando os ácidos hidroxicinâmicos de tal maneira que nos vinhos são encontrados tanto as formas livres como as combinadas. Assim, o teor destes compostos vai depender tanto do tipo da uva quanto do processo de hidrólise destes ésteres (RITCHEY; WATERHOUSE, 1999). A princípio, estes compostos não conferem ao vinho nenhum sabor



ou odor. No entanto, são precursores de compostos fenólicos voláteis que afetam o sabor e odor dos vinhos. Durante a fermentação, a ação enzimática do tipo descarboxilase de algumas leveduras presentes nas uvas pode converter os ácidos *p*-cumárico e ferrúlico em 4-vinilfenol e 4-vinilguaiacol, respectivamente (EDLIN et al., 1998; SALAMEH et al., 2008). Estes compostos, por sua vez, podem ser reduzidos a derivados de etil (etilfenol e etilguaiacol) por vinilredutases presentes em certas leveduras como *Brettanomyces* (DIAS et al., 2003) ou por algumas bactérias lácticas normalmente do gênero *Lactobacillus*. A presença de etilfenóis nos vinhos é responsável por grande perda econômica uma vez que confere aos produtos aroma ruim, conhecido pelos especialistas como aroma de couro, animal ou suor de cavalo (CHATONNET; DUBOURDIEU; BOIDRON, 1995).

Por outro lado, os ácidos hidroxicinâmicos, especialmente os ácidos *p*-cumárico e o caféico, estão envolvidos no processo de acilação dos substituintes glicosídicos das antocianinas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003) e, juntamente com seus derivados 4-vinilfenóis, podem reagir com antocianinas, originando compostos do tipo piranoantocianinas. Estes compostos contêm duplas ligações polarizáveis, isto é, com substituintes de diferentes polaridades em ambos os extremos da dupla ligação, propiciando estas reações. A primeira estrutura de piranoantocianina identificada foi a vitisina A (**Figura 10A**) procedente da reação entre a malvidina-3-glicosídeo com o ácido pirúvico (um metabólito secundário das leveduras) através da forma enólica deste último e, posterior, descarboxilação (RENTZSCH; SCHWARZ; WINTERHALTER, 2007).



**Figura 10.** Estruturas químicas de piranoantocianinas de vinho derivadas da malvidina-3-glicosídeo: (A) piranoantocianinas do tipo vitisina ( $R_1 = \text{COOH}$ , vitisina A;  $R_1 = \text{H}$ , vitisina B); (B) piranoantocianinas do tipo hidroxifenil ( $R_2 = R_3 = \text{H}$ , malvidina-3-glicosídeo-4-vinilfenol;  $R_2 = \text{H}$  e  $R_3 = \text{OH}$ , malvidina-3-glicosídeo-4-vinilcatecol ou pinotina A;  $R_2 = \text{H}$  e  $R_3 = \text{OCH}_3$ , malvidina-3-glicosídeo-4-vinilguaiacol) (RENTZSCH; SCHWARZ; WINTERHALTER, 2007).

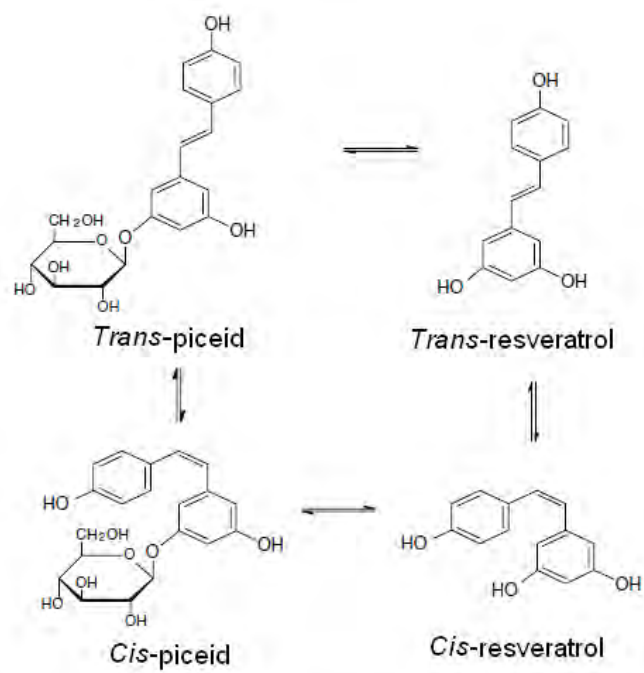
As estruturas das piranoantocianinas são diversificadas e vários caminhos têm sido propostos para sua formação (RENTZSCH; SCHWARZ; WINTERHALTER, 2007). Na **Figura 10B** estão ilustrados outras piranoantocianinas relevantes que são formadas a partir da reação de antocianinas com os ácidos hidroxicinâmicos (piranoantocianinas do tipo hidroxifenil). Estas reações estão envolvidas no processo de estabilização da cor durante o envelhecimento do vinho (RENTZSCH et al., 2010).

#### 4.2.2 Estilbenos

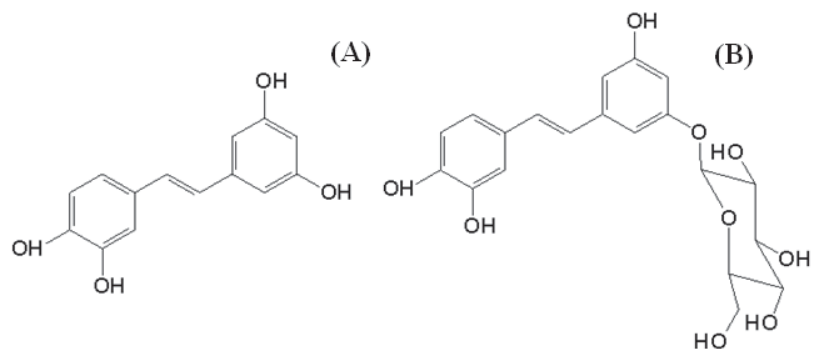
Dentre os principais compostos pertencentes a esta classe dos não flavonóides destacam-se o resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno), o piceid (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno-3-*O*-β-D-glicosídeo) e a astringina (3'-hidróxi-trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno-3-*O*-β-D-glicosídeo) (FLANZY, 2000).

O resveratrol contém um esqueleto baseado na estrutura do 1,2-difeniletileno e, como fitoalexinas (metabólitos secundários antimicrobianos), pode ser sintetizado principalmente nas cascas das uvas como resposta ao *stress* causado por infecção microbiana, dano mecânico ou irradiação por luz ultravioleta (BRAVO, 1996). Desta maneira, pode ser encontrado em uvas (CANTOS et al., 2001; GONZÁLEZ-BARRIO et al., 2006), sucos (ROMERO-PÉREZ et al., 1999; SAUTTER et al., 2005; SOLEAS et al., 1995a, b; YASUI et al., 1997) e vinhos (MORENO-LABANDA et al., 2004; SIEMANN; CREASY, 1992). Este composto existe na forma natural como isômero trans, embora possa hidrolisar-se (sob luz ultravioleta) a seu correspondente isômero cis. Na uva, o resveratrol se encontra unido a uma molécula de glicose através de um grupo fenol na posição 3. O 3-*O*-glicósideo de resveratrol também é conhecido pelos nomes piceid e polidatina, e também pode apresentar-se nas formas cis e trans (**Figura 11**) (LASTRA; VILLEGAS, 2007).

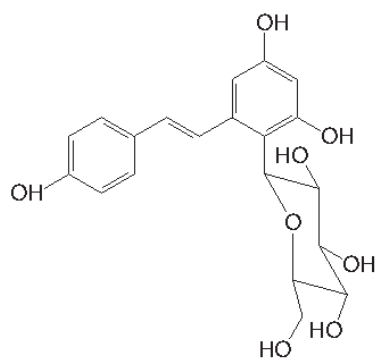
Existe também um composto denominado piceatanol que é um homólogo superior do resveratrol, com um grupo OH a mais na posição 3' e o seu 3-*O*-glicósideo é chamado de astringina (**Figura 12**). A presença de um grupo OH adicional faz com que estes compostos (piceatanol e astringina) apresentem máximos de absorção UV a 302 e 321 nm, respectivamente (PÜSSA et al., 2006), enquanto que o resveratrol os apresentam a 306 e 316 nm. Outro derivado glicosilado do resveratrol encontrado em vinhos Reisling é o trans-resveratrol-2-*C*-glicósideo (BADERSCHNEIDER; WINTERHALTER, 2000), que se diferencia do piceid pela posição do glicósideo na posição C-2 (**Figura 13**).



**Figura 11.** *Trans-resveratrol* e seus derivados (POUR-NIKFARDJAM; LÁSZLO; DIETRICH).

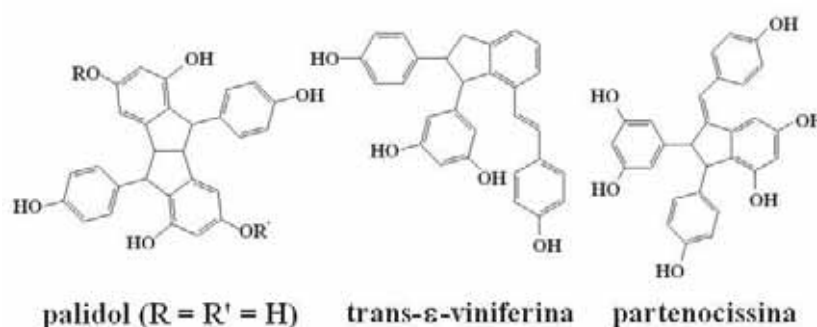


**Figura 12.** Homólogos do resveratrol: piceatanol e seu 3-*O*-glicosídeo (astringina).

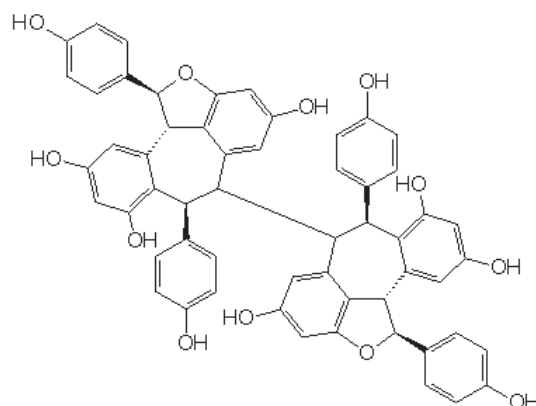


**Figura 13.** Derivado 2-*C*-glicosídeo do *trans-resveratrol*.

Por último, o resveratrol apresenta a capacidade de formar oligômeros (AMIRAGUEBAILIA et al., 2009; BADERSCHNEIDER; WINTERHALTER, 2000; PÜSSA et al., 2006; VITRAC et al., 2001), e já foram relatados na literatura alguns dímeros (palidol, viniferina, partenocissina) (**Figura 14**), e mais recentemente um tetrâmero (hopeafenol) (**Figura 15**).



**Figura 14.** Derivados dímeros do resveratrol. Especificamente para o palidol são conhecidos os derivados 3-glicosídeo (R= glicosil; R' = H) e 3,3'-diglicosídeo (R = R' = glicosil).



**Figura 15.** Tetrâmero do resveratrol (hopeafenol).

Alguns estudos sugerem que as técnicas de vinificação influenciam significativamente nos teores de resveratrol e seus derivados encontrados nos vinhos (BAVARESCO et al., 2000; MORENO-LABANDA et al., 2004), com maiores teores encontrados particularmente em produtos submetidos a maiores tempos de maceração das cascas (MATTIVI, RENIERO; KORHAMMER, 1995). Em contrapartida, operações como clarificação e filtração podem levar a um decréscimo dos níveis de resveratrol e piceid em sucos e vinhos (LAMUELA-RAVENTÓS et al., 1995; VRHOVSEK; WENDELIN, EDER, 1997). Além disso, alguns vinhos elaborados a partir de uvas botrytizadas apresentam menores teores de resveratrol

quando comparados com os elaborados a partir de uvas “normais”. Neste caso, o mesmo fungo (*Botrytis cinérea*) que ataca a uva é responsável por desenvolver gostos e aromas diferenciados aos vinhos por produzir a enzima lacase que oxida o resveratrol (ADRIAN et al., 1998). No entanto, a razão maior para o interesse dos pesquisadores pelo resveratrol está relacionada com seus benefícios para a saúde humana (BAUR; SINCLAIR, 2006; BRAVO, 1996; ESPÍN; GARCÍA-CONESA; TOMÁS-BARBERÁN, 2007; LASTRA; VILLEGAS, 2007; STIVALA et al., 2001).

Há evidências crescentes de que este composto possa prevenir ou retardar o aparecimento de câncer, doenças cardíacas, diabetes, inflamação patológica, infecção viral, entre outros (BAUR; SINCLAIR, 2006). Deve-se levar em conta que os estudos sobre as propriedades bioativas do resveratrol foram realizados fundamentalmente com seu isômero *trans*, exceto por alguns trabalhos disponíveis na literatura como o realizado por Waffo-Tégou et al. (2001) e o de He et al. (2010). É relevante a realização de novos estudos mais conclusivos que demonstrem se essas formas isômeras do resveratrol podem apresentar ou não propriedades similares as atribuídas ao *trans*-resveratrol, ou inclusive se podem mostrar outras atividades que até o momento não foram encontradas para o *trans*-resveratrol.

## **5. COMPOSTOS FENÓLICOS: ESTRUTURA QUÍMICA E SUA RELAÇÃO COM A ATIVIDADE BIOLÓGICA**

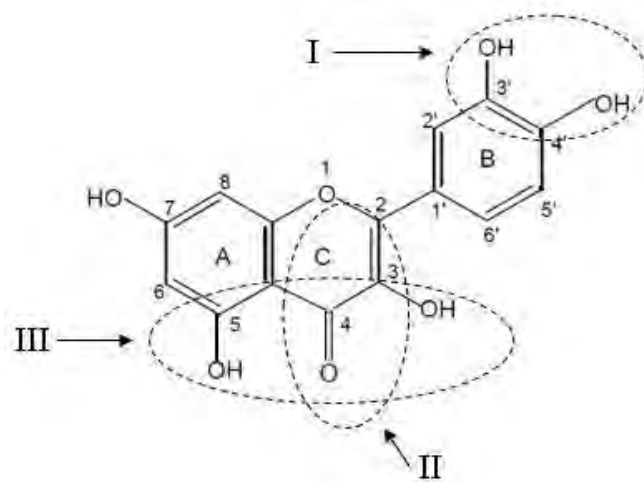
Antocianinas, flavan-3-óis, flavonóis e resveratrol presentes nas uvas e produtos derivados são os compostos fenólicos mais investigados e revisados devido suas ações biológicas (KENNEDY, 2008; MAKRIS; KALLITHRAKAB; KEFALAS, 2006; XIA et al., 2010). Embora a biodisponibilidade e bioconversão destes compostos no corpo humano ainda não estejam bem elucidadas, a Organização Mundial da Saúde (World Health Organization - WHO) enfatiza a importância dos compostos fenólicos com atividade antioxidante, especialmente em frutas, para prevenção dos mais importantes problemas de saúde pública, nomeadamente, doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e obesidade (STAPLETON et al., 2008; THE WORLD HEALTH REPORT, 2002).

Resultados de pesquisas sugerem que estes compostos podem agir como potentes antioxidantes capazes de atuar como sequestradores de radicais livres das células (PRIOR; CAO, 2000; RICE-EVANS, MILLER; PAGANGA, 1996, 1997) e participar da regeneração de outros antioxidantes como a vitamina E e o ácido ascórbico, resultando na proteção dos constituintes celulares contra danos oxidativos (FRANKEL; WATERHOUSE; TEISSEDRE,

1995; HERTOOG et al. 1993; KAUR; KAPOOR, 2001, 2002). Além disso, outras ações relatadas são: quelantes de metais capazes de catalisar a peroxidação de lipídeos (SILVA et al., 1998; TERÃO; PISKULA, 1999); inibidores da proliferação celular (KUNTZ; WENZEL; DANIEL, 1999; WENZEL et al., 2000), antiestrogênicos (MIKSICEK, 1995) e mediadores na transdução dos sinais intracelulares (SCHROETER et al., 2002). No entanto, estudos relatam que os compostos fenólicos presentes nas uvas, sucos e vinhos são, muitas vezes, metabolizados em grande extensão *in vivo* e transformam-se em compostos estruturalmente diferentes dos encontrados originalmente nas frutas (SPENCER et al., 2001; XIA et al., 2010). Desta maneira, a seguir serão apresentadas informações relacionadas à capacidade antioxidante dos compostos associados com sua estrutura química.

Os estudos *in vitro* são praticamente unânimes em mostrar que a habilidade de um composto fenólico, bem como seus metabólitos, têm de sequestrar radicais livres, quelar metais com atividade redox, atenuar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (associadas com patologias crônicas e degenerativas) têm muito a ver com a estrutura química da molécula, em especial o número, posição e tipos de substituintes presentes (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). Na **Figura 16** estão destacados os grupos funcionais de um flavonóide apontados como fundamentais para sua atividade antioxidante: presença do grupo orto-dihidroxi ou grupos catecol no anel B; dupla ligação (C2-C3) conjugada com a função 4-oxo, que aumenta a deslocalização eletrônica a partir do anel B; e grupos hidroxilas na posição 3 e 5 com função oxo, que promove a deslocalização eletrônica do grupo 4-oxo para estes dois substituintes (HAENEN et al., 2006; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; LIEN et al., 1999; SOBRATTEE et al., 2005).

O número e configuração dos grupos hidroxila doadores de hidrogênio exercem influência marcante na capacidade antioxidante dos compostos fenólicos (CAO; SOFIC; PRIOR, 1997; SHEKHER-PANNALA et al., 2001). Estudos demonstraram que a configuração contendo duas hidroxilas no anel B (3',4'-catecol) é a mais significativa para sequestro das espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RSN). Estes grupos doam um H e um elétron para os radicais reativos como o hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), peroxila ( $\text{RO}_2\cdot$ ) e peroxinitrila ( $\text{ONOO}\cdot$ ), estabilizando-os e dando origem a um radical do flavonóide (orto-semiquinona, por exemplo) relativamente estável. A importância da configuração das outras hidroxilas não está muito clara, mas estudos revelam que moléculas com mais grupos hidroxilas podem apresentar maior capacidade antioxidante (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).



**Figura 16.** Características estruturais básicas de um flavonóide com propriedades bioativas. I, estrutura 3',4'-catecol; II, dupla ligação (C2-C3) conjugada com a função 4-oxo; III, grupos hidroxilas na posição 3 e 5 com função oxo.

A quercetina é considerada um dos compostos com maior atividade antioxidante. Dentre os flavonóis agliconas é possível estabelecer a seguinte ordem decrescente de atividade antioxidante: quercetina (2 x OH), miricetina (3 x OH) e kaempferol (1 x OH), que se diferenciam pelo padrão de substituição do anel B. Nota-se que a presença do terceiro grupo hidroxila no anel aromático B, na posição C-5', não resultou em aumento da capacidade antioxidante da miricetina em relação a quercetina (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; SOOBRAATTEE et al., 2005). Tanto quanto as hidroxilas, a presença de grupos metoxila e de açúcares na molécula influencia na capacidade antioxidante dos compostos fenólicos. Embora a taxa de substituição das hidroxilas por metoxilas não esteja clara, alguns resultados sugerem que a introdução de grupos metila na molécula pode diminuir a sua capacidade antioxidante como reflexo de um efeito estérico que perturba a planaridade da molécula e altera a sua solubilidade (ARORA; NAIR; STRASBURG, 1998; BURDA; OLESZEK, 2001). Como exemplo pode-se citar a quercetina que é um potente sequestrador do radical peroxila, seguido decrescentemente pelos derivados *o*-metilados (DUDAS et al., 2000).

A *o*-glicosilação também interfere na coplanaridade do anel B com o restante da estrutura do composto, bem como interfere na solubilidade da molécula. De maneira geral, as agliconas são antioxidantes mais potentes que seus correspondentes glicosídeos (GAO et al., 1999). Alguns autores relataram que a capacidade antioxidante destes compostos pode melhorar quando interagem com alguns compostos fenólicos glicosilados ou não, tal como



ocorre entre miricetina e quercetina-3-glicosídeo e entre cianidina-3-glicosídeo e quercetina-3-glicosídeo, demonstrando efeito sinérgico (HIDALGO; SANCHEZ-MORENO; PASCUAL-TERESA, 2010; RIVERO-PÉREZ; MUÑIZ; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, 2008).

Deve-se ressaltar que a hidrólise e absorção dos derivados glicosilados, bem como a localização e estrutura do açúcar a ser hidrolisado pelas bactérias entéricas influenciam marcadamente na sua efetiva capacidade antioxidante (HOLLMAN et al., 1999). Em adição, outros parâmetros fisiológicos relevantes devem ser levados em consideração para verificar a influência da *o*-metilação e da *o*-glicosilação na capacidade antioxidante dos compostos fenólicos, tais como, lipofilicidade e método de avaliação da capacidade antioxidante (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

Estudos comparando diferentes compostos mostraram que a ausência de uma das características estruturais apontadas na **Figura 16** não impossibilita os compostos de apresentarem atividade antioxidante (BORS et al., 1990; JANEIRO; BRETT, 2004), porém, os tornam antioxidantes menos potentes que os compostos com estrutura compatível com a descrita como ideal (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Como exemplo, pode-se citar a catequina, que embora apresente o mesmo número de grupos hidroxilas na molécula que a quercetina, apresenta capacidade antioxidante significativamente menor. Isto se deve ao fato da estrutura da catequina apresentar ausência de ligações insaturadas na posição C2-C3 em conjugação com a função oxo (-C=O) no anel C, que comparativamente proporciona a quercetina uma maior atividade antioxidante. Com a adição de um grupo hidroxila no anel B da molécula de catequina, este composto passa a denominar-se epigalocatequina e com esta nova estrutura há um aumento na sua atividade antioxidante, porém não equivalente à quercetina (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Em contrapartida, a antocianina derivada da aglicona cianidina que também não apresenta a função oxo (-C=O) no anel C, mas conta com três duplas ligações que podem fazer conjugação, apresenta atividade antioxidante muito próxima a da quercetina (MAMEDE; PASTORE, 2004; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). De acordo com Vennat et al. (1994), o aumento do grau de polimerização da molécula pode aumentar a eficácia dos compostos contra diversas espécies de radicais livres, tal como ocorre para as procianidinas.

Em relação aos compostos não flavonóides, em particular os ácidos fenólicos, é possível observar que os ácidos hidroxicinâmicos são mais efetivos antioxidantes que os ácidos hidroxibenzóicos. Isto se deve à conjugação das duplas ligações do anel com o grupo -CH=CH-COOH da estrutura do ácido cinâmico, que promove o aumento da capacidade de



estabilizar radicais livres. No entanto, deve-se ressaltar que o ácido gálico apresenta atividade antioxidante maior do que a catequina, que conta com cinco grupos hidroxilas em sua estrutura (MAMEDE; PASTORE, 2004; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Atualmente, os mecanismos de ação do resveratrol não estão totalmente esclarecidos, embora haja uma ampla gama de atividades bioquímicas descritas (ATHAR et al., 2007; LASTRA; VILLEGAS, 2007). Segundo Caruso et al. (2004), o grupo 4'-OH da molécula tem grande importância estrutural para a atividade biológica do resveratrol, uma vez que resulta em uma acidez mais alta quando comparada aos outros dois grupos *m*-OH e, por conseguinte, propicia maior transferência de prótons ou átomos de hidrogênio para as espécies reativas. No entanto, deve-se ressaltar que alguns estudos utilizaram o resveratrol na forma pura e em quantidades que infelizmente não são possíveis de obter via alimentação. Uma hipótese para melhorar a eficácia das respostas obtidas *in vivo* seria disponibilizar o produto puro em doses maiores que as normalmente presentes nas fontes naturais. Esta prática deve, porém, ser utilizada com cautela devido aos possíveis efeitos tóxicos (BAUR; SINCLAIR, 2006).

Neste contexto, o desenvolvimento de produtos análogos com melhor biodisponibilidade ou a busca por novos compostos que imitem o efeito do resveratrol, bem como de outros compostos bioativos, tornam-se cada vez mais importantes (BAUR; SINCLAIR, 2006; XIA et al., 2010).

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Há estudos científicos que apontam que as uvas e alguns produtos derivados apresentam uma complexa composição fenólica, incluindo desde os flavonóides como as antocianinas até os não flavanóides como o resveratrol e inúmeras outras moléculas de solubilidades e estruturas diferenciadas, que podem auxiliar no combate a diferentes agentes oxidantes gerados *in vivo*, proporcionando benefícios à saúde. Entretanto, ainda é necessário avançar o entendimento sobre a absorção e metabolismo dos compostos fenólicos cruzando as informações com as variantes estruturais, tais como a estrutura básica, grau de glicosilação e acilação, conjugação com outros grupamentos fenólicos, tamanho molecular, grau de polimerização, solubilidade, ação sinérgica e antagônica com outros compostos. A partir deste patamar de conhecimentos já estabelecido, e principalmente por tratar-se de uma área extraordinariamente multidisciplinar, mais avanços científicos dependem da integração de muitas áreas correlatas, particularmente da química, bioquímica e ciência de alimentos,

cruzando de forma coordenada as informações obtidas, no sentido de elucidar definitivamente o papel destes compostos na promoção da saúde.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, L. T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 394-400, abr./jun. 2007.

ADRIAN, M. et al. Resveratrol oxidation in *Botrytis cinerea* conidia. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, n. 5, p. 472-476, May. 1998.

AMIRA-GUEBAILIA, H. et al. Centrifugal partition chromatography followed by HPLC for the isolation of cis-e-viniferin, a resveratrol dimer newly extracted from a red Algerian wine. **Food Chemistry**, London, v. 113, n. 1, p. 320-324, Mar. 2009.

ANDERSEN, O. M.; JORDHEIM, M. The anthocyanins. In: ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. (Ed.). **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 452-471.

ARORA, A.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 24, n. 9, p. 1355-1363, June 1998.

AROZARENA, I. et al. Differentiation of some Spanish wines according to variety and region based on their anthocyanin composition. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 212, n. 1, p. 108-112, Dec. 2000.

ATHAR, M. et al. Resveratrol: a review of pre-clinical studies for human cancer prevention. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 224, n. 3, p. 274-283, Nov. 2007.

BADERSCHNEIDER, B.; WINTERHALTER, P. Isolation and characterization of novel stilbene derivatives from Riesling wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 7, p. 2681-2686, June 2000.

BARBOSA, M. Aumenta fatia do vinho nacional no mercado. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 26 abr. 2010. Caderno Mercado. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/folha/dinheiro/ult91u725978.shtml>>. Acesso em: 17 jan. 2011.

BATE-SMITH, E. C. Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. **Phytochemistry**, New York, v. 12, n. 4, p. 907-912, Apr. 1973.

BAUBLIS, A.; SPOMER, A.; BERBER-JIMENEZ, M. D. Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, n. 6, p. 1219-1221, Nov. 1995.

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potencial of resveratrol: the *in vivo* evidence. **Nature Reviews**, London, v. 5, n. 6, p. 493-506, June 2006.

BAVARESCO, L. et al. Effect of cluster stems on resveratrol content in wine. **Italian Journal of Food Science**, Pinerolo, v. 12, n. 1, p. 103-108, 2000.

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, Mar. 2002.

BERENTE, B. et al. Method development for the determination of anthocyanins in red wines by high-performance liquid chromatography and classification of German wines by means of multivariate methods. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 871, n. 1/2, p. 95-103, Feb. 2000.

BORS, W. et al. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, p. 343-355, Nov. 1990.

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

\_\_\_\_\_. et al. Teoría y práctica de la elaboración del vino. In: \_\_\_\_\_. **Viticultura para elaboradores de vino**. Zaragoza: Acribia, 1995. p. 15-65.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 1, de 7 de janeiro de 2000. Aprova os regulamentos técnicos para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpas e sucos de frutas. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, n. 6, 2000. Seção I, p. 54-58.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988. Aprova norma referente à “complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho”. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 31 out. 1988. Seção I, p. 20948. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>>. Acesso em: 05 ago. 2008.

\_\_\_\_\_. Decreto nº 2314, de 04 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei n. 8.918 de 14 de julho de 1994 que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 05 set. 1997. Disponível em: <<http://www.e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct>>. Acesso em: 05 ago. 2008.

BRAVO, A. E. Resveratrol in wine: contribution to potential cardiovascular protective activity. **Alimentaria**, Madrid, n. 269, p. 71-72, 1996.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.). **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982. p. 1-40.

BURDA, S.; OLEZSEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 6, p. 2774-2779, May 2001.

CAMARGO, U. A. Impacto das cultivares brasileiras de uva no mercado interno e potencial no mercado internacional. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 12., 2003, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. p. 37-42. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/anais/cbve12/38-43.pdf>>. Acesso em: 12 ago. 2008.

CANTOS, E. et al. Postharvest induction modeling method using UV irradiation pulses for obtaining resveratrol-enriched table grapes: a new “functional” fruit? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 10, p. 5052-5058, Oct. 2001.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure–activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 22, n. 5, p. 749-760, Mar. 1997.

CARREÑO, J.; MARTÍNEZ, A. Proposal of an index for objective evaluation of the color of red table grapes. **Food Research International**, Barking, v. 28, n. 4, p. 373-377, Feb. 1995.

CARUSO, F. et al. Structural basis for antioxidant activity of *trans*-resveratrol: ab initio calculations and crystal and molecular structure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 24, p. 7279-7285, Nov. 2004.

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

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, n. 3, p. 992-1002, Feb. 2007.

\_\_\_\_\_. et al. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* white grape cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 23, n. 7, p. 699-705, Nov. 2010a.

\_\_\_\_\_. 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, n. 1, p. 209-219, Jan. 2009a.

\_\_\_\_\_. 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, n. 17, p. 7883-7891, Sept. 2009b.

\_\_\_\_\_. et al. Structure elucidation of peonidin 3,7-*O*- $\beta$ -diglucoside isolated from Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 24, p. 11105-11111, Sept. 2010b.

CATALUÑA, E. **As uvas e os vinhos**. Rio de Janeiro: Globo, 1998. 203 p. (Coleção do Agricultor).

CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J. N. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 46, n. 4, p. 463-468, Dec. 1995.

CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M.; SARNI-MANCHADO, P. Los compuestos fenólicos. In: FLANZY, C. (Coord.). **Enología: fundamentos científicos y tecnológicos**. Madrid: AMV Ediciones, 2003. p. 120-121.

CRESPO, P. et al. Characterisation of major taste and health-related compounds of four strawberry genotypes grown at different Swiss production sites. **Food Chemistry**, London, v. 122, n. 1, p. 16-24, Sept. 2010.

DALLAS, C.; RICARDO-DA-SILVA, J. M.; LAUREANO, O. Interactions of oligomeric procyanidins in model wine solutions containing malvidin-3-glucoside and acetaldehyde. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 70, n. 4, p. 493-500, Apr. 1996a.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Products formed in model wine solutions involving anthocyanins, procyanidin B2 and acetaldehyde. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 8, p. 2402-2407, Aug. 1996b.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains - characteristics, biosynthesis, processing and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 40, n. 3, p. 173-289, May 2000.

\_\_\_\_\_; PAREDES-LOPEZ, O. **Natural colorants for food and nutraceutical uses**. Boca Raton: CRC Press, 2003.

DIAS, L. et al. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. **Food Microbiology**, London, v. 20, n. 4, p. 377-384, Aug. 2003.

DREOSTI, I. E. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. **Nutrition**, New York, v. 16, n. 7/8, p. 7-8, Jul./Aug. 2000.

DUDAS, A. J. et al. Evaluation of the total peroxy radical scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63, n. 3, p. 327-331, Mar. 2000.

DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. **Separation and characterization of anthocyanins by HPLC**. Disponível em: <<http://www.nshtvn.org/ebook/molbio/Current%20Protocols/CFAPC/faf0103.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2010.

EDLIN, D. et al. Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalus*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 22, n. 4, p. 232-239, Mar. 1998.

ESPÍN, J. C.; GARCÍA-CONESA, M. T.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Nutraceuticals: facts and fiction. **Phytochemistry**, New York, v. 68, n. 22/24, p. 2986-3008, Nov./Dec. 2007.

FLANZY, C. **Enología: fundamentos científicos y tecnológicos**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 2000. 783 p.

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

FREITAS, T. **Mercado de espumante atrai investimento**. Disponível em: <<http://www.blogdojeriel.com.br/2011/03/07/folha-de-s-paulo-mercado-de-espumante-atrui-investimento/>>. Acesso em: 23 mar. 2011.

FREITAS, V.; MATEUS, N. Chemical transformations of anthocyanins yielding a variety of colours: review. **Environmental Chemistry Letters**, Berlin, v. 4, n. 3, p. 175-183, Aug. 2006.

GAO, Z. et al. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 472, n. 3, p. 643-650, Nov. 1999.

GARCÍA-BENEYTEZ, E.; REVILLA, E.; CABELLO, F. Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 215, n. 1, p. 32-37, July 2002.

GOMES, D. **Efeito da vibração na qualidade da uva ‘Niágara Rosada’**. 2006. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

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, June 2008.

GONZÁLEZ-BARRIO, R. et al. Comparison of ozone and UV-C treatments on the postharvest stilbenoid monomer, dimer, and trimer induction in var. ‘Superior’ white table grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 12, p. 4222-4228, May 2006.

GUERRA, C. C. et al. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2009. 69 p. (Documentos, 48)

GUERRERO, R. F. et al. Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. **Food Chemistry**, London, v. 12, n. 4, p. 949-955, Feb. 2009.

HAENEN, G. R. M. M. et al. Structure and activity in assessing antioxidant activity *in vitro* and *in vivo*. A critical appraisal illustrated with the flavonoids. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 21, n. 2, p. 191-198, Feb. 2006.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Anthocyanins and other flavonoids. **Natural Product Reports**, London, v. 12, n. 4, p. 639-657, Aug. 1995.

HASLAM, E. In vino veritas: oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. **Phytochemistry**, New York, v. 19, n. 12, p. 2577-2582, May 1980.



\_\_\_\_\_. Polyphenols-proteins interactions. **Biochemical Journal**, London, v. 139, n. 1, p. 286-288, 1974.

\_\_\_\_\_; LILLEY, T. Natural astringency in foodstuffs: a molecular interpretation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 27, n. 1, p. 1-41, 1988.

HE, S. et al. Neuroprotective effect of parthenocissin A, a natural antioxidant and free radical scavenger, in focal cerebral ischemia of rats. **Phytotherapy Research**, London, v. 24, n. 1, p. S63-S70, Jan. 2010. Supplement.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 13, n. 10, p. 572-584, Oct. 2002.

HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; GARCÍA-ROMERO, E. Anthocyanins of red wine grape cultivars grown in the Spanish region of La Mancha: characteristic cultivar patterns of grapes and single cultivar wines, and evolution during the ripening of the berry. **Alimentaria**, Madrid, n. 352, p. 127-139, 2004.

\_\_\_\_\_; LORENZO, E. S.; ESPINOSA, A. V. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. **Food Chemistry**, London, v. 92, n. 2, p. 269-283, Sept. 2005.

HERTOG, M. et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. **The Lancet**, Minneapolis, v. 342, n. 23, p. 1007-1011, Oct. 1993.

HIDALGO, M.; SANCHEZ-MORENO, C.; PASCUAL-TERESA, S. Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. **Food Chemistry**, London, v. 121, n. 3, p. 691-696, Aug. 2010.

HOFFMANN-RIBANI, R.; HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 22, n. 4, p. 263-268, June 2009.

HOLLMAN, P. C. H.; ARTS, I. C. W. Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, n. 7, p. 1081-1093, May 2000.

\_\_\_\_\_. et al. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. **Free Radical Research**, London, v. 31, n. 6, p. 569-573, Dec. 1999.

HRAZDINA, G. Anthocyanin composition of Concord grapes. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 8, n. 3 p. 111-113, 1975.

HUBER, L. S. **Flavonóides: identificação de fontes brasileiras e investigação dos fatores responsáveis pelas variações na composição**. 2007. 128 f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE VINHO (IBRAVIN). **Produção brasileira de vinhos e suco de uva é destaque em Paris**. 2010. Disponível em:

<[http://www.grapejuiceofbrazil.com/interna\\_noticia.php?id=47](http://www.grapejuiceofbrazil.com/interna_noticia.php?id=47)>. Acesso em: 28 jun. 2010.

JACKSON, R. S. **Wine Science: principles and applications**. San Diego: Academic Press, 1994. 475 p.

JANEIRO, P.; BRETT, A. M. O. Catechin electrochemical oxidation mechanisms. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 518, n. 1/2, p. 109-115, Aug. 2004.

JEFFERY, D.W.; PARKER, M.; SMITH, P. A. Flavonol composition of Australian red and white wines determined by high-performance liquid chromatography. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 14, n. 3, p. 153-161, Nov. 2008.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 153-161, Feb. 2002.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Antioxidants in fruits and vegetables – the millenium’s health. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 36, n. 7, p. 703-725, Oct. 2001.

KENNEDY, J. A. Grape and wine phenolics: observations and recent findings. **Ciencia e Investigación Agrária**, Santiago de Chile, v. 35, n. 2, p. 107-120, May/Aug. 2008.

KIRALP, S.; TOPPARE, L. Polyphenol content in selected Turkish wines, an alternative method of detection of phenolics. **Process Biochemistry**, London, v. 41, n. 1, p. 236-239, Jan. 2006.

KUHNAU, J. The flavonoids, a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. **World Review of Nutrition and Dietetics**, Basel, v. 24, p. 117-191, 1976.

KUNTZ, S.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 38, n. 3, p. 133-142, June 1999.

LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. et al. Direct HPLC analysis of *cis*- and *trans*-resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 2, p. 281-283, Feb. 1995.

LASTRA, C. A.; VILLEGAS, I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 35, pt. 5, p. 1156-1160, 2007.

LECAS, M.; BRILLOUET, J. M. Cell wall composition of grape berry skins. **Phytochemistry**, New York, v. 35, n. 5, p. 1241-1243, Nov. 1994.

LIANG, Z. et al. Anthocyanin composition and content in grape berry skin in *Vitis* germplasm. **Food Chemistry**, London, v. 111, n. 4, p. 837-844, Dec. 2008.



- LIEN, E. J. et al. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, n. 3/4, p. 285-294, Feb. 1999.
- MAIA, G. A. et al. **Processamento de frutas tropicais: nutrição, produtos e controle de qualidade**. Fortaleza: Editora UFC, 2009. 277 p.
- MAKRIS, D. P.; KALLITHRAKAB, S.; KEFALAS, P. Flavonols in grapes, grape products and wines: burden, profile and influential parameters. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 5, p. 396-404, Aug. 2006.
- MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em sucos de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 659-664, out./dez. 2005.
- MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 233-252, dez. 2004.
- MARZAROTTO, V. Suco de uva. In: Venturini, W. G. F. (Org.) **Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. p. 311-346.
- MATTIVI, F.; RENIERO, F.; KORHAMMER, S. Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 7, p. 1820-1823, July 1995.
- \_\_\_\_\_. et al. Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 20, p. 7692-7702, Sept. 2006.
- MAZZA, G.; MINIATI, E. **Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains**. Boca Raton: CRC Press, 1993.
- MIKSICEK, R. J. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 208, n. 1, p. 44-50, Jan. 1995.
- 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, Mar. 2005.
- MORENO-LABANDA, J. F. et al. Determination of piceid and resveratrol in Spanish wines deriving from monastrell (*Vitis vinifera* L.) grape variety. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 17, p. 5396-5403, Aug. 2004.
- MOSKOWITZ, A. H.; HRAZDINA, G. Vacuolar contents of fruit subepidermal cells from *Vitis* species. **Plant Physiology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 686-692, Sept. 1981.
- NIXDORF, S. L.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: phenolic composition and antioxidant capacity. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 659, n. 1/2, p. 208-215, Feb. 2010.

PASTRANA-BONILLA, E. et al. Phenolic content and antioxidant capacity of Muscadine grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 18, p. 5497-5503, Aug. 2003.

PERES, R. G. **Aplicação de CE-DAD e HPLC-DAD-ESI/MS na determinação de compostos fenólicos, metilxantinas e ácidos orgânicos em bebidas**. 2007. 201 f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2007.

PINELO, M.; ARNOUS, A.; MEYER, A. S. Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 17, n. 11, p. 579-590, Nov. 2006.

POMAR, F.; NOVO, M.; MASA, A. Varietal differences among the anthocyanin profile of 50 red table grape cultivars studied by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1094, n. 1/2, p. 34-41, Nov. 2005.

PORTER, L. J. Structure and chemical properties of the condensed tannins. In: \_\_\_\_\_. **Plant polyphenols: synthesis, properties, significance**. New York: Plenum Press, 1992. p. 245-258.

POURCEL, L. et al. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 29-36, Jan. 2007.

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, June 1995.

PRIEUR, C. et al. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. **Phytochemistry**, New York, v. 36, n. 3, p. 781-784, June 1994.

PRIOR, R. L.; CAO, G. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implication. **HortScience**, Alexandria, v. 35, n. 4, p. 588-592, 2000.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A.; MELO, L. M. R. **A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas**. 2008. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura>>. Acesso em: 20 out. 2009.

PÜSSA, T. et al. Survey of grapevine *Vitis vinifera* stem polyphenols by liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 20, p. 7488-7494, Sept. 2006.

RENTZSCH, M.; SCHWARZ, M.; WINTERHALTER, P. Pyranoanthocyanins: an overview on structures, occurrence and pathways of formation. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 18, n. 10, p. 526-534, Oct. 2007.

\_\_\_\_\_. et al. Survey on the content of vitisin A and hydroxyphenyl-pyranoanthocyanins in Tempranillo wines. **Food Chemistry**, London, v. 119, n. 4, p. 1426-1434, Nov. 2010.

RIBÉREAU-GAYON, J. et al. **Tratado de enología: química del vino, estabilización y tratamientos**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 2003. v. 2.

- 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, Sept. 1991.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science Reviews**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 152-159, Apr. 1997. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.
- RITCHEY, J. G.; WATERHOUSE, A. L. A standart red wine: monomeric phenolic analysis of commercial Cabernet Sauvignon wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 50, n. 1, p. 91-100, Mar. 1999.
- RIVERO-PÉREZ, M. D.; MUÑIZ, P.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L. Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 8, p. 2815-2822, Aug. 2008.
- RIZZON, L. A.; MANFROI, V.; MENEGUZZO, J. **Elaboração de suco de uva na propriedade vitícola**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1998. 24 p. (Documentos, 21).  
\_\_\_\_\_; MENEGUZZO, J. **Suco de uva**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. 45 p. (Agroindústria Familiar) Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/item/11888/2/00081370.pdf>>. Acesso em: 4 maio 2010.
- \_\_\_\_\_; MIELE, A. Características analíticas de sucos de uva elaborados no Rio Grande do Sul. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 129-133, jul. 1995.
- ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: a review. **Analyst**, London, v. 122, p. 11R-34R, Feb. 1997.
- RODRÍGUEZ-MONTEALEGRE, R. 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. 19, n. 6/7, p. 687-693, Sept./Nov. 2006.
- ROMERO-PÉREZ, A. I. et al. Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 4, p. 1533-1536, Apr. 1999.
- ROSSO, V. V. et al. Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC-PDA-MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 21, n. 4, p. 291-299, June 2008.
- SALAMEH, D. et al. Highlight on the problems generated by p-coumaric acid analysis in wine fermentations. **Food Chemistry**, London, v. 107, n. 4, p. 1661-1667, Apr. 2008.
- SANTIAGO, J. L. et al. Identification of and relationships among a number of teinturier grapevines that expanded across Europe in the early 20th century. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 14, n. 3, p. 223-229, Nov. 2008.

- SAUTTER, C. K. et al. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 437-442, jul./set. 2005.
- SCHROETER, H. et al. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. **Neurobiology of Aging**, New York, v. 23, n. 5, p. 861-880, Sept./Oct. 2002.
- SCHWARZ, M. et al. Effect of copigments and grape cultivar on the color of red wines fermented after the addition of copigments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 21, p. 8372-8381, Sept. 2005.
- SHEKHER-PANNALA, A.; et al. Flavonoids B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 282, n. 5, p. 1161-1168, Apr. 2001.
- SIEMANN, E. H.; CREASY, L. L. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 43, n. 1, p. 49-52, Mar. 1992.
- SILVA, L. et al. Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 430, n. 3, p. 405-408, July 1998.
- SINGLETON, V. L. In: HEMINGWAY, R. W.; LAKS, P. E. (Ed.). **Plant polyphenols-synthesis, properties and significance**. New York: Plenum Press, 1992. 1066 p.
- SOLEAS, G. J. et al. A derivatized gas chromatographic-mass spectrometric method for the analysis of both isomers of resveratrol in juice and wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 46, n. 3, p. 346-352, Sept. 1995a.
- \_\_\_\_\_. et al. Influences of viticultural and oenological factors on changes in cis- and trans-resveratrol in commercial wines. **Journal of Wine Research**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 107-121, 1995b.
- SOOBRAATTEE, M. A. et al. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 579, n. 1/2, p. 200-213, Nov. 2005.
- SOUQUET, J. et al. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. **Phytochemistry**, New York, v. 43, n. 2, p. 509-512, Sept. 1996.
- SPENCER, J. P. et al. Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms *in vivo*. **Antioxidants & Redox Signaling**, New York, v. 3, n. 6, p. 1023-1039, Dec. 2001.
- STAPLETON, P. A. et al. Obesity and vascular dysfunction. **Pathophysiology**, Amsterdam, v. 15, n. 2, p. 79-89, Aug. 2008.
- STIVALA, L. A. et al. Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 25, p. 22586-22594, June 2001.

TALCOTT, S. T.; LEE, J. H. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of Muscadine wine and juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 11, p. 3186-3192, May 2002.

TERÃO, J.; PISKULA, M. K. Flavonoids and membrane lipid peroxidation inhibition. **Nutrition**, New York, v. 15, n. 10, p. 790-791, Oct. 1999.

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.

THE WORLD HEALTH REPORT. **Reducing risks and promoting healthy life**. Geneva: World Health Organization, 2002.

VENNAT, B. et al. Procyanidins from tormentil: fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 17, n. 12, p. 1613-1615, Dec. 1994.

VITRAC, X. et al. Polyphenols newly extracted in red wine from Southwestern France by centrifugal partition chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 12, p. 5934-5928, Nov. 2001.

VRHOVSEK, U.; WENDELIN, S.; EDER, R. Effects of various vinification techniques on the concentration of *cis*- and *trans*-resveratrol and resveratrol glucoside isomers in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 48, n. 2, p. 214-219, June 1997.

XIA, E. et al. Biological activities of polyphenols from grapes. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 11, n. 2, p. 622-646, Feb. 2010.

WAFFO-TÉGUO, P. et al. Potential cancer-chemopreventive activities of wine stilbenoids and flavans extracted from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures. **Nutrition and Cancer**, London, v. 40, n. 2, p. 173-179, 2001.

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

WENZEL, U. et al. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. **Cancer Research**, Baltimore, v. 60, n. 14, p. 3823-3831, July 2000.

YASUI, Y. et al. Changes in concentration of resveratrol during fermentation of musts from grapes grown in Tokachi. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 48, n. 1, p. 129, Mar. 1997.

## **CAPÍTULO 2**

### **COMPOSTOS FENÓLICOS EM UVAS E VINHOS: PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOQUÍMICAS E QUALIDADE TECNOLÓGICA (PARTE II)**

# COMPOSTOS FENÓLICOS EM UVAS E VINHOS: PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOQUÍMICAS E QUALIDADE TECNOLÓGICA (PARTE II)

Ellen Silva LAGO-VANZELA <sup>a</sup>, Eleni GOMES <sup>b</sup>; Isidro HERMOSÍN-GUTIÉRREZ<sup>c</sup>;  
Roberto DA-SILVA<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, <sup>b</sup>Departamento de Biologia;  
<sup>d</sup>Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.  
<sup>c</sup>Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada, Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola, Universidad de Castilla-La Mancha, 13071 Ciudad Real, Spain.

## RESUMO

Sucos de uvas e vinhos são considerados fontes importantes de compostos fenólicos da dieta humana e apresentam uma composição fenólica muito mais complexa que a encontrada nas uvas utilizadas para sua elaboração. As diferenças qualitativas e quantitativas observadas são decorrentes, em grande parte, de inúmeros processos oxidativos de origem química e bioquímica. Estes processos podem progressivamente diminuir o conteúdo de alguns constituintes fenólicos originais da uva em prol da formação de compostos poliméricos durante a evolução da cor dos sucos e, principalmente, vinhos. O artigo tem por objetivo apresentar uma discussão do estado da arte dos principais processos bioquímicos e químicos de uvas e produtos derivados. O conhecimento destas transformações é de indubitável importância para o controle de qualidade dos produtos e desenvolvimento deste setor.

## ABSTRACT

Grape juices and wines are considered important sources of phenolic compounds in the human diet, and have a phenolic composition that is more complex than that which is found in the grapes used for their preparation. The qualitative and quantitative differences found are largely due to numerous chemical and biochemical oxidative processes. These processes can progressively lower some original phenolic constituents of grapes in order to form polymeric compounds during the evolution of color of juices and especially wines. This article discusses the main chemical and biochemical processes of grapes and their derivatives. Knowledge of these transformations is vital to the quality control of these products and to the development of this sector.



## 1. INTRODUÇÃO

A importância econômica gerada pela comercialização de uvas, sucos e vinhos no país é notória. O avanço do conhecimento das técnicas de processamento associado ao atendimento das demandas de mercado por novos produtos que agreguem às características nutricionais básicas, com fatores de benefícios à saúde, contribui para o crescimento deste setor. Dentre os compostos bioativos de destaque nas uvas e seus derivados estão os flavonóides, compostos fenólicos sintetizados pelas plantas. Considerável número de estudos *in vivo* e, principalmente, *in vitro* tem mostrado a potencialidade destes compostos em promover a saúde devido à capacidade de sequestrar radicais livres, quelar metais com atividade redox e atenuar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, associadas com patologias crônicas e degenerativas. Entretanto, a mesma estrutura química que propicia a estes compostos sua alta atividade como agente antioxidante também os tornam suscetíveis a processos oxidativos durante a cadeia produtiva e processamento da fruta.

Processos oxidativos de origem enzimática podem levar a perda da cor, aroma e valor nutricional das uvas e dos produtos derivados. Por outro lado, a adição de preparações enzimáticas específicas em etapas-chaves do processo industrial desempenha um papel fundamental na melhoria da qualidade dos produtos. O entendimento dos principais processos químicos e bioquímicos que ocorrem na uva e podem afetar positiva ou negativamente estes compostos e, conseqüentemente, a qualidade organoléptica e nutricional dos produtos torna-se necessário. Em outra vertente, inúmeros processos oxidativos de origem química podem levar à progressiva diminuição de alguns constituintes fenólicos originais da uva em prol da formação de compostos poliméricos durante a evolução da cor dos sucos e, principalmente, vinhos. O conhecimento destas transformações é de indubitável importância para o controle de qualidade e desenvolvimento deste setor.

Desta maneira, o artigo tem por objetivo apresentar uma discussão do estado da arte dos principais processos bioquímicos e químicos de uvas e produtos derivados.

## 2. OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NAS UVAS *IN NATURA*

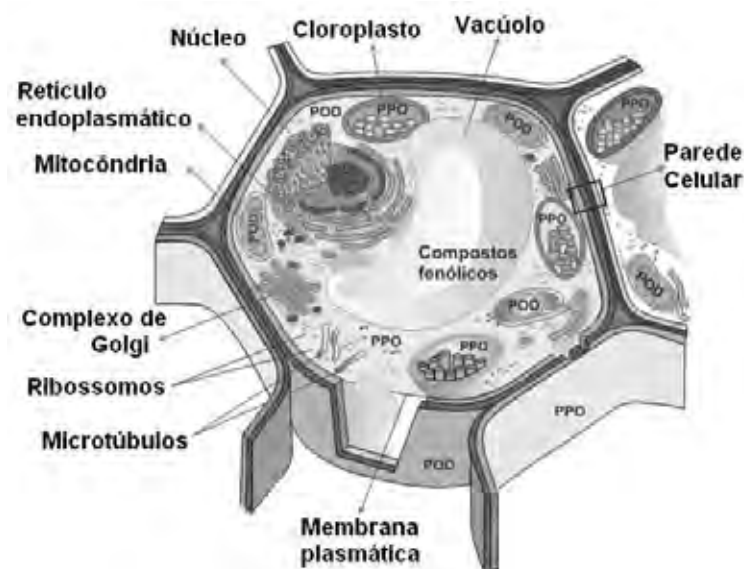
O fenômeno de oxidação enzimática, mais conhecido como escurecimento enzimático, está entre os principais problemas de conservação pós-colheita das uvas, uma vez que acarreta



alterações nas características de cor, diminuição da qualidade nutritiva e, por conseguinte, em perdas econômicas consideráveis (LIMA et al., 2002).

A enzima de maior relevância para catálise destes processos oxidativos nas uvas é a polifenol oxidase (PPO, EC 1.14.18.1) (LI; GUO; WANG, 2008; TOIVONEN; BRUMMELL, 2008). Investigações para determinar as características bioquímicas das PPO de uvas e as condições em que são mais ativas têm sido conduzidas principalmente com as enzimas da espécie *Vitis vinifera* (NÚÑEZ-DELICADO et al., 2007; RAPEANU et al., 2006; UNAL; SENER, 2006; UNAL; SENER; SEN, 2007; WEEMAES et al., 1998; YILMAZ; SAKIROGLU; KÜFREVIÖGLU, 2003). Limitados trabalhos têm sido conduzidos com outras espécies, tais como as uvas híbridas *DeChaunac* (LEE; PENNESI; SMITH, 1983) e a uva apirênica *Crimson Seedless* (FORTEA et al., 2009). Outra enzima da classe das oxirredutases também bem conhecida devido ao envolvimento nas reações de escurecimento enzimático de frutas e vegetais, porém, com menor importância nas uvas é a peroxidase (POD) (FORTEA et al., 2009; LIMA et al., 2002).

O mecanismo bioquímico inicia-se com a quebra da integridade física da baga da uva ocasionada por danos sofridos durante a colheita e transporte ou durante o processamento da fruta na forma de suco e vinho (TOIVONEN; BRUMMELL, 2008). Nesta situação, há a descompartimentação das organelas das células do tecido vegetal, promovendo a liberação dos compostos fenólicos, presentes no vacúolo, juntamente com as PPO, predominantemente encontradas nos plastídeos (Figura 1).



**Figura 1.** Localização dos compostos fenólicos e das enzimas oxidativas (PPO e POD) em uma típica célula de planta.

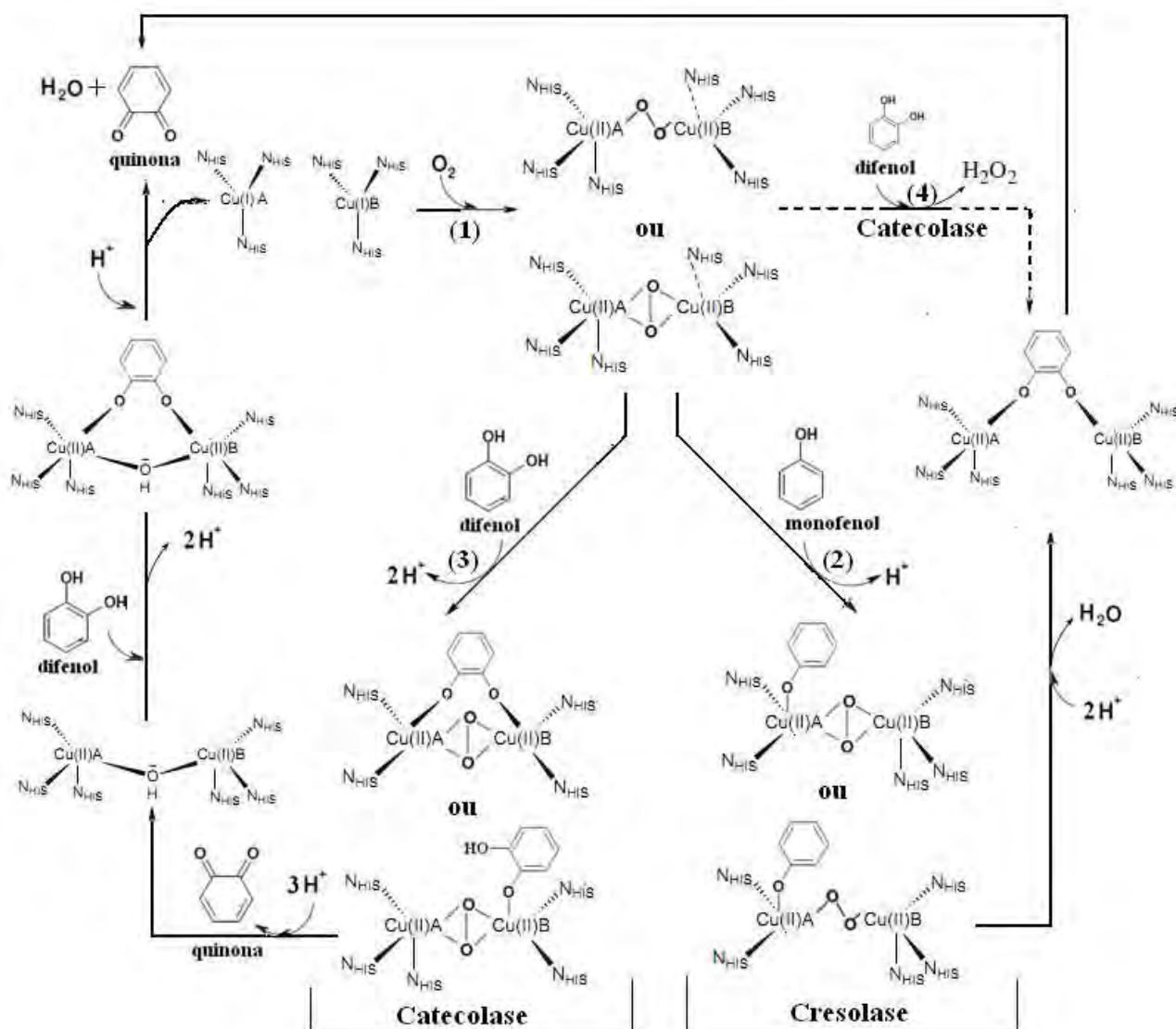
Este contato direto entre os compostos fenólicos (substratos) e as proteínas (enzimas) desencadeiam inúmeras reações na presença de oxigênio molecular ( $O_2$ ), com conseqüente formação de polímeros de coloração escura (OREN-SHAMIR, 2009; TOIVONEN; BRUMMELL, 2008).

A *polifenol oxidase* (PPO) é um termo genérico frequentemente utilizado na literatura para representar três diferentes enzimas: lacase (EC 1.10.3.1), catecolase (EC 1.10.3.2) e cresolase (EC 1.14.18.1, de origem vegetal), sendo as duas últimas também conhecidas, quando atuando em conjunto, como tironase (POURCEL et al., 2007). Há uma certa confusão na nomenclatura destas enzimas e é comum a divergência entre autores quanto à terminologia correta a ser usada (ANISZEWSKI; LIEBEREI; GULEWICZ, 2008; KLABUNDE et al., 1998; LI; GUO; WANG, 2008). Esta variabilidade com respeito à nomenclatura deve-se, em grande parte, a mista ação catalítica deste grupo de enzimas, que podem utilizar diferenciados substratos (ANISZEWSKI; LIEBEREI; GULEWICZ, 2008). A atividade de catecolase é particularmente alta em frutas e vegetais contendo significativo conteúdo de compostos fenólicos (CANTOS et al., 2002), incluindo as uvas tintas (NÚÑEZ-DELICADO et al., 2007; RAPEANU et al., 2006). Especialmente em plantas, a maioria dos estudos sobre cresolase relatou sua ausência ou baixa atividade quando comparada as encontradas para catecolase (ESPÍN et al., 1995; SELINHEIMO et al., 2007). Já a lacase encontra-se presente nas frutas, em grande parte, devido a contaminações fúngicas (ANISZEWSKI; LIEBEREI; GULEWICZ, 2008).

A estrutura e o mecanismo de catálise da PPO já foi objetivo de muitas pesquisas (ANISZEWSKI; LIEBEREI; GULEWICZ, 2008; BORN et al., 2007; MUKHERJEE; MUKHERJEE, 2002; NOKTHAI et al., 2010; VIRADOR et al., 2010) devido a complexidade e peculiaridade das enzimas envolvidas. Embora não haja uma elucidação completa, o mecanismo de ação da catecolase e da cresolase segue basicamente o esquema ilustrado na **Figura 2**.

A catecolase e a cresolase são caracterizadas como metaloenzimas contendo como grupo prostético um centro cúprico dinuclear ( $Cu^{+2}$ ), acoplado antiferromagneticamente próximo ao sítio ativo. Os dois íons cobre são capazes de se ligar ao dióxigênio para formar um complexo dióxigênio-dicobre (II), cujos campos de ligação contêm resíduos de histidina (VIRADOR et al., 2010). Seguindo mecanismo ordenado, a PPO liga primeiramente ao oxigênio (**Figura 2**) e a mudança de valência dos íons cobre provoca a formação de complexo enzima-substrato (monofenol ou difenol). Dependendo da valência do íon cobre (Cu) e da ligação com o oxigênio molecular, o sítio ativo das tironases poderá existir em três estados

intermediários: deoxi (Cu I – Cu I), oxi (Cu II – O<sub>2</sub> – Cu II) e met (Cu II - Cu II) (BORN et al., 2007).



**Figura 2.** Mecanismo de catálise da catecolase e da cresolase.

Pode-se observar pela **Figura 2** que ambas as reações da PPO (catecolase e cresolase) utilizam-se do mesmo centro ativo para sua catálise, com a diferença que os monofenóis (substrato da cresolase) se ligam a um único dos dois íons Cu<sup>+</sup> presentes neste local. À medida que a enzima vai promovendo a oxidação de seus substratos, os átomos de Cu vão se reduzindo e transferindo seus elétrons, de forma que um dos sítios catalíticos sempre esteja pronto para promover a oxidação de um substrato, até a completa redução de todos os sítios e sua reoxidação formando água para retomar novamente o ciclo (ANISZEWSKI; LIEBEREI; GULEWICZ, 2008).

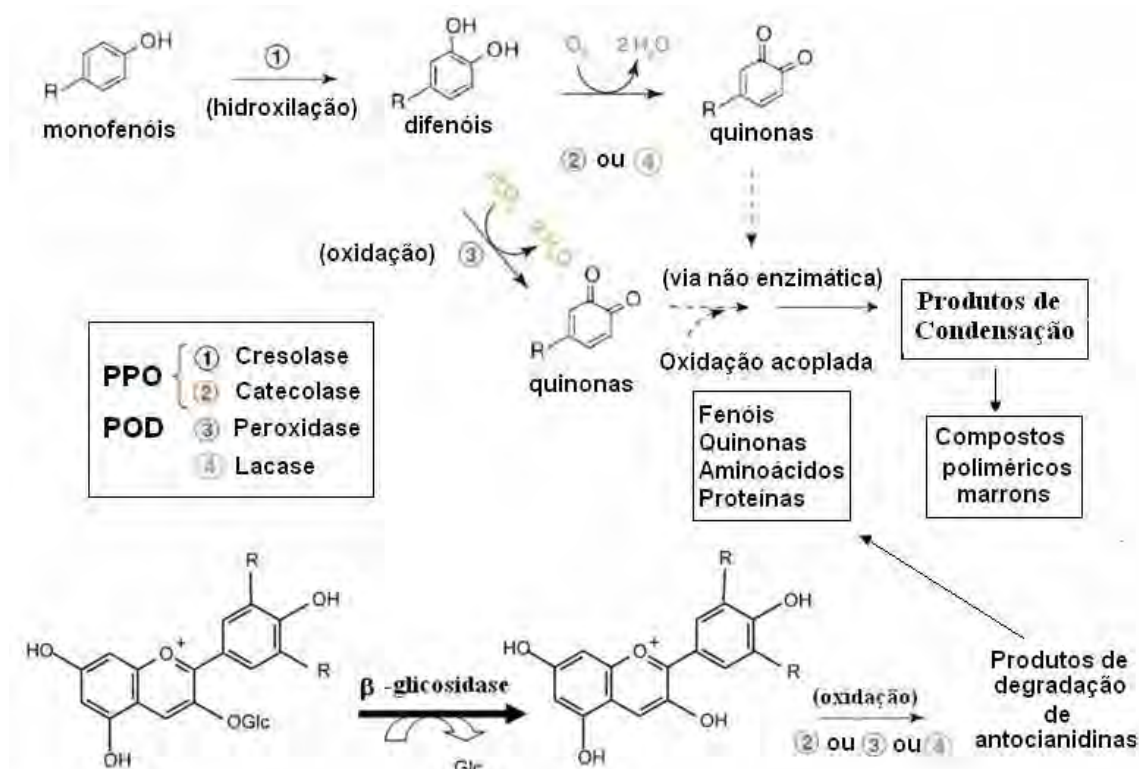
Embora o sítio ativo da enzima seja uma característica invariável, as PPO mostram uma variabilidade considerável quanto às sequências de aminoácidos (sequência primária), tamanho, glicosilação e cinética entre as espécies (VIRADOR et al., 2010). Alguns autores sugerem que a presença de múltiplas formas possa, em alguns casos, ser decorrente de artefatos gerados por liberação parcial das enzimas ligadas às membranas, por parcial desnaturação, proteólise ou fragmentação, bem como ativação de formas latentes (HAREL; MAYER; LEHMAN, 1973).

A propriedade de latência das PPO já foi relatada para algumas cultivares de uvas (FORTEA et al., 2009; NÚÑEZ-DELICADO et al., 2007). Dada à dificuldade de experimentos na própria fruta, a proposta de ativação destas enzimas é baseada na hipótese de que as propriedades de ativação *in vitro* são comparáveis àquelas de ativação *in vivo* (GANDÍA-HERRERO et al., 2005). Esta ativação é realizada principalmente por proteases (LAVEDA; et al, 2001) e por detergentes não-iônicos, aniônicos e catiônicos (FORTEA et al., 2009; LAVEDA et al., 2000; NÚÑEZ-DELICADO et al., 2007). O uso do agente ativador SDS (detergente iônico dodecil sulfato de sódio) é particularmente interessante devido a PPO ser ativada em concentrações de SDS para o qual a maioria das enzimas é desnaturada (NÚÑEZ-DELICADO et al., 2007).

A reação de cresolase catalisa a *o*-hidroxilação de monofenóis a *o*-difenois enquanto a reação da catecolase catalisa a desidrogenação de *o*-difenois a *o*-quinonas (**Figura 3**) (RAPEANU et al., 2006). Em alguns modelos de reação, descreve-se que o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) é liberado durante o processo de catálise da catecolase (**Figura 2**) (BORN et al., 2007), sendo posteriormente utilizado como co-substrato pela POD nos processos oxidativos (TOMÁS-BARBERÁN; ESPÍN, 2001). A ação da POD bem como da lacase serão discutidas oportunamente.

Diferentes PPO apresentam variados substratos específicos, sendo que os mais testados são *p*-cresol, tirosina e ácido *p*-cumárico para determinação de cresolase, e catecol, 4-metilcatecol, L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina), (-)-epicatequina, (+)-catequina, ácido clorogênico e dopamina para determinação de catecolase. Entretanto, a presença *in vivo* de vários dos substratos testados ainda não está demonstrada e a relevância dos mesmos no papel fisiológico ainda está incerta (ANISZEWSKI; LIEBEREI; GULEWICZ, 2008). O catecol e seus derivados estão entre os principais substratos fisiológicos utilizados para a determinação de catecolase, inclusive para a *Vitis vinifera* (UNAL; SENER, 2006; RAPEANU et al., 2006).

A PPO apresenta elevada afinidade pelos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos, especialmente de seus ésteres tartáricos, tais como ácido caftárico e em menor extensão o ácido cutárico, oxidando-os nas respectivas *o*-quinonas (CHEYNIER; BASIRE; RIGAUD, 1989; CHEYNIER et al., 1990; OSZMIANSKI; CHEYNIER; MOUTOUNET, 1996; RIGAUD et al., 1991). O ácido *p*-caftárico, por exemplo, após ser oxidado a ácido cafeiltartárico *o*-quinona, torna-se um potente oxidante capaz de oxidar espontaneamente outros componentes da uva, que não são substratos para a PPO, ocorrendo então a denominada oxidação acoplada. Metais, aminoácidos e proteínas, ao interagirem com as quinonas, tornam-se indisponíveis e, em consequência, a qualidade nutricional dos alimentos oxidados é prejudicada. Embora os compostos polimerizados resultantes destas reações sejam incolores, o aumento do grau de condensação destes compostos leva à formação de pigmentos poliméricos de coloração entre amarelo e marrom (melaninas) (**Figura 3**).



**Figura 3.** Mecanismo de oxidação enzimática dos flavonóides de uva (adaptada de POURCEL et al., 2007).

Os flavonóides *o*-difenois glicosilados (antocianinas e flavonóis) e procianidinas não estão usualmente envolvidos de forma direta nas reações catalisadas pela catecolase. Em contrapartida, estes compostos podem ser oxidados diretamente pela lacase ou pela



peroxidase (POURCEL et al., 2007). Além disso, os *o*-difenóis glicosilados podem ser hidrolisados por  $\beta$ -glicosidasas (EC, 3.2.1.21) para suas respectivas agliconas, que são substratos potenciais para outras enzimas como catecolase, peroxidase e/ou lacase, acelerando o processo de degradação dos compostos (**Figura 3**) (BARBAGALLO et al., 2007; OREN-SHAMIR, 2009).

As *lacases* são glicoproteínas dimérica ou tetramérica, que contêm quatro átomos de cobre por monômero, distribuídos em três sítios redox. Estas enzimas provenientes de fungos tal como o *Botrytis cinérea*, responsável pela podridão nobre, apresentam a capacidade de catalisar a oxidação, dentre outros, dos substratos *o*- e *p*-difenóis, na presença de oxigênio molecular (MAYER; STAPLES, 2002; RANOCHA et al., 1999). Alguns estudos demonstraram que os compostos *o*-substituídos (guaiacol, pirocatecol, ácido caféico, ácido gálico, etc...) são melhores substratos para esta enzima que os *p*-substituídos (*p*-cresol e hidroquinona) (LÓPEZ-NICOLAS; GARCÍA-CARMONA, 2010).

A *peroxidase* (POD) é estruturalmente caracterizada por um grupo prostético heme (ferroprotoporfirina III) e apresenta a capacidade de oxidar uma ampla faixa de compostos orgânicos na presença de peróxido de hidrogênio, promovendo um grande número de reações que culminam em perdas de aroma e valor nutricional das frutas *in natura* e processadas (KOBAYASHI et al., 1987). Embora Subramanian et al. (1999) e Fortea et al. (2009) tenham relatado que a concentração interna de peróxido de hidrogênio, bem como outros aceptores de elétrons, nas plantas é pequena, o que limita o espectro de ação da enzima em comparação a PPO, a POD pode atuar em sinergismo com a PPO, devido à geração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante a oxidação de compostos fenólicos em reações catalisadas por PPO (**Figura 3**).

A POD apresenta a característica marcante de termoestabilidade. Por esta razão, e também devido à sua facilidade de detecção, esta enzima é frequentemente utilizada como índice de efetividade do branqueamento de frutas e vegetais, para prevenir a perda de qualidade na estocagem. No entanto, caso não seja aplicado temperaturas suficientemente altas para inativação irreversível da POD, ela pode regenerar-se e encurtar a vida de prateleira de frutas e vegetais processados. A regeneração da atividade de peroxidase já foi relatada em uvas (CLEMENTE, 1998). Diante do exposto, pode-se observar que a oxidação dos compostos fenólicos depende não só do tipo de substrato, concentração e localização, como também das enzimas presentes no tecido vegetal, de enzimas exógenas (lacase fúngica) e do tipo de polímero formado a partir da quinona (POURCEL et al., 2007). A alta reatividade das

*o*-quinonas está fortemente correlacionada com o desencadeamento das reações oxidativas de origem química durante a maturação e envelhecimento dos vinhos (LI; GUO; WANG, 2008).

### **3. REAÇÕES QUÍMICAS E ENZIMÁTICAS NOS PRODUTOS DERIVADOS DA UVA (SUCOS E VINHOS)**

Os compostos fenólicos responsáveis pela cor dos sucos e vinhos procedem da uva utilizada para sua elaboração. No entanto, os perfis de compostos fenólicos presentes nestes produtos é dependente de inúmeros fatores que incluem a espécie e variedade da uva, localização do plantio, sistema de cultivo, clima, solo, forma de extração dos compostos fenólicos e tipo de processo empregado. Além disso, são também influenciados pelas reações químicas e enzimáticas que se iniciam com o esmagamento das uvas e ocorrem durante todo processo, bem como maturação e envelhecimento, no caso dos vinhos. Desta forma, os vinhos apresentam uma composição fenólica muito mais complexa que a encontrada nas uvas utilizadas para sua elaboração (CHEYNIER; FULCRAND, 2000).

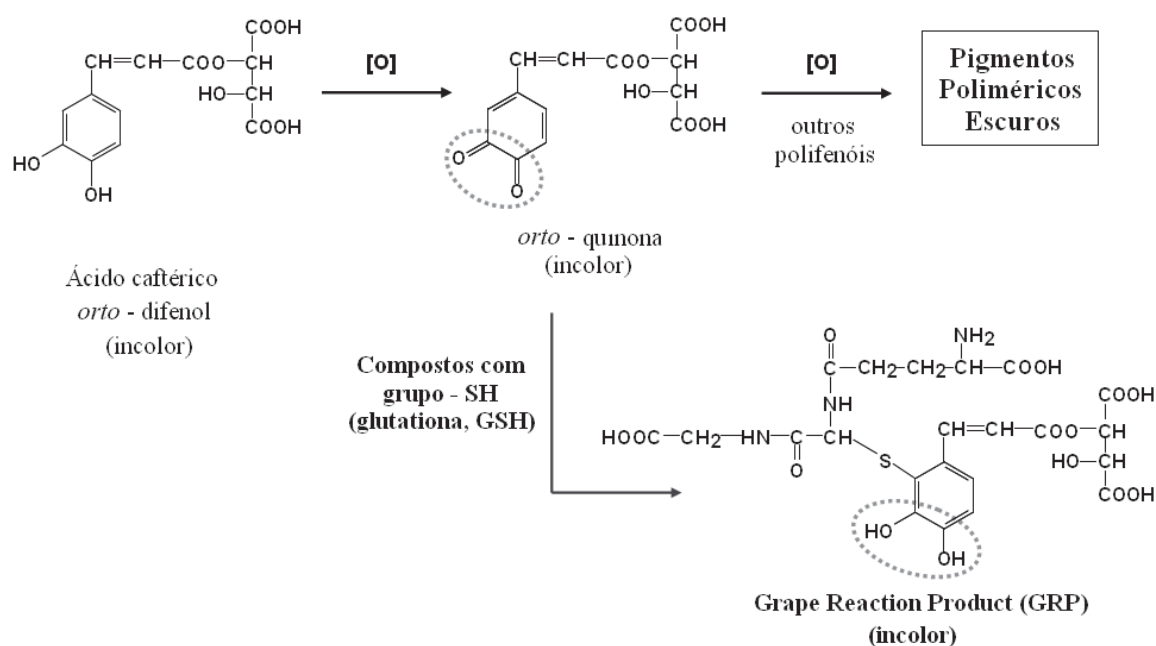
#### **3.1. Oxidação de origem enzimática**

Durante o processamento da fruta, as reações enzimáticas geralmente ocorrem durante as operações tecnológicas iniciais, como o esmagamento da baga para obtenção do mosto (CHEYNIER et al., 1990; LI; GUO; WANG, 2008) e, como já discutido anteriormente para as uvas, estão largamente correlacionadas com os conteúdos de ácido caftárico e cutárico (OSZMIANSKI; CHEYNIER; MOUTOUNET, 1996). Estas reações ocasionam grandes mudanças na tonalidade e intensidade da cor, dependendo do composto oxidado e do tipo de reação (LI; GUO; WANG, 2008; ROBARDS et al., 1999).

Nos mostos de uvas brancas, por exemplo, os principais tipos de compostos fenólicos são os ácidos trans-caftárico, trans-cutárico e cis-cutárico (BETÉS-SAURA; ANDRÉS-LACUEVA; LAMUELA-RAVENTÓS, 1996). Estes compostos foram identificados como os substratos precursores do escurecimento de vinhos brancos (SINGLETON et al., 1984). Para proteção preventiva contra a oxidação do mosto e o desenvolvimento do escurecimento durante o armazenamento do produto na garrafa geralmente utiliza-se dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) (CEJUDO-BASTANTE et al., 2010). Deve-se ressaltar que o emprego de dióxido de enxofre deve ser usado criteriosamente respeitando os níveis autorizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para cada tipo de produto (BRASIL, 1988),

devido à sua toxicidade e efeitos alérgicos já relatados na literatura (GAO et al., 2002; GARDE-CERDÁN et al., 2007).

É aceito que a lacase é mais resistente à ação do SO<sub>2</sub> quando comparada a catecolase, que é facilmente inativada com uma pequena quantidade do agente sulfitante (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Após o tratamento do mosto com SO<sub>2</sub>, desenvolvimento da fermentação e, conseqüente, produção do álcool a atividade da PPO torna-se praticamente nula nos vinhos (CHEYNIER; BASIRE; RIGAUD, 1989; RIBERÉAU-GAYON et al., 2006; SPAGNA; BARBAGALLO; PIFFERI, 2000). Sabe-se também que a glutatona, um tripeptídeo ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) presente no mosto da uva, ajuda a prevenir as reações de escurecimento enzimático. Algumas *o*-quinonas do ácido cafeiltartárico podem reagir espontaneamente com a glutatona formando o ácido 2-S-glutationilcaftárico (Grape Reaction Product, GRP) (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema de oxidação enzimática do ácido caftárico presente nos vinhos.

Este composto não pode ser oxidado pela enzima PPO, limitando em parte o escurecimento oxidativo (CHEYNER et al., 1986; SINGLETON et al., 1985; TOIT et al., 2006). No entanto, ele pode sofrer uma adicional oxidação caso haja a presença de lacase de *Botrytis cinerea*, em uvas atacadas pelo fungo, produzindo suas correspondentes *o*-quinonas. Estes compostos podem ainda continuar reagindo e resultar na formação de ácido 2,5-di-S-glutationilcaftárico, em presença de um excesso de glutatona. Enquanto a glutatona



está disponível, a formação de GRP impede a participação das *o*-quinonas nas reações acopladas que levam à formação dos pigmentos escuros. Deste modo, a adição do antioxidante glutathiona reduzida (GSH) em mosto pode prevenir o escurecimento pré-fermentativo e o desenvolvimento de *off-flavors* em vinhos brancos (HOSRY et al., 2009; TOIT et al., 2006). O GRP pode sofrer reações posteriores, como: hidrólise com liberação de ácido tartárico e subsequente formação de ésteres etílicos, hidrólises das ligações peptídicas do resto da glutathiona e, inclusive, isomerização trans/cis da dupla ligação, como foi demonstrado recentemente (CEJUDO-BASTANTE; PÉREZ-COELLO; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010).

Nos vinhos brancos, geralmente, a oxidação enzimática provoca o escurecimento, mas não necessariamente representa um problema na qualidade do produto final tendo em vista que uma limitada exposição do vinho ao oxigênio pode resultar em redução da adstringência e estabilização da cor (ATANASOVA et al., 2002). Uma das técnicas empregadas com sucesso para esta finalidade é a hiperoxigenação do mosto de uva branca. Esta técnica pré-fermentativa é caracterizada pela adição de oxigênio a um mosto não sulfitado até a saturação (CEJUDO-BASTANTE et al., 2011).

A adição de oxigênio favorece a oxidação enzimática de alguns precursores de compostos polifenólicos presentes no mosto, que poderiam dar origem aos compostos polímeros oxidados e escuros de alto peso molecular. Após a precipitação destes compostos, responsáveis pelo amargor, adstringência, e escurecimento durante o envelhecimento do vinho, eles podem ser removidos previamente à fermentação alcoólica devido à sua elevada solubilização em álcool. Como resultado, a técnica da hiperoxigenação produz vinhos brancos que são mais leves, mais estáveis quanto aos parâmetros sensoriais, e revelam-se menos suscetíveis ao escurecimento oxidativo e mais estáveis com relação à cor quando comparado aos vinhos produzidos por técnicas convencionais (CEJUDO-BASTANTE et al., 2011; SCHNEIDER, 1998; RIBERÉAU-GAYON et al., 2006).

O efeito do tratamento de hiperoxigenação sobre o aroma do vinho branco é dependente da variedade, da composição e da quantidade de oxigênio. Em função disto, resultados contrastantes são encontrados na literatura. Enquanto alguns autores afirmam que os vinhos provenientes de mostos hiperoxidados são caracterizados por uma falta de aroma varietal e por uma diminuição na sua intensidade aromática (NAGEL; GRABER, 1988; SCHNEIDER, 1998; SINGLETON; ZAYA; TROUSDALE, 1980), outros estudos contrariamente relataram que a adição de oxigênio não só preservou o perfil de aroma como também aumentou a sua qualidade dos vinhos produzidos (CHEYNIER et al., 1989, 1991).

Associação de hiperoxidação e adição de glutathiona ao mosto tem resultado em vinhos mais aceitáveis quanto ao aroma típico da fruta e estabilidade da cor, além de maiores teores de compostos fenólicos (VAIMAKIS; ROW, 1996). Recentemente, foi relatado que a hiperoxigenação do mosto da variedade Chardonnay produz vinhos com características sensoriais mais atrativas que são mantidas por mais de um ano de envelhecimento em garrafa (CEJUDO-BASTANTE et al., 2011).

Nos tintos, o escurecimento enzimático causa um impacto limitado sobre a cor dos mesmos, quando sulfitados adequadamente (CHEYNIER; FULCRAND, 2000). Os agentes sulfitantes (SO<sub>2</sub>) ou sais de sódio, potássio e cálcio de sulfito hidrogênio - bissulfito), além de inibirem as reações de escurecimento enzimático e não enzimático durante o processamento da uva e estocagem dos produtos derivados, atuam na inibição da deterioração provocada por bactérias, fungos e leveduras indesejáveis ao processo (TAYLOR; HIGLEY; BUSH, 1986).

### **3.2. Reações de hidrólise enzimática**

Durante a elaboração dos produtos derivados de uvas outras reações de origem enzimática também podem ocorrer durante o esmagamento da uva para obtenção do mosto devido à ação de enzimas endógenas e/ou exógenas, adicionadas intencionalmente durante o processo de elaboração de sucos e principalmente vinhos. Na maioria das vezes, a ação das enzimas endógenas hidrolíticas é insuficiente para as condições de vinificação e utilizam-se preparações industriais com atividades enzimáticas principais e secundárias, cuja adição em etapas chaves do processo desempenha um papel fundamental com suposta melhora sobre a qualidade cromática e nutricional dos produtos (BAUTISTA-ORTÍN et al., 2005).

Isto ocorre porque as cascas das uvas são barreiras limitantes que previnem a liberação dos compostos fenólicos para o mosto. A extração destes compostos, durante a maceração das uvas, requer que a lamela média rica em pectinas das cascas seja degradada para liberar as células, e as paredes celulares sejam quebradas para permitir a extração dos constituintes presentes dentro dos vacúolos celulares (ROMERO-CASCALES et al., 2005).

A aplicação de pectinases apropriadas, bem como de algumas celulases e hemicelulases, sobre a casca da uva pode hidrolisar os polissacarídeos da parede celular e, resultar em melhora na liberação tanto de antocianinas, como de outros compostos de importância como os taninos, para o mosto (REVILLA; GONZALEZ-SAN JOSÉ, 2003a,b; RODRIGUEZ-NOGALES et al., 2008; ROMERO-CASCALES et al., 2008). Por conseguinte, a utilização da maceração enzimática pode influenciar significativamente na velocidade de formação do vinho, na manutenção de certas moléculas polifenólicas

quimicamente estáveis e, conseqüentemente, as características organolépticas e o potencial de proteção à saúde (BAUTISTA-ORTÍN et al., 2007).

A organização internacional com competência no setor vitivinícola mundial, denominada Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV), tem estabelecido que apenas enzimas produzidas pelos fungos *Aspergillus niger* e *Trichoderma* podem ser usadas para produção de vinhos (ROMERO-CASCALES et al., 2008). Dentre os complexos enzimáticos nacionais e importados comerciais usados durante o processamento da uva pode-se citar o Pectinex® BE3-L (pectinesterase, pectinaliase, poligalacturonase, hemicelulase e celulase de *Aspergillus niger*), Vinozym® EC (pectinase e celulase de *Aspergillus niger* e *Trichoderma longibrachiatum*), Vinozym® G (pectinaliase, poligalacturonase, hemicelulase e celulase de *Aspergillus niger*), (MUÑOZ; SEPULVEDA; SCHWARTZ, 2004), Vinozym® FCE G (poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* and *Aspergillus niger*), Celluclast® 1.5 L FG (celulase de *Trichoderma reesei*) (ARNOUS; MEYER, 2010), entre outros.

Como inconveniente, a hidrólise das pectinas pode ocasionar um aumento na quantidade de metanol tanto de sucos como de vinhos, devendo ser controlado pela Legislação vigente. A toxicidade do metanol é baixa, porém, no processo metabólico são produzidos aldeído fórmico e ácido fórmico (BRUN; CABANIS, 1993 citado por BIASOTO, 2008). No ser humano, a sintomatologia da intoxicação por metanol está condicionada à quantidade ingerida e varia desde dores de cabeça, náuseas e vômitos até cegueira e morte (GOSSELIN et al., 1976 citado por BIASOTO, 2008). Os limites máximos para ingestão diária específicos para sucos ainda não foram determinados.

A liberação de metanol dos ácidos poligalacturônicos metilados durante a produção de vinho pode ser minimizada pelo uso de preparações comerciais de pectinases com alta atividade de pectina liase e baixa atividade de pectina metil esterase. Estudos revelam que o teor de metanol, bem como a extrabilidade dos compostos fenólicos, dependem do tipo e da quantidade de enzimas adicionadas, da espécie da uva e do tempo de contato das enzimas com as cascas (DA-SILVA; FRANCO; GOMES, 1997; GOMEZ et al., 2001; MEYER; JEPSEN; SORENSEN, 1998; PARDO et al., 1999).

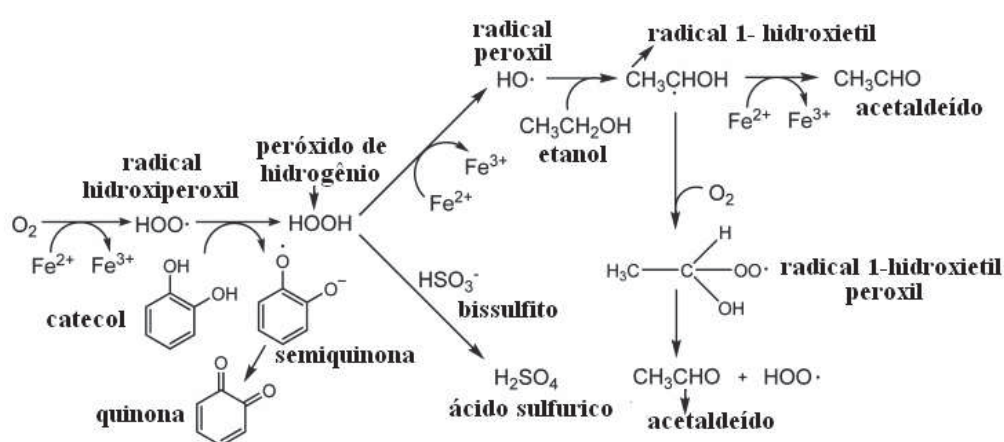
É interessante notar que, segundo resultados de algumas pesquisas, a maceração enzimática nem sempre resulta em aumento na intensidade da cor ou da tonalidade vermelha dos vinhos tintos, podendo apresentar muitas vezes resultados contraditórios. Isto pode ter ocorrido devido às diferenciadas composições e atividades enzimáticas dos preparados comerciais, a heterogeneidade do vinho elaborado e a influência de fatores do processo de vinificação (ALVAREZ et al., 2005; ZIMMAN et al., 2002).

Diante disto, esforços têm sido concentrados no desenvolvimento de preparações enzimáticas que executem, satisfatoriamente e de forma segura, suas funções sob as condições específicas do processo de vinificação (CLARE; SKURRAY; THEAUD, 2002; GIL; VALLES, 2001).

### 3.3. Oxidação de origem não enzimática

A oxidação não enzimática, também conhecida como oxidação química ocorre nos vinhos após incorporação do oxigênio durante as etapas de trasfegas, pela superfície, em função dos espaços vazios nos tanque de armazenamento, que irá depender das práticas do atesto, através dos poros da madeira dos recipientes de maturação e durante o engarrafamento (SCHNEIDER, 1998). A dissolução (ou solubilidade) do oxigênio no vinho é maior quanto maior for o grau alcoólico e menor for a temperatura (WATERHOUSE; LAURIE, 2006).

Numerosos estudos relataram que os compostos fenólicos presentes nos vinhos não podem reagir diretamente com o oxigênio e a presença de íons cobre e ferro é necessária para a iniciação do processo oxidativo (DANILEWICZ, 2003, 2007, DANILEWICZ; SECCOMBE; WHELAN, 2008; WATERHOUSE; LAURIE, 2006). Estes íons metálicos estão presentes nos vinhos devido à presença natural de pequenas quantidades nas uvas ou devido a sua contaminação com o solo, bem como devido à contaminação dos mostos ou vinhos durante o contato com alguns equipamentos utilizados para a vinificação (LASANTA; CARO; PEREZ, 2005; PYRZYNSKA, 2004). Desta forma, há o favorecimento da formação de radicais oxigenados com destaque para o radical hidroxiperoxila ( $\text{HO}_2^\bullet$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (WATERHOUSE; LAURIE, 2006) (**Figura 5**).



**Figura 5.** Mecanismo de oxidação química do vinho catalisada por metais (adaptada de Elias et al., 2009).

Deve-se ressaltar que o peróxido de hidrogênio é um potente oxidante capaz de reagir com o íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ou o íon cuproso ( $\text{Cu}^{2+}$ ) (reação de Fenton), gerando espécies reativas de oxigênio, como o radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ), que é extremamente potente para oxidar inespecificamente quase todos os compostos orgânicos presentes nos vinhos (LAURIE; WATERHOUSE, 2006).

Os *o*-difenóis presentes nas uvas mais suscetíveis ao processo de oxidação são ácido caféico e seus ésteres, catequinas, epicatequinas, antocianinas e seus derivados, e o ácido gálico (FERNÁNDEZ-ZURBANO, 1998; LÓPEZ-TOLEDANO et al., 2002; OSMIANSKI; CHEYNIER; MOUTOUNET, 1996). Durante a elaboração dos vinhos, estes *o*-difenóis podem ser oxidados para *o*-quinonas e, radicais livres de semi-quinona podem ser produzidos enquanto o oxigênio é reduzido para peróxido de hidrogênio (DANILEWICZ, 2003; WATERHOUSE; LAURIE, 2006). A formação das semi-quinonas é um passo determinante para a velocidade de oxidação. As quinonas secundárias geradas por oxidação acoplada, assim como as quinonas primárias produzidas por oxidação enzimática, reagem espontaneamente com as moléculas nucleofílicas do mosto formando diversos produtos de condensação que por sua vez podem estar implicados em novas reações de degradação, que levam às modificações estruturais dos compostos e, por conseguinte, em modificações nas propriedades nutricionais e organolépticas das frutas (POURCEL et al., 2007). No entanto, na presença de excesso de  $\text{SO}_2$ , o  $\text{H}_2\text{O}_2$  parece reagir rapidamente e de forma irreversível, o que limita a oxidação dos compostos fenólicos bem como das outras frações orgânicas do vinho, com destaque para o etanol e o ácido tartárico (DANILEWICS, 2007; ELIAS et al., 2009).

O etanol e o ácido tartárico podem ser oxidados pelo radical  $\bullet\text{OH}$  gerando acetaldeído (**Figura 5**) e ácido glioxílico, respectivamente (FULCRAND et al., 2006). O ácido glioxílico pode reagir com unidades de flavan-3-óis para formar compostos de coloração amarela. Estudos relataram também a ocorrência de outras reações, como a condensação direta flavanol-antocianina que leva à formação de compostos de coloração amarelo ou laranja e a oxidação não enzimática dos flavan-3-óis, formando compostos incolores ou marrons. Estas reações ocorrem muito lentamente, porém, podem influenciar de forma negativa a cor e aroma dos vinhos (ATANASOVA et al., 2002).

### 3.4. Evolução da cor do vinho

A relação entre a cor do vinho tinto e sua composição fenólica já é bem conhecida e o estudo mais aprofundado sobre os pigmentos que contribuem para esta cor tem atraído grande

atenção nas últimas décadas (RENTZSCH et al., 2010). Sabe-se que as antocianinas monoméricas originalmente encontradas nas uvas e consideradas o principal pigmento que dá cor aos vinhos tintos jovens, são relativamente instáveis e rapidamente reagem com outros compostos do mosto, bem como com outros procedentes das leveduras ou gerados durante o armazenamento em barris de madeira, dando lugar a novos pigmentos com diferenciadas estruturas químicas (HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2007; VIVAR-QUINTANA; SANTOS-BUELGA; RIVAS-GONZALO, 2002). Diversas reações químicas decorrentes da oxidação dos compostos fenólicos e polimerização posterior dos produtos oxidados são responsáveis por alterações significativas na cor dos vinhos (LI; GUO; WANG, 2008; MONAGAS; BARTOLOMÉ; GÓMEZ-CORDOVÉS, 2005).

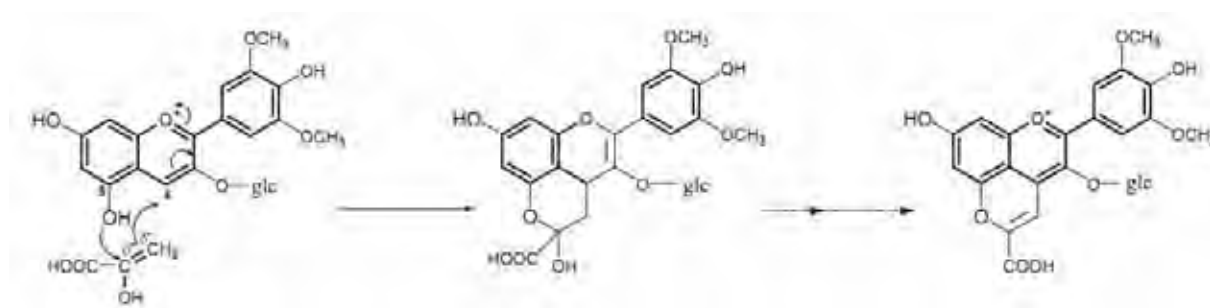
Duas ou mais moléculas de tanino podem reagir e formar pigmentos com alto grau de polimerização que são mais instáveis e precipitam, formando os depósitos de matéria corante observados em vinhos envelhecidos (ES-SAFI; CHEYNIER; MOUTOUNET, 2002, 2003; FULCRAND et al., 2006; LIU; PILONE, 2000). A formação destes pigmentos poliméricos permite explicar a perda da intensidade da cor bem como a mudança de tonalidade dos vinhos tintos durante o envelhecimento, já que os cromóforos iniciais (antocianinas monoméricas) praticamente desaparecem e não podem mais formar complexos de copigmentação (HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2007).

O acetaldeído formado por oxidação ou também no decorrer da fermentação alcoólica como um metabólito secundário da levedura, pode em meio ácido formar um carbocátion que apresenta capacidade de participar de reações de condensação entre antocianinas e flavan-3-óis (taninos) que geram pigmentos poliméricos. Estes pigmentos formados por mediação do acetaldeído, não são muito estáveis e podem ser clivados em moléculas menores (dímeros, trímeros e tetrâmeros) de diferentes pesos moleculares (como 8-vinilflavan-3-óis) que, por sua vez, podem reagir com as antocianinas para dar origem a pigmentos de cor alaranjada (máximos de absorção entre 498 - 512 nm em meio aquoso a  $\text{pH} < 2$ ). Estes pigmentos, denominados piranoantocianinas ou visitinas, são poucos sensíveis às mudanças de pH e à descoloração por  $\text{SO}_2$  e, por conseguinte, apresentam papel importante na estabilização da cor do vinho (SARNI-MANCHADO et al., 1995).

Estes compostos são ainda formados por diferentes mecanismos durante o processamento e estocagem dos vinhos a partir de precursores de origem muito diversa. Segundo Herмосín-Gutiérrez (2007), para que um piranoantocianina seja formado é necessário que uma antocianina monomérica reaja com uma substância que contenha uma dupla ligação polarizada, ou seja, com substituintes de diferentes polaridades em ambos os



extremos da dupla ligação. Como exemplo, pode-se citar o composto vitisina A, que procede da reação entre malvidina-3-glicosídeo com ácido pirúvico (metabólito secundário das leveduras) (**Figura 6**) (FULCRAND et al., 2006) e o composto pinotina A, que é formado a partir da reação com ácido caféico e foi isolado e identificado em vinhos tintos elaborados com a variedade Pinotage (SCHWARZ; JERZ; WINTERHALTER, 2003). Além disso, estas moléculas apresentam pequeno tamanho molecular (similar ao das antocianinas envolvidas nas reações responsáveis pela sua origem) e não mostram tendência a polimerizar, pois são capazes de se manter em dissolução em vinhos envelhecidos.



**Figura 6.** Mecanismo proposto para formação da vitisina A (FULCRAND et al., 1998).

A seqüência de reações tanto de origem enzimática como química que ocorrem nas diversas etapas de elaboração e durante a maturação e envelhecimento dos vinhos, especialmente os tintos, são inevitáveis devido à reatividade dos constituintes fenólicos e, resultam na formação de novos compostos que alteram a coloração e a estabilidade durante a estocagem e seu envelhecimento. De forma geral, os vinhos tintos jovens apresentam uma coloração vermelha com uma tonalidade tendendo para o violeta-azul enquanto nos velhos, uma cor vermelha com tonalidade marrom-alaranjada é percebida, muitas vezes definida como cor *telha* (HERMOSÍN-GUTIÉRREZ; LORENZO; ESPINOSA, 2005).

#### 4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

As reações oxidativas de origem não enzimática ocorrem durante a fermentação e durante os últimos estágios do processamento (maturação e envelhecimento) dos vinhos. Estas reações podem ser influenciadas primeiramente pela composição de compostos fenólicos e seus níveis, bem como por fatores como a acidez do vinho, o conteúdo de SO<sub>2</sub> e de ácido ascórbico, a presença de metais como o Fe<sup>2+</sup> (autooxidação), a quantidade de

oxigênio disponível e a temperatura. Atualmente, estudos buscam elucidar estas moléculas e correlacionar seus efeitos sobre a qualidade organoléptica e nutricional dos produtos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, I. et al. Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 563, n. 1/2, p. 109-115, Mar. 2005.

ANISZEWSKI, T.; LIEBEREI, R.; GULEWICZ, K. Research on catecholases, laccases and cresolases in plants. Recent progress and future needs. **Acta Biologica Cracoviensia**, Krakow, v. 50, n. 1, p. 7-18, 2008.

ARNOUS, A.; MEYER, A. S. Discriminated release of phenolic substances from red wine grape skins (*Vitis vinifera* L.) by multicomponent enzymes treatment. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 68-77, Mar. 2010.

ATANASOVA, V. et al. Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 458, n. 1, p. 15-27, Apr. 2002.

BARBAGALLO, R. N. et al. Characteristic of  $\beta$ -glucosidase from Sicilian blood oranges in relation to anthocyanin degradation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 41, n. 5, p. 570-575, Oct. 2007.

BAUTISTA-ORTÍN, A. B. et al. Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 867-878, Oct. 2005.

BAUTISTA-ORTÍN, J. I. et al. The effects of enological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine colour and their dependence on grape characteristics. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 7, p. 546-552, Nov. 2007.

BETÉS-SAURA, C.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Phenolics in white free run juices and wines from Penedès by highperformance liquid chromatography: changes during vinification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 10, p. 3040-3046, Oct. 1996.

BIASOTO, A. C. T. **Vinhos tintos de mesa produzidos no Estado de São Paulo: caracterização do processo de fabricação, de parâmetros físico-químicos, do perfil sensorial e da aceitação**. 2008. 216 f. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição)–Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

BORN, K. et al. Catecholase activity of dicopper (II)-bispidine complexes: stabilities and structure of intermediates, kinetics and reaction mechanism. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, Berlin, v. 12, n. 1, p. 36-48, Jan. 2007.

BRASIL. Resolução CNS/MS nº 4, de 24 de novembro de 1988. Aprova revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais, bem como os anexos I, II, III e VII, todos do



Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 19 dez. 1988. Seção 1. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/04\\_cns.pdf](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/04_cns.pdf)>. Acesso em: 07 abr. 2011.

CANTOS, E. et al. Phenolic compounds and related enzymes are not rate-limiting in browning development of fresh-cut potatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 10, p. 3015-3023, May 2002.

CEJUDO-BASTANTE, M. J.; PÉREZ-COELLO, M. S.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Identification of new derivatives of 2-S-glutathionyl-caftaric acid in aged white wines by HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 13, p. 11483-11492, July 2010.

\_\_\_\_\_. et al. Hydroxylation and bottle storage of chardonnay white wines: effects on color-related phenolics, volatile composition, and sensory characteristics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 8, p. 4171-4182, Apr. 2011.

CHEYNIER, V.; BASIRE, N.; RIGAUD, J. Mechanism of trans-caffeoyltartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 37, n. 4, p. 1069-1071, July 1989.

\_\_\_\_\_; FULCRAND, H. Oxidación de los polifenoles en los mostos y los vinos. In: FLANZY, C. (Coord.). **Enología: fundamentos científicos y tecnológicos**. Madrid: AMV ediciones, 2000. p. 369-376.

\_\_\_\_\_. et al. Characterization of 2-S-glutathionylcaftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 34, n. 2, p. 217-221, Mar. 1986.

\_\_\_\_\_. et al. Effect of pomace contact and hiperoxidation on the phenolic composition and quality of Grenache and Chardonnay wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 40, n. 1, p. 36-42, Mar. 1989.

\_\_\_\_\_. et al. Hydroxylation: influence of various oxygen supply levels on oxidation kinetics of phenolic compounds and wine quality. **Vitis**, Siebeldingen, v. 30, n. 2, p. 107-115, 1991.

\_\_\_\_\_. et al. Must browning in relation to the behavior of phenolic compounds during oxidation. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 41, n. 4, p. 346-349, Dec. 1990.

CLARE, S., SKURRAY, G.; THEAUD, L. Effect of a pectolytic enzyme on the colour of red wine. **The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker**, Adelaide, v. 456, p. 29-35, 2002.

CLEMENTE, E. Purification and thermostability of isoperoxidase from oranges. **Phytochemistry**, New York, v. 49, n. 1, p. 29-36, Sept. 1998.

DA-SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 249-260, 1997.

DANILEWICZ, J. C. Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: central role of iron and copper. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 58, n. 1, p. 53-60, Mar. 2007.

\_\_\_\_\_. Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 54, n. 2, p. 73-85, June 2003.

\_\_\_\_\_; SECCOMBE, J. T.; WHELAN, J. Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 59, n. 2, p. 128-136, June 2008.

ELIAS, R. J. et al. Identification of free radical intermediates in oxidized wine using electron paramagnetic resonance spin trapping. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 10, p. 4359-4365, Apr. 2009.

ES-SAFI, N. E.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 16, n. 5, p. 535-553, Oct. 2003.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Role of aldehydic derivatives in the condensation of phenolic compounds with emphasis on the sensorial properties of fruit-derived foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 20, p. 5571-5585, Sept. 2002.

ESPÍN, J. C. et al. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 231, n. 1, p. 237-246, Oct. 1995.

FERNÁNDEZ-ZURBANO, P. et al. Role of hydroxycinnamic acids and flavanols in the oxidation and browning of white wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 12, p. 4937-4944, Nov. 1998.

FORTEA, M. I. et al. Kinetic characterization and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (*Crimson Seedless*). **Food Chemistry**, London, v. 113, n. 4, p. 1008-1014, Apr. 2009.

FULCRAND, H. et al. A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. **Phytochemistry**, New York, v. 47, n. 7, p. 1401-1407, Apr. 1998.

\_\_\_\_\_. et al. Phenolic reactions during winemaking and aging. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 57, n. 3, p. 289-297, Sept. 2006.

GANDÍA-HERRERO, F. et al. Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. **Biological Chemistry**, Bethesda, v. 386, n. 6, p. 601-607, June 2005.

GAO, Y. C. et al. Inhibition of spoilage lactic acid bacteria by lysozyme during wine alcoholic fermentation. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 8, n. 1, p. 76-83, Apr. 2002.

GARDE-CERDÁN, T. et al. Influence of SO<sub>2</sub> on the consumption of nitrogen compounds through alcoholic fermentation of must sterilized by pulsed electric fields. **Food Chemistry**, London, v. 103, n. 3, p. 771-777, 2007.

GIL, J. V.; VALLES, S. Effect of macerating enzymes on red wine aroma at laboratory scale: exogenous addition or expression by transgenic wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 11, p. 5515-5523, Nov. 2001.

GOMEZ, E. R. et al. Phenolic compounds and color stability of red wines: effect of skin maceration time. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 52, n. 3, p. 266-270, Sept. 2001.

HAREL, E.; MAYER, A. M.; LEHMAN, E. Multiple forms of *Vitis vinifera* catechol oxidase. **Phytochemistry**, New York, v. 12, n. 11, p. 2649-2654, Nov. 1973.

HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Copigmentación y piranoantocianos: el papel de los flavonoles y los ácidos hidroxicinâmicos en el color del vino tinto. **ACE Revista d'Enologia**, Vilafranca del Penedès, v. 79, p. 12-20, 2007. Disponível em: <[http://www.acenologia.com/ciencia81\\_2.htm](http://www.acenologia.com/ciencia81_2.htm)>. Acesso em: 21 fev. 2011.

\_\_\_\_\_; LORENZO, E. V.; ESPINOSA, A. V. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel and Syrah. **Food Chemistry**, London, v. 92, n. 2, p. 269-283, Sept. 2005.

HOSRY, L. E. et al. Browning susceptibility of white wine and antioxidant effect of glutathione. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 44, n. 12, p. 2459-2463, Dec. 2009.

KLABUNDE, T. et al. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. **Nature Structural Biology**, New York, v. 5, n. 12, p. 1084-1090, Dec. 1998.

KOBAYASHI, S. et al. On the mechanism of the peroxidase-catalyzed oxygen-transfer reaction. **Biochemistry**, Washington, v. 26, n. 16, p. 5019-5022, Aug. 1987.

LASANTA, C.; CARO, I.; PEREZ, L. Theoretical model for íon exchange of iron (III) in chelating resins: Application to metal íon removal from wine. **Chemical Engineering Science**, New York, v. 60, n. 13, p. 3477-3486, July 2005.

LAURIE, V. F.; WATERHOUSE, A. L. Oxidation of glycerol in the presence of hydrogen peroxide and iron in model solutions and wine: Potential effects on wine color. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 13, p. 4668-4673, June 2006.

LAVEDA, F. et al. Proteolytic activation of latent paraguay peach PPO. Characterization of monophenolase activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 2, p. 1003-1008, Feb. 2001.

\_\_\_\_\_. et al. Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 379, n. 1, p. 1-6, Jul. 2000.

LEE, C. Y.; PENNESI, A. P.; SMITH, N. L. Purification and some properties of peroxidase from de Chaunac grapes. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 34, n. 2, p. 128-129, June 1983.

LI, H.; GUO, A.; WANG, H. Mechanisms of oxidative browning of wine. **Food Chemistry**, London, v. 108, n. 1, p. 1-13, May 2008.

LIMA, M. A. C. et al. Aparência, compostos fenólicos e enzimas oxidativas em uva Itália sob influência do cálcio e do armazenamento refrigerado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 39-43, abr. 2002.

LIU, S. Q.; PILONE, G. J. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 49-61, Feb. 2000.

LÓPEZ-NICOLAS, J. M.; GARCÍA-CARMONA, F. Enzymatic and nonenzy degradation of polyphenols. In: ROSA, L. A.; ALVARES-PARRILLA, E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. **Fruit and vegetables phytochemistry**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. p. 101-130.

LÓPEZ -TOLEDANO, A. et al. Yeast-induced inhibition of (+)-catechin and (-)-epicatechin degradation in model solutions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 6, p. 1631-1635, Mar. 2002.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, New York, v. 60, n. 6, p. 551-565, July 2002.

MEYER, A. S.; JEPSEN, S. M.; SORENSEN, N. S. Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 7, p. 2439-2446, June 1998.

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

MUKHERJEE, J.; MUKHERJEE, R. Catecholase activity of dinuclear copper (II) complexes with variable endogenous and exogenous bridge. **Inorganica Chimica Acta**, Lausanne, v. 337, n. 26, p. 429-438, Sept. 2002.

MUÑOZ, O.; SEPULVEDA, M.; SCHWARTZ, M. Effects of enzymatic treatment on anthocyanic pigments from grapes skin from Chilean wine. **Food Chemistry**, London, v. 87, n. 4, p. 487-490, Oct. 2004.

NAGEL, C. W.; GRABER, W. R. Effect of must oxidation on quality of white wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 39, n. 1, p. 1-4, Mar. 1988.

- NOKTHAI, P. et al. Molecular modeling of peroxidase and polyphenol oxidase: substrate specificity and active site comparison. **International Journal of Molecular Science**, Basel, v. 11, n. 9, p. 3266-3276, Sept. 2010.
- NÚÑEZ-DELICADO, E. et al. Characterization of polyphenol oxidase from Napoleon grape. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 1, p. 108-114, 2007.
- OREN-SHAMIR, M. Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants? **Plant Science**, Limerick, v. 177, n. 4, p. 310-316, Oct. 2009.
- OSZMIANSKI, J.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Iron-catalyzed oxidation of (+)-catechin in model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 7, p. 1712-1715, Jul. 1996.
- PARDO, F. et al. Effect of diverse enzyme preparations on the extraction and evolution of phenolic compounds in red wines. **Food Chemistry**, London, v. 67, n. 2, p. 135-142, Nov. 1999.
- POURCEL, L. et al. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 29-36, Jan. 2007.
- PYRZYNSKA, K. Analytical methods for the determination of trace metals in wine. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Boca Raton, v. 34, n. 2, p. 69-83, 2004.
- RANOCHA, P. et al. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases - a divergent gene family - in poplar. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 259, n. 1/2, p. 485-495, Jan. 1999.
- RAPEANU, G. et al. Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. *Sativa*). **Food Chemistry**, London, v. 94, n. 2, p. 253-261, Jan. 2006.
- RENTZSCH, M. et al. Survey on the content of vitisin A and hydroxyphenylpyranoanthocyanins in Tempranillo wines. **Food Chemistry**, London, v. 119, n. 4, p. 1426-1434, Apr. 2010.
- REVILLA, I.; GONZALEZ-SAN JOSÉ, M. L. Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 29-36, Jan. 2003a.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Compositional changes during the storage of red wines treated with pectolytic enzymes: low molecular-weight phenols and flavan-3-ol derivative levels. **Food Chemistry**, London, v. 80, n. 2, p. 205-214, Feb. 2003b.
- RIBÉREAU-GAYON, P. et al. **Handbook of enology: the chemistry of wine stabilization and treatments**. Chichester: John Wiley & Sons, 2006. v. 2.
- RIGAUD, J. et al. Influence of must composition on phenolic oxidation kinetics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Easton, v. 57, n. 1, p. 55-63, 1991.



ROBARDS, K. et al. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, London, v. 66, n. 4, p. 401-436, Sept. 1999.

RODRIGUEZ-NOGALES, J. M. et al. Pectin hydrolysis in a free enzyme membrane reactor: an approach. **Food Chemistry**, London, v. 107, n. 1, p. 112-119, Mar. 2008.

ROMERO-CASCALES, I. et al. Characterisation of the main enzymatic activities present in six commercial macerating enzymes and their effects on extracting colour during winemaking of Monastrell grapes. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 43, n. 7, p. 1295-1305, July 2008.

\_\_\_\_\_. et al. Differences in anthocyanin extractability from grapes to wines according to variety. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 56, n. 3, p. 212-219, Sept. 2005.

SARNI-MANCHADO, P. et al. Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must-like model solutions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 69, n. 3, p. 385-391, Nov. 1995.

SCHNEIDER, V. Must hyperoxygenation: a review. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 49, n. 1, p. 65-73, Mar. 1998.

SCHWARZ, M.; JERZ, G.; WINTERHALTER, P. Isolation and structure of pinotin A, a new anthocyanin derivative from Pinotage wine. **Vitis**, Siebeldingen, v. 42, n. 2, p. 105-106, 2003.

SELINHEIMO, E. et al. Comparison of the characteristic of fungal and plant tyrosinases. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 130, n. 4, p. 471-480, July 2007.

SINGLETON, V. L.; ZAYA, J.; TROUSDALE, E. White table wine quality and polyphenol composition as affected by must SO<sub>2</sub> content and pomace contact time. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 31, n. 1, p. 14-20, Mar. 1980.

\_\_\_\_\_. et al. Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 36, n. 1, p. 50-56, Mar. 1985.

\_\_\_\_\_. et al. Caftaric acid in grapes and conversion to a reaction product during processing. **Vitis**, Siebeldingen, v. 23, p. 113-120, 1984.

SPAGNA, G.; BARBAGALLO, R. N.; PIFFERI, P. G. Fining treatments of white wines by means of polymeric adjuvants for their stabilization against browning. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 10, p. 4619-4627, Oct. 2000.

SUBRAMANIAN, N. et al. Role of polyphenol oxidase and peroxidase in the generation of black tea theaflavins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 7, p. 2571-2578, July 1999.

TAYLOR, S. L.; HIGLEY, N. A.; BUSH, R. K. Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure, assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. **Advances in Food Research**, San Diego, v. 30, p. 1-76, 1986.

TOIT, W. J. d. et al. Oxygen in must and wine: a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, Stellenbosch, v. 27, n. 1, p. 76-94, 2006.

TOIVONEN, P. M. A.; BRUMMELL, D. A. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 1-14, Apr. 2008.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Easton, v. 81, n. 9, p. 853-876, July 2001.

ÜNAL, M. Ü.; SENER, A. Determination of some biochemical properties of polyphenol oxidase from Emir grape (*Vitis vinifera* L. cv. Emir). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Easton, v. 86, n. 14, p. 2374-2379, Nov. 2006.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; SEN, K. Characterization of Sultaniye grape (*Vitis vinifera* L. cv. Sultana) polyphenol oxidase. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 42, n. 9, p. 1123-1127, Sept. 2007.

VAIMAKIS, V.; ROW, I. G. Must oxygenation together with glutathione addition in the oxidation of white wine. **Food Chemistry**, London, v. 57, n. 3, p. 419-422, Nov. 1996.

VIRADOR, V. M. et al. Cloning, sequencing, purification, and crystal structure of grenache (*Vitis vinifera*) polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 2, p. 1158-1201, Jan. 2010.

VIVAR-QUINTANA, A. M.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 458, n. 1, p. 147-155, Apr. 2002.

WATERHOUSE, A. L.; LAURIE, V. F. Oxidation of wine phenolics: a critical evaluation and hypotheses. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 57, n. 3, p. 306-313, Sept. 2006.

WEEMAES, C. A. et al. Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 31, n. 1, p. 440-449, Jan. 1998.

YILMAZ, H.; SAKIROGLU, H.; KÜFROVIOGLU, I. Polyphenol oxidase from mazrumba grape (*Vitis vinifera* L.). **Agrochimica**, Pisa, v. 47, n. 1/2, p. 21-27, 2003.

ZIMMAN, A. et al. Maceration variables affecting phenolic composition in commercial-scale Cabernet Sauvignon winemaking trials. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 53, n. 2, p. 93-98, June 2002.

# CAPÍTULO 3

**PHENOLIC COMPOSITION OF THE EDIBLE PARTS (FLESH AND SKIN) OF  
BORDÔ GRAPE (*V. LABRUSCA*) USING HPLC-DAD-ESI-MS/MS**



# PHENOLIC COMPOSITION OF THE EDIBLE PARTS (FLESH AND SKIN) OF BORDÔ GRAPE (*V. LABRUSCA*) USING HPLC-DAD-ESI-MS/MS

Ellen Silva LAGO-VANZELA<sup>a</sup>; Eleni GOMES<sup>b</sup>; Esteban GARCÍA-ROMERO<sup>c</sup>; Isidro HERMOSÍN-GUTIÉRREZ<sup>d</sup>; Roberto DA-SILVA<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, <sup>b</sup>Departamento de Biologia; <sup>d</sup>Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

<sup>c</sup>Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha, 13700 Tomelloso, Spain.

<sup>d</sup>Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada, Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola, Universidad de Castilla-La Mancha, 13071 Ciudad Real, Spain.

## ABSTRACT

The phenolic composition of the edible parts (flesh and skin) of the Bordô grape has been identified and quantified in detail by means of HPLC-DAD-ESI-MS/MS. This study has also evaluated total phenolic content and antioxidant capacity of this grape. Total phenolic content of the joint parts of the Bordô grape was 1130 mg/kg (as gallic acid equivalents), and was mainly located in the skins. The content of anthocyanins in the Bordô grape skin was high, largely as 3,5-diglucosides (1359 mg of malvidin 3,5-diglucoside equivalents per kg of grapes). The total content of flavonols in the Bordô grape was 154  $\mu\text{mol/kg}$ , mainly located in the skins and with myricetin 3-glucoside found to be the principal flavonol in both grape parts. Hydroxycinnamic acid derivatives (HCAD) mainly derived from caffeic acid and were found in Bordô grape skins in high amounts: the amounts were ten times higher than those in the flesh (total amount: 483  $\mu\text{mol/kg}$ ). The Bordô grape can be considered a grape cultivar that is a high resveratrol producer (10.91 mg/kg). The flavan-3-ol content of the Bordô grape skin was lower than those that are usually reported for *V. vinifera* grape varieties. Flavan-3-ol monomers and dimers were found in very low amounts, and proanthocyanidin composition did not differ significantly from that which has been reported for *V. vinifera* grape varieties. This grape also exhibited a high value of total antioxidant capacity ( $37.6 \pm 1.0$  mmol/kg, as Trolox equivalents). The aforementioned results confirm that this grape constitutes a rich source of total phenolic compounds with antioxidant activity.

## 1. INTRODUCTION

Grapes are one of the most consumed fruits in the world, whether processed or in their natural form, and they also stand out as a source of phenolic compounds that are important to human health (ANASTASIADI et al., 2010; XIA et al., 2010; YADAV, 2009). Although the bioavailability and bioconversion of phenolic compounds have not yet been fully elucidated, results in the literature suggest that these compounds, particularly flavonoids, can act as powerful antioxidants that are capable of scavenging free radicals in cells (PRIOR; CAO, 2000; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996, 1997). These flavonoids also participate in the regeneration of other antioxidants, such as vitamin E and ascorbic acid, which protect cellular constituents against oxidative damage (FRANKEL; WATERHOUSE; TEISSEDRE, 1995; HERTOOG et al., 1993; KAUR; KAPOOR, 2001). In addition, they have been described as chelators of that are capable of catalyzing lipid peroxidation (SILVA et al., 1998; TERÃO; PISKULA, 1999), as inhibitors of cell proliferation (KUNTZ; WENZEL; DANIEL, 1999), as antiestrogens (MIKSICEK, 1995), and as mediators in the transduction of intracellular signals (SCHROETER et al., 2002).

Most of the data available in the literature regarding phenolic composition in grapes and wine is from traditional wine-producing countries (those of Europe and North America), and the grapes used are predominately wine grapes (*Vitis vinifera*). In contrast, American cultivars and hybrids involving American species, as well as *Vitis vinifera*, represent more than 85% of the volume of grapes processed in Brazil. The main cultivars used for the preparation of table wine and juice in the country are Isabel, Bordô and Concord. These cultivars have adapted well to the Brazilian climate, which varies considerably from the mostly tropical North to more temperate zones in the South. The cultivars display a high productive capacity and low susceptibility to major fungal diseases that are known to attack the vine (CAMARGO; MAIA; NACHTIGAL, 2005).

The contents and profile of phenolic compounds found in different grapes may vary according to the species, variety, and ripening and to the environmental conditions during cultivation (PINHEIRO; DA COSTA; CLEMENTE, 2009). There is little knowledge available on the phenolic composition of the grapes, juices and wines produced in Brazil (ABE et al., 2007; FACCO et al., 2006; MUÑOZ-ESPADA et al., 2004; NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010; PINHEIRO; DA COSTA; CLEMENTE, 2009; RIZZON; MIELE, 2003; SANTOS et al., 2011; WANG; RACE; SHRIKHANDE, 2003). Knowledge of these characteristics may be useful in the assessment of both potential winemaking and the

potential of biological activity. It is known that in both *Vitis vinifera* grapes and their wines, monoglycosylated anthocyanins are most commonly identified, while the presence of diglycosylated anthocyanins is a dominant feature of American species and their hybrids (BAUBLIS; SPOMER; BERBER-JIMENEZ, 1995). The predominance of 3,5-diglucosides protect anthocyanins against further reactions, such as those that give rise to the red-orange pigments called pyranoanthocyanins, which are often observed in wines made from *Vitis vinifera* (RENTZSCH et al., 2007).

Although the Bordô grape is one of the most common varieties of *Vitis labrusca* relevant to Brazil, scientific literature on the content and profile phenolic of grapes and derived products from all over the world is extremely scarce. This cultivar, originally called Ives Seedling or simply Ives, was obtained by Henry Ives in Cincinnati, USA from seeds of the Hartford Prolific. This variety of grape allows for the preparation of juices and the development of wines with an intense color and fruity aroma that can be either consumed as is or used in blends with other varieties that have less accentuated color and acidity (BARNABÉ; VENTURINI-FILHO; BOLINI, 2007).

The goal of this study was to examine in detail the phenolic composition of the edible parts (flesh and skin) of the Bordô grape using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. The study comprises the phenolic classes of anthocyanins, flavonols, hydroxycinnamic acid derivatives, stilbenes and flavan-3-ols (monomeric, dimers, and the polymeric proanthocyanidins also called tannins). This study also evaluates total phenolic content and antioxidant activity in the fruit.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Chemicals

All solvents were of HPLC quality, and all chemicals were analytical grade (> 99%). Water was of Milli-Q quality. The following commercial standards from Phytolab (Vestenbergsgreuth, Germany) were used: malvidin 3-glucoside, pelargonidin 3-glucoside, malvidin 3,5-diglucoside, peonidin 3,5-diglucoside, caffeic and *p*-coumaric acids, trans-caftaric acid, trans-piceid, (-)-epigallocatechin, and (-)-gallocatechin. The following commercial standards from Extrasynthese (Genay, France) were used: cyanidin 3-glucoside, cyanidin 3,5-diglucoside, procyanidins B1 and B2, kaempferol, quercetin, isorhamnetin, myricetin and syringetin, and the 3-glucosides of kaempferol, quercetin, isorhamnetin, and syringetin. The following commercial standards from Sigma (Tres Cantos, Madrid, Spain)

were used: gallic acid, trans-resveratrol, (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epicatechin 3-gallate, and (-)-gallocatechin 3-gallate. Some other non-commercial flavonol standards (myricetin 3-glucoside, quercetin 3-glucuronide) were kindly supplied by Dr. Ulrich Engelhardt (Institute of Food Chemistry, Technical University of Braunschweig, Germany), while others were isolated from Petit Verdot grape skins (laricitrin 3-glucoside) used in a previous study (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009a). The trans isomers of resveratrol and piceid (resveratrol 3-glucoside) were transformed into their respective cis isomers by UV-irradiation (366 nm light for 5 minutes in quartz vials) of 25% MeOH solutions of the trans isomers.

All of these standards were used for identification. Anthocyanins were quantified as equivalents of malvidin 3,5-diglucoside (mg/kg of fresh grape weight). Flavonols (as  $\mu\text{mol/kg}$  fresh grape weight) were quantified using the calibration curve of each standard when available; in other cases, the closest flavonol was used for quantification, to make molecular mass correction (3-glucosides for the respective 3-galactosides or 3-glucuronides). Hydroxycinnamic acid derivatives were quantified using their respective common hydroxycinnamic acids (caffeic, *p*-coumaric and ferulic acids) as standards and making molecular mass correction.

## 2.2 Grapes

During the 2010 harvest season, healthy Bordô grapes were collected at optimum ripeness for harvesting in the city of Jales (northwest of the São Paulo, Brazil), which lies at 20° 16' 7" S and 50° 32' 58" W, and 500 m above sea level (referred to datum WGS84, World Geodetic System 1984). Once in the lab, the grapes (5 kg from each batch) were separated for analysis (**Figure 1**).



**Figure 1.** Bordô grape (*Vitis labrusca*).

### 2.3 Sample preparation

200 g of healthy Bordô berries were carefully peeled by hand, and the resulting skins (yield, 40.65% of fresh fruit weight) were immediately frozen at -80°C for 12 h and then freeze-dried for 24 h and weighed (10.62 g). The dried skins were homogenized in a porcelain mortar with the aid of a pestle, and were further divided in four subsamples, three of which were used for chemical analysis. The subsamples (approximately 2.5 g each) were immersed in 50 mL of a solvent mixture of methanol, water, and formic acid (50:48.5:1.5 v/v) and maintained under ultrasonic bar for 10 min. Samples were then centrifuged at 2500 g at 5°C for 10 min. A second extraction of the resulting pellets was completed using the same volume of the solvent mixture (50 mL), and the combined supernatants for each sample were maintained at -18 °C until the beginning of the analysis. Aliquots of skin extracts were diluted with 0.1 N HCl (1:10, v/v), filtered (0.20 µm, polyester membrane, Chromafil PET 20/25, Macherey-Nagel, Düren, Germany) and directly injected onto the HPLC to determine the anthocyanins.

The anthocyanins present in grape skin extracts usually interfere significantly in the chromatographic separation and identification of other phenolic compounds, particularly flavonols. The use of ECX SPE cartridges (40 µm, 500 mg, 6 mL; Scharlab, Sentmenat, Barcelona, Spain), which combine a mixture of reverse-phase adsorbent and cationic-exchanger material, allowed the isolation of non-anthocyanin phenolic compounds from the Bordô grape (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009a), which were used to analyze flavonols, hydroxycinnamic acid derivatives, and stilbenes. To carry out this step, 3 mL of Bordô grape skin extracts were first concentrated in a rotary evaporator (37°C) to eliminate any excess methanol. The extracts were diluted with 3 mL of 0.1 N HCl, and the prepared samples were then passed through the SPE cartridges that had been previously conditioned with 5 mL of methanol and 5 mL of water. After washing of the cartridges in a solution of 5 mL of 0.1 N HCl acid and 5 mL of water, the free-anthocyanin fraction was eluted with 3 x 5 mL of methanol. This eluate was dried in a rotary evaporator (37°C) and re-solved in 3 mL of 20% methanol in water and directly injected into the HPLC equipment.

The peeled berries were finger-pressed to separate the flesh (yield, 56.20 % of fresh fruit weight) and the seeds (yield, 3.15% of fresh fruit weight). The separated flesh was immediately homogenized with 100 mL of a solvent mixture of methanol, water, and formic acid (50:48.5:1.5 v/v), thus avoiding oxidation, followed by 30 min of agitation in the absence of light at room temperature. The flesh extract was then centrifuged at 10000 g at 5°C for 20 min. The supernatant was dried separately in a rotary evaporator (37°C) to eliminate excess

methanol, and its volume was brought to 100 mL using water. To remove the sugars and other polar non-phenolics present in the flesh extract, 3 mL of extract were first diluted with 3 mL of 0.1 N HCl, and the prepared sample was then passed through C18 SPE-cartridges (Sep-Pak Vac, 3cc/500 mg, 55-105  $\mu$ m; Waters) that had been previously conditioned with 5 mL of methanol and 5 mL of water. After washing with 5 mL of 0.1 N HCl and 5 mL of water, the sample was eluted with 3 x 5 mL of methanol. The eluate was dried in a rotary evaporator (37°C), re-solved in 3 mL of 20% methanol in water and directly injected onto the HPLC equipment for the analysis of flesh flavonols and hydroxycinnamic acid derivatives.

Finally, the flavan-3-ols (monomers, B-type dimmers, and proanthocyanidins) were isolated from Bordô grape skin extracts using SPE on C18 cartridges (Sep-pak Plus C18, Waters Corp., Milford, MA; cartridges filled with 820 mg of adsorbent). A mixture of 2 mL of extracts with 0.5 mL of a solution of 20 mg/L of (+)-galocatechin 3-gallate (internal standard) and 6 mL of water was then passed through the C18 cartridge previously conditioned with methanol (10 mL) and water (10 mL); after the cartridge was dried under reduced pressure, methanol (15 mL) and ethyl acetate (5 mL) were added in order to recover adsorbed phenolics; after the solvent was evaporated in a rotary evaporator (40°C), the residue was dissolved in methanol (4 mL) and stored at -18°C until needed.

#### **2.4 Total phenolic content and antioxidant capacity**

Skin and flesh extracts were used to determine total phenolic content and antioxidant capacity. Total phenolic content was measured as mg of gallic acid equivalents following the Folin-Ciocalteu method (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999).

Antioxidant capacity was determined as mmol Trolox equivalents according to the DPPH method (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERST, 1995). The results were referred to kg of fresh grape weight, although other references were also calculated in the case of antioxidant capacity (mg per g of fresh skins, for total phenolic content;  $\mu$ mol or  $\mu$ M per g of dry weight skin, for antioxidant capacity) in order to better compare the results to those in the literature.

#### **2.5 HPLC-DAD-ESI-MS/MS Identification of Bordô grape phenolic compounds**

HPLC identification of Bordô grape skin and flesh phenolic compounds were performed using an Agilent 1200 Series system equipped with DAD (Agilent, Germany), and coupled to an AB Sciex 3200 Q TRAP (Applied Biosystems) electrospray ionization mass spectrometry system (ESI-MS/MS). The chromatographic system was managed by the



Agilent Chem Station (version B.01.03) data-processing station. The mass spectra data were processed with the Analyst MDS software (Applied Biosystems, version 1.5). The samples were injected after their filtration (0.20  $\mu\text{m}$ , polyester membrane, Chromafil PET 20/25, Machery-Nagel, Düren, Germany) on a reversed-phase column Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6  $\times$  250 mm; 5  $\mu\text{m}$  particle; Agilent, Germany).

In the case of grape skin anthocyanins, the diluted extracts were injected (50  $\mu\text{L}$ ) into the chromatographic column thermostated at 40°C. The chromatographic conditions were adapted from the OIV method for the analysis of anthocyanins in red wines (NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010). The solvents were water/acetonitrile/formic acid (87:3:10, v/v/v, solvent A; 40:50:10, v/v/v, solvent B), and the flow rate was 0.63 mL/min. The linear gradient for solvent B was as follows: zero min, 6%; 15 min, 30%; 30 min, 50%; 35 min, 60%; 38 min, 60%; 46 min, 6%. For identification, the ESI-MS/MS in positive ionization mode was operated using a combination of +EMS (enhanced mass spectrum; MS conditions) and +EPI (enhanced product ion; MS/MS conditions) experiments, setting the following parameters: scan, 100-1500 Da (250 Da/s); declustering potential, 65 V; entrance potential, 10; collision energy, 10; curtain gas, 15 psi; collision gas, medium; ion spray voltage, 4000; temperature, 450°C; ion source gas 1, 70; ion source gas 2, 50; and Q3 barrier, 12 V.

HPLC identification of Bordô grape skin and flesh flavonols, hydroxycinnamic acid derivatives, and stilbenes were performed on the same chromatographic system described for anthocyanins. However, the chromatographic conditions used were conditions that had been previously reported (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009a). The solvents were as follows: solvent A (acetonitrile/water/formic acid, 3:88.5:8.5, v/v/v), solvent B (acetonitrile/water/formic acid, 50:41.5:8.5, v/v/v), and solvent C (methanol/water/formic acid, 90:1.5:8.5, v/v/v). The flow rate was 0.63 mL/min, the column was thermostated at 40°C, and the injection volume was 50  $\mu\text{l}$ . The linear solvents gradient was as follows: zero min, 96% A and 4% B; 7 min, 96% A and 4% B; 38 min, 70% A, 17% B and 13% C; 52 min, 50% A, 30% B and 20% C; 52.5 min, 30% A, 40% B and 30% C; 57 min, 50% B and 50% C; 58 min, 50% B and 50% C; 65 min, 96% A and 4% B.

For identification, the ESI-MS/MS was used in negative ionization mode using a combination of -EMS (enhanced mass spectrum; MS conditions) and -EPI (enhanced product ion; MS/MS conditions) experiments, setting the following parameters: scan, 100-650 Da (1000 Da/s); declustering potential, -45 V; entrance potential, -12; collision energy, -20;



curtain gas, 15 psi; collision gas, high; ion spray voltage, -4000; temperature, 425°C; ion source gas 1, 70; ion source gas 2, 50; Q3 barrier, 12 V.

## **2.6 HPLC-DAD Quantification of Bordô grape phenolic compounds**

Anthocyanins and flavonols of the Bordô grape were quantified using an Agilent 1100 Series system (Agilent, Germany), equipped with DAD (G1315B), and coupled to an Agilent ChemStation (version B.01.03) data-processing station. The same column and chromatographic parameters (column model and temperature, solvents and gradient, injection volume) used in section 2.5 were applied. For quantification, DAD-chromatograms were extracted at 520 nm (anthocyanins), 360 nm (flavonols), and 320 nm (hydroxycinnamic acid derivatives and stilbenes).

## **2.7 Identification and quantification of Bordô grape skin flavan-3-ols using Multiple Reaction Monitoring HPLC-ESI-MS/MS**

The same chromatographic system employed for the identification of the other phenolic compounds was also used for both the identification and quantification of flavan-3-ols. The samples were injected (100  $\mu$ L) after filtration (0.20  $\mu$ m, polyester membrane, Chromafil PET 20/25, Machery-Nagel, Düren, Germany) on a reversed-phase column Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6  $\times$  250 mm; 5  $\mu$ m particle; Agilent, Germany), thermostated at 16 °C. The solvents used were water/methanol/formic acid (89:10:1, v/v/v, solvent A) and methanol (solvent B), and the flow rate was 0.5 mL/min. The linear gradient for solvent B was as follows: zero min, 1%; 2 min, 1%; 60 min, 23%; 75 min, 70%; 80 min, 95%; 90 min, 95%; 95 min, 1%; 100, 1%. Two MS scan types were used: Enhanced MS (EMS) for compound identification; and Multiple Reaction Monitoring (MRM) for quantification. MS conditions for both scan types were as follows: ion spray voltage, -4000; ion source temperature, 450°C; collision gas, high; curtain gas, 15; ion source gas 1, 70; ion source gas 2, 50; declustering potential, -35; entrance potential, -10; collision energy, -30; collision cell exit potential, -3.

In the case of the analysis of flavan-3-ol monomers and dimer procyanidins B1 and B2, 0.50 mL of the SPE-C18 grape skin extract was diluted with 2.5 mL of water in a chromatographic vial that was sealed, and the extract was then injected. The selected mass transitions ( $m/z$  pairs) for MRM scan and quantification were as follows: (+)-catechin and (-)-epicatechin (289-245); procyanidins B1 and B2 (577-425 and 577-407); (-)-epigallocatechin and (-)-gallocatechin (305-221 and 305-219); (-)-epicatechin 3-gallate (441-289); and (-)-gallocatechin 3-gallate (457-331 and 457-305). Calibration curves for each flavan-3-ol were

obtained in order to calculate the respective molar response factors against (-)-gallic acid, which was used as internal standard. Analyses were performed in duplicate.

The structural information of proanthocyanidins was obtained following the method of acid-catalyzed depolymerization induced by pyrogallol (BORDITA et al., 2009), a recently proposed alternative nucleophile trapping agent offers similar results when compared to the classic phloroglucinol method (KENNEDY; JONES, 2001), but allow working under milder experimental conditions. In this study, 0.25 mL of a pyrogallol reagent solution (100 g/L of pyrogallol and 20 g/L ascorbic acid in methanolic HCl 0.4 N) was added to 0.25 mL of SPE-C18 grape skin extract, and the mixture was then maintained at 35°C for 20 minutes. After which the reaction was interrupted with the addition of 2 mL of 40-mM sodium acetate, the reaction mixture was analyzed as described above for monomeric and dimeric flavan-3-ols.

In addition to the MRM transitions for monomeric flavan-3-ols (terminal units of proanthocyanidins), the following *m/z* pairs were also selected, corresponding to the pyrogallol adducts of the extension units of proanthocyanidins: (+)-catechin and (-)-epicatechin adducts (413-287); (-)-epigallocatechin adduct (429-303 and 429-261); and (-)-epicatechin 3-gallate adduct (565-413).

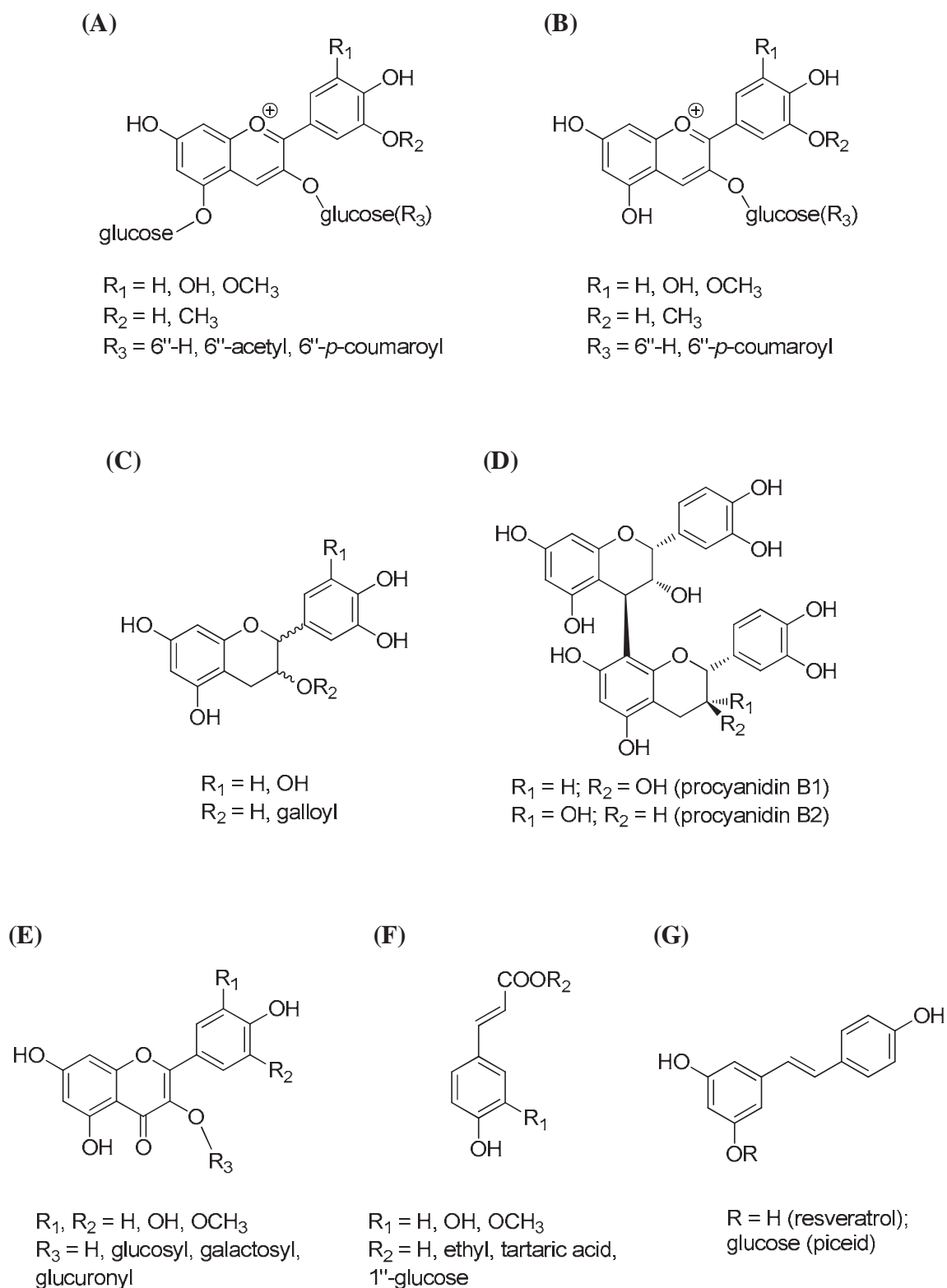
The calibration curve of the adduct formed between pyrogallol with (-)-epicatechin was obtained through depolymerization experiments of both procyanidins (B1 and B2), which allowed for the calculation of its molar response factor against (-)-gallic acid, which was used as internal standard. The factor response of the other adducts was assumed to be proportional to those obtained by their respective monomer precursors. Analyses were performed in duplicate.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

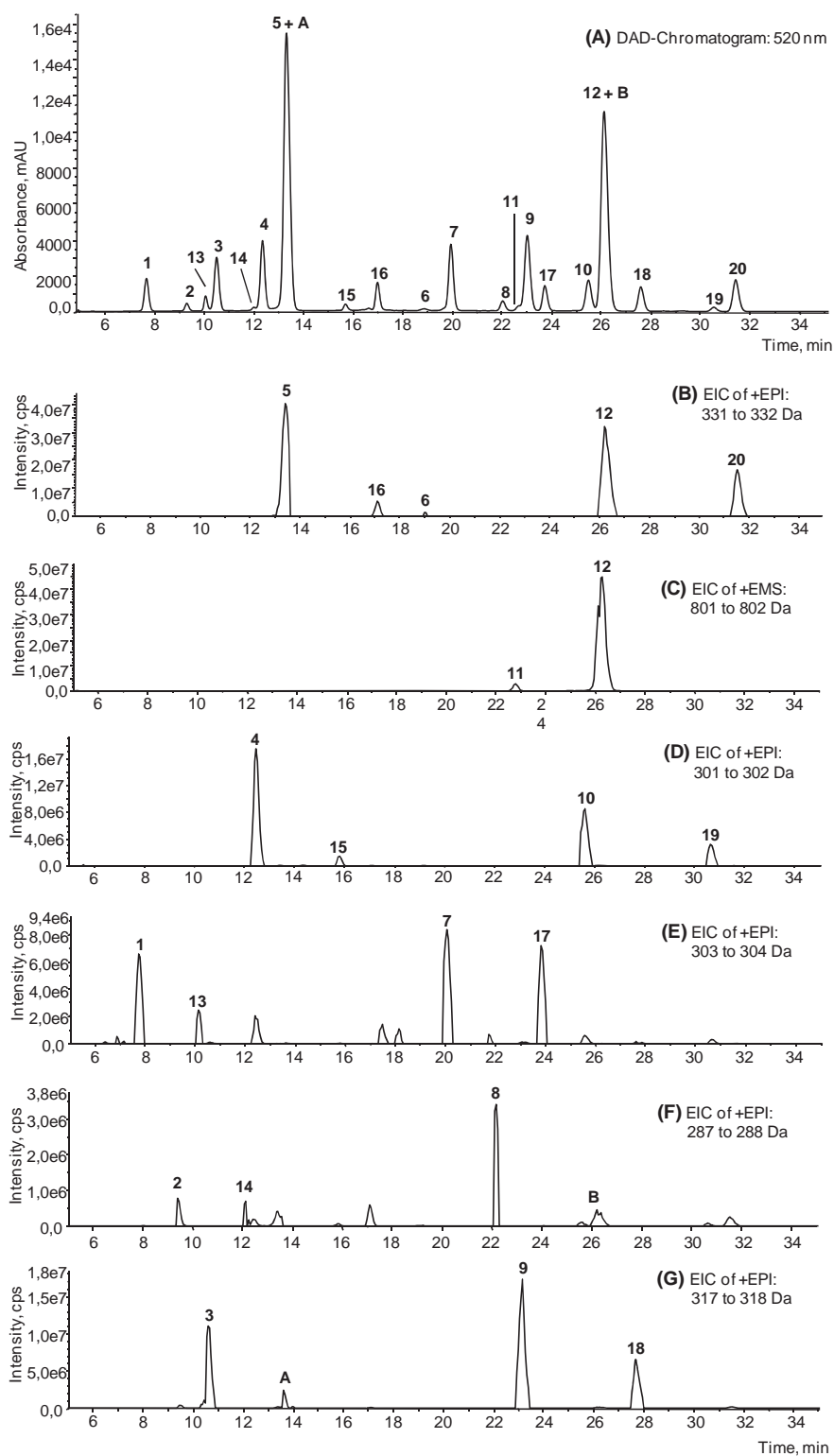
**Figure 2** summarizes the general structures of all of the classes of phenolic compounds identified in the skin and flesh of Bordô grapes.

#### 3.1 Anthocyanins

Anthocyanins occurred only in the Bordô grape skins. The typical chromatographic profile of Bordô grape skin anthocyanins is shown in **Figure 3A**, and their chromatographic and spectral characteristics (molecular and product ions under ESI-MS/MS, on-line DAD UV-vis  $\lambda_{\text{max}}$  values, and retention times) are presented in **Table 1** (peak numbers as in **Figure 3**).



**Figure 2.** General structures of the phenolic compound classes identified in Bordô grapes: anthocyanidin 3,5-diglucosides (A); anthocyanidin 3-glucosides (B); flavan-3-ol monomers (C); flavan-3-ol dimmers or B-type procyanidins (D); flavonol 3-glycosides (E); hydroxycinnamic acid derivatives (F); and resveratrol-type stilbenes (G).



**Figure 3.** Bordô grape anthocyanins: DAD-chromatogram at 520 nm (A); extracted ion chromatograms (EIC) in positive ionization mode at the  $m/z$  values corresponding to the different anthocyanidin-type product ions (+EPI, MS/MS conditions): malvidin (B), peonidin (D), delphinidin (E), cyanidin (F), and petunidin (G); EIC of +EPI at the  $m/z$  values of the expected same molecular ion (+EMS, MS conditions) corresponding to the cis and trans isomers of mv-3-cmglc-5-glc (C). For peak assignation see **Table 1**.

**Table 1.** Chromatographic, UV-vis and mass spectral characteristics of the anthocyanins identified in Bordô grape by HPLC-DAD-ESI-MS/MS (positive ionization mode), and molar proportions (mean value  $\pm$  standard deviation,  $n = 3$ ). Peak numbers as in **Figure 1**.

peak	assignation <sup>a</sup>	R <sub>f</sub> (min)	UV-vis (nm)	molecular and product ions ( <i>m/z</i> )	% molar
1	dp-3,5-diglc	7.68	277, 298 (sh), 346, 440 (sh), 522	627; 465, 303	1.68 $\pm$ 0.02
2	cy-3,5-diglc	9.32	280, 292 (sh), 325 (sh), 380 (sh), 440 (sh), 515	611; 449, 287	0.33 $\pm$ 0.00
3	pt-3,5-diglc	10.51	276, 298 (sh), 348, 440 (sh), 524	641; 479, 317	3.62 $\pm$ 0.03
4	pn-3,5-diglc	12.36	280, 292 (sh), 325 (sh), 380 (sh), 440 (sh), 515	625; 463, 301	5.18 $\pm$ 0.05
5	mv-3,5-diglc	13.33	276, 298 (sh), 348, 440 (sh), 526	655; 493, 331	30.35 $\pm$ 0.04
6	mv-3acglc-5glc	18.87	275, 296 (sh), 345, 528	697; 535, 493, 331	1.01 $\pm$ 0.04
7	dp-3cmglc-5glc	19.96	279, 298, 316 (sh), 529	773; 611, 465, 303	5.11 $\pm$ 0.05
8	cy-3cmglc-5glc	22.05	280, 290 (sh), 312, 521	757; 595, 449, 287	0.77 $\pm$ 0.01
9	pt-3cmglc-5glc	23.03	279, 298, 316 (sh), 531	787; 625, 479, 317	8.04 $\pm$ 0.05
10	pn-3cmglc-5glc	25.50	280, 290 (sh), 312, 521	771; 609, 463, 301	3.64 $\pm$ 0.00
11	mv-3-cis-cmglc-5glc	22.72	280, 298, 312 (sh), 534	801; 639, 493, 331	0.55 $\pm$ 0.01
12	mv-3-trans-cmglc-5glc	26.13	279, 299, 316 (sh), 533	801; 639, 493, 331	29.61 $\pm$ 0.09
13	dp-3glc	10.07	277, 298 (sh), 346, 440 (sh), 524	465; 303	0.36 $\pm$ 0.00
14	cy-3glc	12.02	280, 292 (sh), 325 (sh), 380 (sh), 440 (sh), 517	449; 287	0.11 $\pm$ 0.00
A	pt-3glc	13.50	276, 298 (sh), 348, 440 (sh), 527	479; 317	NQ
15	pn-3glc	15.73	280, 292 (sh), 325 (sh), 380 (sh), 440 (sh), 518	463; 301	0.29 $\pm$ 0.01
16	mv-3glc	17.00	276, 298 (sh), 348, 440 (sh), 528	493; 331	1.57 $\pm$ 0.11
17	dp-3cmglc	23.74	282, 298 (sh), 316 (sh), 440 (sh), 530	611; 303	1.40 $\pm$ 0.01
B	cy-3cmglc	26.09	283, 313, 440 (sh), 522	595; 287	NQ
18	pt-3cmglc	27.61	282, 298 (sh), 316 (sh), 440 (sh), 531	625; 317	2.19 $\pm$ 0.00
19	pn-3cmglc	30.55	283, 313, 440 (sh), 521	609; 301	0.41 $\pm$ 0.01
20	mv-3cmglc	31.43	284, 298 (sh), 316 (sh), 440 (sh), 532	639; 331	3.77 $\pm$ 0.07
Total (mg/kg)*		-	-	-	1359.68 $\pm$ 43.76

<sup>a</sup>dp, delphinidin; cy, cyanidin; pt, petunidin; pn, peonidin; mv, malvidin; glc, glucoside; diglc, diglucoside; acglc, acetylglucoside; cmglc, coumaroylglucoside; NQ, non-quantifiable. \* As malvidin 3,5-diglucoside equivalents (mv-3,5-diglc).

With the help of extracted ion chromatograms (EIC) at the  $m/z$  ratios corresponding to the different anthocyanidins (aglycones), we were able to detect a total of twenty-two anthocyanins in the grape skin (**Figures 3B-3G**). However, we were unable to quantify two of these anthocyanins (peaks A and B) (**Table 1**) because they were very minor compounds that partially coeluted with major malvidin 3,5-diglucoside (peak 5) and its *p*-coumaroyl derivative (peak 12), respectively.

The anthocyanin profile of the Bordô grape was complex due to the presence of five different anthocyanidin aglycones; namely, delphinidin (dp), cyanidin (cy), petunidin (pt), peonidin (pn), and malvidin (mv), having different patterns of B-ring substitution. Neither chromatographic evidence (use of authentic standard) nor mass spectral evidence of the occurrence of pelargonidin-based anthocyanins in grape skin was found, even though pelargonidin 3-glucoside has already been reported in juices of non-vinifera grapes such as Concord (*V. labrusca*), Rubired and Salvador (hybrids from *V. rupestris* and *V. vinifera*) (WANG; RACE; SHRIKHANDE, 2003), as well as in the Garnacha Tintorera grape (*V. vinifera*) (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b). In addition to these findings, pelargonidin 3,5-*o*-diglucoside has been reported in the *V. amurensis* grape (ZHAO; DUAN; WANG, 2010).

The most abundant anthocyanins were those in the group of 3,5-diglucoside derivatives (**Table 1**), with high concentrations of malvidin 3,5-diglucoside (peak 5) and its *p*-coumaroyl derivative (mv-3-trans-cmglc-5glc, peak 12), both accounting for approximately 30% each. These results are in agreement with those reported for other non-vinifera grapes, in which there is a significant amount of malvidin 3,5-diglucoside; and grape samples are usually analyzed for malvidin 3,5-diglucoside equivalents (MUÑOZ-ESPADA et al., 2004). In contrast, malvidin 3-glucoside and its derivatives, mainly acetyl and *p*-coumaroyl derivatives, are usually the major anthocyanins found in *V. vinifera* grapes (HERMOSÍN-GUTIÉRREZ; GARCÍA-ROMERO, 2004).

In this study, small amounts of peonidin 3,5-diglucoside (peak 4) followed by petunidin 3,5-diglucoside (peak 3) and delphinidin 3,5-diglucoside (peak 1) were also found, along with cyanidin 3,5-diglucoside (peak 2), though it was a very minor anthocyanin (less than 0.4%) (**Table 1**). Small amounts of 3-(*p*-coumaroyl)-glucoside-5-glucosides of delphinidin (peak 7), cyanidin (peak 8), petunidin (peak 9) and peonidin (peak 10) were also found, which, all together, accounted for approximately 17.6% of the total concentration of anthocyanins.

A detailed assignment of the anthocyanin peaks detected in Bordô grape extract is depicted in **Figures 3B-3G** and summarized in **Table 1**. The ESI-MS/MS spectrum of peak 5

revealed the molecular ion ( $[M]^+$ ) at  $m/z$  655 and two product ions at  $m/z$  493 and 331, which corresponded to the independent losses of the two hexoses units ( $[M-162]^+$  and  $[M-162-162]^+$ ), as well as the signal at  $m/z$  331 attributable to the aglycone malvidin. Based on the differences between the molecular and product ions, the loss of 162 amu gives a clue as to the nature of the sugar molecule and the fragmentation pattern matched with those of authentic standard of malvidin 3,5-diglucoside. The UV-vis showed a visible maximum in the red-colour region at 526 nm. The UV-vis also revealed a lack of a shoulder around 440 nm, which is characteristic of anthocyanidin 3,5-diglucosides (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2010). All of the aforementioned results, along with the chromatographic coincidence with an authentic standard of the suspected compound, suggest that the anthocyanin eluting under peak 5 could be assigned as malvidin 3,5-diglucoside.

The other 3,5-diglucosylated anthocyanins were assigned based on their UV-vis and mass spectra, their chromatographic characteristics (retention time and elution order) and also on the same arguments used for the assignment of peak 5. Their mass spectra (dp-, cy-, pt- and pn-derivatives) showed the signals expected for their molecular ion ( $[M]^+$ ) ( $m/z$  625, 641, 627 and 611, respectively), and for the two product ions as a result of the independent losses of two hexoses (one linked to the C-3 position and the other to the C-5 position). These sugar units were assigned as glucose, as suggested by the matching of the chromatographic and spectral data obtained (UV-vis and ESI-MS/MS) with those of authentic standards for two of these compounds (3,5-diglucosides of cyanidin and peonidin). As expected, the 3,5-diglucosylated anthocyanins that were found exhibited an increasing order of elution (dp, cy, pt, pn, and mv) as a function of the number of hydroxyl groups and their degree of methoxylation of the aglycone, results which were also found in the case of monomeric anthocyanins (HERMOSÍN-GUTIÉRREZ; GARCÍA-ROMERO, 2004).

In the case of the acylated anthocyanins, compound 12 showed the molecular ion ( $[M]^+$ ) at  $m/z$  801 and three product ions at  $m/z$  639, 493 and 331, which can be assigned to the independent losses of the 3-(6''-*p*-coumaroyl)-glucosidic and 5-glucosidic moieties. The 3-(6''-*p*-coumaroyl)-glucosidic substituent was entirely lost, because no signal for a single loss of a *p*-coumaroyl residue was found ( $[M-146]^+$ ). Their chromatographic and spectral characteristics (molecular and product ions under ESI-MS/MS, on-line DAD UV-vis  $\lambda_{\max}$  values, and retention times) suggested that the identification of the compound eluted at peak 12 was malvidin-3-trans-coumaroylglucoside-5-glucoside (mv-3-trans-cmglc-5-glc). A second signal in the EIC at  $m/z$  801 (**Figure 3C**) was assigned as its minor isomer cis (mv-3-cis-cmglc-5-glc, peak 11), because it showed a mass fragmentation pattern similar to that



shown by compound eluting at peak 12. The *p*-coumaroylated anthocyanins presented UV-vis spectra with a new shoulder corresponding to the *p*-coumaroyl fragment, which may be in *trans* (majority) isomeric configuration as well as *cis* (minority). However, an alteration in the UV-vis spectra was observed for isomer *cis*, mainly on the UV shoulder, due to *p*-coumaroyl residue, in which a lower value for wavelength is seen. Also, as is expected for the elution pattern of these acylated anthocyanins, the *cis* isomer eluted before the *trans* isomer (NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010).

The mass spectra of the other *p*-coumaroyl diglucosylated anthocyanins (peaks 7-10) also revealed the signals expected for their molecular ion ( $[M]^+$ ) ( $m/z$  773, 757, 787 and 771, respectively) and also for the three expected product ions as a result of the independent losses of the 5-glucosidic and the 3-(6''-coumaroyl)-glucosidic moieties. Thus, these acylated anthocyanins were assigned based on their UV-vis and mass spectra, their chromatographic characteristics (retention time and elution order), and also on the same arguments used for the assignation of peak 12, as being dp-3-cmglc-5-glc (peak 7), cy-3-cmglc-5-glc (peak 8), pt-3-cmglc-5-glc (peak 9) and pn-3-cmglc-5-glc (peak 10), and it was assumed that only *trans* isomers of the 3-cmglc moiety were detected.

Only a very small amount of one of the acetylated derivatives of diglucosylated anthocyanins was detected. This compound (peak 6) showed the molecular ion ( $[M]^+$ ) at  $m/z$  697 and three product ions at  $m/z$  535, 493 and 331, in agreement with the independent losses of the 5-glucosidic and the 3-(6''-acetyl)-glucosidic moieties. The chromatographic and spectral characteristics (molecular and product ions under ESI-MS, on-line DAD UV-vis  $\lambda_{\max}$  values, and retention times) suggested that the identification of this compound was malvidin-3-acetylglucoside-5-glicoside (mv-3-acglc-5glc). It should be noted that the acetylated derivative of malvidin (mv-3-acglc-5-glc) presented an UV-vis spectrum that practically matched to that of its non acetylated derivative (mv-3,5-diglc).

With regards to anthocyanidin 3-glucosides, five 3-glucoside anthocyanins (peaks 13, 14, 15, A and 16) and five 3-(6''-*p*-coumaroyl)-glucoside anthocyanins (17, B, 18, 19 and 20) were detected. Mass fragmentation patterns matched those reported for 3-glucosylated and 3-(6''-*p*-coumaroyl)-glucosylated monomeric anthocyanins: the release of dehydrated forms of glucose and 6''-*p*-coumaroyl-glucose yielded losses of 162 and 308 Da, respectively. The mass spectra of peaks 13-16 showed molecular ions ( $[M]^+$ ) at  $m/z$  465, 449, 463 and 493, respectively. Only one product ion related to the loss of a glucose ( $[M-162]^+$ ) was observed in each case: at 303, 287, 301 and 331, respectively. Along with the comparison of the UV-vis spectrum and the coincidence with the chromatographic anthocyanin standards of malvidin

and cyanidin 3-glucosides, these anthocyanins were assigned as delphinidin 3-glucoside (peak 13), cyanidin 3-glucoside (peak 14), peonidin 3-glucoside (peak 15) and malvidin 3-glucoside (peak 16). ESI-MS/MS revealed that peaks 5 and A partially coeluted at retention times of 13.33 and 13.50 min, respectively. Peak A was identified as petunidin 3-glucoside, because it showed molecular ion ( $[M]^+$ ) at  $m/z$  479 and resulted in only one product ion at  $m/z$  317, which itself was as a result of the loss of a glucose ( $[M-162]^+$ ); however, peak A could not be quantified. The 3-monoglucosylated anthocyanins made up a total of approximately 2% of the total anthocyanin concentration.

All *p*-coumaroyl derivatives of the monoglucosylated anthocyanins were found in small concentrations, jointly accounting for only 7.77 % of total anthocyanin concentration, a proportion which was higher than that of their respective non-acylated compounds, and which was in sharp contrast to what is usually observed for *V. vinifera* grapes with a predominance of non-acylated anthocyanins (HERMOSÍN-GUTIÉRREZ; GARCÍA-ROMERO, 2004). The ESI-MS/MS spectra of these anthocyanins (peaks 17-20) showed the signals expected for their molecular ion ( $[M]^+$ ) ( $m/z$  611, 625, 609 and 639, respectively) and also for the product ions ( $m/z$  303, 317, 301 and 331, respectively) as a result of the loss of the entire 3-(6''-coumaroyl)-glucosidic moiety ( $[M-308]^+$ ).

The chromatographic and spectral characteristics (molecular and product ions under ESI-MS, on-line DAD UV-vis  $\lambda_{\max}$  values, and retention times) were used to identify the compounds as delphinidin 3-(6''-*p*-coumaroyl)-glucoside, petunidin 3-(6''-*p*-coumaroyl)-glucoside, peonidin 3-(6''-*p*-coumaroyl)-glucoside and malvidin 3-(6''-*p*-coumaroyl)-glucoside. The ESI-MS/MS revealed that peaks 12 and B partially coeluted at retention times of 26.13 and 26.09 min, respectively. The extracted ion chromatogram (ESI-MS) mass spectrum indicated the identification of peak B as being cyanidin 3-(6''-*p*-coumaroyl)-glucoside. However, it could not be quantified.

It should be noted that it was not possible to identify the minor *cis* isomer of malvidin-3-(6''-*p*-coumaroyl)-glucoside (mv-3-*cis*-cmglc), and that neither acetylated nor caffeoylated anthocyanins were detected among monomeric anthocyanins. Considering these results, it can be concluded that the anthocyanins identified were fundamentally 3,5-diglucosides, making up almost 90% of the total when considered with monoglucosylated anthocyanin concentration (10%). These results confirm that the Bordô grape is a non-*vinifera* variety, since the main characteristic of *V. labrusca* is the predominant presence of diglucosylated anthocyanins, while the anthocyanins of *vinifera* grapes (*Vitis vinifera*) are derived from anthocyanidins 3-glucosides (NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010).

Total anthocyanin content was  $1359.68 \pm 43.76$  mg of malvidin 3,5-diglucoside equivalents per kg of fresh fruit. This content is within the range found for other non-vinifera grapes, such as Concord (*Vitis labrusca*), Marechal Foch (*V. rupestris* and *V. vinifera*) and Norton (*V. aestivalis*) (1116 - 2750 mg of malvidin 3,5-diglucoside equivalents/kg of fresh fruit) (MUÑOZ-ESPADA et al., 2004), as well as for Folha de Figo (*Vitis labrusca*) and Niágara Rosada (*Vitis labrusca*) varieties (60.7 - 1550 mg of cyanidin equivalents /kg of fresh fruit, which correspond to 146 - 3779 mg of malvidin 3,5-diglucoside equivalents /kg) (ABE et al., 2007).

It is known that 3,5-diglucoside-type anthocyanins are more stable than 3-glucoside-types because they offer steric hindrance for the reactions between anthocyanins and tannins involving the C-4 position of anthocyanin (formation of anthocyanin-tannin adducts, whether mediated by acetaldehyde or not), as well as the formation of pyranoanthocyanins, which requires the hydroxyl OH at C-5 position of anthocyanin to be free (RENTZSCH et al., 2007). Thus, structural characteristics of anthocyanins associated with the high content of the phenolics compounds present in Bordô grapes reveal this variety's potential use in the preparation of red table wines with a more stable and attractive color when compared to wines made with vinifera grapes (*Vitis vinifera*). The color of wines made from vinifera grapes changes over time due to both the decrease in color and the progressive alteration of tonality from purple-red to brown-orange that is caused by reactions between anthocyanins and tannins and the formation of pyranoanthocyanins (SANTOS-BUELGA; DE FREITAS, 2009).

These results also reinforce the suggestion of using wine from Bordô variety in assemblages of wines made with other varieties of grapes that present color deficiencies, such as Isabel, Niágara Rosada, and Concord grapes. Wine made from Niágara Rosada grapes, for example, is a drink with aroma and taste widely enjoyed by consumers, but it has a faint and unstable pink color that rapidly changes to yellowish hues. The use of wine assemblage techniques involving the Bordô grape variety wine has already shown good results (BARNABÉ; VENTURINI-FILHO; BOLINI, 2007).

### 3.2 Flavonols

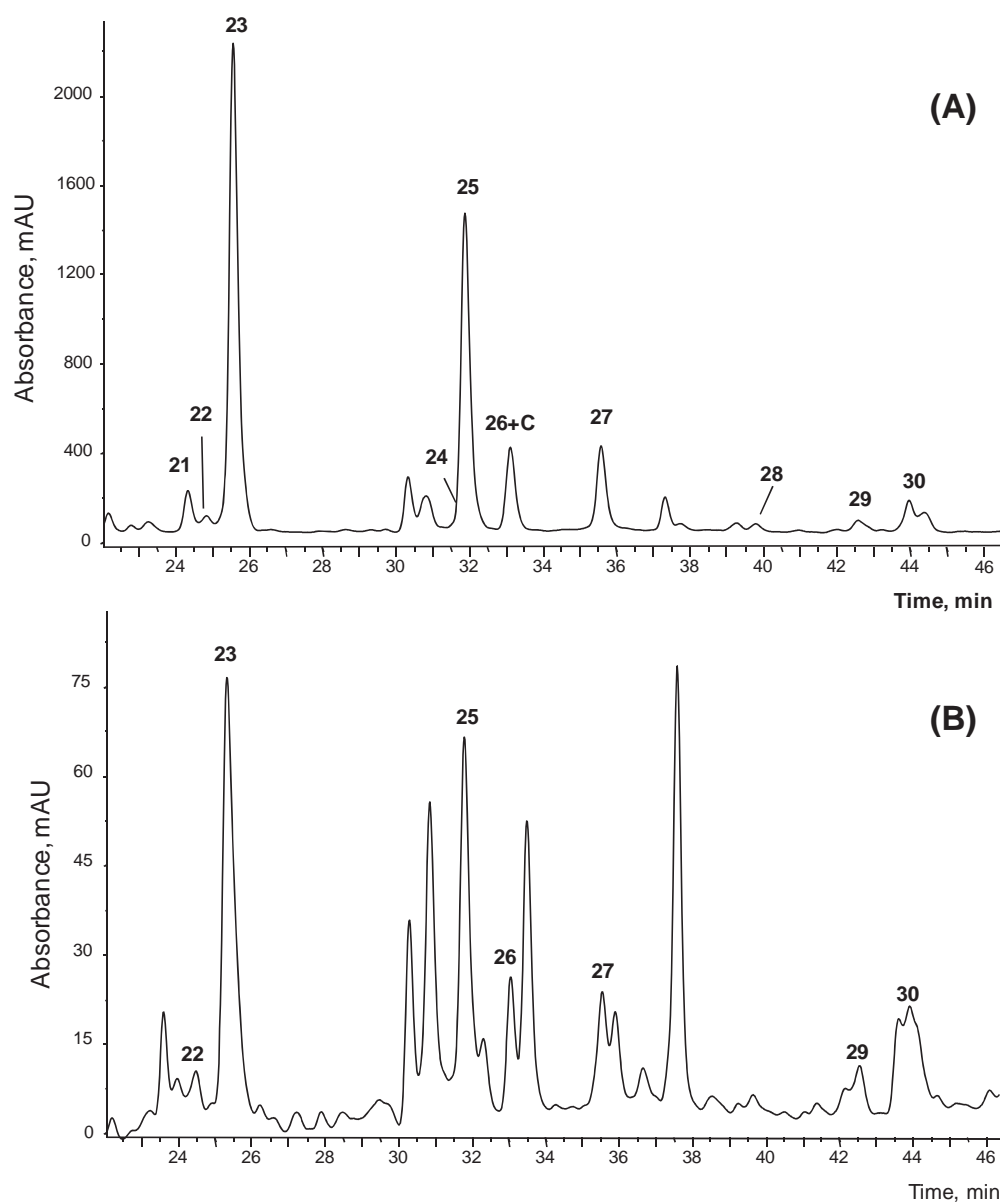
The anthocyanin-free grape extracts made it easier to study the flavonols present in Bordô grapes. The total content of flavonols in the Bordô grapes was approximately 154  $\mu\text{mol/kg}$  fresh grape weight, and it was mainly located in the skins (**Table 2**).

**Table 2.** Chromatographic, UV-vis and mass spectral characteristics of the flavonols identified in Bordô grape by HPLC-DAD-ESI-MS/MS (negative ionization mode), and molar proportions (mean value  $\pm$  standard deviation) of each individual flavonol in both parts of fruit (skin and flesh). Peak numbers as in **Figure 2**.

peak	assignment <sup>a</sup>	R <sub>f</sub> (min)	UV-vis (nm)	pseudomolecular and product ions ( <i>m/z</i> )	molar % (skin, n=3)	molar % (flesh, n=3)
21	M-3-glcU	24.35	257 (sh), 260, 305 (sh), 354	493; 317	4.89 $\pm$ 0.07	ND
22	M-3-gal	24.85	254 (sh), 261, 305 (sh), 356	479; 317	1.57 $\pm$ 0.20 *	3.81 $\pm$ 0.18 **
23	M-3-glc	25.58	255 (sh), 261, 305 (sh), 355	479; 317	47.89 $\pm$ 0.24 *	51.02 $\pm$ 1.23 **
24	Q-3-gal	31.75	256, 264 (sh), 302 (sh), 354	463; 301	NQ	ND
25	Q-3-glcU	31.95	254, 264 (sh), 300 (sh), 353	477; 301	25.19 $\pm$ 0.14 **	18.19 $\pm$ 2.25 *
C	Q-3-rut	33.10	256, 264 (sh), 300 (sh), 354	609; 301	0.33 $\pm$ 0.01	ND
26	Q-3-glc	33.20	256, 264 (sh), 300 (sh), 354	463; 301	6.32 $\pm$ 0.26 **	4.24 $\pm$ 0.66 *
27	L-3-glc	35.69	255, 262 (sh), 305 (sh), 357	493; 331	9.15 $\pm$ 0.22	9.23 $\pm$ 1.98
28	K-3-glc	37.90	264, 300 (sh), 325 (sh), 349	447; 285	0.72 $\pm$ 0.04	ND
29	I-3-glc	42.77	254, 264 (sh), 300 (sh), 354	477; 315	1.24 $\pm$ 0.04 *	4.34 $\pm$ 0.53 **
30	S-3-glc	44.17	253, 264 (sh), 305 (sh), 357	507; 345	2.70 $\pm$ 0.18 *	9.16 $\pm$ 0.49 **
Total ( $\mu$ mol/kg)		-	-	-	152.88 $\pm$ 17.86 **	1.44 $\pm$ 0.01 *

<sup>a</sup> M, myricetin; Q, quercetin; L, laricitrin; K, kaempferol; I, isorhamnetin; S, syringetin; glcU, glucuronide; gal, galactoside; glc, glucoside; rut, rutinoside (6"-rhamnosylglucoside); ND, non-detectable. NQ, non-quantifiable. (\*, \*\*) indicated significant differences (Student "t" test;  $\alpha$  = 0.05) between skin and flesh composition.

Content values were within the range found for many other varieties of vinifera grapes (129-346  $\mu\text{mol/kg}$ ) (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2007). **Figure 4** shows the DAD-chromatogram of the flavonols (detection at 360 nm) from Bordô grape skins (**Figure 4A**) and flesh (**Figure 4B**), and their chromatographic and spectral characteristics (molecular and product ions under ESI-MS/MS, on-line DAD UV-vis  $\lambda_{\text{max}}$  values, and retention times) are presented in **Table 2**. The data obtained was consistent with previous reports involving the analysis of flavonols present in different varieties of grapes (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2007; CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009a; CANTOS; ESPÍAN; TOMÁS-BARBERÁN, 2002).



**Figure 4.** HPLC-DAD chromatogram (detection at 360 nm) of grape skin (A) and flesh (B) flavonols of Bordô grape. For peak assignment see **Table 2**.

The flavonols that were detected and identified in Bordô grapes using LC-MS occurred only as 3-glycosides of six aglycone flavonol structures, following the B-ring substitution pattern: kaempferol (K; 1xOH); quercetin (Q; 2xOH); isorhamnetin (I; 1xOH, 1xOCH<sub>3</sub>); myricetin (M; 3xOH); laricitrin (L; 2xOH, 1xOCH<sub>3</sub>); and syringetin (S; 1xOH, 2xOCH<sub>3</sub>). As in the case of anthocyanins, the value of the wavelength of the absorption maximum close to the visible zone of the UV-vis spectra shows a small difference due to B-ring substitution levels, which were found in the kaempferol derivatives (mono-substituted) at 349 nm; in the quercetin and isorhamnetin derivatives (di-substituted) at 353-354 nm; and in the derivatives of tri-substituted structures (myricetin, laricitrin and syringetin) at 354-357 nm. All of the aforementioned results were consistent with those reported for *V. vinifera* red wine grapes (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009a).

The flavonols that occur in Bordô grape skin made up the series of 3-glucosides (3-glc), 3-galactosides (3-gal), and 3-glucuronides (3-glcU) of myricetin and quercetin, except for Q-3-gal, and only the derivatives 3-glc of the other flavonols (kaempferol, isorhamnetin, laricitrin and syringetin) were detected. In the case of quercetin, the presence of a diglycoside at C-3 position (quercetin 3-*O*-(6''-rhamnosyl)-glucoside, also known as rutin) was also detected as a very minor flavonol, as has been previously described for *V. vinifera* grape cultivars (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009a). The aforementioned results were in agreement with the occurrence of eight main flavonols found in *V. vinifera* grape cultivars (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2007). However, the complete series of 3-glc, 3-gal and 3-glcU of the six flavonol aglycones have been found in *V. vinifera* grapes (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009a).

In the flesh of the Bordô grape, in which there is an absence of anthocyanins, much lower amounts of flavonols were detected (approximately 100 times lower when compared to the skin). Therefore, some of the flavonols present in the skin were not detected in the flesh, as was the case of compounds M-3-glcU, Q-3-rut and K-3-glc. None of the compounds identified in both parts of the fruit were acylated, as has been also found in *V. vinifera* grapes (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009a) and red wine from the non-vinifera Isabel grape (NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010).

The flavonol profiles found in the skin and flesh were different, especially regarding the change in the proportions of 3-glucuronide derivatives (M-3-glcU was not detected in flesh and Q-3-glcU decreased its proportion from 25% in the skin to 18% in the flesh). In both cases, myricetin-type flavonols were predominant, with a total of approximately 47 and 51% in both skin and flesh, respectively. The compounds that were derived from quercetin also

presented relevant concentrations in both grape parts (32% in skin and 22% in flesh). Myricetin 3-glucoside and, especially quercetin 3-glucoside, were the most important flavonols in the skin of Garnacha tintorera (*V. vinifera*) (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b); however, the importance of myricetin 3-glucoside decreased in the berry's flesh.

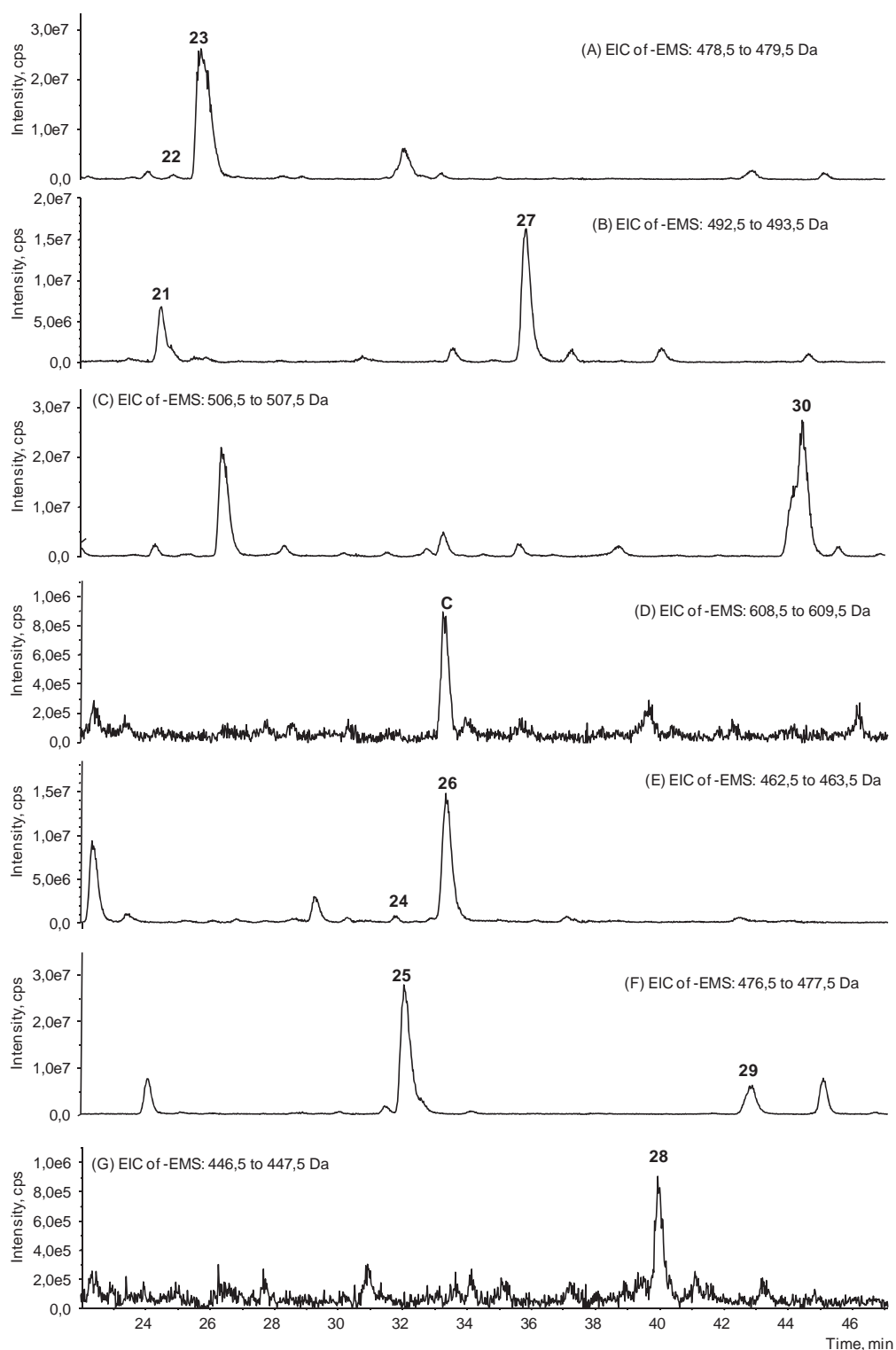
In this study, though, the minor flavonols consisted of laricitrin-type flavonols (accounting for 9% of the total flavonol concentration for both skin and flesh of the Bordô grape), syringetin-type flavonols (with 9% in the flesh and less than 3% in the skin), followed by isorhamnetin-type flavonols (which accounted for very low total concentrations: less than 5%). Kaempferol-type flavonols were detected only in trace proportions (less than 1% and only in the skin).

The identification of peaks 23, 26, 27, 28, 29 and 30 as being the complete series of 3-glc flavonols (M, Q, L, K, I and S, respectively), as well as the identification of peaks 22 and 24 as being from the series of 3-gal flavonols (M-3-gal and Q-gal), were based on their ESI-MS/MS signals corresponding to the pseudomolecular ion ( $[M-H]^-$ ) at  $m/z$  at 479 for M-type, 463 for Q-type, 493 for L-type, 447 for K-type, 477 for I-type, and 507 for S-type flavonols) and to product ions ( $m/z$  at 317, 301, 331, 285, 315 and 345, respectively) that were generated by the loss of a hexose fragment for both 3-galactoside and 3-glucoside derivatives ( $[(M-162)-H]^-$ ).

**Figure 5** illustrates the assignments made with the help of extracted ion chromatograms (EIC) at the  $m/z$  values of the expected pseudomolecular ions for each individual flavonol (some of which have coincident values). Since the UV-vis spectra of the different derivatives (3-glc and 3-gal) of the same aglycone flavonol were practically identical, the 3-galactoside and 3-glucoside derivatives were distinguished by a remarkable characteristic: the 3-galactoside flavonol derivatives always eluted before their corresponding 3-glucoside derivatives under the reversed-phase HPLC conditions used (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009a).

Peaks 21 and 25 were identified as 3-glucuronide derivatives of myricetin and quercetin, respectively, even though peak 25 partially overlapped with Q-3-gal (peak 24) due to the characteristic loss of a fragment of 176  $m/z$  units corresponding to a glucuronic acid molecule attached to the aglycone, the latter of which showed the expected values of  $m/z$  for myricetin (317) and quercetin (301).





**Figure 5.** Bordô grape flavonols. Extracted ion chromatograms (EIC) in negative ionization mode at the  $m/z$  values corresponding to the expected molecular ions (-EMS, MS conditions) corresponding to: 3-galactoside and 3-glucoside of myricetin (A); myricetin 3-glucuronide and laricitrin 3-glucoside (B); syringetin 3-glucoside (C); rutin or quercetin 3-rutinoside (D); 3-galactoside and 3-glucoside of quercetin (E); quercetin 3-glucuronide and isorhamnetin 3-glucoside (F); and kaempferol 3-glucoside (G). Peak numbers as in **Table 2**.

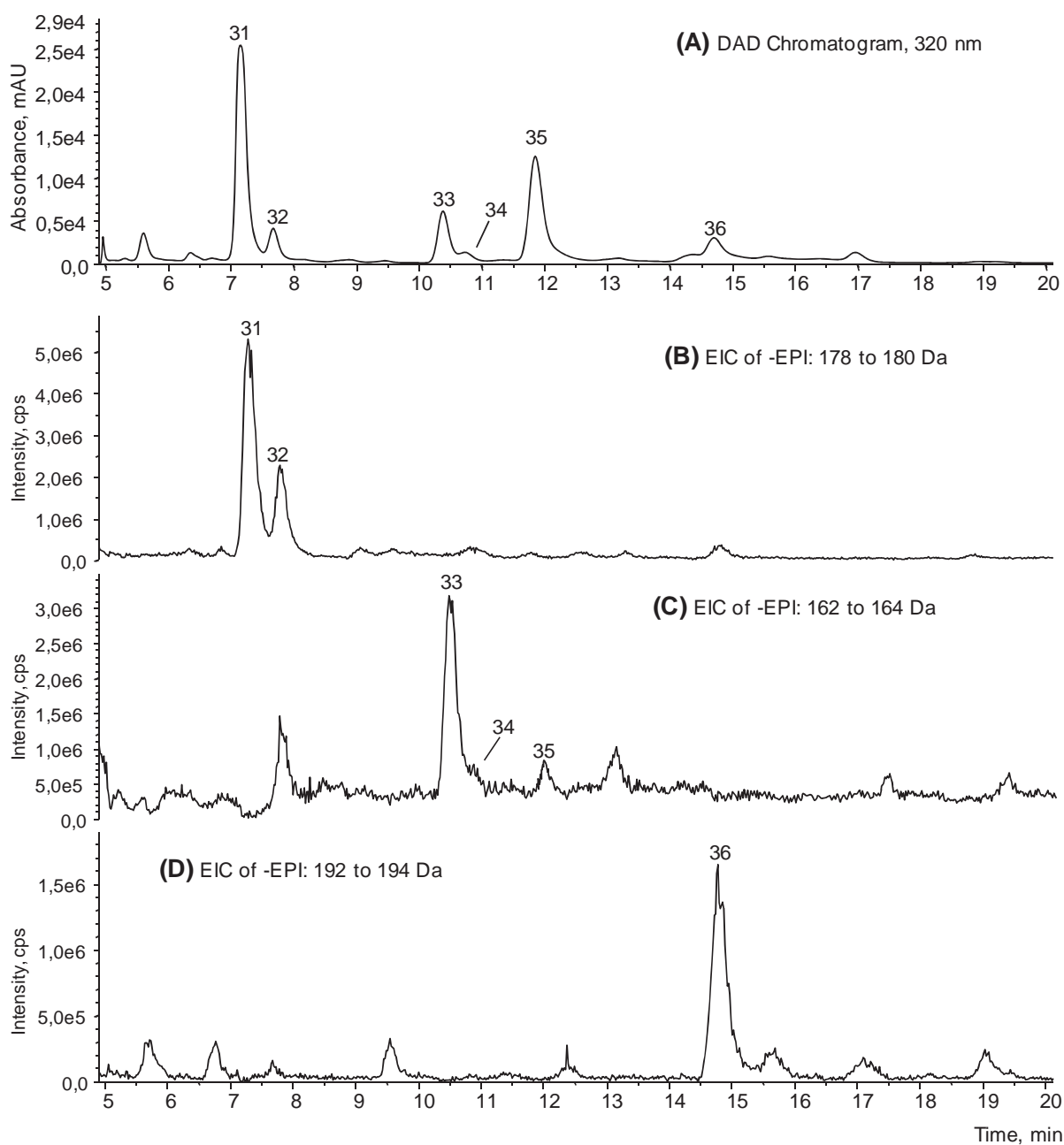
Peak C was identified after obtaining the EIC in negative ionization mode at the  $m/z$  value corresponding to the pseudomolecular ion of rutin ( $[M-H]^-$ ,  $m/z = 609$ ; **Figure 5D**). For the quantification of rutin, which partially coeluted with quercetin 3-glucoside (peak 26, **Figure 5E**), the ratio between the peak areas was obtained using standard solutions of both compounds in their corresponding DAD chromatograms at 360 nm, as well as in their respective EICs at the two characteristic pseudomolecular ion  $m/z$  values (609 and 463, respectively).

### 3.3 Hydroxycinnamic acid derivatives (HCAD) and stilbenes

The expected hydroxycinnamoyl-tartaric acids, which are also known as caftaric (from caffeic acid), coutaric (from *p*-coumaric acid), and fertaric (from ferulic acid) acids, were found in both the skin and flesh of Bordô grapes. The trans isomers of the aforementioned acids (peaks 31, 33 and 36 in **Figure 6**) were predominant, and the cis isomer was also detected only in the case of coutaric acid (peak 34 in **Figure 6**).

The identifications were based on the UV and MS data (**Table 3**). The signals attributable to the pseudomolecular ions ( $[M-H]^-$ ) at the expected  $m/z$  values ( $[M-H]^-$ , at  $m/z$  311, 295 and 325 from caftaric, coutaric and fertaric acids, respectively) resulted in product ions corresponding to the cleavage of the ester bond in two different ways (BUIARELLI et al., 2010): the releasing of the deprotonated hydroxycinnamic acid (HCA) moiety ( $[HCA-H]^-$ , at  $m/z$  179, 163 and 193 from caftaric, coutaric and fertaric acids, respectively; **Figures 6B-6D**), that further suffered decarboxylation under our MS/MS conditions ( $[(HCA-CO_2)-H]^-$ , at  $m/z$  135, 119 and 149 from caftaric, coutaric and fertaric acids, respectively); and the releasing of a common deprotonated tartaric acid ( $TH_2$ ) moiety ( $[TH]^-$ , at  $m/z$  149).

The extracted ion chromatograms (EIC) of Bordô grapes corresponding to the caffeic- and *p*-coumaric-type derivatives (**Figures 6B** and **6C**, respectively) showed two new peaks (peaks 32 and 35, respectively), which were assigned as the glucose esters of caffeic and *p*-coumaric acids, respectively. The main evidence came from the MS/MS spectra, which showed product ions to be attributable to the remaining hydroxycinnamic acid following the loss of the dehydrated glucose (162 Da) moiety ( $[(M-162)-H]^-$  at  $m/z$  179 and 163, respectively for peaks 32 and 35) and the subsequent decarboxylation product ions ( $[(M-162-CO_2)-H]^-$  at  $m/z$  135 and 119, respectively for peaks 32 and 35), which corresponded to  $m/z$  values that were also shown by the product ions of caftaric and coutaric acids, respectively (**Table 3**).



**Figure 6.** Bordô grape hydroxycinnamic acid derivatives. DAD-Chromatogram at 320 nm of grape flesh extract (A), and extracted ion chromatograms (EIC) in negative ionization mode at the  $m/z$  values corresponding to the expected product ions (-EPI, MS/MS conditions) corresponding to the different hydroxycinnamic-type derivatives: caffeic-type derivatives, common product ion at  $m/z$  179 (B); *p*-coumaric-type derivatives, common product ion at  $m/z$  163 (C); ferulic-type derivatives, common product ion at  $m/z$  193 (D). Peak numbers as in **Table 3**.

**Table 3.** Chromatographic, UV-vis and mass spectral characteristics of the hydroxycinnamic acid derivatives (HCAD) and stilbenes (resveratrol and is 3-glucoside, piceid) identified in Bordô grape by HPLC-DAD-ESI-MS/MS (negative ionization mode), molar proportions of each individual HCAD, total content of HCAD, and stilbene concentrations (mg/kg) in both parts of fruit (skin and flesh; mean value  $\pm$  standard deviation). Peak numbers as in **Figure 6**.

peak	assignment <sup>a</sup>	R <sub>t</sub> (min)	UV-vis (nm)	psedomolecular and product ions ( <i>m/z</i> )	molar % (skin, n=3)	molar % (flesh, n=3)
31	trans-CAFT	7.14	300 (sh), 328	311; 179, 149, 135	66.62 $\pm$ 0.71 **	53.17 $\pm$ 0.19 *
32	glc-CAFF	7.67	302 (sh), 328	341; 179, 161, 135, 133	5.74 $\pm$ 0.18	6.12 $\pm$ 0.87
33	trans-COUT	10.38	300 (sh), 310	295; 163, 149, 119	7.73 $\pm$ 0.27 *	9.59 $\pm$ 0.47 **
34	cis-COUT	10.73	300 (sh), 308	295; 163, 149, 119	3.81 $\pm$ 0.13 **	3.20 $\pm$ 0.16*
35	glc-COUM	11.85	300 (sh), 314	325; 163, 145, 119, 117	13.13 $\pm$ 0.05 *	25.30 $\pm$ 0.48 **
36	trans-FERT	14.70	300 (sh), 324	325; 193, 149	2.97 $\pm$ 0.54	2.63 $\pm$ 0.05
Total HACD ( $\mu$ mol/kg)		-	-	-	438.1 $\pm$ 34.2 **	44.8 $\pm$ 2.32 *
37	trans-piceid <sup>b</sup>	26.80	307, 318	389; 227	4.64 $\pm$ 0.87	ND
38	trans-resveratrol <sup>b</sup>	38.69	306, 316	227	6.27 $\pm$ 1.23	ND

<sup>a</sup> CAFT, caftaric acid; CAFF, caffeic acid; COUT, coumaric acid; COUM, p-coumaric acid; FERT, fertaric acid. <sup>b</sup> Concentrations in mg/kg. ND, non-detectable. NQ, non-quantifiable. (\*, \*\*) indicated significant differences (Student "t" test;  $\alpha = 0.05$ ) between skin and flesh composition.

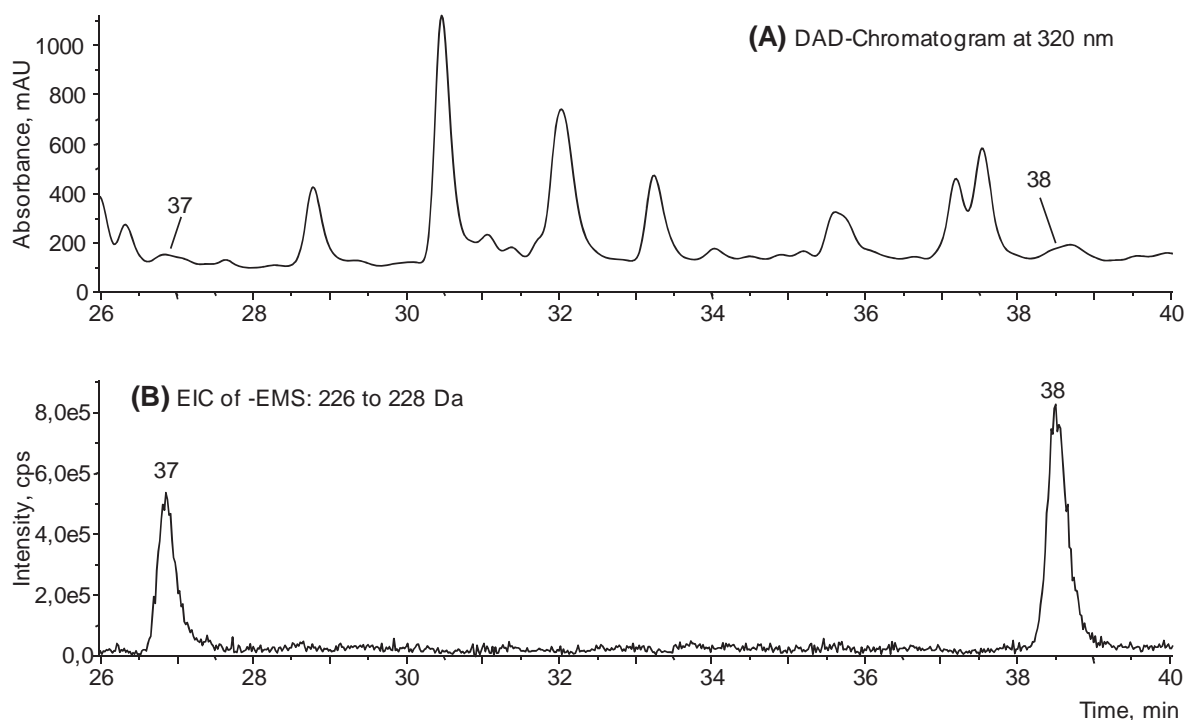
In the case of the MS/MS spectra of compounds eluting at peaks 32 and 35, their most intense signal corresponded to product ions that could be attributed to the loss of an entire molecule of glucose ( $[(M-180)-H]^-$  at  $m/z$  161 and 145, respectively for peaks 32 and 35). The compounds also showed a second signal, which was likely due to the subsequent loss of a CO molecule ( $[(M-180-CO)-H]^-$  at  $m/z$  133 and 117, respectively for peaks 32 and 35).

The occurrence of glucose derivatives of hydroxycinnamic acids has been reported in Riesling wines as minor compounds and found after a process of concentration and isolation (BADERSCHNEIDER; WINTERHALTER, 2001). The latter compounds were both 1''-glucose esters of hydroxycinnamic acids and 4-glucosyl-hydroxycinnamic acids, and the main spectral difference was a hypsochromic shift of the main maximum UV for the latter type of derivatives (v.g. 327 nm for 1''-glucose ester of ferulic acid and 284 nm for 4-glucosyl-ferulic acid). The latter UV data reinforced the assignment made for compounds 32 and 35 as 1''-glucose esters of caffeic and *p*-coumaric acids.

The total content of HCAD in Bordô grapes (ca. 438  $\mu\text{mol/kg}$ ) was in the range of the contents that have been reported for *V. vinifera* grapes (CHEYNIER; MOUTOUNET; SARNI-MANCHADO, 2003). However, it is important to note that HCAD distribution was ten times higher in the case of Bordô grape skins (**Table 3**). Other studies have concluded that the flesh of the grape is the main source of HCAD in *V. vinifera* cultivars (CHEYNIER; MOUTOUNET; SARNI-MANCHADO, 2003), although recent data has suggested that HCAD proportions are three times higher in the skin of Garnacha Tintorera (*V. vinifera*) grapes when compared to their flesh (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b). Moreover, the HCAD molar profile was different depending on the part of the grape being considered (**Table 3**): although caffeic-type derivatives were predominant in both the skin and the flesh, the proportion of caftaric acid was significantly higher in the skins; as for the *p*-coumaric-type derivatives, the proportions of the *p*-coumaric acid 1''-glucose ester in flesh was double those found in the skin.

Finally, as expected, resveratrol and its 3-glucoside (piceid) were found only in the skin of Bordô grapes and as the sole trans isomers (**Table 3** and **Figure 7**). There is a lack of data on the content of resveratrol and its isomers in non-*vinifera* grapes. However, according to the classification proposed for *V. vinifera* grape cultivars (GATTO et al., 2008), the amounts of stilbenes found in the Bordô grape suggest that it can be considered a grape cultivar that is a high resveratrol producer. This type of cultivar is characterized by the following mean values (mg/kg of grape) of resveratrol-type derivatives: trans-resveratrol, 2.37

(6.27 in Bordô grapes); cis-piceid, 4.19 (not detected in Bordô grapes); trans-piceid, 4.18 (4.64 in Bordô grapes); and total resveratrols, 10.74 (10.91 in Bordô grapes).



**Figure 7.** Bordô grape resveratrol derivatives. DAD-Chromatogram at 320 nm of grape skin extract (A), and extracted ion chromatograms (EIC) in negative ionization mode at the  $m/z$  values (227) corresponding to the expected product ions (-EPI, MS/MS conditions) corresponding to the different resveratrol derivatives (B). Peak numbers as in **Table 3**.

### 3.4 Flavan-3-ols

Five flavan-3-ol monomers were found in the skin of Bordô grapes (**Table 4**); they were mainly found as (+)-catechin, with lower amounts of (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin and (-)-gallocatechin and, finally, with minor amounts of (-)-epicatechin 3-gallate. B-type dimer flavan-3-ols were also found in similar amounts, particularly that of procyanidin B1. The total sum of flavan-3-ol monomers and dimers accounted for approximately 2.9 mg of (+)-catechin equivalents per kg of grape (mg/kg), an amount quite lower than that which corresponded to flavan-3-ol oligomers and polymers (proanthocyanidins). The latter amounts averaged  $99.7 \pm 6.6$  mg/kg (a value deduced from the analysis of proanthocyanidin composition, by total sum of extension and terminal units released after acid-catalyzed depolymerization assisted by pyrogallol).

**Table 4.** Monomeric flavan-3-ol and dimer B-type procyanidin content (MV  $\pm$  SD, mg/kg grape) and proanthocyanidin characterization (molar % of each of the extension and terminal units of monomeric flavan-3-ols) of Bordô grape skin.

<b>flavan-3-ol</b>	<b>free monomeric and dimer flavan-3-ols (mg/kg)</b>	<b>proanthocyanidin monomeric extension units (molar %)</b>	<b>proanthocyanidin monomeric terminal units (molar %)</b>
(-)-epicatechin	0.28 $\pm$ 0.10	74.59 $\pm$ 0.84	0.75 $\pm$ 0.10
(+)-catechin	1.20 $\pm$ 0.11	1.94 $\pm$ 0.26	7.11 $\pm$ 0.39
(-)-epigallocatechin	0.16 $\pm$ 0.04	14.08 $\pm$ 0.30	0.12 $\pm$ 0.03
(-)-epicatechin 3-gallate	0.04 $\pm$ 0.01	1.24 $\pm$ 0.05	0.17 $\pm$ 0.01
(-)-gallocatechin	0.09 $\pm$ 0.05		
procyanidin B1	1.86 $\pm$ 0.16		
procyanidin B2	0.30 $\pm$ 0.06		



The total content of proanthocyanidins in the Bordô grape skins was lower than usual values reported for *V. vinifera* grape cultivars, although some samples of Spanish Syrah grape skins have been reported as having only  $282 \pm 40$  mg/kg, as (+)-catechin equivalents (BUSSE-VALVERDE et al., 2010).

The results of the structural analysis of the main type of flavan-3-ols present in Bordô grape skins, their proanthocyanidins, were generally in agreement with previously reported data for *V. vinifera* grape cultivars (BUSSE-VALVERDE et al., 2010; LABARBE et al., 1999; SOUQUET et al., 1996). The mean degree of polymerization (mDP) was  $12.29 \pm 0.64$ , with a galloylation percentage (% of 3-gallate esters) of  $1.40\% \pm 0.04$ , and a percentage of B-ring tri-hydroxylated units (also known as prodelfinidins) of  $14.21\% \pm 0.28$ .

The extension units that formed Bordô grape skin proanthocyanidins were the same as the four expected (**Table 4**) in *V. vinifera* grape skins (SOUQUET et al., 1996): (-)-epicatechin accounted for around 75% of total units, followed by the characteristic grape skin (-)-epigallocatechin, which accounted for around 14%; (+)-catechin and (-)-epicatechin 3-gallate were minor extension units found in the skins of Bordô grapes, each one accounting for less than 2%. With regard to the terminal units, most studies have reported only the occurrence of (+)-catechin as the main flavanol and, to a lesser extent, (-)-epicatechin (BUSSE-VALVERDE et al., 2010). Our results, which are similar, are detailed in **Table 4**. However, we were able to quantify very minor percentages (less than 0.2%) of terminal units corresponding to the other flavan-3-ol monomers ((-)-epigallocatechin and (-)-epicatechin 3-gallate), which also contributed to the total extension units, though these results were very likely due to the higher sensitivity of the MRM technique used for detection and identification.

### 3.5 Total phenolic content and antioxidant capacity

The total phenolic content found in Bordô grapes was  $1130 \pm 105$  mg (as gallic acid) per kg of fresh fruit, distributed between 93.7% in the skin and 6.3% in the flesh. This value is within the range described for *V. vinifera* red grapes (731-3486 mg gallic acid per kg of fresh fruit) (KATALINIC et al., 2010) and slightly lower than those reported for *V. rotundifolia* grape skins ( $2.8 \pm 0.3$  mg per g of fresh skins vs. 3.59-5.04) (SANDHU et al., 2011). These results confirm that this grape is a rich source of total phenolic compounds, even when only its edible parts are considered.

With regard to total antioxidant capacity, the Bordô grape exhibited the following values, expressed in different units: grape skin,  $37.6 \pm 1.0$  mmol/kg of fresh grape weight as

Trolox equivalents ( $714.0 \pm 18.9 \mu\text{mol/g}$  dry weight skin;  $137.1 \pm 7.5 \mu\text{M/g}$  dry weight skin;  $92.5 \pm 2.5 \mu\text{mol/g}$  fresh weight skin); and grape flesh,  $1.86 \pm 0.05 \text{ mmol/kg}$  of fresh grape weight as Trolox equivalents. These results were a reflection of the distribution of phenolic compounds within grape skin and flesh. Wine antioxidant capacity data are easily available in the literature. However, it is difficult to find similar data for grapes and even more difficult to compare them because of the differences in the assay methods used (DPPH vs. ABTS, for instance) and the differences in the grape material used (fresh weight grape, fresh weight skins or dry weight skins).

In this context, and only considering data reporting on DPPH values, the antioxidant capacity shown by Bordô grape skin was approximately four times higher than that of skins of *V. rotundifolia* grapes ( $20.5\text{-}26.6 \mu\text{mol/g}$  fresh weight skin) (SANDHU et al., 2011), and approximately five times higher than capacities shown by some *V. aestivalis* and *V. vinifera* grapes ( $8\text{-}9 \mu\text{mol/g}$  fresh weight of a mixture of skin and flesh) (HOGAN et al., 2009). However, the values found for our Bordô grape skins were similar to those recently reported for European (*V. vinifera*), American (*V. rotundifolia*), Euro-American and Euro-Asian hybrids, as well as those reported for many Asian *Vitis* species: the values ranged between  $94$  and  $196 \mu\text{M/g}$  dry weight skin (XU et al., 2010).

On the basis of the aforementioned results, it can be suggested that Bordô grape skin has a high potential antioxidant capacity that is mainly linked to its equally high content of phenolic compounds. However, this high antioxidant capacity potential needs to be evaluated using different vintages and cultivation conditions, because the phenolic content of grapes is strongly affected by these factors.

#### 4. CONCLUSION

Bordô grape constitutes a rich source of total phenolic and was mainly located in the skins. The content of anthocyanins in the Bordô grape skin was high, largely as 3,5-diglucosides. Myricetin 3-glucoside was the principal flavonol while the hydroxycinnamic acid derivatives were mainly derived from caffeic acid in both grape parts (skins and flesh). Although flavan-3-ol content of the Bordô grape skin was lower than those that are usually reported for *V. vinifera* grape varieties, it can be considered a grape cultivar that is a high resveratrol producer. This grape also exhibited a high value of total antioxidant capacity. The aforementioned results confirm that this grape compounds with antioxidant activity.

## 5. ACKNOWLEDGMENTS

This work has been partially financed by funding from the IVICAM (project PREG-10-002). The authors would like to thank the following Brazilian agencies: FAPESP, for their financial assistance; CNPq, for the productivity scholarship (Da-Silva, R.); CAPES, for their scholarship, and the PDEE program (Lago-Vanzela, E.S.). The authors are also grateful to Mr. Sebastião Santin, the owner of Vinhos Santin winery (Jales, Brazil) for supplying the grape samples.

## 6. REFERENCES

- 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, abr./jun. 2007.
- ANASTASIADI, M. et al. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification byproducts: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. **Food Research International**, Barking, v. 43, n. 3, 805-813, Apr. 2010.
- BADERSCHNEIDER, B.; WINTERHALTER, P. Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from riesling wine and screening for antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 6, p. 2788-2798, May 2011.
- BARNABÉ, D.; VENTURINI-FILHO, W. G.; BOLINI, H. M. A. Análise descritiva quantitativa de vinhos produzidos com uvas Niágara Rosada e Bordô. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 10, n. 2, p. 122-129, abr./jun. 2007.
- BAUBLIS, A.; SPOMER, A.; BERBER-JIMENEZ, M. D. Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, n. 6, p. 1219-1221, Nov. 1995.
- BORDITA, M. et al. Pyrogallol: a new trapping nucleophile in proanthocyanidins analysis. In: CONGRESO MUNDIAL DE LA VIÑA Y EL VINO (OIV), 32., 2009, Zagreb. **Anais...** Zagreb, 2009.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERST, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BUIARELLI, F. et al. Identification of hydroxycinnamic acid–tartaric acid esters in wine by HPLC–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, London, v. 123, n. 1, p. 827-833, Dec. 2010.

BUSSE-VALVERDE, N. et al. Effect of different enological practices on skin and seed proanthocyanidins in three varietal wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 17, p. 11333-11339, Oct. 2010.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; NACHTIGAL, J. C. **BRS violeta**: nova cultivar de uva para suco e vinho de mesa. Brasília, DF: Embrapa, 2005. (Comunicado Técnico, 63). Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot063.pdf>>. Acesso em: 24 Mar. 2011.

CANTOS, E.; ESPÍAN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 20, p. 5691-5696, Aug. 2002.

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, n. 1, p. 209-219, Jan. 2009a.

\_\_\_\_\_. et al. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 3, p. 992-1002, Feb. 2007.

\_\_\_\_\_. 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, n. 17, p. 7883-7891, Sept. 2009b.

\_\_\_\_\_. et al. Structure elucidation of peonidin 3,7-O- $\beta$ -diglucoside isolated from Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 24, p. 11105-11111, Sept. 2010.

CHEYNIER, V.; FULCRAND, H. Oxidación de los polifenoles en los mostos y los vinos. In: FLANZY, C. (Coord.). **Enología**: fundamentos científicos y tecnológicos. Madrid: AMV Ediciones, 2000. p. 369-376.

FACCO, E. M. P. et al. **Compostos funcionais no processamento de vinhos. tos fenólicos no processamento de vinhos**. 2006. 131f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006. Disponível em: <[http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver\\_documento.php?did=336&pid=1&p=30&order=ano](http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=336&pid=1&p=30&order=ano)>. Acesso em: 12 abr. 2011.

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

GATTO, P. et al. Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 24, p. 11773-11785, Dec. 2008.

HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; GARCÍA-ROMERO, E. Anthocyanins of red wine grape cultivars grown in the Spanish region of La Mancha: characteristic cultivar patterns of grapes and single cultivar wines, and evolution during the ripening of the berry. **Alimentaria**, Madrid, n. 352, p. 127-139, 2004.

HERTOG, M. et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. **The Lancet**, Minneapolis, v. 342, n. 23, p. 1007-1011, Oct. 1993.

HOGAN, S. et al. Antioxidant properties and bioactive components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Cabernet Franc (*Vitis vinifera*) wine grapes. **Lebensmittel Wissenschaft und Technology**, London, v. 421, n. 7, p. 269-274, Sept. 2009.

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, n. 2, p. 715-723, Mar. 2010.

KAUR C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millenium’s health. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 36, n. 7, p. 703-725, Oct. 2001.

KENNEDY, J. A.; JONES, G. P. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 4, p. 1740-1746, Mar. 2001.

KUNTZ, S.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 38, n. 3, p. 133-142, June 1999.

LABARBE, B. et al. Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 7, p. 2719-2723, June 1999.

MIKSICEK, R. J. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 208, n. 1, p. 44-50, Jan. 1995.

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

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

PINHEIRO, E. S.; DA COSTA, J. M. C.; CLEMENTE, E. Total phenolics and total anthocyanins found in grape from Benitaka cultivar (*Vitis vinifera* L.). **Journal of Food Technology**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 78-83, 2009.

PRIOR, R. L.; CAO, G. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implication. **HortScience**, Alexandria, v. 35, n. 4, p. 588-592, 2000.

RENTZSCH, M. et al. Formation of hydroxyphenyl-pyranoanthocyanins in Grenache wines: precursor levels and evolution during aging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 12, p. 4883-4888, June 2007.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science Reviews**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 152-159, Apr. 1997.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Merlot para elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 156-161, dez. 2003. Suplemento.

SANDHU, A. K. et al. Effects of exogenous abscisic acid on antioxidant capacities, anthocyanins, and flavonol contents of muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) skins. **Food Chemistry**, London, v. 126, n. 3, p. 982-988, June 2011.

SANTOS, L. P. et al. Phenolic compounds and fatty acids in different parts of *Vitis labrusca* and *V. vinifera* grapes. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 5, p. 1414-1418, June 2011.

SANTOS-BUELGA, C.; DE FREITAS, V. Influence of phenolics on wine organoleptic properties. In: MORENO-ARRIBAS, M. V., POLO, M. C. (Ed.) **Wine chemistry and biochemistry**. New York: Springer Science and Business Media, 2009. p. 529-570.

SCHROETER, H. et al. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. **Neurobiology of Aging**, New York, v. 23, n. 5, p. 861-880, Sept./Oct. 2002.

SILVA, L. et al. Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 430, n. 3, p. 405-408, July 1998.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: SIES H. et al. (Ed.). **Methods in enzymology: polyphenols and flavonoids** San Diego: Academic Press, 1999. p. 152-178.

SOUQUET, J. et al. Polimeric proanthocyanidins from grape skins. **Phytochemistry**, New York, v. 43, n. 2, p. 509-512, Sep. 1996.

TERÃO, J.; PISKULA, M. K. Flavonoids and membrane lipid peroxidation inhibition. **Nutrition**, New York, v. 15, n. 10, p. 790-791, Oct. 1999.

XIA, E. et al. Biological activities of polyphenols from grapes. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 11, n. 2, p. 622-646, Feb. 2010.

XU, C. et al. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. **Food Chemistry**, London, v. 119, n. 4, p. 1557-1565, Apr. 2010.

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

YADAV, M. Biological and medicinal properties of grapes and their bioactive constituents: an update. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 12, n. 3, p. 473-483, June 2009.

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



# **CAPÍTULO 4**

**PHENOLIC COMPOSITION OF THE BRAZILIAN SEEDLESS TABLE GRAPE  
VARIETIES BRS CLARA AND BRS MORENA**

# PHENOLIC COMPOSITION OF THE BRAZILIAN SEEDLESS TABLE GRAPE VARIETIES BRS CLARA AND BRS MORENA

Ellen Silva LAGO-VANZELA<sup>a</sup>; Eleni GOMES<sup>b</sup>; Esteban GARCÍA-ROMERO<sup>c</sup>; Isidro HERMOSÍN-GUTIÉRREZ<sup>d</sup>; Roberto DA-SILVA<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, <sup>b</sup>Departamento de Biologia; <sup>d</sup>Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

<sup>c</sup>Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha, 13700 Tomelloso, Spain.

<sup>d</sup>Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada, Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola, Universidad de Castilla-La Mancha, 13071 Ciudad Real, Spain.

## ABSTRACT

The BRS Clara and BRS Morena seedless grapes are new varieties that have been developed by the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA). In this study, the detailed phenolic composition (anthocyanins, flavonols, hydroxycinnamic acid derivatives, stilbenes and flavan-3-ols) in the skin and flesh of these grapes has been studied using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. The qualitative phenolic composition of BRS Clara and BRS Morena grapes did not differ from those found for *Vitis vinifera* grape varieties in any of the phenolics considered. The two new table grape varieties accounted for high amounts of phenolic compounds, especially for BRS Morena, which were mainly located in their skins in both cases. In addition, qualitative differences between the phenolic compounds present in the skin and flesh of the BRS Morena grape were also observed. The most notable differences were those found for anthocyanin and flavonol profiles of BRS Morena. The high content of phenolic compounds was consistent with the equally high antioxidant capacity values registered for both grape varieties (with the highest values found in the BRS Morena grape). Proanthocyanidins and hydroxycinnamoyl-tartaric acids were the main phenolic compounds found in BRS Clara. The latter phenolic compounds were also important in BRS Morena, although anthocyanins were the main phenolic compounds in this case. These results suggest that the entire grape, including the skin, may potentially possess properties that are useful and beneficial to human health. In this context, the BRS Morena grape can be considered a high resveratrol producer.

## 1. INTRODUCTION

The inclusion of table grapes and derived products in the diet of Western countries has increased significantly in recent decades largely due to the mounting evidence that the phenolic compounds of these grapes present functional characteristics and properties that are beneficial to human health (ANASTASIADI et al., 2010; KENNEDY, 2008; MAKRIS; KALLITHRAKAB; KEFALAS, 2006; XIA et al., 2010; YADAV, 2009). In this niche market, the seedless grapes have gained importance because in addition to nutritional value, they are easy to consume.

The advancement of genetic knowledge, along with an increase in market demands for new quality products have contributed to the introduction of several seedless grapes into worldwide markets, such as Superior Seedless or Festival, Crimson Seedless, Thompson Seedless, Catalunha, Vênus, Marroo Seedless, and Perlette. The phenolic composition of certain grapes has been studied, and results have shown that they are important sources of phenolic compounds (CANTOS; ESPÍN; TOMÁS-BARBERÁN, 2002; CARREÑO et al., 1997; QUIJADA-MOLINA et al., 2010; SPANOS; WROLSTAD, 1999).

Due to the growth in the demand for seedless grapes, the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) developed two new varieties of seedless grapes that are adapted to the tropical regions found in the country. BRS Clara is a complex hybrid variety that originated from the crossbreed between CNPUV 154-147 and Centennial Seedless, which is known for its soft and pleasant taste, yellow-green color, crunchy texture of its pulp, and its high glucometric potential (CAMARGO et al., 2003a). BRS Morena is a grape with a red-colored flesh, so it is also known as a teinturier variety, a type of variety which has a high fertility, moderate vigor, and a preferred taste (it was praised by consumers during the validation tests). It also has a pulp with a firm and crunchy texture (CAMARGO et al., 2003b).

As far as we know, no further studies have been developed to identify phytochemical constituents of these seedless grapes, even though these constituents to the aforementioned biological activities. Therefore, the goal of this study was to thoroughly examine the phenolic composition of the edible parts (flesh and skin) of the BRS Clara and BRS Morena grapes using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. The study comprises the phenolic classes of anthocyanins, flavonols, hydroxycinnamic acid derivatives, stilbenes and flavan-3-ols (monomers, dimers, and the polymeric proanthocyanidins also called tannins). This study also evaluates total phenolic content and antioxidant activity in the fruit.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Chemicals

All solvents were of HPLC quality and all chemicals were of analytical grade (> 99%). The water used was of Milli-Q quality. The following commercial standards from Phytolab (Vestenbergsgreuth, Germany) were used: malvidin 3-glucoside, caffeic and *p*-coumaric acids, trans-caftaric acid, trans-piceid, (-)-epigallocatechin, and (-)-gallocatechin.

The following commercial standards from Extrasynthese (Genay, France) were used: cyanidin 3-glucoside, procyanidins B1 and B2, kaempferol, quercetin, isorhamnetin, myricetin and syringetin, and the 3-glucosides of kaempferol, quercetin, isorhamnetin, and syringetin. The following commercial standards from Sigma (Tres Cantos, Madrid, Spain) were used: gallic acid, trans-resveratrol, (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epicatechin 3-gallate, and (-)-gallocatechin 3-gallate.

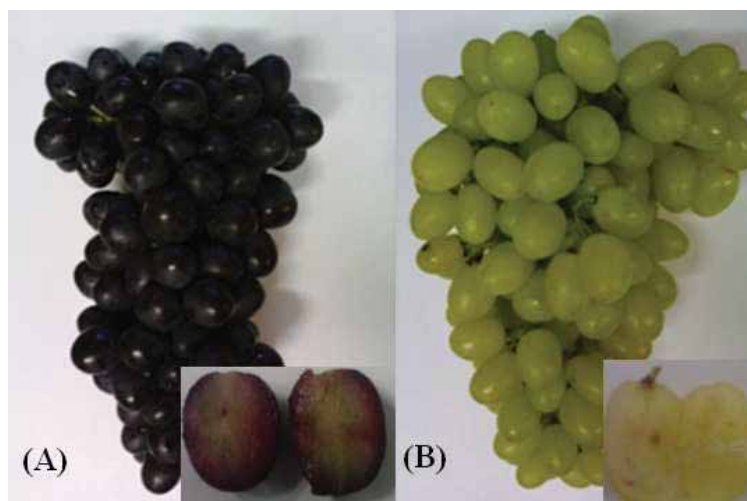
Other non-commercial flavonol standards (myricetin 3-glucoside, quercetin 3-glucuronide) were either kindly supplied by Dr. Ulrich Engelhardt (Institute of Food Chemistry, Technical University of Braunschweig, Germany) or were isolated from Petit Verdot grape skins (laricitrin 3-glucoside) used in previous study (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009a). The trans isomers of resveratrol and piceid (resveratrol 3-glucoside) were transformed into their respective cis isomers using UV-irradiation (366 nm light for 5 minutes in quartz vials) with 25% MeOH solutions of the trans isomers.

All of these standards were used for identification. Anthocyanins were quantified as equivalents of malvidin 3-glucoside (mg/kg of fresh grape weight). Flavonols (as  $\mu\text{mol/kg}$  fresh grape weight) were quantified using the calibration curve of each standard when available; in other cases, the closest flavonol was used for quantification making molecular mass correction (3-glucosides for the respective 3-galactosides or 3-glucuronides). Hydroxycinnamic acid derivatives were quantified using their respective common hydroxycinnamic acids (caffeic, *p*-coumaric and ferulic acids) as standards and making molecular mass correction.

### 2.2 Grapes

During the 2010 harvest season, healthy BRS Clara and BRS Morena grapes (at optimum ripeness for harvesting) were donated by the Experimental Station of Tropical Viticulture of EMBRAPA (Brazilian Agricultural Research Corporation), in the city of Jales (northwest of the São Paulo, Brazil), which lies at 20° 15' 08" S and 50° 33' 29" W, and 500

m above sea level (referred to datum WGS84, World Geodetic System 1984). Once in the lab, 5 kg from each grape batch were separated for analysis (**Figure 1**).



**Figure 1.** Brazilian seedless grapes. (A) BRS Morena; (B) BRS Clara.

### 2.3 Sample preparation

200 g of each grape, BRS Morena and BRS Clara, were carefully peeled by hand, and the resulting skins (yield, 25.06% and 24.05% of fresh fruit weight, respectively) were immediately frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 12 h and then freeze-dried for 24 h and weighed (results were 8.94 g and 10.77 g, respectively). The dried skins were homogenized in a porcelain mortar with the aid of a pestle and further divided in four subsamples, three of which were used for chemical analysis. The subsamples (approximately 2 g per subsample) were immersed in 50 mL of a solvent mixture of methanol, water, and formic acid (50:48.5:1.5 v/v) and then maintained under an ultrasonic bar for 10 min. Samples were then centrifuged at 2500 g at  $5^{\circ}\text{C}$  for 10 min. A second extraction of the resulting pellets was completed using the same volume of the solvent mixture (50 mL), and the combined supernatants for each sample were maintained at  $-18^{\circ}\text{C}$  until the beginning of the analysis. Aliquots of skin extracts were diluted with 0.1 N HCl (1:10, v/v), filtered (0.20  $\mu\text{m}$ , polyester membrane, Chromafil PET 20/25, Macherey-Nagel, Düren, Germany), and directly injected onto the HPLC to determine the anthocyanins.

Anthocyanins usually cause great interference in the HPLC-DAD analysis of grape flavonols. The use of ECX SPE cartridges (40  $\mu\text{m}$ , 500 mg, 6 mL; Scharlab, Sentmenat, Barcelona, Spain), which combine a mixture of reverse-phase adsorbent and cationic-exchanger material, allowed the isolation of grape flavonols (CASTILLO-MUÑOZ et al.,

2007). To carry out this step, 3 mL of BRS Clara skin extracts, 3 mL of BRS Morena skin extracts, and 3 mL of BRS Morena flesh extracts were concentrated in a rotary evaporator (37 °C) to eliminate any excess methanol. These extracts were then diluted with 3 mL of 0.1 N HCl, and the prepared samples were passed through the SPE cartridges, which had been previously conditioned with 5 mL of methanol and 5 mL of water. After the cartridges were washed (5 mL of 0.1 N HCl acid and 5 mL of water), the free-anthocyanin flavonol fractions were eluted with 3 x 5 mL of methanol. The flavonol extracts were dried in a rotary evaporator (37°C) and redissolved in 3 mL of water with 20% methanol and directly injected into the HPLC equipment. Because BRS Clara is a white grape, this last step was not necessary for BRS Clara.

The separated flesh of both fruits (BRS Morena yield, 74.94% of fresh fruit weight and BRS Clara yield, 75.95 % of fresh fruit weight) was immediately homogenized with 100 mL of a solvent mixture of methanol, water, and formic acid (50:48.5:1.5 v/v) in order to avoid oxidation. This homogenization was followed by 30 min of agitation in the absence of light at room temperature. The flesh extract was then centrifuged at 10000g at 5°C for 20 min. The supernatants were dried separately in a rotary evaporator (37°C) to eliminate excess methanol and its volume was brought up to 100 mL with water.

To remove the sugars and other polar, non-phenolic compounds present in the flesh extracts, 3 mL of extract were diluted with 3 mL of 0.1 N HCl, and the prepared sample was then passed through C18 SPE-cartridges (Sep-Pak Vac, 3cc/500mg, 55-105µm; Waters) that had been previously conditioned with 5 mL of methanol and 5 mL of water. After the cartridges were washed with 5 mL of 0.1 N HCl and 5 mL of water, the sample was eluted with 3 x 5 mL of methanol. The eluate was dried in a rotary evaporator (37°C), re-solved redissolved in 3 mL of 20% methanol in water, and directly injected into the HPLC equipment.

#### **2.4 Total phenolic content and antioxidant capacity**

Skin and flesh extracts were used to determine total phenolic content and antioxidant capacity. Total phenolic content was measured as mg of gallic acid equivalents following the Folin-Ciocalteu method (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999). Antioxidant capacity was determined as mmol Trolox equivalents according to the DPPH method (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERST, 1995). The results were expressed in kg of fresh grape weight, although other values were also calculated in the case of antioxidant

capacity (mg per g of fresh skins, for total phenolic content;  $\mu\text{mol}$  or  $\mu\text{M}$  per g of dry weight skin, for antioxidant capacity) in order to better compare the data to that of the literature.

## **2.5 HPLC-DAD-ESI-MS/MS identification of the grapes' phenolic compounds**

HPLC identification of grape skin and flesh phenolic compounds was performed using an Agilent 1200 Series system equipped with DAD (Agilent, Germany), and coupled to an AB Sciex 3200 Q TRAP (Applied Biosystems) electrospray ionization mass spectrometry system (ESI-MS/MS). The chromatographic system was managed by the Agilent Chem Station (version B.01.03) data-processing station. The mass spectra data were processed with the Analyst MDS software (Applied Biosystems, version 1.5). The samples were injected into a Zorbax Eclipse XDB-C18 reversed-phase column ( $4.6 \times 250$  mm;  $5 \mu\text{m}$  particle; Agilent, Germany) after their filtration ( $0.20 \mu\text{m}$ , polyester membrane, Chromafil PET 20/25, Machery-Nagel, Düren, Germany).

In the case of grape skin anthocyanins, the diluted extracts were injected ( $50 \mu\text{L}$ ) into the chromatographic column thermostated at  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . The chromatographic conditions were adapted from the OIV method for the analysis of anthocyanins in red wines (NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010). The solvents were water/acetonitrile/formic acid (87:3:10, v/v/v, solvent A; 40:50:10, v/v/v, solvent B), and the flow rate was  $0.63 \text{ mL/min}$ . The linear gradient for solvent B was as follows: zero min, 6%; 15 min, 30%; 30 min, 50%; 35 min, 60%; 38 min, 60%; 46 min, 6%. For identification, the ESI-MS/MS in positive ionization mode was operated using a combination of +EMS (enhanced mass spectrum; MS conditions) and +EPI (enhanced product ion; MS/MS conditions) experiments, setting the following parameters: scan, 100-1500 Da ( $250 \text{ Da/s}$ ); declustering potential, 65 V; entrance potential, 10 V; collision energy, 10 (arbitrary units); curtain gas, 15 psi; collision gas, medium; ion spray voltage, 4000 V; temperature,  $450^\circ\text{C}$ ; ion source gas 1, 70 (arbitrary units); ion source gas 2, 50 (arbitrary units); and Q3 barrier, 12 V.

HPLC identification of grape skin and flesh flavonols, hydroxycinnamic acid derivatives, and stilbenes was performed on the same chromatographic system described for anthocyanins. However, the chromatographic conditions used were conditions that had been previously reported (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009a). The solvents were: solvent A (acetonitrile/water/formic acid, 3:88.5:8.5, v/v/v), solvent B (acetonitrile/water/formic acid, 50:41.5:8.5, v/v/v), and solvent C (methanol/water/formic acid, 90:1.5:8.5, v/v/v). The flow



rate was 0.63 mL/min, the column was thermostated at 40°C, and the injection volume was 50 µL.

The linear solvents gradient was as follows: zero min, 96% A and 4% B; 7 min, 96% A and 4% B; 38 min, 70% A, 17% B and 13% C; 52 min, 50% A, 30% B and 20% C; 52.5 min, 30% A, 40% B and 30% C; 57 min, 50% B and 50% C; 58 min, 50% B and 50% C; 65 min, 96% A and 4% B. For identification, the ESI-MS/MS was used in negative ionization mode using a combination of -EMS (enhanced mass spectrum; MS conditions) and -EPI (enhanced product ion; MS/MS conditions) experiments, and with the following parameters: scan, 100-650 Da (1000 Da/s); declustering potential, -45 V; entrance potential, -12 V; collision energy, -20 (arbitrary units); curtain gas, 15 psi; collision gas, high; ion spray voltage, -4000 V; temperature, 425°C; ion source gas 1, 70 (arbitrary units); ion source gas 2, 50 (arbitrary units); and Q3 barrier, 12 V.

## **2.6 HPLC-DAD quantification of the grape' phenolic compounds**

Anthocyanins and flavonols were quantified using an Agilent 1100 Series system (Agilent, Germany), equipped with DAD (G1315B), and coupled to an Agilent ChemStation (version B.01.03) data-processing station. The same column and chromatographic parameters (column model and temperature, solvents and gradient, injection volume) used for their identification were applied. For quantification, DAD-chromatograms were extracted at 520 nm (anthocyanins), 360 nm (flavonols), and 320 nm (hydroxycinnamic acid derivatives and stilbenes).

## **2.7 Identification and quantification of grape skin flavan-3-ols using Multiple Reaction Monitoring HPLC-ESI-MS/MS**

The same chromatographic system employed for the identification of the other phenolic compounds was also used for both the identification and quantification of flavan-3-ols. The samples were injected (100 µL) into a Zorbax Eclipse XDB-C18 reversed-phase column (4.6 × 250 mm; 5 µm particle; Agilent, Germany) after filtration (0.20 µm, polyester membrane, Chromafil PET 20/25, Machery-Nagel, Düren, Germany), thermostated at 16 °C. The solvents used were water/methanol/formic acid (89:10:1, v/v/v, solvent A) and methanol (solvent B), and the flow rate was 0.5 mL/min. The linear gradient for solvent B was as follows: zero min, 1%; 2 min, 1%; 60 min, 23%; 75 min, 70%; 80 min, 95%; 90 min, 95%; 95 min, 1%; 100, 1%. Two MS scan types were used: Enhanced MS (EMS) for compound

identification; and Multiple Reaction Monitoring (MRM) for quantification. MS conditions for both scan types were as follows: ion spray voltage, -4000 V; ion source temperature, 450°C; collision gas, high; curtain gas, 15 psi; ion source gas 1, 70 (arbitrary units); ion source gas 2, 50 (arbitrary units); declustering potential, -35 V; entrance potential, -10 V; collision energy, -30 (arbitrary units); collision cell exit potential, -3 (arbitrary units).

In the case of the analysis of flavan-3-ol monomers and dimer procyanidins B1 and B2, 0.50 mL of the SPE-C18 grape skin extract was diluted with 2.5 mL of water in a chromatographic vial that was sealed and the extract was then injected. The selected mass transitions ( $m/z$  pairs) for MRM scan and quantification (in some cases two most intense transitions were available, thus gaining in sensitivity) were as follows: (+)-catechin and (-)-epicatechin (289-245); procyanidins B1 and B2 (577-425 and 577-407); (-)-epigallocatechin and (-)-gallocatechin (305-221 and 305-219); (-)-epicatechin 3-gallate (441-289); and (-)-gallocatechin 3-gallate (457-331 and 457-305). Calibration curves for each flavan-3-ol were obtained in order to calculate the respective molar response factors against (-)-gallocatechin 3-gallate used as internal standard. Analyses were performed in duplicate.

The structural information of proanthocyanidins was obtained following the method of acid-catalyzed depolymerization induced by pyrogallol (BORDITA et al., 2009), a recently proposed alternative nucleophile trapping agent which offers similar results when compared to the classic phloroglucinol method (KENNEDY; JONES, 2001), but which also functions under milder experimental conditions. In this study, 0.25 mL pyrogallol reagent solution (100 g/L of pyrogallol and 20 g/L ascorbic acid in methanolic HCl 0.4 N) was added to 0.25 mL of SPE-C18 grape skin extract, and the mixture was then maintained at 35°C for 20 minutes. After the reaction was interrupted with the addition of 2 mL of 40 mM sodium acetate, the reaction mixture was analyzed as described above for monomeric and dimer flavan-3-ols. In addition to the MRM transitions for monomeric flavan-3-ols (terminal units of proanthocyanidins), the following  $m/z$  pairs (in some cases two most intense transitions were available) were also selected, corresponding to the pyrogallol adducts of the extension units of proanthocyanidins: (+)-catechin and (-)-epicatechin adducts (413-287); (-)-epigallocatechin adduct (429-303 and 429-261); and (-)-epicatechin 3-gallate adduct (565-413).

The calibration curve of the adduct formed between pyrogallol and (-)-epicatechin was obtained through depolymerization experiments of both procyanidins (B1 and B2), which allowed the calculation of their molar response factor against (-)-gallocatechin 3-gallate, which was used as internal standard. The factor response of the other adducts was assumed to

be proportional to those obtained by their respective monomer precursors. Analyses were performed in duplicate.

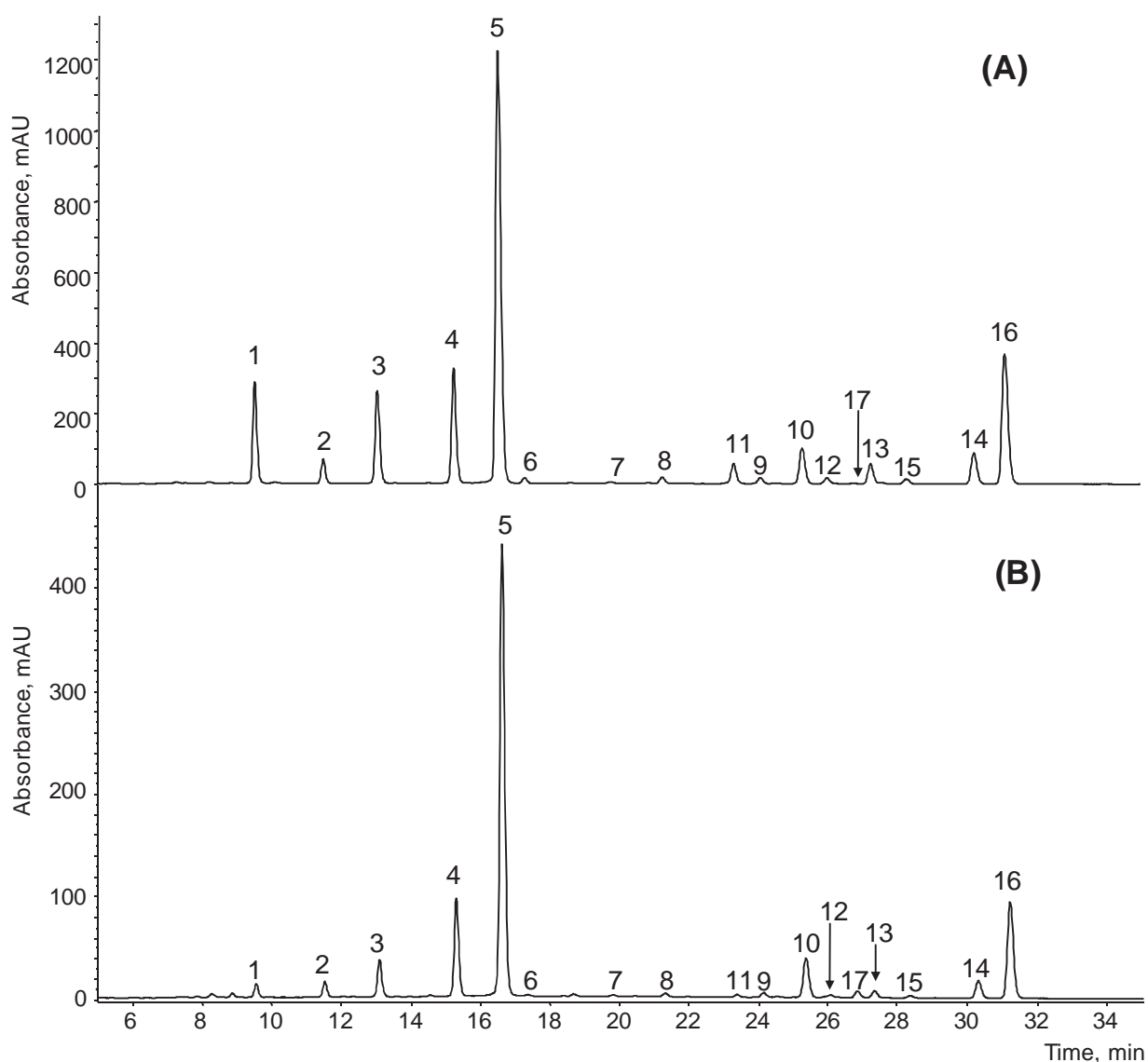
### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Anthocyanins

Anthocyanins occurred only in the BRS Morena grapes; however, because it is a teinturier variety, they were present in both the skin and flesh. The typical chromatographic profiles of the anthocyanins of BRS Morena grape skin and flesh are shown in **Figure 2A** and **Figure 2B**, respectively. Their spectral characteristics (molecular and product ions under ESI-MS/MS, on-line DAD UV-vis  $\lambda_{\max}$  values) are presented in **Table 1**. With the help of extracted ion chromatograms (EIC) at the  $m/z$  ratios corresponding to the different anthocyanidins (aglycones), we were able to detect a total of seventeen anthocyanins in both edible parts (flesh and skin) of the grape. The identification of the anthocyanins was completed based on coincident spectral data, with authentic standards and with data reported previously in the literature (NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010; CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b).

In summary, only 3-glucosides of the same five anthocyanidins usually found in *Vitis vinifera* grape varieties (delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin, and malvidin) were detected in the BRS Morena grape. The completed series of non-acylated anthocyanins (peaks 1-5), acetylated anthocyanins (peaks 6-10) and *p*-coumaroylated anthocyanins (peaks 11-15, corresponding to the major trans isomers; and also the cis isomer of the malvidin derivative, peak 16), along with the caffeoylated derivative of malvidin (peak 17), were identified. These results show that the anthocyanin profile of this grape resembles the anthocyanin profiles shown by the most widespread *Vitis vinifera* red grape varieties (HERMOSÍN-GUTIÉRREZ; GARCÍA-ROMERO, 2004; GÓMEZ-PLAZA et al., 2008; MAZZUCA et al., 2005; LIANG et al., 2008).

These results are in agreement with those found for the genealogy of BRS Morena (CAMARGO et al., 2003b; LEÃO, 2008), which is described as a complex hybrid grape variety, predominantly coming from crosses between *Vitis vinifera* grape varieties (Marroo Seedless and Centennial Seedless). It is commonly accepted that the anthocyanin profile of a given variety is closely linked to its genetic inheritance, although environmental factors may have some influence on this profile (GÓMEZ-PLAZA et al., 2008; POUDEL et al., 2009).



**Figure 2.** Anthocyanin chromatographic profile (DAD at 520 nm) of BRS Morena grape skin (A) and flesh (B). Peak numbering as in **Table 1**.

The anthocyanin profile (molar percentage in which each anthocyanin appears; **Table 1**) was also dominated by malvidin-type derivatives in the case of both the skin and flesh of the BRS Morena grape (63% and 77%, respectively), but it was also found in the form of non-acylated derivatives (61% and 72%, respectively), *p*-coumaroyl derivatives (29% and 19%, respectively) and acetyl derivatives (9% and 8%, respectively); caffeoyl derivatives were very minor anthocyanins (less than 1%).

**Table 1.** Data for the identification of the anthocyanins in the BRS Morena grape using HPLC-DAD-ESI-MS/MS (positive ionization mode), and molar proportions (mean value  $\pm$  standard deviation,  $n = 3$ ) of each anthocyanin in the two parts of grape. Peak numbers as in **Figure 2**.

peak	anthocyanin*	UV-vis (nm)	molecular and product ions ( $m/z$ )	molar % (skin, $n=3$ )	molar % (flesh, $n=3$ )
1	dp-3-glc	277, 298 (sh), 346, 440 (sh), 524	465; 303	5.79 $\pm$ 0.23 a	1.37 $\pm$ 0.01 b
2	cy-3-glc	280, 292 (sh), 325 (sh), 380 (sh), 440 (sh), 517	449; 287	0.66 $\pm$ 0.01 a	1.49 $\pm$ 0.05 b
3	pt-3-glc	276, 298 (sh), 348, 440 (sh), 527	479; 317	6.68 $\pm$ 0.04 a	4.10 $\pm$ 0.03 b
4	pn-3-glc	280, 292 (sh), 325 (sh), 380 (sh), 440 (sh), 518	463; 301	4.66 $\pm$ 0.00 a	10.75 $\pm$ 0.03 b
5	mv-3-glc	276, 298 (sh), 348, 440 (sh), 528	493; 331	43.84 $\pm$ 0.29 a	54.38 $\pm$ 0.14 b
6	dp-3-acglc	277, 298 (sh), 349, 440 (sh), 526	507; 303	0.51 $\pm$ 0.01 a	0.19 $\pm$ 0.02 b
7	cy-3-acglc	440 (sh), 519***	491; 287	0.10 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.00
8	pt-3-acglc	276, 298 (sh), 349, 440 (sh), 529	521; 317	0.79 $\pm$ 0.01 a	0.46 $\pm$ 0.01 b
9	pn-3-acglc	280, 330, 380 (sh), 440 (sh), 519	505; 301	0.56 $\pm$ 0.03 a	0.71 $\pm$ 0.01 b
10	mv-3-acglc	278, 298 (sh), 349, 440 (sh), 529	535; 331	7.10 $\pm$ 0.23	6.55 $\pm$ 0.01
11	dp-3-cmglc	282, 298 (sh), 316 (sh), 440 (sh), 530	611; 303	1.87 $\pm$ 0.03 a	0.35 $\pm$ 0.00 b
12	cy-3-cmglc	283, 313, 440 (sh), 522	595; 287	0.50 $\pm$ 0.06 a	0.60 $\pm$ 0.04 b
13	pt-3-cmglc	282, 298 (sh), 316 (sh), 440 (sh), 531	625; 317	2.47 $\pm$ 0.03 a	0.95 $\pm$ 0.02 b
14	mv-3-cis-cmglc	280, 296 (sh), 306 (sh), 440 (sh), 535	639; 331	0.59 $\pm$ 0.01 a	0.36 $\pm$ 0.03 b
15	pn-3-cmglc	283, 313, 440 (sh), 521	609; 301	2.72 $\pm$ 0.06 a	2.56 $\pm$ 0.00 b
16	mv-3-trans-cmglc	284, 298 (sh), 316 (sh), 440 (sh), 532	639; 331	20.99 $\pm$ 0.17 a	14.34 $\pm$ 0.06 b
17	mv-3-cfglc	281, 298 (sh), 333, 440 (sh), 529	655; 331	0.17 $\pm$ 0.03 a	0.96 $\pm$ 0.05 b
Total concentration (mg/kg)**				526.36 $\pm$ 67.14 a	16.18 $\pm$ 4.29 b

\*dp, delphinidin; cy, cyanidin; pt, petunidin; pn, peonidin; mv, malvidin; glc, glucoside; acglc, 6''-(acetyl)-glucoside; cfglc, 6''-(caffeoyl)-glucoside; cmglc, 6''-(*p*-coumaroyl)-glucoside (trans configuration if not indicated). \*\*As malvidin 3-glucoside equivalents (mv-3-glc). \*\*\*Only visible maxima were able to be measured. (a, b) indicate significant differences (Student "t" test;  $\alpha = 0.05$ ) between skin and flesh composition.

This type of anthocyanin profile, especially that found in the skin of the BRS Morena grape, was also similar to the profiles of anthocyanins shown by Marroo Seedless and Black Seedless table grapes, which, in other studies, were found to be approximately 61 and 49% of the malvidin-type anthocyanins, respectively, and higher proportions of *p*-coumaroyl anthocyanins (around 14% in both cases) within the acylated anthocyanins (CARREÑO et al., 1997). The similarity to the Marroo Seedless grape profile was expected, considering that this grape was used in the hybridization process during the production of the BRS Morena grape. However, the profile that was found differs from that which has been reported for other table grapes, such as Red Globe, Crimson Seedless, and Napoleon, which all presented peonidin 3-glucoside as the predominant anthocyanin (CARREÑO et al., 1997). It also differs from the profiles of the Flame Seedless (CANTOS; ESPÍN; TOMÁS-BARBERÁN, 2002) and the Ruby Seedless (CARREÑO et al., 1997) varieties, which presented more balanced proportions of acylated anthocyanidin 3-glucosides, particularly in the case of peonidin- and cyanidin-type 3-glucosides.

When BRS Morena was compared to more widespread *Vitis Vinifera* grape varieties used in the production of red wine, its anthocyanin profile resembled those of grape varieties of Spanish origin, such as Tempranillo, Garnacha, and Bobal. In contrast, the typical French varieties (Cabernet Sauvignon and Merlot) are characterized by the presence of a higher proportion of acetylated anthocyanins than *p*-coumaroylated anthocyanins. Other French varieties (Syrah or Petit Verdot) have similar and relatively high proportions in the case of both types of derivatives (acetylated derivatives and *p*-coumaroylated derivatives) (HERMOSÍN-GUTIÉRREZ; GARCÍA-ROMERO, 2004).

Significant differences among the anthocyanins profiles of skin and flesh of the BRS Morena grape were observed, and largely involved higher proportions of non-acylated anthocyanins (except for delphinidin- and petunidin-type 3-glucosides) in the flesh, as well as the acylated derivatives malvidin 3-(6''-caffeoyl)-glucoside and peonidin 3-(6''-acetyl)-glucoside.

Anthocyanins have also been found to be unevenly distributed within the skin and flesh of other varieties of teinturier grapes. When compared to its own skin, the flesh of the Yan 73 grape hybrid variety (Muscat Hamburg and Alicante Bouschet) showed a much lower ratio of 3',5'-substituted to 3'-substituted anthocyanins, and a much higher ratio of methoxylation of anthocyanin B-ring to non methoxylation. The values of acylated anthocyanin content in the skin were also higher than those found in the flesh (HE et al., 2010). The anthocyanin composition of Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera*) grape showed a

slight predominance of malvidin-type anthocyanins in the skin, followed by equally high proportions of peonidin-type derivatives, while peonidin 3-glucoside was the major anthocyanin in the flesh (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b).

Anthocyanin content in grapes depends on the variety, and its maturity stage, as well as on seasonal conditions, production area, and cultural practices (MAZZA; MINIATI, 1993). Anthocyanin content of the BRS Morena grape (approximately 542 mg/kg as malvidin 3-glucoside) was found in amounts that were similar to those found in other varieties that are commonly used for making red wines. For instance, reported total anthocyanin content for Cencibel (Tempranillo) grape was of  $690 \pm 30$  mg/kg, but with values ranging from 210-1500 mg/kg (VERDEJO FERNÁNDEZ et al., 2007).

In addition, total anthocyanin content of red grapes also depends on the analyzed variety (FRAGOSO et al., 2011): Cabernet Sauvignon (range, 686-883 mg/kg; average,  $784 \pm 58$  mg/kg); Merlot (range, 843-1296 mg/kg; average,  $1021 \pm 139$  mg/kg); Syrah (range, 826-1316 mg/kg; average,  $1024 \pm 142$  mg/kg); Tempranillo (range, 651-1002 mg/kg; average,  $782 \pm 103$  mg/kg); Garnacha (range, 348-482 mg/kg; average,  $411 \pm 41$  mg/kg); and Cariñena (range of 485-759 mg/kg; average value of  $639 \pm 70$  mg/kg).

The anthocyanin content of BRS Morena was also within the range for certain table grapes (between 509 and 669 mg/kg), such as Michele Palieri, Monuka, Moscatel Hamburgo, Ribol, Pella, Bel Air, Black Seedless, Marroo Seedless and Pasiga (CARREÑO et al., 1997). Although both edible parts of the BRS Morena grape (skin and flesh) were pigmented, the amount of anthocyanins of the flesh was remarkably lower ( $16.18 \pm 4.29$  mg/kg, as malvidin 3-glucoside) than the amount in the skin ( $526.36 \pm 67.14$  mg/kg).

### 3.2 Flavonols

Only flavonol 3-glycosides were found in BRS Morena and BRS Clara grapes. The identification of the occurring flavonols was largely completed using their MS/MS data (Table 2), which were in agreement with those provided by the literature (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009a, 2007, 2010). Moreover, the on-line DAD UV-vis spectra (data not shown) helped to confirm the type of flavonoid structure, and the visible maxima appeared at the expected wavelength values for flavonol 3-glycosides (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009a): 348-349 nm for the kampferol-type; 353-354 nm for quercetin- and isorhamnetin-types; and 355-359 nm for myricetin-, laricitrin- and syringetin-types.

BRS Morena grape flavonols consisted of the six flavonoid aglycones that have been previously found in red grape varieties (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009a, 2007), but in our



study, only the 3-glucoside series was completely identified, and they were the only kind of 3-glycosides found for the laricitrin and syringetin aglycones, and isorhamnetin was also found as 3-galactoside. The 3-glucuronides occurred for only the non-methoxylated aglycones (kaempferol, quercetin and myricetin) and, finally, rutin (quercetin 3-rutinoside), was found partially coeluting with quercetin 3-glucoside as a minor flavonol. Because BRS Morena is of the teinturier grape variety, it was expected that flavonols would be found in its flesh, as has been reported for the *Vitis vinifera* Garnacha Tintorera teinturier variety (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b). As in the latter case, the flavonol profiles shown by the skin and the flesh of BRS Morena were different (**Figures 3A** and **3B**). However, non-teinturier grape varieties, such as French Merlot, also seem to contain flavonols in their flesh (PEREIRA et al., 2006). While myricetin-type flavonols (mainly the 3-glucoside derivative) predominate in BRS Morena skin (around 47.5 %), only myricetin 3-glucoside was present in the flesh in quantifiable amounts, and in much lower proportions (only 8.4%).

Quercetin-type flavonols were the second most common flavonols found in BRS Morena skin (27.8%) with similarly high proportions of 3-glucuronide and 3-glucoside derivatives (12-14% each). Their amounts increased in the flesh (45.3%), particularly that of quercetin 3-glucoside, which accounted for the highest individual proportion out of all of the flavonols (34.6%). The large decrease in the proportions of myricetin-type flavonols in the flesh was accompanied by the increase of the other types of flavonols, and more notably for their methoxylated analogues (syringetin-type, from 7.4% in skin to 20.8% in flesh; laricitrin-type, from 11.4% to 16.6%) but also for isorhamnetin-type flavonols (from 4.3% to 7.1%).

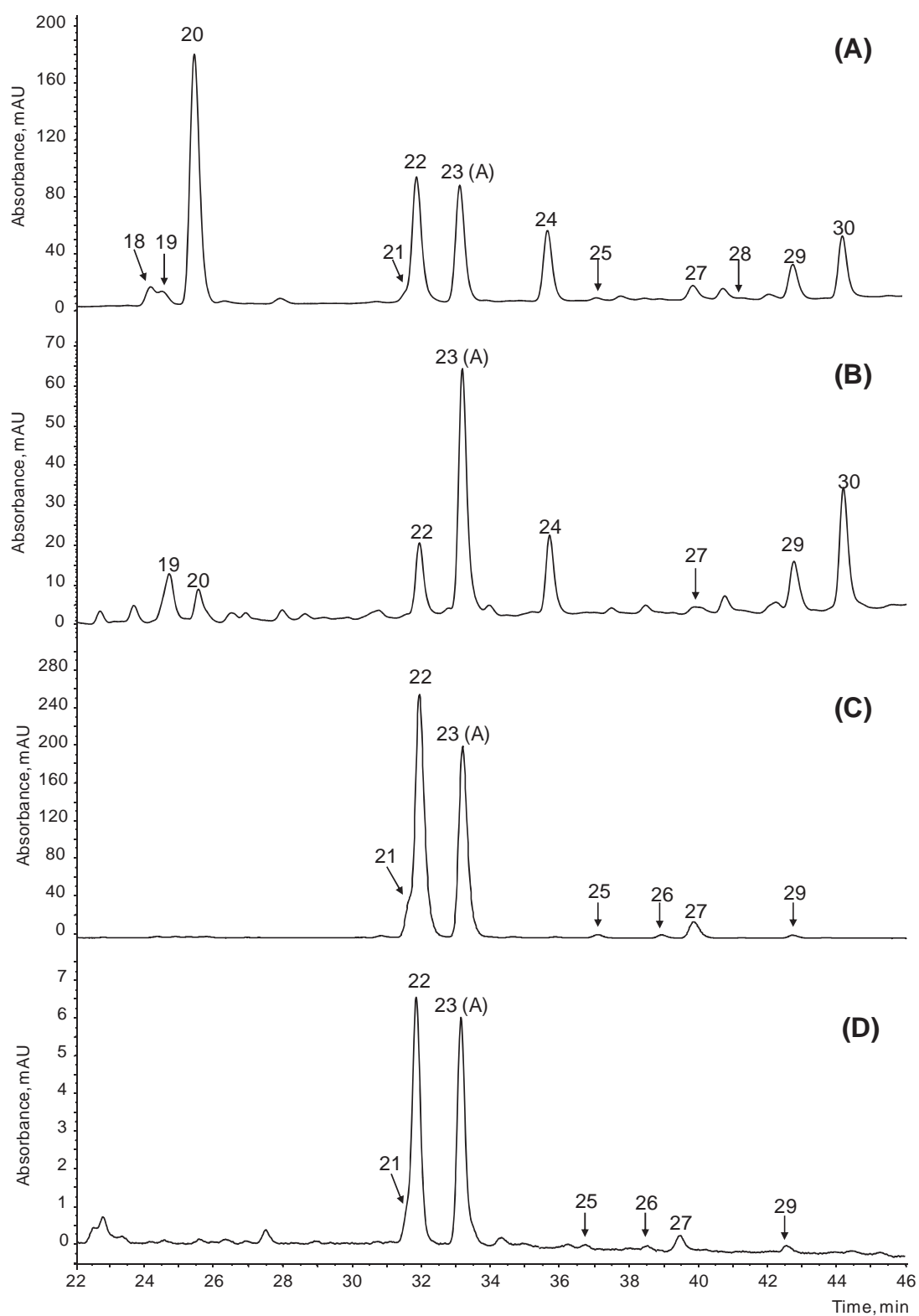
Despite of the aforementioned differences between skin and flesh flavonol profiles, the most notable difference was the very low amount in which flavonols were found in the flesh of the BRS Morena grape when compared to its skin (2.2  $\mu\text{mol/kg}$  vs. 114.0  $\mu\text{mol/kg}$  in the skin, or a ratio of approximately 1:50), results which have been similarly reported for the Garnacha Tintorera grape variety (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b).

The level of flavonols found in the BRS Morena grape (around 116  $\mu\text{mol/kg}$ ) was within the range described for other red table grapes (68.5-150.7  $\mu\text{mol/kg}$  fresh fruit) (CANTOS; ESPÍN; TOMÁS-BARBERÁN, 2002), and was slightly lower than those found for several varieties of *Vitis vinifera* red wine grapes (129-346  $\mu\text{mol/kg}$ ) (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2007). The BRS Clara grape contained flavonols in the skin, as expected, but also in the flesh, with a ratio flesh to skin of approximately 1:40.

**Table 2.** Data for the identification of the flavonols in the BRS Morena and BRS Clara grapes using HPLC-ESI-MS/MS (negative ionization mode), and molar proportions (mean value  $\pm$  standard deviation) of each flavonol in both parts of grape (skin and flesh). Peak numbers as in **Figure 3**.

peak	flavonol*	pseudomolecular and product ions ( <i>m/z</i> )	Morena molar % (skin, n=3)	Morena molar % (flesh, n=3)	Clara molar % (skin, n=3)	Clara molar % (flesh, n=3)
18	M-3-glcU	493; 317	3.29 $\pm$ 0.09	ND	ND	ND
19	M-3-gal	479; 317	1.05 $\pm$ 0.03	NQ	ND	ND
20	M-3-glc	479; 317	43.19 $\pm$ 0.70 b	8.41 $\pm$ 0.61 a	ND	ND
21	Q-3-gal	463; 301	1.27 $\pm$ 0.26	ND	6.32 $\pm$ 0.97	4.90 $\pm$ 0.35
22	Q-3-glcU	477; 301	13.95 $\pm$ 0.47 b	10.51 $\pm$ 0.62 a	47.59 $\pm$ 0.96 B	45.00 $\pm$ 0.10 A
23	Q-3-glc	609; 301	12.35 $\pm$ 1.21 a	34.58 $\pm$ 1.03 b	35.64 $\pm$ 0.41 A	40.23 $\pm$ 0.30 B
A	Q-3-rut	463; 301	0.25 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.01	4.14 $\pm$ 0.05 B	3.07 $\pm$ 0.02 A
24	L-3-glc	493; 331	11.42 $\pm$ 0.30 a	16.55 $\pm$ 0.16 b	ND	ND
25	K-3-gal	447; 285	0.29 $\pm$ 0.05	ND	1.03 $\pm$ 0.03	NQ
26	K-3-glcU	461; 285	ND	ND	0.76 $\pm$ 0.02	NQ
27	K-3-glc	447; 285	1.21 $\pm$ 0.10 a	1.86 $\pm$ 0.00 b	3.97 $\pm$ 0.08	4.36 $\pm$ 0.39
28	I-3-gal	477; 315	0.61 $\pm$ 0.26	ND	ND	ND
29	I-3-glc	477; 315	3.69 $\pm$ 0.27 a	7.01 $\pm$ 0.31 b	0.55 $\pm$ 0.03 A	2.44 $\pm$ 0.18 B
30	S-3-glc	507; 345	7.43 $\pm$ 0.32 a	20.84 $\pm$ 0.11 b	ND	ND
total concentration ( $\mu$ mol/kg)			114.02 $\pm$ 6.30 b	2.16 $\pm$ 0.11 a	139.73 $\pm$ 3.68 B	3.20 $\pm$ 0.05 A

\*M, myricetin; Q, quercetin; L, laricitrin; K, kaempferol; I, isorhamnetin; S, syringetin; glcU, glucuronide; gal, galactoside; glc, glucoside; rut, rutinoside (6''-rhamnosylglucoside); ND, non-detectable. NQ, non-quantifiable. (a, b) and (A, B) indicate significant differences (Student "t" test;  $\alpha = 0.05$ ) between skin and flesh composition of Morena and Clara varieties, respectively.



**Figure 3.** Flavonol chromatographic profile (DAD at 360 nm) of BRS Morena grape skin (A) and flesh (B) and BRS Clara grape skin (C) and flesh (D). Peak numbering as in **Table 2**.

The flavonol profile of the BRS Clara grape was characterized by only 3-glycoside derivatives and a lack of B-ring tri-substituted flavonoid structures (myricetin, laricitrin and syringetin). These results are in agreement with those that have been previously reported results for *Vitis vinifera* white wine grape varieties (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2010).

The following flavonol 3-glycosides were identified through the use of ESI-MS/MS data (**Table 2**), as well as through the confirmation of on-line DAD UV-vis spectra (data not shown): the complete expected series of kampferol-type derivatives (3-glucoside, 3-galactoside, and 3-glucuronide) and quercetin-type derivatives (3-glucoside, 3-galactoside, 3-glucuronide, and 3-rutinoside), and only the isorhamnetin 3-glycoside derivatives (3-galactoside and, less frequently, 3-glucuronide derivatives) have been found in other white wine grapes. In contrast to the flavonol profiles found for the BRS Morena grape, the flavonol profiles found in the skin and flesh of the BRS Clara grape were very similar (**Figures 3C and 3D**), with few but significant differences that mainly involved increases in the proportions of quercetin 3-glycosides and their methoxylated analogue, isorhamnetin (**Table 2**). As mentioned previously, flavonols concentrated in the skin of the BRS Clara grape and its contents can be considered important (approximately 140  $\mu\text{mol/kg}$ ), because the content found in 22 varieties of white grapes varied between 8 and 160  $\mu\text{mol/kg}$ , and only four varieties (Jaén, Malvar, Moscatel grano menudo and Viognier) had values that exceeded the values obtained for BRS Clara (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2010).

Flavonols are excellent natural antioxidants. Because there is a high content of flavonols in the BRS Clara grape, we suggest that it be consumed as table grape with skins. If this grape is used in the production of white wines, a pre-fermentation of cold maceration could increase the flavonol content of the wines without causing an excessive change in wine color or oxidative browning once the wines are stored.

### **3.3 Hydroxycinnamic acid derivatives (HCAD) and stilbenes**

The expected hydroxycinnamoyl-tartaric acids were the only hydroxycinnamic acid derivatives (HCAD) found in both BRS Morena and BRS Clara grapes. The identification of cftaric acids (only trans isomer), coutaric acids (trans and cis isomers) and fertaric acids (only trans isomer) was largely completed using their ESI-MS/MS data (**Table 3**), and was confirmed by their on-line DAD UV-vis spectra (data not shown), which was in agreement with the data from the literature (BUIARELLI et al., 2010).

**Table 3.** Data for the identification of the hydroxycinnamic acid derivatives (HCAD) and stilbenes (resveratrol and its 3-glucoside, piceid) in the BRS Morena and BRS Clara grapes using HPLC-ESI-MS/MS (negative ionization mode), and molar proportions of each HCAD, total content of HCAD, and stilbene concentrations (mg/kg) in both parts of the grapes (skin and flesh; mean value  $\pm$  standard deviation).

compound*	psedomolecular and product ions ( <i>m/z</i> )	Morena molar % (skin, n=3)	Morena molar % (flesh, n=3)	Clara molar % (skin, n=3)	Clara molar % (flesh, n=3)
trans-CAFT	311; 179, 149, 135	61.91 $\pm$ 1.46 b	53.02 $\pm$ 1.17 a	82.29 $\pm$ 0.66 A	89.40 $\pm$ 0.22 B
trans-COUT	295; 163, 149, 119	23.14 $\pm$ 0.49 b	6.35 $\pm$ 1.14 a	9.12 $\pm$ 0.52 B	4.29 $\pm$ 0.07 A
cis-COUT	295; 163, 149, 119	12.41 $\pm$ 0.85 a	20.98 $\pm$ 2.22 b	7.79 $\pm$ 0.27 B	2.65 $\pm$ 0.24 A
trans-FERT	325; 193, 149	2.55 $\pm$ 0.12 a	19.65 $\pm$ 2.26 b	0.81 $\pm$ 0.11 A	3.67 $\pm$ 0.39 B
total HACD ( $\mu$ mol/kg)	-	101.1 $\pm$ 12.5 b	8.0 $\pm$ 1.0 a	85.1 $\pm$ 8.8 B	34.5 $\pm$ 2.7 A
trans-piceid **	389; 227	2.56 $\pm$ 0.64	ND	0.23 $\pm$ 0.01	ND
trans-resveratrol **	227	3.91 $\pm$ 1.00	ND	ND	ND

\* CAFT, caftaric acid; CAFF, caffeic acid; COUT, coutaric acid; COUM, p-coumaric acid; FERT, fertaric acid. \*\* Concentrations in mg/kg. ND, non-detectable. (a, b) and (A, B) indicate significant differences (Student "t" test;  $\alpha = 0.05$ ) between skin and flesh composition.

Additional confirmation was obtained by the injection of a standard of trans-caftaric acid. HCAD were present in both grape parts, and were more commonly located in the skins (ratio flesh to skin of 1:12 for BRS Morena, and 1:2.5 for BRS Clara). The BRS Morena grape contained slightly higher amounts of HCAD than the BRS Clara grape did (101 and 85  $\mu\text{mol/kg}$ , respectively).

These results are in agreement with the literature, which reported between 2 and 100 times more HCAD content in the skin of *Vitis vinifera* grape than in the flesh, and which calculated grape skin HCAD contents in the range of 19-278  $\mu\text{mol/kg}$  (CHEYNIER; MOUTOUNET; SARNI-MANCHADO, 2003), although some grape varieties were reported as reaching values as high as 800  $\mu\text{mol/kg}$  (CASTILLO-MUÑOZ et al., 2009b). The HCAD molar profile also differed according to grape variety and to the grape part being considered.

The predominant HACD was always trans-caftaric acid (especially in the case of BRS Clara) (**Table 3**), followed by coumaric acid and trans-fertaric acid. This data is consistent with the data reported for *Vitis vinifera* (CHEYNIER; MOUTOUNET; SARNI-MANCHADO, 2003). The proportion of trans-caftaric acid was significantly lower in the flesh of the BRS Morena grape. This low proportion, along with a significant decrease in the proportion trans-coumaric acid, resulted in significant increases in the proportion of cis-coumaric, and more pronounced increases in the proportions of trans-fertaric acids in the flesh. These changes occurred when these acids were minor compounds in the skins. However, the total sum of coumaric acid decreased in the flesh HCAD profile of the BRS Morena grape (from 35.55% in the skin to 27.33% in the flesh). In the case of the BRS Clara grape, the flesh contained significantly higher proportions of trans-caftaric and trans-fertaric acids than the skin. The flesh also presented significantly lower proportions of both isomers of coumaric acid.

Finally, resveratrol and its 3-glucoside (piceid) were found in the skin of the BRS Morena grape, and solely in the form of trans isomers, whereas BRS Clara skin only contained small amounts of trans-piceid (**Table 3**). There is a lack of data regarding the content of resveratrol and its isomers in non-vinifera grapes. However, according to the classification proposed for *V. vinifera* grape cultivars (GATTO et al., 2008), the amounts of stilbenes found in the BRS Morena grape suggested that it may be considered a high resveratrol producer. This type of grape cultivar is characterized by the following mean value contents of resveratrol-type derivatives (mg/kg of grape): trans-resveratrol, 2.37 (3.91 in the BRS Morena grape); cis-piceid, 4.19 (not detected in the BRS Morena grape); trans-piceid,

4.18 (2.56 in the BRS Morena grape); total resveratrols, 10.74 (6.47 in the BRS Morena grape).

In contrast, the BRS Clara grape seems to belong to the pool of low resveratrol producers. This grape variety is characterized by the following mean values (mg/kg of grape): trans-resveratrol, 0.53 (not detected in the BRS Clara grape); cis-piceid, 0.29 (not detected in the BRS Clara grape); trans-piceid, 0.48 (0.23 in the BRS Clara grape); and total resveratrols, 1.30 (0.23 in the BRS Clara grape).

### 3.4 Flavan-3-ols

Five flavan-3-ol monomers were found in the skin of BRS Morena and BRS Clara grapes (**Table 4**), the most common of which was (+)-catechin (C), followed by lower amounts of (-)-gallocatechin (GC), (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), and (-)-epicatechin 3-gallate (ECG). The dimer procyanidin B1 (PB1) was also found in amounts comparable to those of (+)-catechin, along with lower amounts of procyanidin B2 (PB2). Significant differences between the two grape varieties were found in terms of the content of (+)-catechin, which was higher in the BRS Clara grape; the BRS Clara grape also presented lower contents of the minor monomers (GC, EC and EGC) and the other dimer (PB2).

**Table 4.** Monomeric flavan-3-ol and dimer B-type procyanidin content (MV  $\pm$  SD, mg/kg grape) in the skin of BRS Morena and BRS Clara grapes.

flavan-3-ol	BRS Morena (n=3)	BRS Clara (n=3)
(-)-epicatechin	1.08 $\pm$ 0.20 b	0.50 $\pm$ 0.10 a
(+)-catechin	6.25 $\pm$ 0.52 a	10.62 $\pm$ 0.27 b
(-)-epigallocatechin	0.36 $\pm$ 0.06 b	0.08 $\pm$ 0.02 a
(-)-gallocatechin	1.47 $\pm$ 0.11 b	0.68 $\pm$ 0.03 a
(-)-epicatechin 3-gallate	0.07 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.02
procyanidin B1	10.23 $\pm$ 0.84	11.78 $\pm$ 1.48
procyanidin B2	1.28 $\pm$ 0.14 b	0.47 $\pm$ 0.05 a
total (mg/kg)*	14.98 $\pm$ 1.38 a	18.08 $\pm$ 1.20 b

\*As (+)-catechin equivalents. (a, b) indicate significant differences (Student “t” test;  $\alpha = 0.05$ ) between grape varieties.



The total sum of flavan-3-ol monomers and dimmers was low, although it was higher in the case of the BRS Clara grape (18.08 vs. 14.98 for BRS Morena, as mg/kg of (+)-catechin equivalents). The main fraction of flavan-3-ols was present in both grape varieties as oligomers and polymers, jointly referred to as grape proanthocyanidins (PA). They accounted for 391 and 264 mg/kg (as (+)-catechin equivalents (**Table 5**) for BRS Morena and BRS Clara, respectively.

**Table 5.** Structural characterization of the skin proanthocyanidins (MV  $\pm$  SD: mDP, mean degree of polymerization; % galloylation, % of 3-gallate units; % prodelphinidin, % of epigallocatechin units; and % of each of the flavan-3-ol monomers as extension and terminal units) of BRS Morena and BRS Clara grapes.

proanthocyanidins	BRS Morena (n=3)	BRS Clara (n=3)
total PA (mg/kg)*	391.4 $\pm$ 29.4 b	264.0 $\pm$ 9.8 a
mDP	9.90 $\pm$ 0.56 b	7.03 $\pm$ 0.07 a
% galloylation	2.50 $\pm$ 0.09 a	3.17 $\pm$ 0.05 b
% prodelphinidin	26.34 $\pm$ 0.12 b	12.91 $\pm$ 0.71 a
% extension-EC	57.67 $\pm$ 0.25 a	64.72 $\pm$ 0.52 b
% extension-C	3.80 $\pm$ 0.09 a	5.21 $\pm$ 0.15 b
% extension-EGC	26.02 $\pm$ 0.14 b	12.83 $\pm$ 0.69 a
% extension-ECG	2.39 $\pm$ 0.10 a	3.02 $\pm$ 0.06 b
% terminal-EC	0.82 $\pm$ 0.11 b	0.47 $\pm$ 0.09 a
% terminal-C	8.87 $\pm$ 0.46 a	13.52 $\pm$ 0.22 b
% terminal-EGC	0.32 $\pm$ 0.04 b	0.08 $\pm$ 0.02 a
% terminal-ECG	0.11 $\pm$ 0.01 a	0.14 $\pm$ 0.01 b

\*As (+)-catechin equivalents, calculated by total sum of the concentrations of extension and terminal units. EC, (-)-epicatechin; C, (+)-catechin; EGC, (-)-epigallocatechin; ECG, (-)-epicatechin 3-gallate. (a, b) indicate significant differences (Student "t" test;  $\alpha = 0.05$ ) between grape varieties.

These values were lower than the usual values reported for the total PA content in skins of *V. vinifera* grape cultivars, although some samples of Spanish Syrah grape skins were

reported as having only  $282 \pm 40$  mg/kg, as (+)-catechin equivalents (BUSSE-VALVERDE et al., 2010). The structural analysis of the proanthocyanidins of BRS Morena and BRS Clara grapes produced results (**Table 5**) that, in general, were consistent with previously reported data for *V. vinifera* grape cultivars (KATALINIC et al., 2010; LABARBE et al., 1999; SOUQUET et al., 1996). The mean degree of polymerization (mDP) was higher in the BRS Morena grape (9.90 vs. 7.03 in BRS Clara). The BRS Morena grape also had a higher proportion of prodelfhinidin units (26.34% vs. 12.91% in BRS Clara) and a lower degree of galloylation or 3-gallate ester units (2.50% vs. 3.17 in BRS Clara). The extension units that formed the skin proanthocyanidins of the two BRS grape varieties (**Table 5**) were the same as the four expected found in *V. vinifera* grape skins (SOUQUET et al., 1996): In our study, (-)-epicatechin was the main extension unit, with higher a proportion in BRS Clara (64.72% vs. 57.67% in BRS Morena).

Our analysis also revealed (-)-epigallocatechin (12.83% in BRS Clara, and 26.02% in BRS Morena), as well as (+)-catechin and (-)-epicatechin 3-gallate, which were minor extension units found in the skins of both grapes (each one contributed to no more than approximately 5%). With regard to the terminal units, it is common to find studies that only report on (+)-catechin as the main extension unit (which was significantly higher in BRS Clara), while (-)-epicatechin has been reported in lower values (BUSSE-VALVERDE et al., 2010), which was consistent with our findings (**Table 5**). However, we were able to quantify very minor percentages (less than 0.4%) of terminal units corresponding to the other flavan-3-ol monomers ((-)-epigallocatechin and (-)-epicatechin 3-gallate), which also contributed as extension units. The latter finding might be very likely linked to the higher sensitivity of the MRM technique used for detection and quantification of flavan-3-ols.

### 3.5 Total phenolic content and antioxidant capacity

The BRS Morena and BRS Clara grape varieties showed a total phenolic content of 1008 mg and 577 mg (as gallic acid equivalents) per kg of fresh fruit, respectively. This content was distributed between 86.2% in the skin and 13.8% in the flesh for the BRS Morena grape, and between 76.5% in the skin and 23.5% in the flesh for the BRS Clara grape (**Table 6**). The contents of the phenolic compounds found were significantly higher than those reported for other table grapes (70-361 mg as gallic acid per kg of fresh fruit) (CANTOS; ESPÍN; TOMÁS-BARBERÁN, 2002). The value found in BRS Morena was within the range described for *V. vinifera* red grapes (731-3486 mg as gallic acid per kg of fresh fruit) (SOUQUET et al., 1996), results which reinforced their genetic origins. The aforementioned

results confirm once again that the edible parts of these grapes, especially the skin, constitute a rich source of phenolic compounds.

**Table 6.** Total phenolic content (mg/kg, as gallic acid equivalents) and antioxidant capacity (mmol/kg, as Trolox equivalents) of BRS Morena and BRS Clara grape skin and flesh.

	<b>BRS Morena skin (n=3)</b>	<b>BRS Morena flesh (n=3)</b>	<b>BRS Clara skin (n=3)</b>	<b>BRS Clara flesh (n=3)</b>
Total Phenolic Content	869.2 ± 16.4 b	138.9 ± 0.2 a	441.2 ± 15.3 B	135.5 ± 0.1 A
Antioxidant Capacity	36.46 ± 0.92 b	3.16 ± 0.19 a	13.83 ± 0.19 B	2.10 ± 0.05 A

(a, b) and (A, B) indicate significant differences (Student “t” test;  $\alpha = 0.05$ ) between skin and flesh composition.

With regard to total antioxidant capacity (**Table 6**), BRS Morena and BRS Clara grapes exhibited high values ( $39.62 \pm 1.11$  and  $15.93 \pm 0.24$  mmol/kg as Trolox equivalents, respectively) that were mainly located at the skins (92.0% in BRS Morena, and 86.8% in BRS Clara). It is difficult to find similar data for other grapes and even more difficult to compare them because of the differences in the assay method used (DPPH vs. ABTS, for example) or because of the differences in the grape material measured (fresh weight grape, fresh weight skins or dry weight skins). For this reason, we calculated the values for antioxidant capacity of the skins of BRS Morena grapes using other units (as Trolox equivalents): 146  $\mu\text{mol/g}$  fresh weight skin; 680  $\mu\text{mol/g}$  dry weight skin; and 150  $\mu\text{M/g}$  dry weight skin. In the case of the BRS Clara grape, the values in other units were as follows: 58  $\mu\text{mol/g}$  fresh weight skin; 312  $\mu\text{mol/g}$  dry weight skin; and 63  $\mu\text{M/g}$  dry weight skin. In this context, and only considering data regarding DPPH values, the antioxidant capacity found in the BRS Morena grape skin was approximately six times higher than that of skins of *V. rotundifolia* grapes (20.5-26.6  $\mu\text{mol/g}$  fresh weight skin) (SANDHU et al., 2011). The value found in BRS Clara was approximately two times higher.

The values found in BRS Morena and the BRS Clara were approximately fifteen times higher and six times higher, respectively, than those found in some *V. aestivalis* and *V. vinifera* grapes (8-9  $\mu\text{mol/g}$  fresh weight of a mixture of skin and flesh) (HOGAN et al., 2009). In a recent study, DPPH antioxidant capacity values in the range of 94-276  $\mu\text{M}$  of Trolox equivalents per g of dry weight skin was reported for several European (*V. vinifera*), American (*V. rotundifolia*), Euro-American and Euro-Asian hybrids, as well as for Asian *Vitis*

species (XU et al., 2010). BRS Clara antioxidant capacity values were higher, and closer to the upper limit of the aforementioned range, but BRS Morena values were 2-3 times higher. On the basis of these results, it can be suggested that the skin of new grape varieties developed by EMBRAPA, especially BRS Morena, have a high potential antioxidant capacity that is linked to its equally high content of phenolic compounds. However, this high potential of antioxidant capacity needs to be evaluated using different vintages and under different cultivation conditions, because the phenolic content of grapes is strongly affected by these factors.

#### 4. CONCLUSION

The two new table grape varieties accounted for high amounts of phenolic compounds, especially for BRS Morena, which were mainly located in their skins in both cases, and high antioxidant capacity values. Proanthocyanidins and hydroxycinnamoyl-tartaric acids were the main phenolic compounds found in BRS Clara. The latter phenolic compounds were also important in BRS Morena, although anthocyanins were the main phenolic compounds in this case. These results suggest that the entire grape, including the skin, may potentially possess properties that are useful and beneficial to human health.

#### 5. ACKNOWLEDGMENTS

This work has been partially financed by funding from the IVICAM (project PREG-10-002). The authors would like to thank the following Brazilian agencies: FAPESP, for their financial assistance; CNPq, for the productivity scholarship (Da-Silva, R.); CAPES, for their scholarship, and the PDEE program (Lago-Vanzela, E.S.). The authors are also grateful to Dra. Rosimeire de Lellis Naves and Dr. Umberto Almeida Camargo for supplying the grape samples.

#### 6. REFERENCES

ANASTASIADI, M. et al. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification byproducts: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. **Food Research International**, Barking, v. 43, n. 3, p. 805-813, Apr. 2010.

BORDITA, M. et al. Pyrogallol: a new trapping nucleophile in proanthocyanidins analysis. In: CONGRESO MUNDIAL DE LA VIÑA Y EL VINO (OIV), 32., 2009, Zagreb. **Anais...** Zagreb, 2009.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERST, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BUIARELLI, F. et al. Identification of hydroxycinnamic acid–tartaric acid esters in wine by HPLC–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, London, v. 123, n. 1, p. 827-833, Dec. 2010.

BUSSE-VALVERDE, N. et al. Effect of different enological practices on skin and seed proanthocyanidins in three varietal wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 17, p. 11333-11339, Oct. 2010.

CAMARGO, U. A. et al. **BRS clara**: nova cultivar de uva branca de mesa sem semente. (Comunicado Técnico, 46). Brasília, DF: Embrapa, 2003a. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot046.pdf>>. Acesso em: 12 July 2010.

\_\_\_\_\_. et al. **BRS morena**: nova cultivar de uva preta de mesa sem semente. (Comunicado Técnico, 47). Brasília, DF: Embrapa, 2003b. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot047.pdf>>. Acesso em: 12 July 2010.

CANTOS, E.; ESPÍAN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 20, p. 5691-5696, Aug. 2002.

CARREÑO, J. et al. Chemotaxonomical classification of red table grapes based on anthocyanin profile and external colour. **Lebensmittel Wissenschaft und Technology**, London, v. 30, n. 3, p. 259-265, May 1997.

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, n. 1, p. 209-219, Jan. 2009a.

\_\_\_\_\_. et al. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 3, p. 992-1002, Feb. 2007.

\_\_\_\_\_. et al. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* white grape cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 23, n. 7, p. 699-705, Nov. 2010.

\_\_\_\_\_. 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, n. 17, p. 7883-7891, Sept. 2009b.

CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M.; SARNI-MANCHADO, P. Los compuestos fenólicos. In: FLANZY, C. (Coord.). **Enología**: fundamentos científicos y tecnológicos. Madrid: AMV Ediciones, 2003. p. 120-121.

FRAGOSO, S. et al. Application of FT-MIR spectroscopy for fast control of red grape phenolic ripening. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 6, p. 2175-2183, Mar. 2011.

GATTO, P. et al. Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 24, p. 11773-11785, Dec. 2008.

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, June 2008.

HE, J. et al. Different anthocyanin profiles of the skin and the pulp of Yan73 (Muscat Hamburg × Alicante Bouschet) grape berries. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 3, p. 1141-1153, 2010.

HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; GARCÍA-ROMERO, E. Anthocyanins of red wine grape cultivars grown in the Spanish region of La Mancha: characteristic cultivar patterns of grapes and single cultivar wines, and evolution during the ripening of the berry. **Alimentaria**, Madrid, n. 352, p. 127-139, 2004.

HOGAN, S. et al. Antioxidant properties and bioactive components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Cabernet Franc (*Vitis vinifera*) wine grapes. **Lebensmittel Wissenschaft und Technology**, London, v. 421, n. 7, p. 269-274, Sept. 2009.

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, n. 2, p. 715-723, Mar. 2010.

KENNEDY, J. A. Grape and wine phenolics: observations and recent findings. **Ciência e Investigación Agrária**, Santiago de Chile, v. 35, n. 2, p. 107-120, May/Aug. 2008.

\_\_\_\_\_; JONES, G. P. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 4, p. 1740-1746, Mar. 2001.

LABARBE, B. et al. Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 7, p. 2719-2723, June 1999.

LEÃO, P. C. S. **Recursos genéticos de videira (*Vitis* spp.): análise da diversidade e caracterização da coleção de germoplasma da Embrapa Semi-Árido**. 2008. 126 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

LIANG, Z. et al. Anthocyanin composition and content in grape berry skin in *Vitis* germplasm. **Food Chemistry**, London, v. 111, n. 4, p. 837-844, Dec. 2008.

MAKRIS, D. P.; KALLITHRAKAB, S.; KEFALAS, P. Flavonols in grapes, grape products and wines: burden, profile and influential parameters. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 5, p. 396-404, Aug. 2006.



MAZZA, G.; MINIATI, E. **Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains**. Boca Raton: CRC Press, 1993.

MAZZUCA, P. et al. Mass spectrometry in the study of anthocyanins and their derivatives: differentiation of *Vitis vinifera* and hybrid grapes by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 40, n. 1, p. 83-90, Jan. 2005.

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

PEREIRA, G. E. et al. Microclimate influence on mineral and metabolic profiles of grape berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 18, p. 6765-6775, Sept. 2006.

POUDEL, P. R. et al. Influence of Temperature on Berry Composition of Interspecific Hybrid Wine Grape 'Kadainou R-1' (*Vitis ficifolia* var. ganebu × *V. vinifera* 'Muscat of Alexandria'). **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v. 78, n. 2, p. 169-174, 2009.

QUIJADA-MOLINA, D. M. A. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of table grape (*Vitis vinifera* L.) skin from northwest Mexico. **CyTA – Journal of Food**, Galicia, v. 8, n. 1, p. 57-63, May 2010.

SANDHU, A. K. et al. Effects of exogenous abscisic acid on antioxidant capacities, anthocyanins, and flavonol contents of muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) skins. **Food Chemistry**, London, v. 126, n. 3, p. 982-988, June 2011.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: SIES H. et al. (Ed.). **Methods in enzymology: polyphenols and flavonoids**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 152-178.

SOUQUET, J. et al. Polimeric proanthocyanidins from grape skins. **Phytochemistry**, New York, v. 43, n. 2, p. 509-512, Sept. 1996.

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson Seedless grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 38, n. 7, p. 1565-1571, July 1999.

VERDEJO FERNÁNDEZ, C. et al. Contribución al estudio para la zonificación de la denominación de origen Valdepeñas: análisis de la uva de la vendimia 2004. **Enólogos**, Madrid, v. 9, n. 45, p. 58-66, 2007.

XIA, E. et al. Biological activities of polyphenols from grapes. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 11, n. 2, p. 622-646, Feb. 2010.

XU, C. et al. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. **Food Chemistry**, London, v. 119, n. 4, p. 1557-1565, Apr. 2010.



YADAV, M. Biological and medicinal properties of grapes and their bioactive constituents: an update. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v, 12, n. 3, p. 473-483, June 2009.

# CAPÍTULO 5

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LATENT AND ACTIVE  
POLYPHENOLOXIDASE IN BRS CLARA (CNPUV 154-147 X *CENTENNIAL  
SEEDLESS*) AND BRS MORENA (*MARROO SEEDLESS* X *CENTENNIAL SEEDLESS*)  
SEEDLESS TABLE GRAPES**

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LATENT AND ACTIVE  
POLYPHENOLOXIDASE IN BRS CLARA (CNPUV 154-147 X CENTENNIAL  
SEEDLESS) AND BRS MORENA (MARROO SEEDLESS X CENTENNIAL SEEDLESS)  
SEEDLESS TABLE GRAPES**

Ellen Silva LAGO-VANZELA, Fabiana Cristina PAVEZZI; Natália MARTIN, Eleni  
GOMES, Roberto DA-SILVA

Sao Paulo State University, UNESP, IBILCE, Laboratory of Biochemistry and Applied  
Microbiology, R. Cristovao Colombo 2265, Sao Jose do Rio Preto-SP 15054-000, Brazil

**ABSTRACT**

The seedless grapes *BRS Clara* and *BRS Morena*, developed in Brazil, are currently growing in popularity due to their premium texture and taste. However, there are no reports on the polyphenol oxidase (PPO) from these cultivars. In this paper, active and latent PPO from *BRS Clara* and *BRS Morena* seedless grapes were extracted using the nonionic detergents Triton-X-100 (active) and Triton-X-114 (latent), and their catecholase activities were characterized. The PPO extracted using Triton-X-110 exhibited maximum activities at pH 6.0 and at 25°C. Above 30°C, a gradual decline in activities was noted, with complete inactivation at 60°C. The PPO from grapes extracted with Triton-X-114 was activated with 0.2% ionic detergent sodium dodecyl sulfate (SDS), and exhibited maximum activities at pH 5.5 and at 30°C. It was stable until the temperature reached 60°C.

## 1. INTRODUCTION

The Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) developed two new cultivars of seedless grapes (BRS Clara and BRS Morena) that are adapted to the tropical regions found in the country. These cultivars have great potential for commerce due to their tropical flavors (CAMARGO et al., 2003a,b). Handling, transporting and storing these berries may damage their physical integrity, modifying their cellular compartments and consequently releasing the phenolic compounds of the intracellular content along with their oxidative enzymes particularly polyphenol oxidase (PPO, EC 1.14.18.1). This contact instigates oxidative reactions that result in enzymatic browning of the berries, which limits the quality and economic value of the product and which also lowers the nutritional value. The extent of browning depends on oxygen, endogenous phenolic compounds, and PPO contents (MAYER; HAREL, 1979).

Polyphenoloxidase (PPO, EC 1.14.18.1) is a copper-containing enzyme which, in the presence of oxygen, catalyzes the hydroxylation of monophenols to *o*-diphenols (cresolase activity) and the oxidation of *o*-diphenols to their corresponding *o*-quinones (catecholase activity). Catecholase activity is particularly high in black grapes (NÚÑEZ-DELICADO et al., 2007; RAPEANU et al., 2006), but the extraction of catecholase for biochemical studies is complicated by the existence of an important secondary metabolism that produces highly reactive phenols and tannins that are confined to vacuoles *in vivo* (NÚÑEZ-DELICADO et al., 1996). The extraction protocols of these enzymes generally work toward an effective and economically viable method that meets certain requirements: it is able to solubilize the enzymes bound to the cell wall; it is able to prevent oxidation of phenolic compounds, and it is able to protect the metabolites of interest from deterioration. Different methods have been developed to this end, such as acetone powders, ammonium-sulfate fractionation, salts, insoluble polymers and detergents (WESELAKE; JAIN, 1992).

PPO may exist in either its active or its latent state, but the methods used to extract the enzymes differ depending on the state. In recent years, frequent attention has been given to the use of two-phase aqueous micellar system extraction and purification of PPOs using the non-ionic detergent Triton-X-114, whose action results in the removal of phenolic and anthocyanin compounds and which yields PPO in a clear solution (NÚÑEZ-DELICADO et al., 2007). The PPO obtained under these conditions is latent (FORTEA et al., 2009; LÓPEZ-MIRANDA et al., 2011; NÚÑEZ-DELICADO et al., 2005, 2007). PPO can be activated by exposure to either acidic pH, different concentrations of ionic detergent sodium dodecyl

sulfate (SDS), or unsaturated fatty acids or through its incubation with proteases (SELLÉS-MARCHART; CASADO-VELA; BRU-MARTÍNEZ, 2007).

The PPO enzymes of fruits, including grapes, are also commonly isolated in their natural (active) form with 1% of nonionic detergent Triton-X-100 at a neutral pH. Sometimes, this extraction involves agents such as polyvinyl pyrrolidone (PVP) or polyethylene glycol (PEG) and ascorbic acid to remove polyphenols and to prevent accumulation of oxidative products of polyphenols (CENI et al., 2008; GONZÁLEZ; DE-ANCOS; CANO, 2000; HAREL; MAYER, 1971; HAREL; MAYER; LEHMAN, 1973; SUN et al., 2010; WEEMAES et al., 1998; WUYTS; DE-WAELE; SWENNEN, 2006). There are also reports of a precipitation step using organic solvents or using v/v (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and dialysis to completely remove compounds that could interfere with PPO characterization (AYDEMIR, 2010; SERRADELL et al., 2000).

Both detergents (Triton-X-100 and Triton-X-114) have a polyoxyethylene group with the same length as the alkyl group (C8), but they differ in their number of oxyethylene units, with 9 and 7 units, respectively. This feature strongly influences their cloud points, which is approximately 22°C in the case of Triton-X-114 and approximately 67°C in the case of Triton-X-100. Triton-X-114 is capable of separating hydrophilic proteins, such as PPO enzymes, through the use of two-phase aqueous micellar systems at biocompatible temperatures (SÁNCHEZ-FERRER et al., 1994).

Investigations to determine the characteristics of grape PPO and its most active conditions have been conducted in various grape varieties, including *Vitis vinifera*, *Vitis labrusca* and related hybrids (FORTEA et al., 2009; NÚÑEZ-DELICADO et al., 2007; RAPEANU et al., 2006; SÁNCHEZ-FERRER et al., 1988; UNAL; SENER, 2006; UNAL; SENER; SEN, 2007; WEEMAES et al., 1998; YILMAZ; SAKIROGLU; KUFREVIOGLU, 2003). As far as we know, no study has reported on PPO from BRS Morena and BRS Clara grapes. Therefore, more studies were needed to increase the information available on this cultivar. In this study, active and latent forms of these enzymes were isolated, and their catecholase activities were characterized.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Grapes**

The BRS Morena and BRS Clara seedless grapes used were in the optimal commercial stage of maturity, as measured by the soluble solids content (SSC = 16.3 and 18.9 °Brix,

respectively). The samples used were donated by the Experimental Station of Tropical Viticulture of EMBRAPA (the Brazilian Agricultural Research Corporation), from the city of Jales in the state of Sao Paulo, Brazil.

The grapes were quickly and carefully transported to the Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology of IBILCE/UNESP in the city of Sao Jose do Rio Preto, also in the state of Sao Paulo. Three replications of 10 grapevines were selected, and a 1.5 kg random sample was picked for each replication. The grapes were conditioned in plastic bags in 100g portions and were kept refrigerated at 4°C ( $\pm$  1°C) until further analysis.

## **2.2 Study of enzymatic extraction protocol**

Grapes were extracted in triplicate using two different methods for obtaining PPO enzymes in active and latent forms.

### ***2.2.1 Extraction of PPO from grapes in their active form***

The grapes (50 g) were washed and homogenized with the aid of a mixer at maximum speed for 30 seconds in six different extracting solutions (1:1, p/v). The first extracting solution was a 0.2-M sodium phosphate buffer at pH 6.5, serving as the negative control. The second was a 0.2-M sodium phosphate buffer at pH 6.5, containing 10 mM of ascorbic acid, 1 mM ethylenediaminetetraacetic (EDTA), 2% polyvinylpyrrolidone (PVP), 0.5 M of NaCl (sodium chloride) and 1% Triton-X-100, a solution which served as the positive control. The other four solutions were similar to the positive control, but in each of these four solutions, one of the components was excluded (ascorbic acid, EDTA, NaCl or Triton-X-100).

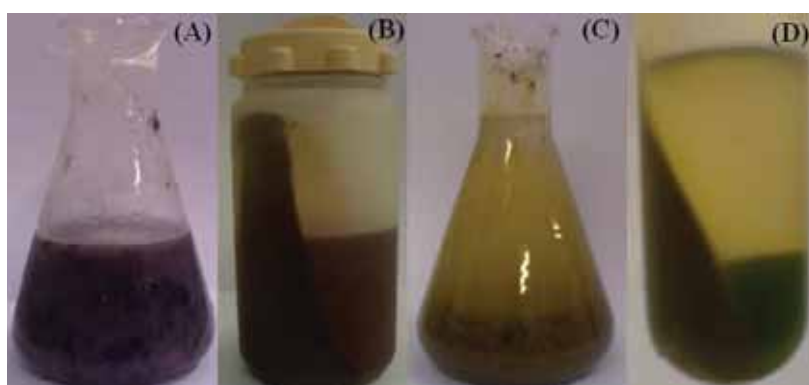
The homogenates were mixed for 30 minutes and then centrifuged for 20 min/10,000 g at 4°C (Avanti J-25, BECKMAN COULTER). Aliquots of the crude enzymatic extracts were first subjected to precipitation with commercial alcohol (92%) at 80-90% (v/v) in order to completely remove compounds that could interfere with PPO characterization. After this process, the solution was left untouched for 12 h at 2°C and was then centrifuged again at 10.000 g/20 min at 1°C. The pellet obtained was suspended in a minimal volume of 0.2 M sodium phosphate buffer at pH 6.5. The partially purified PPO in active form (PPO-A) was used in the enzymatic assays. The enzymatic activity (EA) and proteins were assayed after extractions. The purification factor was determined as:

$$\text{Yield EA} = \text{EA step} / \text{EA crude extract} \times 100$$

$$\text{Purification factor EA} = \text{EA specific step} / \text{EA specific crude extract}$$

### 2.2.2 Extraction of PPO from grapes in their latent form

The extraction was carried out in two steps. In step 1, the grapes (100 g) were washed and homogenized with the aid of a mixer at maximum speed for 30 seconds with 50 mL of a 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.3) containing 10 mM ascorbic acid and 1% PVP for BRS Clara and 5% PVP for BRS Morena (**Figure 1A**). The homogenates were filtered through eight layers of gauze and centrifuged at 4.000 g and 4°C for 15 minutes. The supernatants were then discarded (**Figure 1B**).



**Figure 1.** Steps for obtaining PPO in latent from the BRS Morena grape using two-phase aqueous micellar systems with Triton-X-114 as a surfactant.

In step 2, the precipitates were extracted with 20 mL of 4% Triton-X-114 (w/p) in a 100-mM sodium phosphate buffer (pH 7.3). The mixtures were subjected to temperature-induced phase partitioning by maintaining the emulsion at 4°C for 15 minutes, and then warming to 37°C for 15 minutes. At this time, the solutions became spontaneously turbid due to the formation, aggregation and precipitation of large mixed micelles of detergent, which contained hydrophobic proteins and phenolic compounds (**Figure 1C**). These turbid solutions were centrifuged at 10,000 g for 15 minutes at 25°C (**Figure 1D**). After centrifugation, the detergent-rich phases were discarded and the clear detergent-poor supernatants were used as purified PPO in latent form (PPO-L) (NÚÑES-DELICADO et al., 2007).

### 2.3 Enzyme activities

Catecholase activities were assessed in triplicate using a DU 640 spectrophotometer (BECKMAN COULTER) following the method of González; De-Ancos; Cano (2000), with modifications. No significant oxidation of catechol (the most common substrate used to assay activity of plant polyphenoloxidases) was observed in any of the experiments during the short period employed to measure PPO activity. The corresponding means and standard deviations



were plotted. The reaction mixture was made up of 2.4 mL of a 0.2-M sodium phosphate buffer at pH 6.5, and 0.3 mL of 0.1 M catechol, to which 0.3 mL of the (adequately diluted) enzymatic extract were added. The reaction was carried out at 25°C for 5 minutes. The control sample contained 2.4 mL of a 0.2-M sodium phosphate buffer at pH 6.5, 0.3 mL of 0.1 M catechol and 0.3 mL of enzymatic extract that had been previously inactivated.

In the SDS standard assay, samples contained the above mixture, and 0.25 % SDS detergent was utilized. The degree of activation was determined as the ratio of reaction with SDS/without SDS at different pHs. The rate of the reaction was calculated from the initial linear portion of the curve of  $\lambda A_{420}$  versus time.

One unit of enzyme activity (U) was arbitrarily defined as the amount of enzyme that caused an increase in the absorbance of 0.001/min/100 g fresh fruit under the assay conditions. Specific activity was expressed as units of enzymatic activity per mg of protein.

#### **2.4 Determination of total proteins**

Protein content was measured following the method of Hartree (1972), using bovine serum albumin (BSA) as standard.

#### **2.5 Determination of phenolic compounds present in the enzyme extract**

Total phenolics were quantified using a modified Folin-Ciocalteu colorimetric method (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999). The results were expressed as mg gallic acid eq/L. Calibration was performed by analyzing the standard gallic acid (Sigma - Aldrich CO, USA) at different concentrations in the range of 0 - 500 mg ( $R^2 = 0.9965$ ). The percentage of total phenolics in latent form (Triton-X-114) was calculated by comparing it to the active form (Trinton-X-100), which corresponds to 100%.

#### **2.6 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis**

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out to determine the purity of the enzymes as described by Laemmli (1979). Proteins were denaturated in a boiling water bath for 5 min in an electrophoresis sample buffer containing 0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 0.1 M DTT and 0.001 M Bromophenol blue. Twelve percent running gel and 4% stacking gel were prepared according to Sambrook; Russel (2001). Staining was performed according to Blum; Bier; Gross (1987).

## **2.7 Native-Page gel electrophoresis**

The polyacrylamide concentration was 12% and concentrator gel was 4%, as outlined by Sambrook; Russell (2001). A sample buffer consisting of 0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol, and 0.001 M bromophenol blue was mixed with the proteins, and the resulting solution was applied to the gel twice. Once the run was finished, the gel was divided into two parts, and revelation was performed as follows: one part was revealed using the silver reagent method (BLUM; BIER; GROSS, 1987) and the other part was revealed by determining the PPO activity in bands following the method adapted from Anil-Kumar; Kishor-Mohan; Murugan (2008) and Vanloon (1971). For the second method, the gel activity was balanced in a 50-mM citrate buffer at pH 5.0 for 30 minutes at room temperature. It was then incubated in the same buffer containing 50 mM catechol for 30 minutes under vigorous agitation until the bands appeared.

## **2.8 Effects of pH and temperature on enzyme activity**

To determine the optimum pH of the PPO enzymes, partially purified activities were measured under standard assay conditions (25°C, using catechol as substrate), at different pH values using the following 0.2-M buffer solutions: sodium acetate (pH 3.0-5.5) and sodium phosphate (pH 5.5-8.0). PPO activity as a function of temperature was determined under standard assay conditions (pH 6.5, using catechol as substrate) using temperatures from 15 to 65°C, with 5-degree intervals.

The effect of SDS concentration on the activities of the PPO enzymes was evaluated by incubating the extracts at optimum pHs in different concentrations of SDS (0.1 - 0.8 M). In this study, experiments were performed to evaluate the effect of the detergent SDS on the kinetic parameters, and also to find the optimum pH and temperature of latent PPO from grape berries. In these experiments, both the phosphate buffer and the substrate solution were prepared with a set concentration (0.25%) of SDS as the detergent. pH studies were carried out both with and without SDS using a 0.2-M sodium phosphate buffer at a pH that ranged from 3.5 to 8.0. PPO activity as a function of temperature was determined under standard assay conditions (optimum pH and concentration of SDS) using temperatures from 15 to 65°C, with 5-degree intervals.

## **2.9 Effects of pH and temperature on enzyme stability**

For pH stability, the enzyme was dispersed (1:1) in the following 0.2-M buffer solutions: sodium acetate (pH 3.0-5.5) and sodium phosphate (pH 5.5-8.0), and maintained at

25°C for 24 h. The percentage of residual PPO activity was calculated by comparing it to the non-heated enzyme, which was determined under optimum conditions of pH and temperature (6.5 and 25°C, respectively) and which corresponds to 100%.

Thermal stability was assayed by incubating the enzyme at different temperatures ranging from 15°C to 75°C with 5-degree intervals for 1 h. Residual enzyme activities were then determined as a percentage of the residual non-heated enzyme under optimum pH and temperature conditions (6.5 and 25°C, respectively). In activation assays, SDS was added at a routine concentration of 0.25%.

### **3. RESULTS AND DISCUSSION**

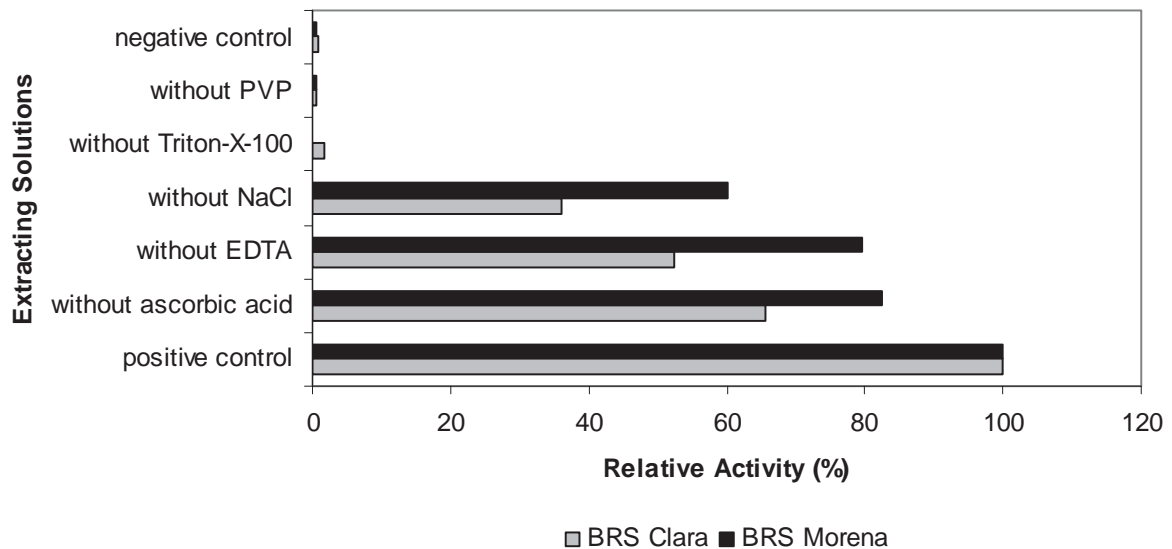
#### **3.1 Study of enzymatic extraction protocol for the PPO enzymes of the grapes**

The effect of each component of the extraction solutions on PPO activity (active) from BRS Clara and BRS Morena was investigated, and can be seen in **Figure 2**. It is important to note that the 0.2M sodium phosphate buffer at pH 6.5 (negative control) alone is inadequate when attempting to extract PPO from grape cell compartments. A great variety of buffers can be used for the extraction, with pH values that vary according to the enzyme source, but they are generally adjusted to guarantee a slightly acidic medium.

In the literature, there are studies in which PPOs are extracted using only buffer solutions, as was the case of Todaro et al. (2010) for the enzyme from artichokes. However, it is more common to use more complex extraction solutions, in which a cocktail of substances is added to preserve the structure of the biological material and to optimize enzymatic extraction, as in the study by González, De-Ancos and Cano (2000). In our study, we were able to verify that the synergism among the ascorbic acid, EDTA, PVP, Triton-X-100 and NaCl (positive control), can be used for an adequate extraction yield and stability of PPOs. Of these components, the presence of Triton and PVP proved to be essential, because their absence made enzyme extraction from the plant tissue difficult.

In comparison to animal tissues and microbial cells, plant tissues have a lower protein content and, the vacuole, which occupies a large part of the cell, may contain numerous compounds, including high levels of phenolic compounds, as in the case of red grapes. Methods to avoid or minimize the reaction of PPO with these phenols include the use of poly vinyl (poly) pyrrolidone (PVP and PVPP) (MAYER; HAREL 1979). PVP is an insoluble synthetic polymer of high molecular mass that is sold as a white powder with low granulometry. It is able to form hydrogen bonds with phenols. This forms a chelate complex

with the phenols, thus avoiding their interaction with the oxireductases, which makes the extraction of the target molecule easier. **Figure 2** shows that the addition of PVP to the extracting solution was essential in obtaining the desired enzyme, as described by Fang et al. (2007), for PPOs from the Chinese strawberry (bayberry).



**Figure 2.** Grape PPO extraction. (Positive control: sodium phosphate buffer; ascorbic acid; EDTA, PVP, NaCl and Triton-X-100). Negative control: 0.2-M sodium phosphate buffer (pH 6.5). (Other points on the y-axis represent the extracting solutions described without the indicated reagent).

The synergism between Triton-X-100 detergent and PVP was clear in the extraction of the enzymes from both Brazilian seedless grapes. In many cases, the oxireductactes were found in both soluble and insoluble forms. The strength of the bond of the oxireductases to the membranes seems to vary depending on the plant tissue and on the stage of its development. The results indicate that PPO enzymes from BRS Morena and BRS Clara are predominantly found in the insoluble form (less than 5% of the activity corresponding to the soluble fraction), and more drastic conditions were required to solubilize the oxireductases associated with the cell wall, such as the use of detergent Triton-X-100.

Similar results were observed by Yokotsuka, Makino, and Singleton (1988) in the case of Koshu grape must. They reported that the total insoluble activity was higher than the soluble activity. This detergent exhibits the ability to cause very mild protein denaturation, which reduces the interactions with particles or with the fruit's cell wall, aiding in enzyme extraction. The addition of NaCl and Triton-X-100 together likely contributed to the

dissociation of the bonds between enzymes and the cell wall. The use of an extracting solution comprised mostly of PVP and Triton-X-100 for the extraction of PPO enzymes has been successfully reported for other grape cultivars (SÁNCHEZ-FERRER et al., 1988; VALERO; VARÓN; GARCIA-CARMONA, 1988; WEEMAES et al., 1998).

Whether combined with other chelating agents or not, ascorbic acid and EDTA are known as efficient PPO inhibitors and are alternatively used by the food industry as antioxidants in fruits and vegetables in order to prevent enzymatic browning. EDTA has the ability to form complexes with copper ion ( $\text{Cu}^{2+}$ ), which is part of a prosthetic group that is essential for the catalysis of metalloenzyme PPO (SATROUTDINOV et al., 2000). Ascorbic acid acts mainly on the reaction products, minimizing enzymatic browning through the reduction of quinones to phenols, which are initially formed by enzyme action before the quinones polymerize through secondary reactions, leading to the formation of melanins. However, ascorbic acid can also act on enzymatic inhibition as an acidifier (SAPERS, 1993).

It has been verified that both EDTA and ascorbic acid are also effective for PPO extraction. When EDTA and ascorbic acid were removed from the positive control (**Figure 2**), losses of PPO activity were noted: there was a loss of 20% to 48% without EDTA, and a loss of 17% to 34% without ascorbic acid. This result may seem contradictory at first when we consider the effects that they have on PPO enzymes, but it is important to note that they were eliminated through alcoholic fractionation processes.

The components added to the extracting solution, as well as natural substances extracted with the enzymes, may interfere with the action and characterization of the enzymes. Because of this potential interference, a partial purification was completed with ethanol fractionation. The isolation results for PPO enzymes from BRS Morena and BRS Clara are shown in **Table 1**. The use of 80% ethanol resulted in enzymatic precipitates of PPO from BRS Morena and the use of 90 % ethanol resulted in enzymatic precipitates of PPO from BRS Clara. These ethanol levels also resulted in the highest specific activities, along with higher yields and purification factors.

The membrane-bound PPO latent forms from BRS Morena and BRS Clara were extracted and homogenized with a 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.3) containing 10 mM ascorbic acid and PVP; after centrifugation, supernatants were obtained, particularly from the BRS Morena grape, with large amounts of phenolics and anthocyanins.

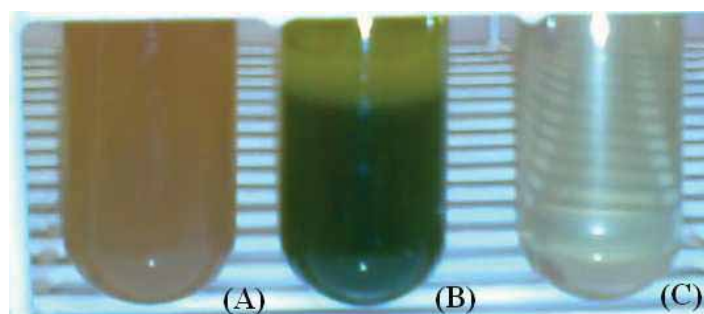
Since they interfere with the spectrophotometric determination of PPO activity, they were discarded (Step 1, **Figure 3A**). In step 2, the precipitates were extracted with more than 4 % Triton-X-114 (w/p) in a 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.3). After phase

separation induced by incubation, we were able to separate them into two phases: a lower phase containing hydrophobic proteins and probably the pigments, especially chlorophyll (**Figure 3B**), and a higher phase with very clear pigments containing hydrophilic enzymes, in which PPO activity was detected (**Figure 3C**). The PPO enzymes extracted with this protocol possessed the property of latency, a behavior which has been reported for other grape cultivars (FORTEA et al., 2009; NÚÑEZ-DELICADO et al., 2007) and for other fruits (CABANES et al., 2007; FRAIGNIER et al., 1995; SELLÉS-MARCHART; CASADO-VELA; BRU-MARTÍNEZ, 2007).

**Table 1.** Fractionations of total PPO enzymes from BRS Morena and BRS Clara\*.

fraction	Vol (mL)	Enz. Act. (U/ml)	Tot. Prot. (mg)	Tot. Act. (U)	Specific Act. (U/mg)	Yield (%)	Purif. Factor (fold)
<b>BRS Morena</b>							
<b>TX-100</b>	3.0	1344.11	14.82	4033.33	272.09	100	1
<b>Ethanol 80%</b>	1.5	5146.22	4.49	7719.33	1717.58	191	6.3
<b>BRS Clara</b>							
<b>TX-100</b>	3.0	1295.98	16.84	3887.95	230.94	100	1
<b>Ethanol 90%</b>	1.5	3742.22	4.95	5613.33	1134.28	144	4.9

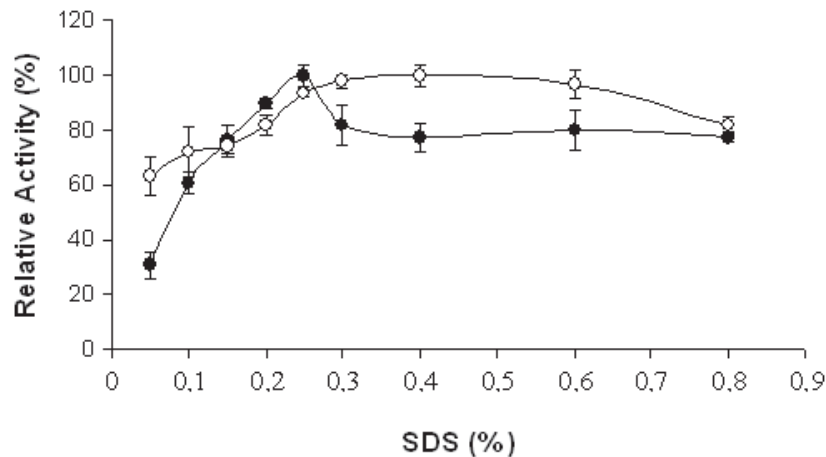
\* TX-100: Triton-X-110; TX-114: Triton-X-114; Vol = volume; Enz. Act. = Enzyme Activity; Tot. Prot. = Total Proteins; Tot. Act.= total activity; Specific Act. = Specific activity; Purif. = Purification. One unit of enzyme activity (U) was arbitrarily defined as the amount of enzyme that caused an increase in absorbance of 0.001/min/100 g fresh fruit, under the assay conditions.



**Figure 3.** Solubilization of the grape BRS Morena with the detergent Triton-X-114 followed by temperature-induced phase separation: supernatant (A); detergent-rich phase (B); clear, detergent-poor supernatant phase (C).

Due to the difficulty of direct experiments on fruit, it is believed that the activation properties *in vitro* are comparable to those of activation *in vivo* (GANDÍA-HERRERO et al., 2005). The use of SDS as an agent activator is particularly important, because the PPO is activated at concentrations of SDS in which most enzymes are denatured (NÚÑEZ-

DELICADO et al., 2007). Thus, the effect of SDS concentration on the activities of PPO enzymes was determined by incubating the extracts in suitable substrates prepared at optimum pH at different concentrations of SDS (0.1 - 0.8 M) (**Figure 4**).



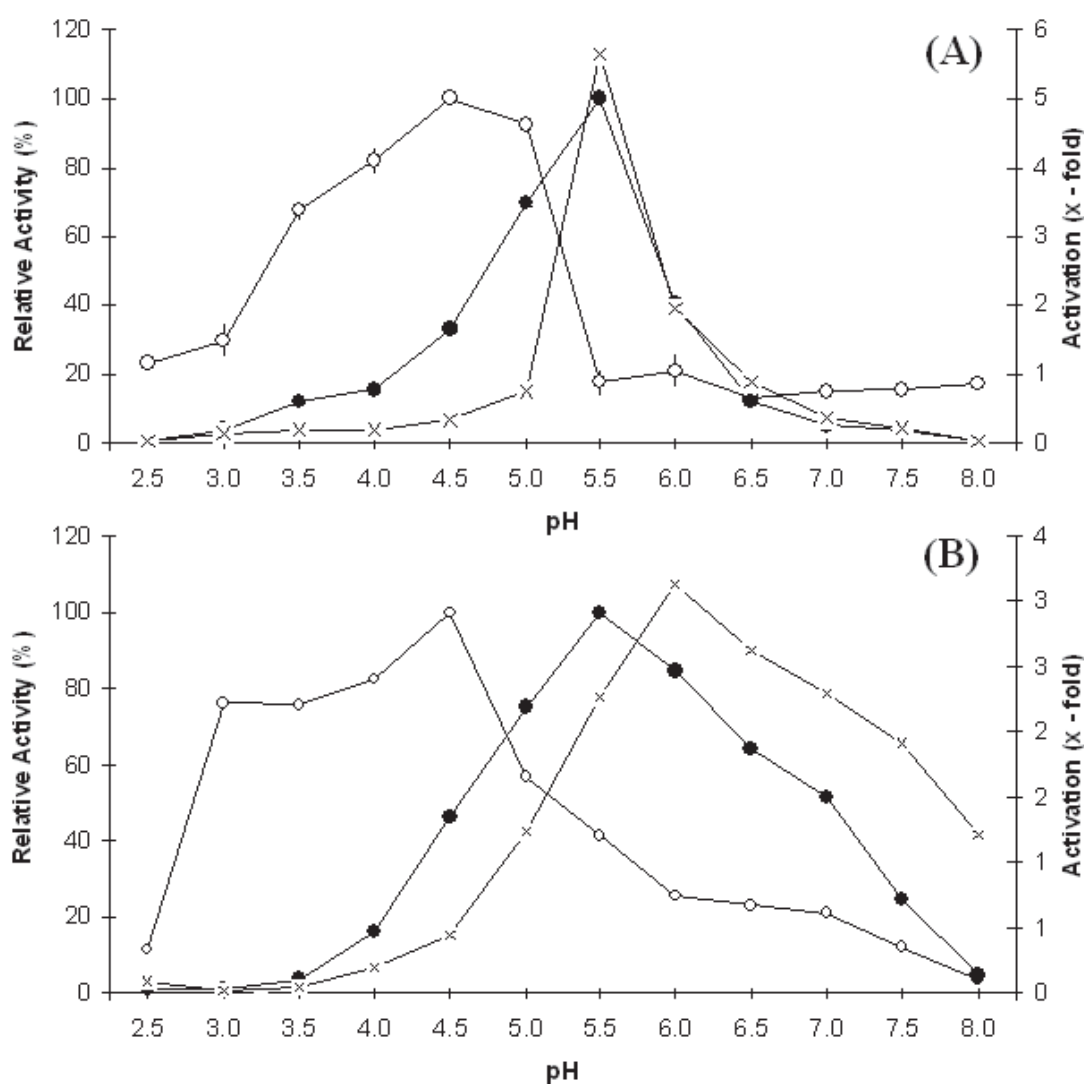
**Figure 4.** Effect of SDS concentration on PPO activities of BRS Clara (●) and BRS Morena (○).

According to Pérez-Gilabert et al. (2001), the amount of SDS necessary to obtain a maximum activation depends on the nature of the substrate. In this study, using catechol as substrate, the results showed the positive effect of the addition of SDS in the reaction mixture on PPO activity with concentrations of 0.25% for BRS Clara and 0.3 - 0.6% for BRS Morena. SDS concentrations that were higher than these levels decreased the activities. The inhibition of PPO activity through the use of high concentrations of SDS have been reported by Núñez-Delicado et al. (2007) in the case of the Napoleon grape. The degree of PPO activation at different pHs was determined by incubating the enzymes in buffers with different pH levels both with and without SDS at 25°C. **Figure 5** shows that pH was an important factor for the PPO activity profile of grapes.

Without SDS, the enzymes showed high activity at extremely acidic pH levels, especially in the case of BRS Morena enzymes. Their activation by short exposure to acid (acid shock) has been widely reported for various PPO enzymes of plant origin (CABANES et al. 2007; CHAZARRA et al. 1996; NÚÑEZ-DELICADO; GARCÍA-CARMONA, SÁNCHEZ-FERRER, 2003) and also for other cultivars of grapes, including the Napoleon grape (NÚÑEZ-DELICADO et al., 2007), using different substrates. However, when SDS was added as a detergent to the reaction medium, the optimum activity of the enzymes shifted



to pH 5.5 and 6.0, with 3 times more PPO activity in BRS Clara and with 6 times more PPO activity in BRS Morena (**Table 2**). Other authors have also reported on the activity of PPO enzymes of plant origin with SDS at pH higher than 5.0 (MOORE; FLURKEY, 1990; SELLÉS-MARCHART; CASADO-VELA; BRU-MARTÍNEZ, 2007; RATHJEN; ROBINSON, 1992). The degree of SDS activation obtained for peaches (3.5-fold) (CABANES et al., 2007), lettuce (5-fold) (CHAZARRA et al., 1996) and mushrooms (6-fold) (NÚÑEZ-DELICADO et al., 1996) were similar to those found in the grapes of this study.



**Figure 5.** Effect of pH on PPO activity of BRS Clara (A) and BRS Morena (B) grapes in a 0.2-M sodium acetate buffer (pH 3.0 - 5.5) and a 0.2-M sodium phosphate buffer (pH 6.0 – 8.0) with 0.25 % SDS (●) and without 0.25 % SDS (o). Degree of activation at different pHs (x).

However, other fruits have been reported to have greater degrees of activation, such as persimmons (15-fold) (NÚÑEZ-DELICADO; GARCÍA-CARMONA; SÁNCHEZ-FERRER, 2003), loquats (16.2-fold) (SELLÉS-MARCHART; CASADO-VELA; BRU-MARTÍNEZ, 2007), Monastrell grapes (19.2-fold) (SÁNCHEZ-FERRER; BRU; GARCÍA-CARMONA, 1989), Napoleon grapes (22-fold) (NÚÑEZ-DELICADO et al., 2007), Crimson Seedless grapes (40-fold) (FORTEA et al., 2009) and Dominga grapes (43.7-fold) (NÚÑEZ-DELICADO et al., 2005).

**Table 2.** Comparison between the activities of membrane-bound PPO grapes (BRS and BRS Morena Clara) and the percentage of phenolics\*.

<b>fraction</b>	<b>Enz. Act.</b> <b>(Ux10<sup>3</sup>/100g flesh fruit)</b>	<b>Phenolics</b> <b>(%)</b>	<b>Activation</b> <b>(fold)</b>
<i><b>BRS Morena</b></i>	-	-	-
<b>Triton-X-100</b>	227.21	100	-
<b>Triton-X-114</b>	266.76	14	6
<i><b>BRS Clara</b></i>	-	-	-
<b>Triton-X-100</b>	142.95	100	-
<b>Triton-X-114</b>	167.56	67	3

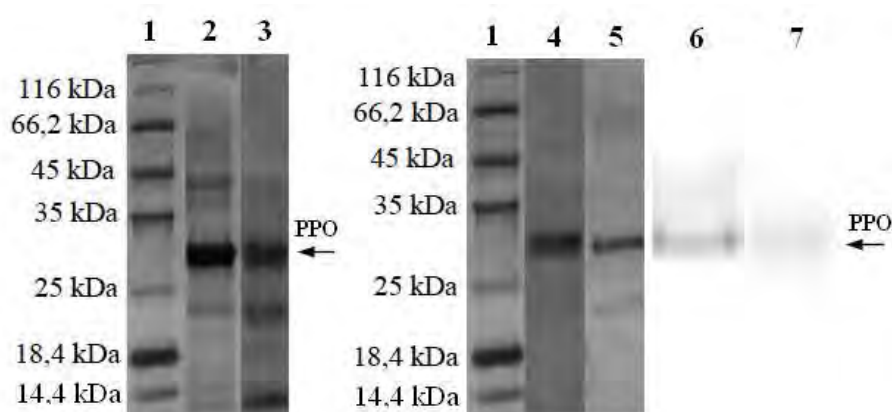
\* Enz. Act. = Enzyme Activity; n.d. = not determined; Phenolic (%) = The percentage total phenolics of latent (Triton-X-114) were calculated by comparison with active form (Triton-X-100), which corresponds to 100%.

When compared to the extracts obtained with the aid of Triton-X-100 detergent, the enzymatic extracts obtained with the aid of Triton-X-114 showed a significant decrease in the percentage of phenolic compounds, especially with respect to BRS Morena grape extract (**Table 2**). **Figure 6** shows the SDS-PAGE of enzymatic extracts of BRS Morena and BRS Clara grapes obtained with the aid of Triton X-100 (**Figure 6**, Columns 2 and 3, respectively), Triton-X-114 (**Figure 6**, Columns 4 and 5) and Native-PAGE of Triton-X-114 (**Figure 6**, Columns 6 and 7).

Several bands were visualized in extracts from grapes obtained with Triton-X-100, especially the BRS Morena grape, possibly due to the presence of other enzymes present in crude extract. Some authors suggest that the presence of multiple forms may, in some cases, be due to artifacts generated by the partial release of enzymes connected to the membranes through partial denaturation, proteolysis or fragmentation (HAREL; MAYER, LEHMAN, 1973).

**Figure 6** shows that the PPO obtained with Triton-X-114 was partially purified, suggesting an efficient removal of phenolic compounds. This removal may have prevented

the multiplicity of activity bands arising from the formation of artifactual bands because of the covalent interaction of *o*-quinones and phenols with the enzyme. The PPO enzymes obtained with Triton-X-114 were found one strong protein band of approximately 30kDa, whose activity was revealed by electrophoresis with Native-PAGE in the case of both grapes (**Figure 7**, Columns 6 and 7). This value is in agreement with the range reported for PPO enzymes in plants (26 - 32kDa) by Mayer, Harel (1979) and is similar to the range found by Virador et al. (2010) for Grenache grape PPO, which was 38.4 kDa.



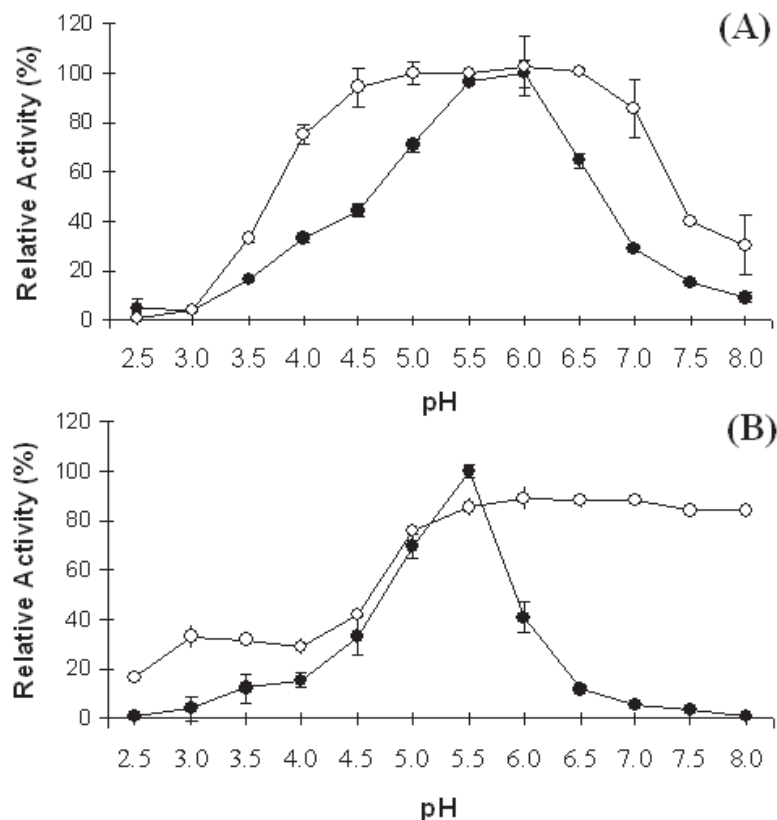
**Figure 6.** Electrophoresis in polyacrylamide gel containing SDS (SDS-PAGE) at 12% concentration. Column 1: molecular weight markers:  $\beta$  galactosidase, 116 kDa, BSA, 66.2 kDa, ovalbumin, 45 kDa, lactate dehydrogenase, 35 kDa; Bsp981 Reaser, 25 kDa,  $\beta$ -lactoglobulin, 18.4 kDa; Columns 2 and 4: enzymatic extracts of BRS Morena and BRS Clara obtained with Triton-X-100; Columns 3 and 5: enzymatic extracts of BRS Morena and BRS Clara obtained with Triton-X-114; Columns 6 and 7: Native-PAGE, for the enzymatic extract of BRS Morena and BRS Clara obtained with Triton-X-114. Arrows indicate PPO enzymes of the grapes.

### 3.2 PPO physical-chemical characterization

The biochemical characterizations of active and latent PPO enzymes from BRS Clara and BRS Morena grapes are presented in **Figures 7, 8, 9** and **10**. It can be seen that the maximum activity for active PPO from both grapes occurred at pH 6.0 (**Figure 7A** e **8B**), which is consistent with the reports on other grape cultivars, including DeChaunac (LEE; SMITH; PENNESI et al., 1983) and Koshu (NAKAMURA; AMANO; KAGAMI, 1983).

Our results were similar to those found at pH 6.3 found for the Concord cultivar (CASH; SISTRUNK; STUTTE, 1976) and the Muscat Bailey A cultivar (OKUDA et al., 1999). However, many other grape cultivars exhibit more acidic optimum pHs than those

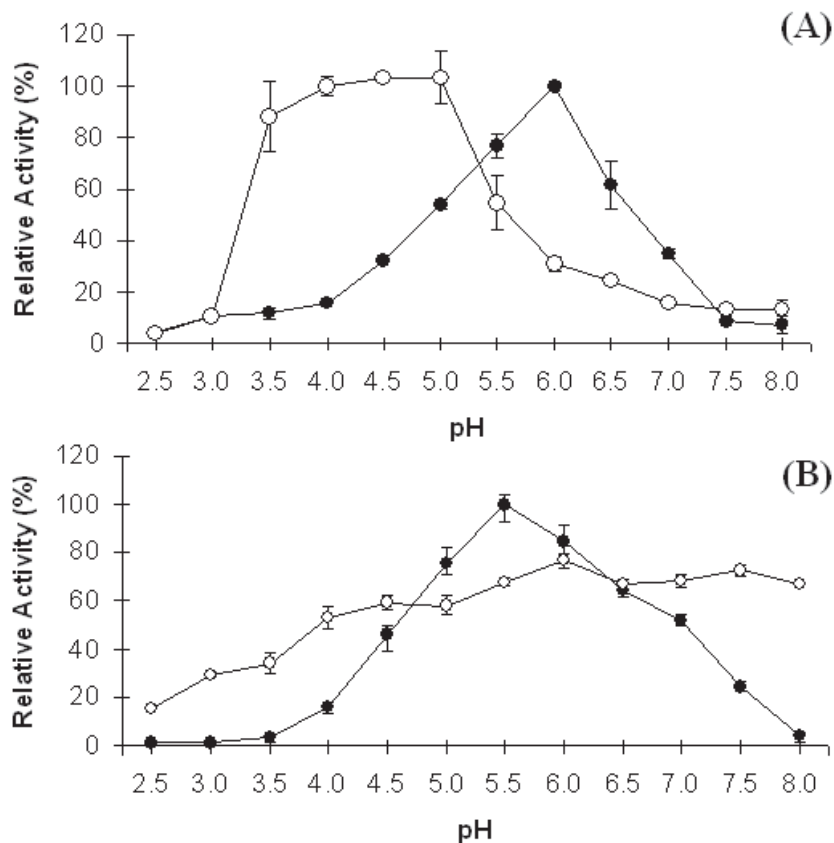
found in this study: optimum pH levels have also been reported as being between 3.4 and 5.5 (SÁNCHEZ-FERRER et al., 1988; ÜNAL; SENER, 2006; ÜNAL; SENER; SEN, 2007; VALERO; VARÓN; GARCÍA-CARMONA, 1988; WISSEMAN; LEE, 1981). At pH levels that were close to optimum levels (5.0 and 6.5), PPO from BRS Clara was still active (approximately 60%), but activity decreased rapidly at alkaline pHs (7.0-8.0) and in acid (2.5-4.5) (**Figure 7A**). Frequently, PPO is inactivated at a pH below 4.0, which suggests a method that can be used to control enzymatic browning: lowering the pH. Though various studies show that the activity-pH profile may vary depending on the cultivar, ripening stage, enzyme purity, nature of the phenolic compounds and forms of isoenzymes, the results exhibited by PPO from BRS Clara are similar to those from BRS Morena (**Figure 8A**).



**Figure 7.** Effect of pH on activity (●) and stability (○) of BRS Clara PPO extracted using Triton-X-100 (A) and Triton-X-114 (B).

Over the 24 hours of incubation at different pH, there was almost no significant difference in the residual activity of PPO from BRS Clara between pHs 4.5 and 6.5, and at pH 7.0, there was still 85% activity. After pH 7.5, residual enzymatic activity decreased gradually until it was almost completely inactivated at pH 8.0 (**Figure 7A**). PPO from BRS Morena, on

the other hand, exhibited stability at more acidic pHs; between 4.0 and 5.0, there was no significant difference in the activity (100%), and approximately 85% of residual activity was noted at pH 3.5. After pH 5.5, residual enzymatic activity decreased gradually and reached almost complete inactivation at pH 8.0 (**Figure 8A**). The PPO of the two grapes activated with SDS showed optimum activity at pH 5.5. Comparatively, the PPO-L was more stable than PPO-A in the alkaline region (**Figure 7B** and **Figure 8B**).

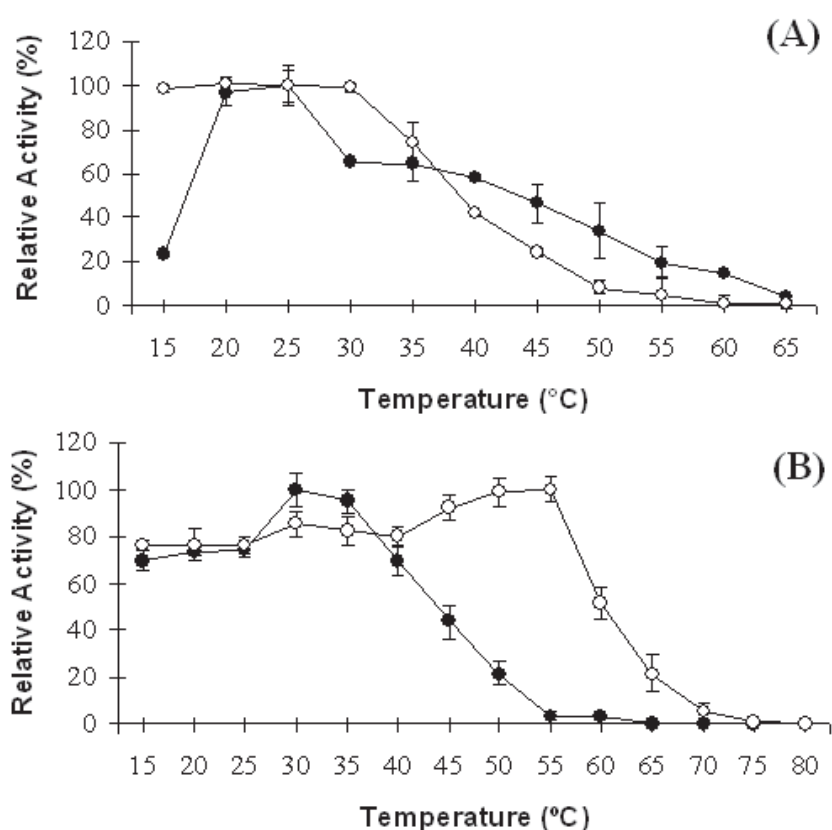


**Figure 8.** Effect of pH on activity (●) and stability (o) of BRS Morena PPO extracted using Triton-X-100 (A) and Triton-X-114 (B).

The maximum activity temperature for both PPO grapes extracted with Triton-X-110, was 25°C. Similar results were found for other grape cultivars that presented optimum activity between 25°C and 30°C (LEE; SMITH; PENNESI, 1983; NAKAMURA; AMANO; KAGAMI, 1983; RAPEANU et al., 2006; ÜNAL; SENNER, 2006). At 30°C, the enzymes exhibited approximately 65% activity, and started a decrease of approximately 5 to 10% every 5°C (**Figure 9A** and **Figure 10A**). After an incubation period of 60 minutes at different temperatures, residual PPO activities were found to be stable between 15°C and 30°C. As the

temperature increased beyond this range, a gradual activity decrease was noted, with almost complete inactivation for both enzymes at 60°C (**Figure 9A** and **Figure 10A**).

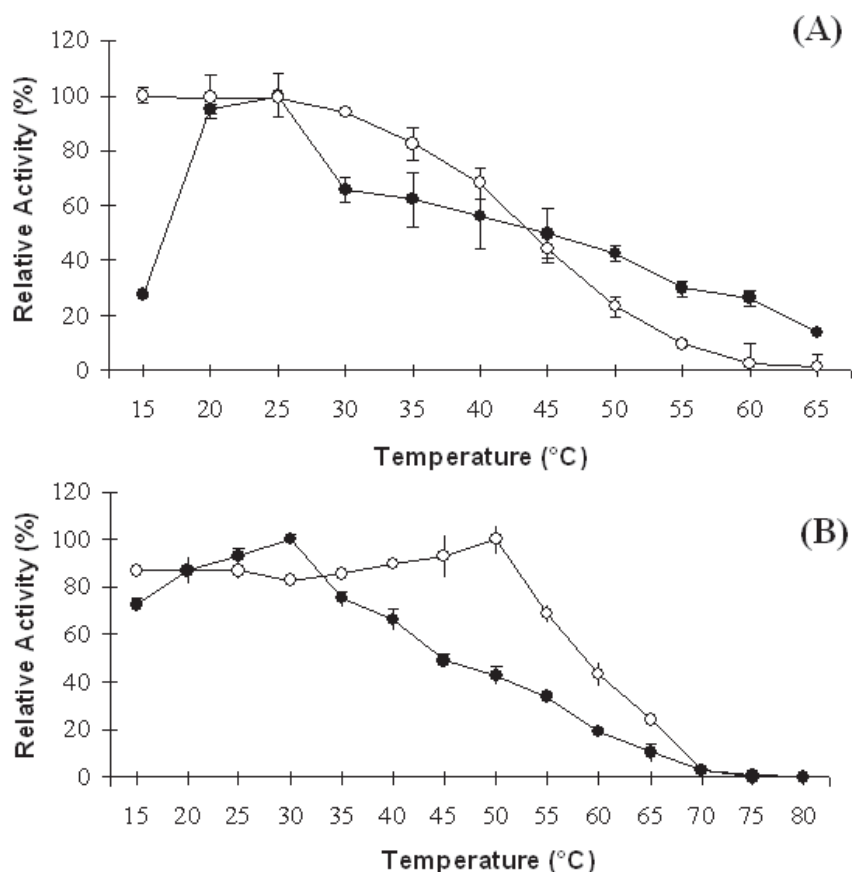
PPO thermostability varies considerably from one fruit to another. However, many studies have shown that PPO from plant sources are stable between 20°C and 40°C and significantly lose their activity at temperatures higher than 55°C (WEEMAES et al., 1998). The PPO-L activated from both grapes showed optimum activity at 30°C. However, it showed significantly high thermal stability when temperatures were close to 50°C (**Figure 9B** and **Figure 10B**, respectively).



**Figure 9.** Effect of temperature on activity (●) and stability (○) of BRS Clara PPO extracted using Triton-X-100 (**A**) and Triton-X-114 (**B**).

PPO-L results differed markedly from PPO-A results: in this temperature range, PPO-A showed almost no residual activity. Therefore, the results suggest the Triton-X-100 detergent was able to solubilize proteins, but did not contribute to the stability of PPO enzymes. This behavior was consistent with that reported by Sellés-Marchart; Casado-Vela; Bru-Martínez (2007).

These results also suggest that interactions between the enzyme and Triton-X-114 may have induced changes in the conformation and/or active site of the enzyme, thereby affecting the enzyme's activity and stability. These interactions possibly involve both the electrostatic interactions between the surfactant head group and the charged amino acid residues of the enzyme, as well as the hydrophobic interactions between the alkyl chains of the detergent and the hydrophobic amino acid residues of the enzyme.



**Figure 10.** Effect of temperature on activity (●) and stability (○) of BRS Morena PPO extracted using Triton-X-100 (A) and Triton-X-114 (B).

#### 4. CONCLUSION

Triton-X-100 was efficient in the extraction of PPO-A. PPO-A of BRS Morena and BRS Clara presented the same optimum pH and optimum temperature (6.0 and 25°C). Above 30°C, a gradual decline of activity was noted, with complete inactivation for both enzymes at 60°C, revealing the grapes' high sensibility to heat, a characteristic that has been exhibited by other grape varieties. Partially purified Latent PPO enzymes were obtained in two steps with



Triton-X-114 and were activated with 0.2% SDS. The optimum pH of PPO-L was 5.5, and PPO-L was also found to have high stability, even with changes to both pH and temperature.

## 5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Brazilian organization CAPES (the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) for the scholarships, as well as the Sao Paulo State Research Support Foundation (FAPESP) for their financial assistance, and the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) for the productivity scholarship. We'd also like to thank the researchers from the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA), Umberto Almeida Camargo and Rosemeire de Lellis Naves, for their grape donation and their cooperation.

## 6. REFERENCES

- ANIL-KUMAR, V. B.; KISHOR-MOHAN, T. C.; MURUGAN, K. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malfighia glabra* L.). **Food Chemistry**, London, v. 110, n. 2, p. 328-333, Sept. 2008.
- AYDEMIR, T. Selected kinetic properties of polyphenol oxidase extracted from *Rosmarinus officinalis* L. **International Journal of Food Properties**, Philadelphia, v. 13, n. 3, p. 475-485, 2010.
- BLUM, H.; BIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 8, n. 2, p. 93-99, Apr. 1987.
- CABANES, J. et al. Partial purification of latent polyphenol oxidase from peach (*Prunus persica* L. cv. Catherina). Molecular properties and kinetic characterization of soluble and membrane-bound forms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 25, p. 10446-10451, Dec. 2007.
- CAMARGO, U. A. et al. **BRS clara**: nova cultivar de uva branca de mesa sem semente. (Comunicado Técnico, 46). Brasília, DF: Embrapa, 2003a. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot046.pdf>>. Acesso em: 12 July 2010.
- \_\_\_\_\_. et al. **BRS morena**: nova cultivar de uva preta de mesa sem semente. (Comunicado Técnico, 47). Brasília, DF: Embrapa, 2003b. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot047.pdf>>. Acesso em: 12 July 2010.
- CASH, J. N.; SISTRUNK, W. A.; STUTTE, C. A. Characteristics of Concord grape polyphenol oxidase involved in juice colour loss. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 41, n. 6, p. 1398-1402, Aug. 1976.

- CENI, G. C. et al. Oxidases from mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*): extraction optimization and stability at low and high temperatures. **Bioprocess Biosystems Engineering**, Heidelberg, v. 31, n. 6, p. 541-550, 2008.
- CHAZARRA, S. et al. Partial purification and characterization of latent polyphenol oxidase in iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 4, p. 984-988, Apr. 1996.
- FANG, Z. et al. Polyphenol oxidase from bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) and its role in anthocyanin degradation. **Food Chemistry**, London, v. 103, n. 2, p. 268-273, 2007.
- FORTEA, M. I. et al. Kinetic characterization and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (*Crimson Seedless*). **Food Chemistry**, London, v. 113, n. 4, p. 1008-1014, Apr. 2009.
- FRAIGNIER, M. P. et al. Biochemical and immunological characteristics of polyphenol oxidase from different fruits of *Prunus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 9, p. 2375-2380, Sept. 1995.
- GANDÍA-HERRERO, F. et al. Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 386, n. 6, p. 601-607, June 2005.
- GONZÁLEZ, E. M.; DE-ANCOS, B.; CANO, M. P. Partial characterization of peroxidase and polyphenol oxidase activities in blackberry fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 11, p. 5459-5564, Oct. 2000.
- HAREL, E.; MAYER, A. M. Partial purification and properties of catechol oxidases in grapes. **Phytochemistry**, New York, v. 10, n. 1, p. 17-22, Jan. 1971.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; LEHMAN, E. Multiple forms of *Vitis vinifera* catechol oxidase. **Phytochemistry**, New York, v. 12, n. 11, p. 2649-2654, Nov. 1973.
- HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 48, n. 2, p. 422-427, Aug. 1972.
- LAEMMI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, Basingstoke, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970.
- LEE, C. Y.; SMITH, N. L.; PENNESI, A. P. Polyphenoloxidase from DeChaunac grapes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Easton, v. 34, n. 9, p. 987-991, Sept. 1983.
- LÓPEZ-MIRANDA, S. et al. Effect of ripening on protein content and enzymatic activity of Crimson Seedless table grape. **Food Chemistry**, London, v. 127, n. 2, p. 481-486, July 2011.
- MAYER, A. M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**, New York, v. 18, n. 2, p. 193-215, Feb. 1979.

- MOORE, B. M.; FLURKEY, W. H. Sodium dodecyl sulfate activation of plant polyphenoloxidase. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 265, n. 9. p. 4982-4988, Mar. 1990.
- NAKAMURA, K.; AMANO, Y.; KAGAMI, M. Purification and some properties of a polyphenol oxidase from Koshu grapes. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 34, n. 2, p. 122-127, June 1983.
- NUÑES-DELICADO, E.; GARCÍA-CARMONA, F.; SÁNCHEZ-FERRER, A. Partial purification of latent persimmon fruit polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 7, p. 2058-2063, Feb. 2003.
- \_\_\_\_\_. et al. Characterization of polyphenol oxidase from Napoleon grape. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 1, p. 108-114, 2007.
- \_\_\_\_\_. et al. Polyphenol oxidase from Dominga table grape. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 15, p. 6087-6093, July 2005.
- \_\_\_\_\_. et al. Triton-X-114 aided purification of latent tyrosinase. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 680, n. 1/2, p. 105-112, May 1996.
- OKUDA, T. et al. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Muscat Bailey A grape juice. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 50, n. 2, p. 137-143, 1999.
- PÉREZ-GILABERT, M. et al. Partial purification, characterization, and histochemical localization of fully latent desert truffle (*Terfezia Claveryi* Chatin) polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 4, p. 1922-1927, Mar. 2001.
- RAPEANU, G. et al. Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. *Sativa*). **Food Chemistry**, London, v. 94, n. 2, p. 253-261, Jan. 2006.
- RATHJEN, A. H.; ROBINSON, S. P. Aberrant processing of polyphenol oxidase in a variegated grapevine mutant. **Plant Physiology**, Washington, v. 99, n. 4, p. 1619-1625, Aug. 1992.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SÁNCHEZ-FERRER, A. ; BRU, R.; GARCIA-CARMONA, F. Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. **Plant Physiology**, Washington, v. 91, n. 4, p. 1481-1487, Dec. 1989.
- \_\_\_\_\_. et al. Characterization of catecholase and cresolase activities of Monastrell grape polyphenol oxidase. **Phytochemistry**, New York, v. 27, n. 2, p. 319-321, Feb. 1988.
- \_\_\_\_\_. et al. Triton X-114 phase partitioning in plant protein purification. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 668, n. 1, p. 75-83, May 1994.

SAPERS, G. M. Browning of foods: control by sulfites, antioxidants, and others means. **Food Technology**, Chicago, v. 47, n. 10, p. 75-84, 1993.

SATROUTDINOV, A. D. et al. Degradation of metal-EDTA complexes by resting cells of the bacterial strain DSM 9103. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 34, n. 9, p. 1715-1720, Mar. 2000.

SELLÉS-MARCHART, S.; CASADO-VELA, J.; BRU-MARTÍNEZ, R. Effect of detergents, tripsina and unsaturated fatty acids on latent loquat fruit polyphenol oxidase: basis for the enzyme's activity regulation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 464, n. 2, p. 295-305, Aug. 2007.

SERRADELL, M. D. A. et al. Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch., cv Selva): characterisation and partial purification. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Easton, v. 80, n. 9, p. 1421-1427, July 2000.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: SIES H. et al. (Ed.). **Methods in enzymology**: polyphenols and flavonoids. San Diego: Academic Press, 1999. p. 152-178.

SUN, J. et al. Comparison on characterization of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) polyphenoloxidase using endogenous and exogenous substrates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 18, p. 10195-10201, Sept. 2010.

TODARO, A. et al. Polyphenol oxidase activity from three sicilian artichoke [*Cynara cardunculus* L. Var. *scolymus* L. (Fiori)] cultivars: studies and technological application on minimally processed production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 3, p. 1714-1718, Feb. 2010.

ÜNAL, M. Ü.; SENER, A. Determination of some biochemical properties of polyphenol oxidase from Emir grape (*Vitis vinifera* L. cv. *Emir*). **Journal of the Science and Food and Agriculture**, Easton, v. 86, n. 14, p. 2374-2379, Nov. 2006.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; SEN, K. Characterization of Sultaniye grape (*Vitis vinifera* L. cv. *Sultana*) polyphenol oxidase. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 42, n. 9, p. 1123-1127, Sept. 2007.

VALERO, E.; VARÓN, R.; GARCIA-CARMONA, F. Characterization of polyphenol oxidase from Airen grapes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 53, n. 5, p. 1482-1485, Sept. 1988.

VANLOON, L. C. Tobacco polyphenol oxidases: a specific staining method indicating non-identity with peroxidases. **Phytochemistry**, New York, v. 10, n. 3, p. 503-507, Mar. 1971.

VIRADOR, V. M. et al. Cloning, sequencing, purification, and crystal structure of grenache (*Vitis vinifera*) polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 2, p. 1158-1201, Dec. 2010.

- WEEMAES, C. A. et al. Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 31, n. 1, p. 440-449, Jan. 1998.
- WESELAKE, R. J.; JAIN, J. C. Strategies in the purification of plant proteins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 84, n. 2, p. 301-309, Feb. 1992.
- WISSEMANN, K. W.; LEE, C. Y. Characterization of polyphenoloxidase from Ravat 51 and Niagara grapes. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 2, p. 506-508, 514, Aug. 1981.
- WUYTS, N.; DE-WAELE, D.; SWENNEN, R. Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, n. 5/6, p. 308-314, May/June 2006.
- YILMAZ, H.; SAKIROGLU, H.; KÜFREVIÖGLU, I. Polyphenol oxidase from Mazrma grape (*Vitis vinifera* L.). **Agrochimica**, Pisa, v. 47, n. 1/2, p. 21-27, 2003.
- YOKOTSUKA, K.; MAKINO, S.; SINGLETON, V. Polyphenol oxidase from grapes: precipitation, re-solubilization and characterization. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 39, n. 4, p. 293-302, Dec. 1988.

# CAPÍTULO 6

**EFEITO DE PECTINASE DE *THERMOMUCOR INDICAE-SEUDATICA*E N31  
SOBRE O TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS NA EXTRAÇÃO DO SUÇO**

## **EFEITO DE PECTINASE DE *THERMOMUCOR INDICAE-SEUDATICA*E N31 SOBRE O TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS NA EXTRAÇÃO DO SUCO**

Ellen Silva LAGO-VANZELA, Sara Neme DE-BARROS, Marcelo Andrés UMZA-GUEZ, Natália MARTIN, Thaise TOBAL, Maurício BOSCOLO, Eleni GOMES, Roberto DA-SILVA

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

### **RESUMO**

O efeito de preparado enzimático pectinolítico produzido pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 sobre o teor de fenólicos totais, teor de metanol e cor de sucos de uvas foi estudado. A introdução de tratamento enzimático a etapa de maceração, durante 1 hora, resultou em produtos com boas características cromáticas e teor de fenólicos superiores (1637, 21 mg/L, expresso em equivalentes de ácido gálico - GAE) aos encontrados em suco elaborado de forma convencional (1422,59 mg GAE/L) e, muito próximo ao apresentado por suco obtido por tratamento enzimático das uvas com preparado comercial (1682,10 mg GAE/L). Além disso, os teores de metanol dos sucos elaborados foram inferiores a 200mg/L. Estes resultados incentivam novos estudos que viabilizem a obtenção de preparado enzimático produzido por este fungo passível de ser oferecido comercialmente às indústrias processadoras de uva.

### **ABSTRACT**

The effect of pectinolytic enzyme preparation produced by the fungus *Thermomucor referrals seudaticae*-N31 on the content of total phenolics, on the content of methanol and on the color of grape juice was studied. The introduction of enzyme treatment through a step that involves soaking for 1 hour resulted in products with good color characteristics and higher phenolic content (1637.21 mg/L, as gallic acid equivalents - GAE) than those found in conventionally prepared juice (1422.59 mg GAE/L) and that were very similar to those presented by the juice obtained through the enzymatic treatment of commercially prepared grapes (1682.10 mg GAE/L). Furthermore, the concentrations of methanol in the juice that was produced were less than 200 mg/L. These results encourage further studies that will enable enzyme preparation produced by this fungus that can be offered commercially to grape-processing industries.



## 1. INTRODUÇÃO

Os sucos de uvas integrais são importantes fontes de compostos bioativos incluindo antocianinas e outros compostos fenólicos que reconhecidamente estão associados ao adequado desenvolvimento e manutenção da saúde humana, bem como à redução de riscos de doenças degenerativas (BUB et al., 2003; DAY et al., 1997; FRANKEL et al., 1998; OSMAN et al., 1998; SINGLETARY et al., 2003; XIA et al., 2010). Como a maior parte destes compostos é propensa à degradação durante o processamento e armazenamento, as diferentes técnicas empregadas durante o processo (métodos de extração e tratamentos térmicos e enzimáticos) podem profundamente afetar o potencial de promoção à saúde deste produto (CHEYNIER, 2005; FRANKEL et al., 1998).

Uma etapa crucial do processamento é a maceração das uvas. A transferência destes compostos da casca da uva tinta para o mosto varia em função da variedade, do grau de maturação, do estado sanitário da uva, bem como das variações nas técnicas empregadas durante o processo (PINELO et al., 2005; PINELO; SINEIRO; NUÑEZ, 2006). Alguns estudos sobre processamento da fruta na forma de suco e vinho relataram que submeter uvas inteiras ou previamente esmagadas a um branqueamento pode, dependendo da variedade, aumentar a extração dos compostos fenólicos e desnaturar enzimas oxidativas como polifenol oxidase (PPO) e peroxidase (POD). Temperatura e tempo de exposição ao aquecimento são parâmetros relevantes que devem ser controlados durante o processo (AUW et al., 1996; KOVAC et al., 1992; SACCHI; BISSON; ADAMS, 2005). Além disso, os processadores de alimentos estão utilizando misturas pectinolíticas complexas, algumas vezes adicionadas de celulases, hemicelulases e proteases para promover a hidrólise dos polissacarídeos presentes na parede celular das uvas e permitir a liberação dos constituintes presentes dentro dos vacúolos celulares para o mosto ou suco (RODRIGUEZ-NOGALES et al., 2008).

Este processo pode ocasionar um aumento na quantidade de metanol dos produtos, devido à ação da pectinametilesterases (REVILLA; GONZALES-SANJOSE, 1998), que atuam removendo grupos metoxílicos ( $\text{OCH}_3$ ) das substâncias pécticas, reduzindo seu grau de metoxilação e, conseqüentemente, liberando metanol e ácido péctico (HOU et al., 2008; PEDROLLI et al., 2009). No ser humano, a sintomatologia da intoxicação por metanol está condicionada à quantidade ingerida e varia desde dores de cabeça, náuseas e vômitos até cegueira e morte (MEDINSKY; DORMAN, 1995). Os limites máximos para ingestão diária específicos para sucos ainda não foram determinados.

Estudos revelam que o teor de metanol, bem como a extratibilidade dos compostos fenólicos, dependem do tipo e da quantidade de enzimas adicionadas, da espécie da uva e do tempo de contato das enzimas com as cascas (DA-SILVA; FRANCO; GOMES, 1997; PARDO et al., 1999). Diante disto, esforços têm sido concentrados no desenvolvimento de preparações enzimáticas que executem, satisfatoriamente e de forma segura, suas funções sob as condições específicas de processo para sucos, bem como vinhos.

Este trabalho objetivou avaliar o efeito do uso de preparado enzimático produzido pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 na etapa de maceração da uva sobre o teor de fenólicos totais, teor de metanol e cor para produção de suco de uva. Como ferramenta de comparação, o preparado enzimático comercial Vinoxym Ventage FCE (Novozyme, Alemanha), também foi aplicado às uvas nas mesmas condições experimentais, porém na concentração recomendada pelo fabricante.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Produção do preparado enzimático experimental**

A produção do preparado enzimático denominado PEC-N31, pelo fungo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, foi realizada através de fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo e bagaço de laranja segundo Martin et al. (2010). A análise de micotoxinas no meio fermentado (7 dias) e não fermentado (controle) pelo fungo foi realizada previamente pelo Laboratório de Micotoxinas do Departamento de Agroindústria Alimentos e Nutrição da ESALQ-USP, Piracicaba, SP, Brasil. Os resultados mostraram que o preparado enzimático PEC-N31 é isento das toxinas aflatoxina B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona. Do ponto de vista de aplicabilidade este resultado é promissor, visto que, um requisito essencial para a aplicação de pectinases microbianas em produtos alimentícios é que o extrato enzimático esteja livre de micotoxinas (UMSZA-GUEZ, 2009).

### **2.2 Atividade das principais pectinases presentes no preparado enzimático PEC-N31**

A atividade enzimática de exo-poligalacturonase (Exo-PG), de endo-poligalacturonase (Endo-PG) e de pectinametilsterase (PME) foi determinada no preparado enzimático N31 e comparada com um preparado enzimático comercial Vinoxym Ventage FCE (Novozyme, Alemanha), que é produzido pelos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus aculeatu*.

A atividade de **Exo-PG** foi avaliada numa mistura contendo 0,1 mL do preparado enzimático e 0,9 mL de solução de pectina cítrica 1% (64-72% de esterificação, marca Kelco)

dissolvida em tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 4,0), que foi incubada a 37° C por 10 minutos. Após esse período, a reação foi paralisada pela adição de 1,0 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) à mistura e, em seguida, colocada em água em ebulição por 10 minutos e resfriada em banho de gelo. A coloração desenvolvida foi medida por meio de espectrofotômetro a 540 nm. O açúcar redutor liberado (ácido D-galacturônico), após a incubação da mistura, foi quantificado segundo Miller (1959). Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de ácido galacturônico por minuto a partir da pectina cítrica, nas condições de ensaio.

A atividade de **Endo-PG** foi avaliada em uma mistura contendo 2 mL do preparado enzimático e 6 mL de solução de pectina cítrica 3% (64-72% de esterificação, marca Kelco) dissolvida em tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 4,5). Após a incubação por 10 minutos a 37°C, a mistura foi rapidamente resfriada em banho de gelo e a sua viscosidade foi determinada utilizando-se o viscosímetro basic (marca Fungilab) com peso 5 e na velocidade de 2 rpm na temperatura de 25°C. Na solução controle foi usada enzima previamente inativada por 10 minutos em banho em ebulição. A medida foi realizada em mPa/s e através da mesma, foi calculada a porcentagem de redução da viscosidade da amostra em relação ao controle. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir em 50% à viscosidade do substrato em 10 minutos (LÓPEZ; FUENTE; BURGOS, 1994).

A atividade de **PME** foi determinada de acordo com método descrito por Deng; Wu; Li (2005): 5 mL de solução de pectina cítrica de alto teor de metoxilação a 1% (Sigma) contendo 0,6% de NaCl foi usada como substrato e ajustada para pH 7,0 com solução de NaOH 0,02 M antes da adição de 1 mL do preparado enzimático. A mistura reacional foi incubada a 35°C e continuamente agitada. Durante o decorrer da reação, o pH foi mantido a pH 7,0 através da adição de solução de NaOH 0,01 M durante 10 minutos. Uma unidade de PME foi definida como µmol de ester hidrolisado por minuto, por mg ou mL, sob as condições do ensaio.

### **2.3 Análises físico-químicas e bioquímicas parciais da matéria-prima**

Uvas tintas da variedade Bordô (*Vitis Labrusca*) foram coletadas, em condições ótimas de maturação, no município de Jales (Nordeste do Estado de São Paulo, Brasil), durante a safra de 2010 e utilizadas para elaboração dos testes preliminares e dos sucos.

### **2.3.1 Análises físico-químicas**

Para o preparo da amostra experimental, foram coletados aleatoriamente 10% dos cachos de uva da amostra de trabalho (5 kg) e de cada cacho foram retiradas quatro bagas, sendo uma da parte superior, duas da parte média e uma da parte inferior. Três porções das bagas previamente selecionadas (200 g) foram homogeneizadas integralmente em um mixer por 30 segundos, constituindo uma amostra homogênea.

As seguintes análises foram realizadas: teor de umidade, por método termogravimétrico; teor de sólidos solúveis totais (SST, expressa em °Brix) por refratometria (Abbe Modelo 2 Waj, Biobrix); valor de pH, medido diretamente em pHmetro (Marconi); acidez total titulável (ATT, expressa em g de ácido tartárico/L) e relação SST/ATT (AMERINE; OUGH, 1976). Além disso, a determinação do conteúdo de fenólicos totais foi realizada de acordo com método colorimétrico modificado Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999) após extração dos compostos de interesse segundo Castillo-Muñoz et al. (2009). As leituras de absorvância do padrão e das amostras foram realizadas a 765 nm utilizando espectrofotômetro DU 640 (BECKMAN COULTER). A quantificação foi possível com o auxílio de uma curva de calibração feita com soluções de ácido gálico de diferentes concentrações entre 0 - 500 mg/L ( $R^2 = 0,9965$ ). Os resultados foram expressos como mg/100 g de fruta (peso fresco) como equivalentes de ácido gálico (GAE).

### **2.3.2 Análises bioquímicas**

A atividade das enzimas PPO e POD foi determinada após obtenção dos extratos. Três porções de frutas (100 g) foram homogeneizadas por mixer, durante 30 segundos, com 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 6,5) contendo ácido ascórbico 10 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, polivinilpirrolidona (PVP) a 2%, cloreto de sódio (NaCl) 0,5M e 1% de detergente Triton-X-100. Os homogenatos foram agitados por 30 minutos e centrifugados por 20 min/10,000 g a 4-5°C (Avanti J-25, BECKMAN COULTER). Os sobrenadantes obtidos foram denominados extratos enzimáticos brutos e reservados para dar prosseguimento aos ensaios.

A atividade de PPO e de POD foi determinada em triplicata segundo González, De-Ancos, Cano (2000) com pequenas modificações. A mistura de reação foi composta por 2,4 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 6,5) e 0,3 mL de catecol 0,1 M ou guaiacol 0,1 M, respectivamente para PPO e POD, para qual 0,3 mL de extrato enzimático (adequadamente diluído) foi adicionado. Esta mistura foi incubada a 25°C e ao final de 5 minutos, realizou-se a leitura da absorvância em espectrofotômetro a 420 e 485 nm, respectivamente para PPO e

POD. Um controle foi preparado contendo a mistura de reação sob leitura no tempo zero de incubação. A taxa de reação foi calculada na porção linear da curva de  $\Delta A_{420}$  ou  $\Delta A_{485}$ , respectivamente para PPO e POD, versus o tempo. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi arbitrariamente definida como a quantidade de enzima que causa um aumento na absorvância de 0,001/minuto, sob as condições de ensaio, e foram corrigidas para cada 100g de fruta fresca. Em todos os experimentos, oxidação não significativa do catecol e do guaiacol foram observadas durante o curto período de tempo de reação para determinação da atividade das enzimas.

Para determinação da atividade das pectinases presentes na uva Bordô, primeiramente duas porções de fruta (100 g) foram homogeneizadas com solução tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 8,0) contendo EDTA 1 mM, 5% de PVP e NaCl 2M na proporção de 1:1, p/v e, submetidas a procedimento de extração similar ao descrito para a PPO e POD. O sobrenadante obtido foi utilizado para realização das análises de atividade enzimática das pectinases, tal como no item 2.2 para os preparados enzimáticos, exceto pela concentração de atividade de ENDO-PG, no qual foi utilizada uma solução de pectina cítrica 1% (64 - 72% de esterificação, marca Kelco) dissolvida em tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 4,5). Todos os valores de atividade enzimática foram convertidos para 100 g de fruta fresca.

#### **2.4 Branqueamento a vapor das uvas**

Para minimizar o efeito de enzimas endógenas sobre o processamento da uva e possibilitar uma avaliação mais clara sobre a viabilidade de uso do preparado enzimático N31 na extração de suco, o emprego de um branqueamento a vapor sobre as uvas foi estudado. Para tanto, nove porções da uva (100 g) foram expostas durante diferentes tempos (0 a 10 minutos, com intervalos de 1 minuto) à ação de vapor saturado e, depois de resfriadas: três porções foram homogeneizadas com solução extratora similar a descrita no item 2.3.2 para obtenção dos extratos enzimáticos; três porções foram brandamente prensadas, clarificadas por centrifugação (10 min/6.000 g/4°C) e os mostos obtidos foram reservados para determinação do índice de escurecimento, das características cromáticas e do teor de fenólicos totais; e as outras três porções foram incubadas a 37°C por 60 minutos, que é o tempo normalmente utilizado na etapa de despectinização com preparados comerciais. Transcorrido este período, as frutas foram brandamente prensadas e o filtrado foi utilizado para determinação do teor de metanol.

O tempo de branqueamento mais adequado para minimizar o escurecimento do suco por PPO e POD e a liberação de metanol por PME, sem prejudicar significativamente o teor de fenólicos totais e a cor do suco foi padronizado e esta etapa foi inserida ao processo. Para tanto, determinou-se o teor de fenólicos totais dos mostos, considerando a amostra sem tratamento (tempo 0) como 100 %, bem como determinou-se a atividade da PPO e POD tal como descrito no item 2.3.2. Além disso, as seguintes análises foram realizadas:

#### **2.4.1 Análises de cor**

Volumes padronizados (25 mL) dos mostos foram utilizados para determinação das coordenadas CIE  $L^*$  (luminosidade),  $a^*$  (-a, verde; +a, vermelho) e  $b^*$  (-b, azul; +b, amarelo) por espectrofotômetro (HunterLab Colorimeter ColorFlex).

O índice de escurecimento (IE) foi determinado segundo as equações 1 e 2 (NDIAYE; XU; WANG, 2009):

$$X = (a^* + (1,75 \cdot L^*)) / ((5,645 \cdot L^*) + a^* - (3,012 \cdot b^*)) \quad (1)$$

$$IE = (100 \cdot (X - 0,31)) / 0,172 \quad (2)$$

O Cromo ( $C^*$ ), que representa a intensidade ou saturação da cor, bem como o ângulo Hue ( $H^*$ ) (tonalidade cromática), que é o atributo em que a cor é percebida foram determinados segundo as equações 3 e 4, respectivamente (NDIAYE; XU; WANG, 2009):

$$C^* = (a^2 + b^2)^{1/2} \quad (3)$$

$$H^* = 360 + [\tan^{-1}(b/a)], \text{ quando } a > 0 \text{ e } b < 0 \quad (4)$$

onde  $0^\circ$  corresponde a cor vermelho-azulado;  $90^\circ$  a cor amarela;  $180^\circ$  a cor verde e  $270^\circ$  a cor azul (PALOU et al., 1999).

#### **2.4.2 Determinação do teor de metanol**

Esta análise foi realizada utilizando-se um cromatógrafo gasoso HP-5890 equipado com detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar de sílica fundida HP-FFAP 25 m x 0,2 mm x 0,3  $\mu$ m. Alíquotas de 3 mL dos mostos foram mantidas a  $40^\circ\text{C}$  por 10 minutos e 20  $\mu$ L da fração volátil foi injetado. As condições cromatográficas utilizadas foram: nitrogênio como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min, no modo split 1:20; temperatura do injetor:  $200^\circ\text{C}$ ; temperatura do detector:  $250^\circ\text{C}$ ; programação térmica:  $50^\circ\text{C}/\text{min}$ , aumentando  $20^\circ\text{C}/\text{min}$  até  $150^\circ\text{C}$ . Para quantificação do metanol (mg/L) foram utilizadas soluções padrões de metanol em diferentes concentrações, submetidas à análise cromatográfica nas mesmas condições anteriormente descritas.

## 2.5 Elaboração dos sucos

Porções das bagas das uvas (3 kg) foram expostas durante 3 minutos à ação de vapor saturado e, posteriormente resfriadas até 37°C. Nesta temperatura, as uvas foram esmagadas brandamente e a despectinização foi realizada pela adição do preparado enzimático experimental PEC-N31 (1 ml/Kg de fruta), no pH natural da fruta. Como ferramenta de comparação, o preparado enzimático comercial Vinoxym Ventage FCE (Novozyme, Alemanha), também foi aplicado às uvas nas mesmas condições experimentais, porém na concentração recomendada pelo fabricante (0,04 g/kg de fruta).

O tratamento enzimático foi empregado durante diferentes tempos (0,5, 1, 2, 3 e 4 horas), sob agitação a 37°C. Seguida esta etapa, as amostras foram imediatamente prensadas, clarificadas por centrifugação (10 min/6.000 g/4°C), filtradas e expostas novamente à ação de vapor saturado até atingir a temperatura de aproximadamente 94°C, sendo mantidas nesta temperatura por 5 minutos. Transcorrido este período, o suco foi engarrafado a quente em frasco de vidro (250 mL), tampado e resfriado a temperatura ambiente por 24 horas. Todos os sucos foram elaborados em triplicata. Um suco controle foi elaborado por processo de extração por meio de vapor saturado por aproximadamente uma hora e engarrafado à quente (mínimo de 75°C).

## 2.6 Efeito do preparado enzimático PEC-N31 sobre o teor de fenólicos totais, teor de metanol e cor durante extração de suco

Os sucos produzidos com os preparados enzimáticos (N31 e Vinoxym) bem como o suco controle foram analisados quanto ao teor de fenólicos totais e de metanol, bem como com relação as suas características cromáticas. A determinação de fenólicos totais foi realizada como descrito no item 2.3.1 e os resultados expressos em mg/L como equivalente de ácido gálico (GAE). O teor de metanol foi determinado segundo item 2.4.2.

A determinação da cor dos sucos foi realizada conforme Glories (1984) e Sudraud (1958). As amostras foram diluídas e a leitura das suas absorvâncias nos comprimentos de onda de 620, 520 e 420 nm, em cubeta de quartzo com 10 mm de caminho óptico foi realizada. O índice de cor (IC) foi determinado segundo a equação 5, considerando-se a diluição e o percurso óptico aplicado:

$$IC = 0,1 * (abs|_{420} + abs|_{520} + abs|_{620}) \quad (5)$$

sendo 420 nm correspondente a cor amarela, 520 nm correspondente a cor vermelha e 620 nm correspondente a cor violeta-azul.



A influência da cor amarela sobre a vermelha (coloração T) foi determinada de acordo com a equação 6:

$$T = \text{abs}|_{420} / \text{abs}|_{520} \quad (6)$$

## 2.7 Análises físico-químicas dos sucos produzidos

As amostras de sucos foram submetidas a análises físico-químicas de densidade relativa a 20°C, teor de sólidos solúveis (°Brix), sólidos insolúveis, pH, acidez total, relação °Brix/acidez total, acidez volátil, teor de açúcares não redutores, redutores e totais, teor de cinzas, teor alcoólico e extrato seco total, analisadas segundo os padrões de identidade e qualidade estabelecidos para produtos derivados de uva (BRASIL, 2000).

## 2.8 Análise estatística

Os resultados analíticos obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias determinadas para cada experimento ao teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa computacional ESTAT versão 2.0 (BANZATTO; KRONKA, 2006).

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Caracterização físico-química e bioquímica parcial da uva

Algumas características físico-químicas e bioquímicas da uva Bordô, utilizada para elaboração dos sucos, estão apresentadas na **Tabela 1**. Observa-se que esta cultivar não vinífera apresentou conteúdo de umidade dentro da faixa descrita para a maioria das uvas, 70 a 85% (CATALUÑA, 1988).

O pH determinado neste estudo (3,34) foi próximo ao relatado por Rombaldi et al. (2004) em mosto de uva Bordô (pH entre 3,52 e 3,58), e apresentou-se dentro da faixa relatada para sucos de uvas comerciais elaborados com a mesma variedade (pH entre 3,30 e 3,64) (BURIN et al., 2010). A acidez da uva está condizente com o estabelecido pela legislação que é de no mínimo 0,41%, expresso em ácido tartárico (BRASIL, 2000).

O valor médio de SST obtido pela uva Bordô está dentro da faixa descrita por Rombaldi et al. (2004) (14,3 - 16,2 °Brix) e acima do limite mínimo recomendado pela legislação que é de 14 °Brix (BRASIL, 2000). A relação SST/ATT representa o equilíbrio entre o gosto doce e ácido do suco de uva, portanto, um indicativo de sua qualidade. O alto valor encontrado pode estar relacionado à baixa acidez das frutas e está dentro da faixa

relatada para suco de uva comercial analisado por Burin et al. (2010) e de acordo com os valores limites estabelecidos pela legislação brasileira (15 - 45) (BRASIL, 2000).

**Tabela 1.** Características químicas e bioquímicas parcial da uva Bordô\*.

<b>Determinações</b>	<b>Média ± DP</b>
Umidade (%)	83,84 ± 0,01
pH	3,34 ± 0,05
AT, expressa em ácido tartárico (%)	0,557 ± 0,00
SST (° Brix)	15,92 ± 0,29
Relação SST/ATT	28,58 ± 0,11
Compostos fenólicos (mg GAE/100 g)	113,26 ± 10,67
PPO (U/100 g de peso fresco)	21,42 ± 1,15
POD (U/100 g de peso fresco)	44,19 ± 0,12
Endo-PG (U/100 g de peso fresco)	64, 54 ± 0,34
Exo-PG (U/100 g de peso fresco)	547, 09 ± 2,87
PME (U/g de peso fresco)	15,90 ± 0,98

\* SST = sólidos solúveis totais; ATT = acidez total titulável. Todas as análises foram realizadas em triplicata

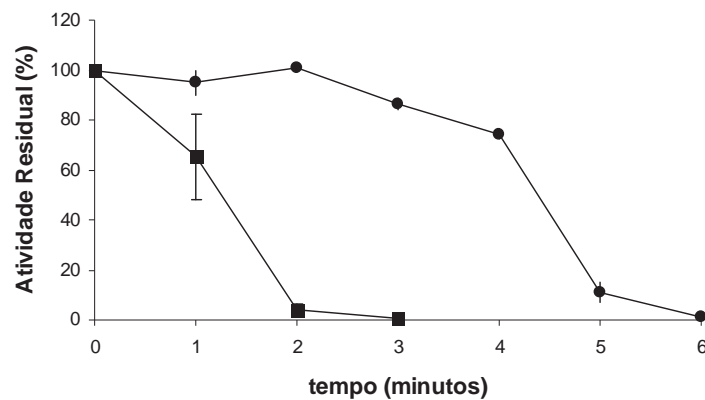
Pode-se observar que esta variedade de uva constitui uma rica fonte de fenólicos totais. Por outro lado, apresenta atividade de PPO e POD, que podem oxidar os compostos fenólicos durante a maceração das uvas, bem como atividade de três importantes pectinases, inclusive de PME, que durante a maceração pode liberar metanol no meio em consequência da hidrólise dos grupos metil ester das pectinas presentes principalmente na casca das uvas.

Deste modo, buscou-se um procedimento que fosse capaz de minimizar os efeitos deletérios ocasionados pelas enzimas endógenas da uva e então possibilitar uma avaliação, com menos interferentes, do efeito do preparado enzimático experimental sobre a qualidade do suco.

### **3.2 Branqueamento das uvas como pré-tratamento para elaboração de suco**

Pela **Figura 1** foi possível observar que a atividade de PPO e POD decresceram com o aumento do tempo de branqueamento a vapor das bagas das uvas, com inativação das respectivas enzimas em 3 e 6 minutos. Estes resultados estão em concordância com os

apresentados para a inativação de oxirredutases de outras frutas, no qual o tempo necessário variou de 2 a 8 minutos (LLANO et al., 2003; NDIAYE; XU; WANG, 2009).



**Figura 1.** Comparação entre a atividade residual de PPO (■) e POD (●) de uva Bordô usando diferentes tempos de branqueamento a vapor.

O branqueamento a vapor das uvas como pré-tratamento para a inativação destas enzimas mostrou ser um processo não simultâneo. Estes resultados estão em concordância com os relatados por Freitas et al. (2008) para uvas da variedade Benitaka e Rubi, e com os relatados por Valderrama; Marangoni; Clemente (2001), em seus estudos com maçãs. Além de minimizar o escurecimento enzimático, este pré-tratamento térmico provavelmente resultou em amaciamento dos tecidos e, conseqüente perda da coesão das células e da resistência mecânica da parede celular, o que facilitou a permeabilidade dos pigmentos da casca para o mosto, tal como relatado para uvas Napoleão e Rede Globe (SOUZA; RICARDO-DA-SILVA; LAUREANO, 2003). Resultados similares também já foram relatados por Rossi et al. (2003), após empregarem branqueamento a vapor como tratamento prévio de *blueberry* para obtenção de suco.

As características cromáticas dos mostos elaborados com as uvas previamente branqueadas reforçam esta hipótese (**Tabela 2**), uma vez que se observa um aumento no valor das coordenadas  $L^*$  e  $a^*$ , bem como a diminuição dos valores da coordenada  $b^*$ , e diminuição do IE, quando comparados ao mosto elaborado com uvas *in natura*. Embora não tenham sido observadas diferenças muito grandes entre os valores de ângulo Hue, houve um aumento dos valores de  $C^*$  à medida que aumentou o tempo de branqueamento, isto é, houve um aumento na intensidade da cor.

O mosto obtido a partir das uvas *in natura* apresentou um teor de metanol de 73,5 mg/L, valor este menor que o relatado por Rizzon; Link (2006) para suco de uva Bordô (135,3 mg/L) e próximos ao apresentado para sucos de uva Isabel (55 - 69 mg/L) (ZANUZ, 1991). Ao incubar a uva Bordô, levemente macerada, a 37°C por 1 hora foi possível observar que os teores de metanol aumentaram significativamente, chegando a 673,5 mg/L. Após o emprego do tratamento térmico, as amostras tratadas de 3 a 6 minutos apresentaram apenas traços de metanol no mosto (dados não apresentados). Isto leva a crer que, nas condições de processo, a PME endógena pode atuar sobre a pectina das cascas das uvas, liberando metanol no mosto e que um tratamento térmico de 3 minutos é suficiente para minimizar a ação da PME endógena da uva Bordô. Deve-se observar que no tempo de 3 minutos de branqueamento, no qual a PPO foi completamente inativada (**Figura 1**), os mostos apresentaram boas características cromáticas e um baixo índice de escurecimento. Diante destes resultados, conclui-se que o tempo de 3 minutos mostra-se um tratamento térmico eficaz para minimizar interferências de enzimas endógenas da uva sobre a avaliação do efeito de preparados enzimáticos sobre o teor de fenólicos totais e de metanol durante extração do suco.

**Tabela 2.** Características cromáticas dos mostos das uvas *in natura* e previamente branqueadas por diferentes tempos.

T (min)	L*	a*	b*	H*	C*	IE	F (%)
0	5,18 ± 0,10e	13,70 ± 0,06e	-3,70 ± 0,07c	344,88 ± 0,34a	14,19 ± 0,04e	64,45 ± 0,69a	100
1	6,31 ± 0,13d	15,70 ± 0,27d	-3,95 ± 0,56c	345,89 ± 2,00a	16,19 ± 0,26d	62,17 ± 2,47a	141
2	8,23 ± 0,07c	18,76 ± 0,07c	-5,70 ± 0,06b	343,10 ± 0,13ab	19,60 ± 0,08c	53,80 ± 0,13b	143
3	11,26 ± 0,01a	20,29 ± 0,04b	-6,29 ± 1,15a	342,81 ± 2,94b	21,26 ± 0,36b	46,15 ± 7,52d	160
4	8,38 ± 0,21c	20,32 ± 0,32b	-6,34 ± 0,11ab	342,68 ± 0,29b	21,29 ± 0,32b	54,37 ± 0,87b	163
5	9,40 ± 0,18b	21,71 ± 0,08a	-6,91 ± 0,05a	342,35 ± 0,05b	22,79 ± 0,09a	51,89 ± 0,57bc	174
6	8,55 ± 0,04c	20,34 ± 0,16b	-6,92 ± 0,06a	341,22 ± 0,07b	21,49 ± 0,16b	49,27 ± 0,36c	164

\* T (min) = tratamentos (minutos); F (%) = porcentagem de fenólicos totais dos mostos de uvas tratadas termicamente e *in natura*, que corresponde a 100%. Letras iguais nas colunas – mostos não diferiram entre si (P > 0,05) pelo teste de Tukey.

### 3.3 Efeito do preparado enzimático PEC-N31 sobre os compostos fenólicos durante extração do suco

A caracterização das principais pectinases presentes no preparado enzimático experimental PEC-N31 foi primeiramente realizada (**Tabela 3**) e como ferramenta de comparação, utilizou-se o preparado enzimático comercial Vinozym Ventage FCE. Pode-se observar que o preparado PEC-N31 apresentou atividade de Endo-PG e Exo-PG, que

normalmente catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas  $\alpha$  (1→4) no ácido pécico, de forma aleatória ou sequencial a partir da extremidade não redutora da molécula, respectivamente (CHITARRA; CHITARRA, 2005; DA-SILVA; FRANCO; GOMES, 1997). Além disso, detectou-se também atividade de PME. A ação inicial desta enzima é necessária para desmetoxilação da pectina, deixando-a em condições de ser degradada pelas PGs, porém, sua atividade não deve ser muito elevada para evitar a produção excessiva de metanol.

**Tabela 3.** Atividade enzimática das principais enzimas pectinolíticas\*.

<b>Preparados enzimáticos</b>	<b>Endo-PG</b>	<b>Exo-PG</b>	<b>PME</b>
<b>PEC-N31</b>	0,65 ± 0,01 U/mL	6,97 ± 0,24 U/mL	4,50 ± 0,16 U/mL
<b>Vinozym</b>	36,54 ± 0,12 U/mg	725,45 ± 12,65 U/mg	625,0 ± 9,87 U/mg

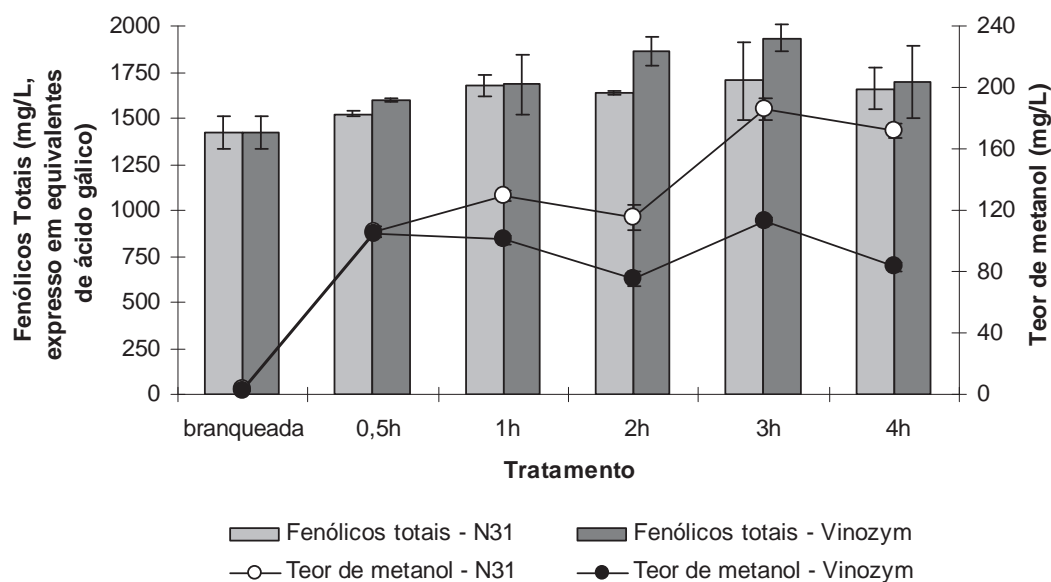
\* determinada em triplicata.

O fabricante do Vinozym declara a presença apenas de poligalacturonase (PG) com uma atividade de 7500 PGNU/g, que é uma Unidade Enzimática definida pela empresa. Tal como no PEC-N31, encontrou-se no Vinozym tanto PG quanto PME com altas atividades enzimáticas, porém, deve-se levar em consideração que o Vinozym está na forma liofilizada diferentemente do PEC-N31 que é um extrato aquoso. ROMERO-CASCALES et al. (2008) caracterizaram algumas enzimas, inclusive Endo-PG e PME, de seis preparados enzimáticos comerciais, e relataram diferenças significativas tanto na composição das enzimas presentes como também nas suas concentrações. Assim, torna-se razoável monitorar os teores de metanol dos sucos produzidos com uvas tratadas enzimaticamente que são disponibilizados para a população como forma de evitar um risco potencial para a saúde, tal como já alertado por Hou et al. (2008).

O efeito do tempo de contato entre as cascas das uvas e o preparado PEC-N31 (1 ml do extrato/kg de fruta) sobre o teor de fenólicos totais e o teor de metanol foi avaliado e comparado com os resultados obtidos, nas mesmas condições de processo, pelo preparado Vinozym. Pela **Figura 2** é possível observar que o branqueamento a vapor das uvas foi eficaz para minimizar a formação de metanol por PME endógenas da fruta. O tratamento enzimático com PEC-N31 e Vinozym resultou em um aumento do teor de metanol dos sucos, com valores máximos após 3 horas de tratamento para ambos preparados enzimáticos e posterior estabilização após 4 horas de tratamento. Hou et al. (2008) e Servilli et al. (1992) já relataram

correlação positiva entre a liberação de metanol e a atividade de PME em sucos e vinhos, respectivamente.

O limite máximo de metanol, dado pela Organização Internacional do Vinho (OIV, 1990), é 150 mg/L para o branco e rose, e 300 mg/L para o tinto. Levando em consideração estes limites e comparando-os com o teor de metanol apresentado pelos sucos elaborados no presente estudo, observa-se que a introdução do tratamento enzimático ao processo resultou em produtos com teores de metanol inferiores a 200 mg/L (**Figura 2**). Estes resultados são importantes, pois indicam que os produtos elaborados com o preparado enzimático N31, nestas condições, não apresentarão risco potencial à saúde devido à presença excessiva de metanol.

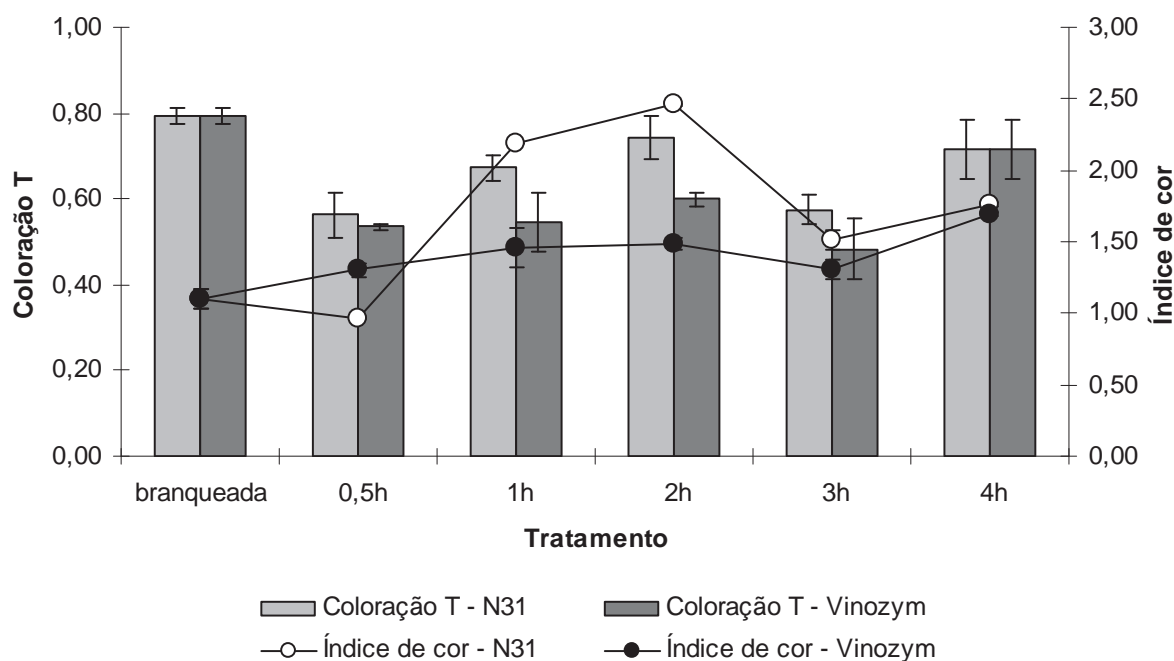


**Figura 2.** Teor de fenólicos totais e de metanol dos sucos elaborados com uva branqueada e uvas branqueadas tratadas enzimaticamente com os preparados enzimáticos PEC-N31 e Vinozym Ventage FCE, por diferentes tempos.

A aplicação do PEC-N31 proporcionou um aumento no teor de fenólicos totais do suco tratado enzimaticamente quando comparado ao elaborado com uva branqueada sem tratamento. Pode-se observar que após 1 hora de tratamento, os sucos elaborados com PEC-N31 e Vinozym já apresentavam teor significativo de fenólicos totais (1677,25 e 1682,10 mg/L, respectivamente), muito próximo ao obtido após 3 horas de tratamento com PEC-N31 (1701,16 mg GAE/L). Os resultados obtidos por PEC-N31 foram inferiores ao encontrado nos sucos elaborados após 3 horas de tratamento com Vinozym FCE ( $1934,84 \pm 74,17$  mg

GAE/L). Bons resultados com o emprego do mesmo preparado comercial sobre as cascas das uvas para obtenção de vinhos foram apresentados por Muñoz; Sepúlvera; Schwartz (2004).

O teor de fenólicos totais encontrados nos sucos produzidos com a uva Bordô está dentro da faixa relatada por Burin et al. (2010) para sucos de uvas comerciais obtidos a partir da uva Bordô (1117 - 3433 mg GAE/L) e por Frankel et al. (1998) para sucos de uvas da variedade Concord (1654 - 1971 mg GAE/L). Este aumento no conteúdo de fenólicos totais das amostras tratadas enzimaticamente refletiu positivamente na cor (**Figura 3**).



**Figura 3.** Índice de cor e coloração T dos sucos elaborados com uva branqueada (controle, sem adição de enzimas) e uvas branqueadas tratadas enzimaticamente com os preparados enzimáticos N31 e Vinozym Ventage FCE, por diferentes tempos.

Observa-se que o suco elaborado com o preparado enzimático N31 apresentou melhores valores de índice de cor após 2 horas de tratamento enquanto os melhores valores para as características cromáticas do suco elaborado com Vinozym Ventage FCE foram obtidas após 4 horas de tratamento, com valores ainda inferiores aos alcançados pelo N31. Nota-se que após 1 hora de tratamento enzimático com N31, os sucos já apresentavam características cromáticas melhores que as apresentadas pelos sucos tratados com Vinozym. Além disso, observa-se que os índices de coloração T dos sucos diminuíram após o tratamento enzimático, o que sugere que os compostos fenólicos, incluindo as antocianinas, foram efetivamente liberados após a ação das enzimas sobre as cascas das uvas. De acordo



com os resultados de teor de fenólicos totais e de cor dos sucos, sugere-se que 1 hora de tratamento enzimático das uvas com o N31 é suficiente para obter produtos com maior conteúdo de compostos fenólicos e, conseqüentemente, com melhoria na coloração do produto final.

### 3.4 Padrões de identidade e qualidade dos sucos

Os parâmetros físico-químicos dos sucos de uva elaborados de forma convencional (controle) e após aplicação dos preparados enzimáticos (PEC-N31 e Vinozym) por 1 hora estão apresentados na **Tabela 4**. É possível observar que todos os sucos estão em acordo com os parâmetros estabelecidos pela legislação em vigência e a aplicação do preparado enzimático PEC-N31 não interferiu nas características do produto.

**Tabela 4.** Análises físico-químicas dos sucos de uva\*.

Análise	Controle	Vinozym	PEC-N31	Especificação <sup>a</sup>
Densidade a 20°C (g/cm <sup>3</sup> )	1,068	1,069	1,066	min 1,057
Relação °Brix /Acidez total (g/kg)	29,92	29,91	31,70	min 15,0/max 45
Açúcares não redutores em sacarose (g/100 g)	4,270	5,285	4,639	
Açúcares redutores em glicose (g/100 g)	12,375	12,400	11,625	
Açúcares totais naturais da uva (g/100 g)	17,302	17,685	16,264	max 20,00
Acidez total em ácido tartárico (g/100 g)	0,555	0,555	0,511	mín 0,41//max 0,90
Acidez volátil em ácido acético (g/100 g)	0,007	0,007	0,007	max 0,050
Teor alcoólico (% vol)	0,000	0,000	0,000	max 0,50
Sólidos solúveis a 20°C (°Brix)	16,600	16,600	16,200	min 14,00
Sólidos insolúveis a 20°C (% v/v)	2,598	2,296	3,138	max 5,00
Extrato seco total (g/Kg)	18,900	18,981	18,402	
Cinzas (g/100 g)	0,657	0,546	0,637	
pH	3,17	3,18	3,18	min 2,9

\* Sucos foram analisados em triplicata e apenas a média dos resultados foi apresentada. a Especificação segundo Instrução Normativa n. 1, de 07 de janeiro de 2000 sobre Regulamento Técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa e suco de uva. min = mínimo de; max = máximo de.

## 4. CONCLUSÃO

O suco de uva Bordô obtido após 1 hora de tratamento com o preparado enzimático PEC-N31 apresentou baixo teor de metanol e teor de fenólicos totais muito próximo ao valor

obtido pelo produto elaborado com o preparado enzimático comercial (Vinozym FCE). Além disso, obtiveram-se produtos com características cromáticas satisfatórias e padrões de qualidade de acordo com a legislação em vigência. Estes resultados incentivam novos estudos que viabilizem a obtenção de preparado enzimático produzido por este fungo passível de ser oferecido comercialmente às indústrias processadoras de uva. O conhecimento a ser adquirido poderá ser aplicado no desenvolvimento de projetos de integração com produtores de sucos de uva integrais da região de Jales, com o objetivo de melhorar a qualidade dos produtos naquela localidade.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERINE, M. A.; OUGH, C. S. **Analisis de vinos y mostos**. Zaragoza: Acribia, 1976. 158p.

AUW, J. W. et al. Effect of processing on the phenolics and color of Cabernet Sauvignon, Chambourcin, and Noble wines and juices. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 47, n. 3, p. 279-286, Sept. 1996.

BRASIL. Instrução Normativa n° 01, de 7 de janeiro de 2000. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta e suco de uva. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, n. 6, 2000. Seção I, p. 54-58, 10 jan. 2000.

BUB, A. et al. Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status, and DNA damage. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Los Altos, v. 14, n. 2, p. 90-98, Feb. 2003.

BURIN, V. M. et al. Colour, phenolic content and antioxidant activity of grape juice. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 4, p. 1027-1032, Oct./Dec. 2010.

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, n. 17, p. 7883-7891, Sept. 2009.

CATALUÑA, E. **As uvas e os vinhos**. Rio de Janeiro: Editora Globo, 1988.

CHEYNIER, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. **American Society for Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 81, n. 1, p. 223S-229S, Jan. 2005.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

DA-SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases, celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 249-260, 1997.

DAY, A. P. et al. Effect of concentrated red grape juice consumption on serum antioxidant capacity and low-density lipoprotein oxidation. **Annals of Nutrition and Metabolism**, Basel, v. 41, n. 6, p. 353-357, 1997.

DENG, Y.; WU, Y.; LI, Y. Changes in firmness, cell wall composition and cell wall hydrolases of grapes stored in high oxygen atmospheres. **Food Research International**, Barking, v. 38, n. 7, p. 769-776, Aug. 2005.

FRANKEL, E. N. et al. Commercial grape Juices inhibit the in vitro oxidation of human lowdensity lipoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 3, p. 834-838, Feb. 1998.

FREITAS, A. A. et al. Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoxidase (PPO) nas uvas das cultivares Benitaka e Rubi e em seus sucos e geléias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 172-177, Jan./Mar. 2008.

FREITAS, V.; MATEUS, N. Chemical transformations of anthocyanins yielding a variety of colours: review. **Environmental Chemistry Letters**, Berlin, v. 4, n. 3, p. 175-183, Aug. 2006.

GLORIES, Y. La couleur des vins rouges. 1<sup>a</sup> partie: Les equilibres des anthocyanes et des tannins. **Connaissance de la Vigne et du Vin**, Talence, v. 18, n. 174, p. 195-217, 1984.

GONZÁLEZ, E. M.; DE-ANCOS, B.; CANO, M. P. Partial characterization of peroxidase and polyphenol oxidase activities in blackberry fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 11, p. 5459-5464, Oct. 2000.

HOU, C. Effect of storage conditions on methanol content of fruit and vegetable juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 21, n. 5, p. 410-415, Aug. 2008.

KOVAC, V. et al. Effect of several enological practices on the content of catechins and proanthocyanidins of red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 40, n. 10, p. 1953-1957, Oct. 1992.

KRONKA, S. N.; BANZATTO, D. A. **Estatística aplicada à engenharia de alimentos**. Jaboticabal: UNESP; FCAV, 2006.

LLANO, K. M. et al. Mechanical and biochemical response of kiwifruit tissue to steam blanking. **Food Research International**, Barking, v. 36, n. 8, p. 767-775, 2003.

LÓPEZ, P.; FUENTE, J. L.; BURGOS, J. Continuous determination of endopolygalacturonase activity by means of rotational viscosimeters. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 220, n. 2, p. 346-350, Aug. 1994.

MARTIN, N. et al. Pectinase production by a Brazilian thermophilic fungus *Thermomucor indicae seudaticae* N31 in solid state and submerged fermentation. **Microbiology**, Washington, v. 79, n. 3, p. 306-313, May/June 2010.

MEDINSKY, M. A.; DORMAN, D. C. Recent developments in methanol toxicity. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 82/83, p. 707-711, Dec. 1995.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426 - 428, Mar. 1959.

MUÑOZ, O.; SEPULVEDA, M.; SCHWARTZ, M. Effects of enzymatic treatment on anthocyanic pigments from grapes skin from Chilean wine. **Food Chemistry**, London, v. 87, n. 4, p. 487-490, Oct. 2004.

NDIAYE, C.; XU, S.; WANG, Z. Steam blanching effect on polyphenoloxidase, peroxidase and colour of mango (*Mangifera indica* L.) slices. **Food Chemistry**, London, v. 113, n. 1, p. 92-95, Mar. 2009.

OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN (OIV). **Recueil des methods internationaux d'analyse des vins et desmouts**. Paris: Edition Officielle, 1990.

OSMAN, H. E. et al. Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys (*Macaca fascicularis*). **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 128, n. 12, p. 2307-2312, Dec. 1998.

PARDO, F. et al. Effect of diverse enzyme preparations on the extraction and evolution of phenolic compounds in red wines. **Food Chemistry**, London, v. 67, n. 2, p. 135-142, Nov. 1999.

PALOU, E. et al. Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 64, n. 1, p. 42-45, Jan. 1999.

PEDROLI, D. B. et al. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. **The Open Biotechnology Journal**, London, v. 3, p. 9-18, 2009.

PINELO, M.; SINEIRO, J.; NUÑEZ, M. J. Mass transfer during continuous solid-liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 77, n. 1, p. 57-63, Nov. 2006.

PINELO, M. et al. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. **Food Chemistry**, London, v. 92, n. 1, p. 109-117, Aug. 2005.

REVILLA, I.; GONZALES-SAN JOSÉ, M. L. Methanol release during fermentation of red grapes treated with pectolytic enzymes. **Food Chemistry**, London, v. 63, n. 3, p. 307-312, Nov. 1998.

RIZZON, L. A.; LINK, M. Composição do suco de uva caseiro de diferentes cultivares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 2, p. 689-692, mar./abr. 2006.

RODRIGUEZ-NOGALES, J. M. et al. Pectin hydrolysis in a free enzyme membrane reactor: an approach to the wine and juice clarification. **Food Chemistry**, London, v. 107, n. 1, p. 112-119, Mar. 2008.

- ROMBALDI, C. V. et al. Produtividade e qualidade de uva, cv. Bordô (Ives), sob dois sistemas de cultivo. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 4, p. 519-521, Out./Dez. 2004.
- ROMERO-CASCALES, I. et al. Characterisation of the main enzymatic activities present in six commercial macerating enzymes and their effects on extracting colour during winemaking of Monastrell grapes. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 43, n. 7, p. 1295-1305, July 2008.
- ROSSI, M. et al. Effect of fruit blanching on phenolics and radical scavenging activity of highbush blueberry juice. **Food Research International**, Barking, v. 36, n. 9/10, p. 999-1005, 2003.
- SACCHI, K. L.; BISSON, L. F.; ADAMS, D. O. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 56, n. 3, p. 197-206, Sept. 2005.
- SERVILI, M. et al. Utilization of a yeast pectinase in olive oil extraction and red wine making processes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 58, n. 2, p. 253 - 260, 1992.
- SINGLETARY, K. W. et al. Inhibition of mammary *Tumorigenesis* by Concord grape juice constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 25, p. 7280-7286, Dec. 2003.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: SIES H. et al. (Ed.). **Methods in enzymology: polyphenols and flavonoids** San Diego: Academic Press, 1999. p. 152-178.
- SOUZA, I.; RICARDO-DA-SILVA, J. M.; LAUREANO, O. Inativação da enzima polifenoloxidase em bagos de uva para preservação da cor e dos compostos fenólicos em produtos derivados da uva. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 10., 2003. **Anais...** Bento Gonçalves, 2003. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/anais>>. Acesso em: 13 mar. 2009.
- SUDRAUD, P. Interprétation des courbes d'absorption des vins rouges. **Annals of Technology and Agriculture**, Paris, v. 7, n.2, p. 203 - 208, 1958.
- UMSZA, M. A. **Produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em escala de frascos e biorreator de leito fixo.** 2009. 106 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.
- VALDERRAMA, P.; MARANGONI, F., CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase em maçã (*Mallus comunis*). **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 321-325, set./dez. 2001.

XIA, E. et al. Biological activities of polyphenols from grapes. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 11, n. 2, p. 622-646, Feb. 2010.

ZANUZ, M.C. **Efeito da maturação sobre a composição do mosto e qualidade do suco de uva**. 1991. 117 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.

## CONCLUSÕES GERAIS

1. A uva Bordô (casca e polpa) apresentou elevado teor de compostos fenólicos, sendo predominantemente encontrado nas cascas. Nas cascas, as antocianinas se apresentaram principalmente como 3,5-diglicosídeos. Miricetina-3-glicosídeo foi o principal flavonol encontrado em ambas as partes da fruta (casca e polpa) enquanto os derivados do ácido hidroxicinâmico nas cascas derivaram principalmente do ácido caféico. Embora não possua elevado teor de flavan-3-óis, a fruta exibiu considerável teor de resveratrol e capacidade antioxidante.

2. As uvas apirênicas BRS Clara e BRS Morena apresentaram composição fenólica qualitativa muito similar à encontrada por uvas da variedade *Vitis vinifera*, alto teor de fenólicos totais e elevada capacidade antioxidante. Diferenças qualitativas entre os compostos fenólicos presentes na casca e na polpa da uva BRS Morena foram observadas, sendo mais notáveis com relação ao perfil de antocianinas e flavonóis. Proantocianidinas e ácidos hidroxicinamoil-tartáricos são os principais compostos fenólicos encontrados na uva BRS Clara. Estes compostos, bem como o resveratrol, apresentam-se em teores importantes nas uvas BRS Morena, embora nestas o principal componente seja a antocianina.

3. A PPO ativa e latente presente nas uvas BRS Clara e BRS Morena foram extraídas usando detergente Triton-X-100 (ativa) e Triton-X-114 (latente). Com Triton-X-110, as catecolases exibiram máxima atividade a pH 6,0 e na temperatura de 25 °C. Acima de 30°C, um declínio gradual das atividades foi notado, com completa inativação a 60°C. As PPO extraídas com Triton-X-114 foram ativadas com 0,2% de SDS, e exibiram máximas atividades a pH 5.5 e na temperatura de 30 °C, sendo estáveis até temperatura de 60°C.

4. O preparado experimental N31 apresenta potencial para ser futuramente oferecido comercialmente às indústrias processadoras de uva, pois seu emprego na etapa de maceração por 1 hora resultou em suco com boas características cromáticas, alto teor de fenólicos totais e baixo teor de metanol, bem como com características físico-químicas de acordo com o estabelecido pela legislação em vigência.



## **ANEXO**

ESPECIFICAÇÃO DO PREPARADO ENZIMÁTICO COMERCIAL  
VINOZYM VINTAGE FCE



# Vinozym<sup>®</sup> Vintage FCE

– enhancing colour  
and flavour in premium red wines

Increase colour stability, polyphenol, aroma extraction and throughput in your winery with Vinozym Vintage FCE. This unique enzyme solution is a cost-effective way of getting the most out of your red wine grapes and producing premium wines with more body and mouthfeel.

## Benefits

### • Enhances colour

Ease colour extraction and improve colour stability by up to 20% with Vinozym Vintage FCE. In addition, this solution's unique enzyme activity maintains the colour of your wine even after fermentation and maturation.

### • Improves overall flavour profile

Produce wines with more body and mouthfeel with Vinozym Vintage FCE, which enhances soft tannin extraction by 15% without increasing astringency. This unique enzyme solution does this by extracting smooth tannins from the skin and polysaccharides from the pulp, leading to wine with a better overall flavour profile.

### • Increases throughput

Increase the free-run wine release at the end of alcohol fermentation by 5-10% with Vinozym Vintage FCE, and minimise maceration time by 30%. This reduces mechanical work such as pumping, and limits cold prefermentary maceration.

### • Enables more fruity flavours

This unique enzyme solution enhances the release of flavours and aroma precursors from the skin of the grape to help you produce red wines with more fruity flavours.

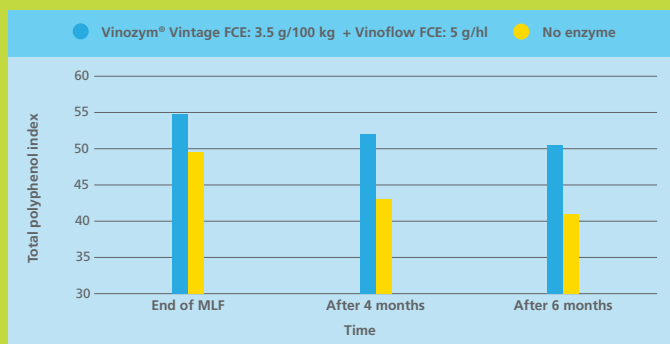


Novozymes is the world leader in bioinnovation. Together with customers across a broad array of industries we create tomorrow's industrial biosolutions, improving our customers' business and the use of our planet's resources.

## Vinozym Vintage FCE

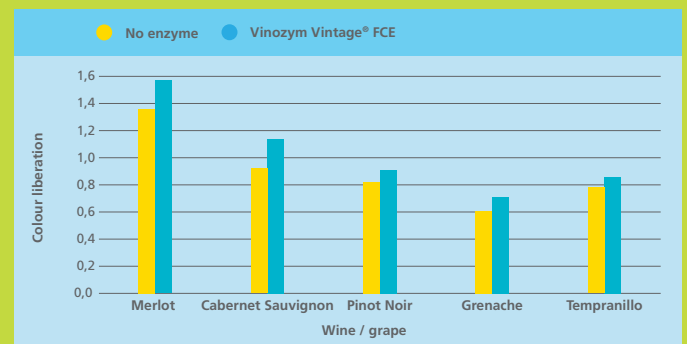
– enhancing colour and aroma in premium red wines.

### Total polyphenol index follow-up over time



Vinozym Vintage FCE has a positive effect on colour and polyphenol extraction. The effect varies according to the year and the grape variety, and enzyme-treated wine is more stable over time.

### Vinozym Vintage FCE's effect on colour liberation on various varieties



Vinozym Vintage FCE significantly improves colour liberation in a variety of red wines.

### Technical parameters

Vinozym Vintage FCE is used after the crusher/destemmer when filling the maceration tank. SO<sub>2</sub> does not affect enzyme activity. Vinozym Vintage FCE enables you to reduce the cold maceration time by 30-100% and can even eliminate the cold soak process. This ensures that you produce fruity red wines with one day of cooling instead of two without enzymes.

### Dosage

3-4 g/100 kg grapes on large berries. The dose should be increased to 4-5 g/100 kg for small berry grapes or under dry-year conditions or lower ripeness.

### Contact time

The enzyme is active as soon as it is added to the grapes.

For more information, or for more office addresses, visit [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com)

Novozymes Switzerland AG · Neumattweg 16 · 4243 Dittingen · Switzerland · Tel. +41 61 765 6111 · Fax +41 61 765 6333

Novozymes A/S · Krogshoejvej 36 · 2880 Bagsvaerd · Denmark · Tel. +45 4446 0000 · Fax +45 4446 9999 · [wineprocessing@novozymes.com](mailto:wineprocessing@novozymes.com) · [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com)

Laws, regulations, and/or third party rights may prevent customers from importing, using, processing, and/or reselling the products described herein in a given manner. Without separate, written agreement between the customer and Novozymes to such effect, this document does not constitute a representation or warranty of any kind and is subject to change without further notice.