

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

Carine Glaucia Comarella

**ULTRASSOM EM PÓS-COLHEITA DE UVAS ISABEL E CABERNET
SAUVIGNON: INFLUÊNCIA SOBRE A COMPOSIÇÃO FENÓLICA DA
FRUTA, SUCO E VINHO**

Santa Maria, RS, Brasil

2016

Carine Glaucia Comarella

**ULTRASSOM EM PÓS-COLHEITA DE UVAS ISABEL E CABERNET
SAUVIGNON: INFLUÊNCIA SOBRE A COMPOSIÇÃO FENÓLICA DA FRUTA,
SUCO E VINHO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Neidi Garcia Penna

Santa Maria, RS, Brasil
2016

COMARELLA, CARINE GLAUCIA
ULTRASSOM EM PÓS-COLHEITA DE UVAS ISABEL E CABERNET
SAUVIGNON: INFLUÊNCIA SOBRE A COMPOSIÇÃO FENÓLICA DA
FRUTA, SUCO E VINHO / CARINE GLAUCIA COMARELLA.- 2016.
131 p.; 30 cm

Orientadora: NEIDI GARCIA PENNA
Coorientadora: CLÁUDIA KAEHLER SAUTTER
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2016

1. Sonicação 2. Antocianinas 3. Extração 4. Elicitor 5.
Processamento I. GARCIA PENNA, NEIDI II. KAEHLER
SAUTTER, CLÁUDIA III. Título.

Carine Glauca Comarella

**ULTRASSOM EM PÓS-COLHEITA DE UVAS ISABEL E CABERNET
SAUVIGNON: INFLUÊNCIA SOBRE A COMPOSIÇÃO FENÓLICA DA FRUTA,
SUCO E VINHO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

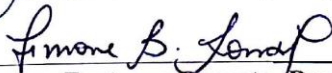
Aprovado em 29 de agosto de 2016:



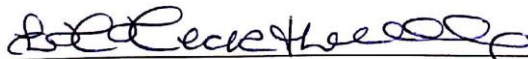
Neidi Garcia Penna, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



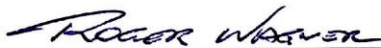
César Valmor Rombaldi, Dr. (UFPEL)



Simone Bertazzo Rossato, Dra. (IFRS)



Luisa Helena Rychcki Hecktheuer, Dra. (UFSM)



Roger Wagner, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

DEDICATÓRIA

*Aos meus amados pais, Carmelino e Lorena,
pelo amor e incentivo sempre..
dedico*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me permitir mais esta conquista.

Aos meus amados pais e irmão pelo incentivo, apoio e auxílio de todas as formas possíveis.

A minha orientadora Neidi pela oportunidade, confiança, auxílio e disponibilidade sempre.

A Professora Cláudia Sautter, minha coorientadora, colega e amiga, pela orientação, ajuda e principalmente, motivação.

Ao meu namorado André pelo companheirismo, carinho, compreensão e todo o auxílio.

Aos colegas e estagiários do Lab 114 por toda ajuda e amizade.

As colegas Taísa Treptow, Márcia Arenhart, Fernanda Franco, Eduarda Machado, Cris Copetti e Juciane Fortes pelo auxílio, carinho, amizade e companheirismo.

AVivian Bochi pela dedicação e enorme ajuda neste trabalho.

Aos Professores do DTCA pelos ensinamentos.

A Vinícola Almadén, na pessoa de Fabrício Domingues, pela atenção, cordialidade e doação de amostras de uva.

Ao Laboratório Lamic/UFSM, em especial a Vanessa Gass da Silveira, pela gentileza e empréstimo de equipamento.

Professor Eliseu Rodrigues do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS) pelo auxílio e empréstimo de equipamentos.

Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade, valores e ensinamentos.

Muito obrigada!!

EPIGRAFE

“Não tenho certeza de nada,
mas a visão das estrelas me faz sonhar”

Van Gogh

RESUMO

ULTRASSOM EM PÓS-COLHEITA DE UVAS ISABEL E CABERNET SAUVIGNON: INFLUÊNCIA SOBRE A COMPOSIÇÃO FENÓLICA DA FRUTA, SUCO E VINHO

AUTORA: Carine Glauca Comarella
ORIENTADORA: Neidi Garcia Penna
COORIENTADORA: Claudia Kaehler Sautter

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal, onde a uva se destaca como importante fonte disponível dessas substâncias. Nessa fruta e em produtos derivados, estes compostos desempenham papel fundamental no desenvolvimento de características sensoriais, além de possuírem atividade antioxidante pronunciada, podendo atuar na prevenção de diversas doenças. O teor de compostos fenólicos é dependente de diversos fatores edafoclimáticos a qual a uva é submetida, e seu grau de maturação fenólica, juntamente com a eficiência do processo de extração, influenciam sobremaneira a concentração dessas substâncias no suco e vinho. O ultrassom é uma tecnologia emergente que apresenta uma gama de aplicações e vantagens na indústria alimentícia, tendo dentre seus principais usos, a facilitação da extração de compostos vegetais. Mais recentemente, tem sido avaliada a sua utilização na pós-colheita de frutas e vegetais, como possível agente elicitador capaz de promover a síntese de compostos fenólicos. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar o desempenho do ultrassom no tratamento pós-colheita de uvas Isabel e Cabernet Sauvignon, em relação aos efeitos sobre a extratibilidade dos compostos fenólicos da fruta e respectiva concentração nos sucos e vinhos elaborados. Para isso foram testados diferentes tempos de aplicação de ultrassom (3, 5, 7 e 10 minutos) em uvas das safras 2013, 2014 e 2015 e analisado o período necessário para observação da resposta em cada tratamento utilizado. Na fruta foi realizada análise de maturação fenólica, avaliando a extratibilidade e concentração de compostos fenólicos. Nos sucos de uvas Isabel e vinhos de Cabernet Sauvignon foram avaliados compostos fenólicos e índices de cor, identificação de antocianinas do suco por HPLC/DAD/MS e análise sensorial descritiva quantitativa dos vinhos. Os resultados obtidos demonstraram que os efeitos do ultrassom são dependentes do tempo de aplicação, o que influencia também o período necessário para o desencadeamento da resposta. Para a cultivar de uvas Isabel foi possível observar de forma mais acentuada o efeito do tratamento sobre a extratibilidade. Esta pode ser melhorada dependendo das condições de aplicação do ultrassom, levando a um aumento substancial do teor de antocianinas do suco. Os dados do potencial fenólico de uvas Isabel também sugerem um possível efeito elicitador do ultrassom, ou seja, estímulo à síntese de compostos fenólicos. No suco desta cultivar foram identificadas 33 antocianinas, com a presença de 5 agliconas, mono e diglicosiladas, assim como moléculas aciladas, produtos de condensação direta, ou mediados por acetaldeído e piranoantocianinas. Os resultados demonstraram maior influência do ultrassom sobre a concentração do que sobre o perfil dos pigmentos. Em uvas Cabernet Sauvignon, o ultrassom pode levar a degradação significativa de antocianinas na fruta, o que reflete no respectivo vinho. Neste produto, de modo geral o ultrassom não pareceu promover uma melhoria da qualidade sensorial, ou aceitação do vinho, mas em determinadas doses elevou a intensidade de aromas como frutas vermelhas. O acompanhamento das diferentes safras demonstrou que os efeitos do ultrassom são influenciados pelas condições de maturação da fruta, visto que os resultados nem sempre se repetiram ao longo dos anos.

Palavras-chave: Sonicação. Antocianinas. Extração. Elicitor. Processamento.

ABSTRACT

ULTRASOUND IN POST-HARVEST OF ISABELLA AND CABERNET SAUVIGNON GRAPES: INFLUENCE ON PHENOLIC COMPOSITION OF FRUIT, JUICE AND WINE

AUTHOR: Carine Glaucia Comarella

ADVISOR: Neidi Garcia Penna

CO-ADVISOR: Claudia Kaehler Sautter

Phenolic compounds are secondary metabolites widely distributed in the plant kingdom, where the grape stands out as an important available source of these substances. In this fruit and its derivatives, these compounds play an important role in the development of sensory characteristics, besides having pronounced antioxidant activity and can act in the prevention of various diseases. The content of phenolic compounds is dependent upon various edafoclimatic factors which grapes are subjected, and its degree of phenolic maturation along with the efficiency of the extraction process greatly affects the concentration of these substances in juice and wine. Ultrasound is an emerging technology that has a range of applications and advantages in the food industry, having among its main uses, facilitating the extraction of plant compounds. More recently, its use has been evaluated in post-harvest of fruits and vegetables as possible elicitor agent capable of promoting the synthesis of phenolic compounds. Thus, this study aimed to evaluate the performance of ultrasound in the postharvest treatment of Isabella and Cabernet Sauvignon grapes, about the effects on the extractability of fruit phenolic compounds and corresponding concentration in juices and wines. For that were tested different ultrasound application times (3, 5, 7, and 10 minutes) in grapes from 2013, 2014 and 2015 harvests and analyzed the time required for observing the response in each treatment used. In fruit maturation phenolic analysis was performed by evaluating the extractability and concentration of phenolic compounds. In the fruit was performed analysis of phenolic maturation by evaluating the extractability and concentration of phenolic compounds. In Isabel grape juice and Cabernet Sauvignon wine the phenolic compounds were evaluated and color indices, anthocyanin identification juice by HPLC/DAD/MS and quantitative descriptive sensory analysis of wine. The results showed that the effects of ultrasound are dependent of time applied, which also influences the period required to initiate the response. In Isabella cultivar grapes was more sharply observed the effect of treatment on extractability. This can be improved depending on the ultrasound conditions of application, resulting in a substantial increase in anthocyanin content of the juice. The phenolic potential data of Isabella grapes also suggest a possible elicitor effect of ultrasound, i.e., synthesis stimulation of phenolic compounds. In juice of this cultivar 33 anthocyanins have been identified, among which 5 aglycones, mono and diglucosilated, as well as acylated compounds, direct or mediated by acetaldehyde condensation products, and pyranoanthocyanins. The results showed more influence of ultrasound on concentration than on the profile of these pigments. In Cabernet Sauvignon grapes, ultrasound can lead to significant degradation of fruit anthocyanins, which reflects in their wine. In this product, generally the ultrasound did not appear to promote better sensory quality or acceptance of the wine, but in certain doses increased the intensity of aromas such as red fruit. The monitoring of the different harvests showed that the state of fruit maturation influences the response to ultrasound, since the behavior to the treatments is not always repeated over the years.

Keywords: Sonication. Anthocyanins. Extraction. Elicitor. Processing.

LISTA DE FIGURAS

APRESENTAÇÃO

Figura 1 – Uva Isabel, safra 2015 (Itaara, RS).....	16
Figura 2 – Uva Cabernet Sauvignon, safra 2015 (Santana do Livramento, RS).....	17
Figura 3 – Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário.....	19
Figura 4 – Principais rotas de formação de compostos fenólicos.....	21
Figura 5 – Estrutura genérica de uma molécula de flavonóide.....	24
Figura 6 – Estrutura geral dos flavonóides e suas agliconas com os respectivos radicais.....	25
Figura 7 – Estrutura dos flavan-3-óis.....	25
Figura 8 – Estrutura geral das proantocianidinas dom os principais derivados e seus respectivos substituintes.....	26
Figura 9 – Antocianinas encontradas em <i>Vitis vinifera</i>	27
Figura 10 - Representação esquemática da principal posição reativa da estrutura de antocianinas.....	28
Figura 11 – Alteração na estrutura das antocianinas em diferentes valores de pH.....	29
Figura 12 – Estrutura genérica de compostos não flavonóides mais comuns em uvas: (A) derivados do ácido cinâmico; (B) derivados do ácido benzoico; (C) estilbenos.....	31
Figura 13 – Espectro do som.....	35
Figura 14 – Banho ultrassônico.....	36
Figura 15 – Sistema de sonda de ultrassom.....	37
Figura 16 – Cavitação acústica.....	38
ARTIGO 2	
Figura 1 – Chromatographic separation of anthocyanins and related pigments detected in Isabella juice samples from grapes submitted to postharvest treatment with 5 minutes of Ultrasound and 1 day of storage period after sonication...	88
ARTIGO 3	
Figura 1 – Perfil sensorial de vinhos Cabernet Sauvignon provenientes de uvas submetidas a diferentes tratamentos com Ultrassom na safra de 2014.....	103
Figura 2 – Média das notas de aceitação de vinhos Cabernet Sauvignon elaborados a partir de uvas submetidas a diferentes tratamentos com Ultrassom na safra de 2014.....	106

LISTA DE TABELAS

APRESENTAÇÃO

Tabela 1- Comercialização de vinhos e sucos de uva provenientes do Rio Grande do Sul, em litros.....	15
--	----

ARTIGO 1

Table 1 – Phenolic potential of Isabella grapes submitted to different exposure times of Ultrasound (US) and post-treatment storage periods in 2013, 2014 and 2015 vintages.....	61
Table 2 –Phenolic potential of Cabernet Sauvignon grapes submitted to different exposure times of Ultrasound (US) and post-treatment storage periods in 2013, 2014 and 2015 vintages.....	62
Table 3 –Phenolic compounds and color indices in juices from Isabella grapes submitted to different exposure times of Ultrasound (US) and post-treatment storage periods in 2013, 2014 and 2015 vintages.....	63
Table 4 - Phenolic compounds and color indices in wines from Cabernet Sauvignon grapes submitted to different exposure times of Ultrasound (US) and post-treatment storage periods in 2013, 2014 and 2015 vintages.....	64

ARTIGO 2

Table 1 – Monomeric anthocyanins in Isabella grapes juices produced with berries that where submitted to ultrasound (US) postharvest treatment.....	89
Table 2 – Tentative identification of anthocyanins and derived anthocyanins pigments in Isabella juices produced with grapes submitted to ultrasound (US) postharvest treatment.....	90
Table 3 – Quantification of individual anthocyanins by HPLC-PDA from Isabella juices produced with grapes submitted to ultrasound (US) postharvest treatment.....	92

ARTIGO 3

Tabela 1 – Termos descritores e referências utilizadas na avaliação de vinhos Cabernet Sauvignon.....	99
Tabela 2 – Composição geral de vinhos Cabernet Sauvignon elaborados com uvas submetidas a tratamento pós-colheita com Ultrassom na safras de 2014.....	101
Tablea 3 – Pontuações médias dos atributos sensoriais para os quais foram observadas diferenças significativas entre as amostras de vinhos Cabernet Sauvignon provenientes de uvas submetidas a diferentes tratamentos com Ultrassom na safra de 2014.....	104

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....	12
1.1 INTRODUÇÃO.....	12
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
1.3 OBJETIVOS.....	42
2 ARTIGO 1 – ULTRASOUND IN THE POSTHARVEST TREATMENT OF GRAPES: IMPACT ON THE EXTRACTABILITY AND PHENOLIC COMPOSITION OF JUICE AND WINE.....	44
3 ARTIGO 2 – STUDY OF ULTRASOUND IRRADIATION ON GRAPES: EFFECT ON ANTHOCYANIN PROFILE OF ISABELLA JUICE.....	66
4 ARTIGO 3 – PERFIL SENSORIAL DE VINHOS DE UVAS CABERNET SAUVIGNON SUBMETIDAS A TRATAMENTO COM ULTRASSOM.....	94
5 DISCUSSÃO.....	112
6 CONCLUSÃO.....	116
REFERÊNCIAS.....	118
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	128
APÊNDICE B – FICHA DE ESCALA NÃO ESTRUTURADA PARA AVALIAÇÃO SENSORIAL DE VINHOS CABERNET SAUVIGNON.....	130

1 APRESENTAÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o cultivo da uva está relacionado com o início da nossa colonização e após vários ciclos e períodos de adaptação, o mercado de produtos enológicos passou por uma completa transformação na última década. A crescente absorção desta cultura levou a agroindústria desse setor a investir na modernização das vinícolas e processadoras de suco, principalmente pela necessidade de desenvolver técnicas de competitividade com os produtos importados (EMBRAPA, 2016). Contudo, o setor de produção vitícola não avançou no mesmo ritmo e com a mesma objetividade necessária para que a qualidade da matéria-prima nacional (uvas para processamento) apresente potencial enológico similar ao dos principais mercados concorrentes.

A qualidade da uva é resultado de uma série de fatores tais como cultivar, clima, solo, disponibilidade de água, práticas culturais e grau de maturação, os quais exercem influência direta sobre a composição química da fruta (FERRER-GALLEGO et al., 2012). Entre as substâncias mais afetadas está uma classe de metabólitos secundários importante na determinação da qualidade sensorial e nutricional da uva e de seus derivados, os compostos fenólicos (IGNAT; VOLF, POPA, 2011).

Os compostos fenólicos possuem potente ação antioxidante e seu consumo é associado à prevenção de diversas doenças (HAMINIUK et al., 2012). Além disso, atributos sensoriais como cor, corpo, amargor e adstringência são decorrência da presença dessas substâncias (KENNEDY, 2008; VIDAL et al., 2004). Em produtos como suco e vinho, a concentração de compostos fenólicos não é determinada somente pelo teor contido na uva, mas também pela eficiência da extração durante o processamento da fruta.

A utilização do ultrassom na indústria alimentícia tem despertado bastante interesse devido a sua versatilidade de uso, praticidade, economia e por ser uma tecnologia ambientalmente amigável (FENG, BARBOSA-CÁNOVAS, WEISS, 2010). Neste âmbito, o ultrassom figura como uma alternativa para a substituição de diversos processos convencionais. Entre os empregos mais frequentes do ultrassom está justamente o auxílio à extração de compostos bioativos assim como os fenólicos (SORIA; VILLAMIEL, 2010) e, mais recentemente, também vem sendo testado como elicitador abiótico em matrizes vegetais, demonstrando expressiva capacidade de estímulo à síntese de metabólitos secundários (HASAN; BAEK 2013, HASAN et al., 2014, YU et al., 2016). Dessa forma, pode o ultrassom

apresentar potencial como tecnologia capaz de melhorar a concentração de compostos fenólicos em produtos derivados da uva. No entanto, são escassos na literatura os trabalhos sobre aplicação pós-colheita de ultrassom nessa fruta e avaliação da qualidade de seus produtos.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 Panorama da vitivinicultura nacional

A vitivinicultura brasileira caracteriza-se como uma atividade importante para a sustentabilidade da pequena propriedade no país, além de promover o desenvolvimento das regiões produtoras, com a geração de emprego em grandes empreendimentos. Implantada no Brasil em 1532 através de colonizadores portugueses na então Capitania de São Vicente, hoje Estado de São Paulo, foi expandida para outras regiões do país, primeiramente com cultivares de *Vitis vinifera*. Após a dizimação da cultura por doenças fúngicas trazidas da Europa, abriu espaço para o cultivo da *Vitis labrusca* Isabel, que viabilizou o desenvolvimento da vitivinicultura nos estados de São Paulo e, principalmente no Rio Grande do Sul (DEBASTIANI et al., 2015).

Após passar por diversos ciclos, com introdução e adaptação de diversas variedades de videiras, o Brasil chegou em 2015 a uma produção de 1.499.353 toneladas de uvas, totalizando uma área plantada de 79.094 hectares. A maior parte desta produção é destinada ao processamento, em especial para a elaboração de produtos como vinhos finos e suco, do qual o estado do Rio Grande do Sul detém cerca de 90% do mercado. Mesmo com o avanço da crise econômica e baixo desempenho da economia do país, a quantidade de suco e vinhos comercializados pelo Rio Grande do Sul, em 2015, apresentou acréscimo de 4,52% (Tabela 1) (EMBRAPA, 2016).

Impulsionada pelo desempenho do setor no mercado interno, especialmente a partir da década de 70, a agroindústria do vinho nacional, passou a investir na implantação e modernização do setor industrial. Atualmente, o nível tecnológico utilizado na elaboração de vinhos finos é comparável àqueles existentes nos países de vitivinicultura avançada, apresentando qualidade reconhecida nacional e internacionalmente (EMBRAPA, 2014).

O potencial de expansão deste mercado e a tendência de diversificação dentro da cadeia vitivinícola também levaram às empresas que elaboram suco de uva a buscar uma estrutura moderna e detentora de alta tecnologia. Este segmento tem sido uma alternativa para a sustentabilidade da vitivinicultura no RS, absorvendo boa parte da produção de uvas americanas e híbridas (EMBRAPA, 2016).

Tabela 1 - Comercialização de vinhos e sucos de uva provenientes do Rio Grande do Sul, em litros.

Produtos\Anos	2013	2014	2015
Vinho de Mesa	221.590.810	206.404.427	210.147.593
Tinto	188.033.494	178.250.072	182.807.550
Rosado	1.777.648	1.419.855	1.430.767
Branco	31.779.668	26.734.500	25.909.276
Vinho Fino	27.912.934	20.424.983	21.218.965
Tinto	19.121.750	15.354.938	16.210.163
Rosado	214.269	164.219	168.203
Branco	8.576.915	4.905.826	4.850.599
Vinho Frisante	1.764.851	1.893.469	1.963.096
Espumantes	12.194.973	12.602.610	14.431.193
Espumante Moscatel	3.783.531	4.588.465	5.620.169
Suco de Uva Integral	72.216.872	88.013.377	115.389.024
Suco de Uva Concentrado	191.849.570	196.799.675	185.967.593
TOTAL	531.313.541	530.727.006	554.737.634

Fonte: Dados UVIBRA e IBRAVIN (EMBRAPA, 2016).

1.2.2 Principais variedades de uvas

A videira é pertencente ao gênero *Vitis*, composto por mais de 60 espécies que compreendem uma grande diversidade genética e estão adaptadas a diferentes condições ambientais.

A espécie mais cultivada no mundo é a *Vitis vinifera*, apresentando grande número de cultivares que são destinados tanto para a elaboração de vinho, como também de uvas de mesa e para a produção de passas. As cultivares desta espécie são denominadas uvas europeias ou uvas finas, que por sua vez dão origem aos vinhos finos e espumantes. Dentre as principais variedades desta espécie estão as tintas Cabernet Sauvignon, Tannat, Merlot, Pinot Noir, e as brancas Chardonnay, Sauvignon Blanc, Riesling, entre outras. A variedade europeia é bastante suscetível a moléstias fúngicas, o que aumenta a dificuldade de cultivo e afeta sua produção, principalmente em climas como o tropical e sub-tropical, que ocorrem no Brasil (AGEITEC, 2016).

A segunda espécie mais importante em termos de área cultivada no mundo é a *Vitis labrusca*. De origem americana, engloba as variedades para consumo *in natura* e para

processamento, em especial para a elaboração de suco de uva e vinho de mesa. No Brasil, as cultivares destas espécies, assim como as cultivares híbridas interespecíficas, são classificadas como uvas comuns. Devido à sua resistência às moléstias fúngicas, pragas e clima úmido, as uvas americanas possibilitam boa produtividade e facilidade de cultivo nas condições climáticas do Brasil (AGEITEC, 2016).

Neste cenário, em termos de volume processado, entre as uvas que despontam na produção de sucos e de vinhos finos estão a cultivar americana Isabel e a vinífera Cabernet Sauvignon, respectivamente.

1.2.2.1 Uva Isabel

A uva Isabel (Figura 1) é uma das principais cultivares de *Vitis labrusca*, espécie americana originária do sul dos Estados Unidos. No Brasil é a variedade mais extensamente cultivada devido a sua fácil adaptação às condições edafoclimáticas, rusticidade e fertilidade, o que proporciona colheitas fartas e com poucas intervenções de manejo. Apresenta cachos de tamanho médio, bagas arredondadas, de cor preta, recobertas de pruína, polpa sucosa e doce (LEÃO; SOARES, 2000). Os principais destinos da uva Isabel são a produção de suco de uva, vinho tinto comum, vinagre, geleias e comercializada como fruta *in natura* (RIZZON; MIELE; MENEGUZZO, 2000; ROMBALDI et al., 2004).

Figura 1 – Uva Isabel, safra 2015 (Itaara, RS).



Fonte: Taschetto, (2015).

Por possuir coloração e teor de açúcar abaixo do desejável, o suco proveniente desta cultivar frequentemente necessita ser cortado com suco de cultivares tintureiras, visando à obtenção de produtos com a qualidade e intensidade de cor que o mercado exige (CAMARGO et al., 2010). Como característica geral das variedades não viníferas, a ‘Isabel’ apresenta elevado teor de antranilato de metila, substância que produz aroma forte de uva e que se mantém nos sucos e vinhos, originando o aroma “foxado”, muito apreciado por uma faixa de consumidores (CAMARGO, 2003).

1.2.2.2.2 Uva Cabernet Sauvignon

A cultivar Cabernet Sauvignon (Figura 2) originou-se na região de Bordeaux, França, de onde se difundiu para a maioria das regiões vitícolas, e hoje é uma das mais demandadas na viticultura internacional. No Brasil é uma das uvas viníferas mais cultivadas (GIOVANNINI, 2001; POMMER; TERRA; PIRES, 2003).

Figura 2 – Uva Cabernet Sauvignon, safra 2015 (Santana do Livramento, RS)



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Variedade de maturação e brotação tardia, a Cabernet Sauvignon é relativamente vigorosa, apresentando uma produção média e elevada qualidade de vinificação. Os cachos são de tamanho médio a pequeno, com formato irregular, geralmente cônico longo, folgado a

compacto. As bagas de Cabernet Sauvignon são pequenas, com muitas sementes, esféricas com pele preta, densas e muito resistentes. Esta característica faz as uvas razoavelmente resistentes à doença e capazes de suportar algumas chuvas do outono com poucos danos (RICHTER, 2008). Resultante do cruzamento natural da Cabernet Franc com a Sauvignon Blanc apresenta aromas de frutas vermelhas que lembram a Cabernet Franc, e de ervas frescas que remetem à Sauvignon Blanc. Seu vinho, de intensa cor rubi, encorpado e de agradável buquê, é de fácil reconhecimento em cortes, tendo aromas e sabores que se destacam, e uma boa capacidade para envelhecer e ganhar complexidade (LAROUSSE DO VINHO, 2004).

1.2.3 Metabolismo secundário vegetal e a síntese de compostos fenólicos

Em todo o reino vegetal o metabolismo essencial da célula é realizado pelo metabolismo considerado primário, responsável por processos metabólicos relacionados com crescimento e funcionamento celular, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Este metabolismo produz substâncias como aminoácidos, proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos, distribuídos de forma universal nas plantas (TAIZ; ZEIGER, 2006).

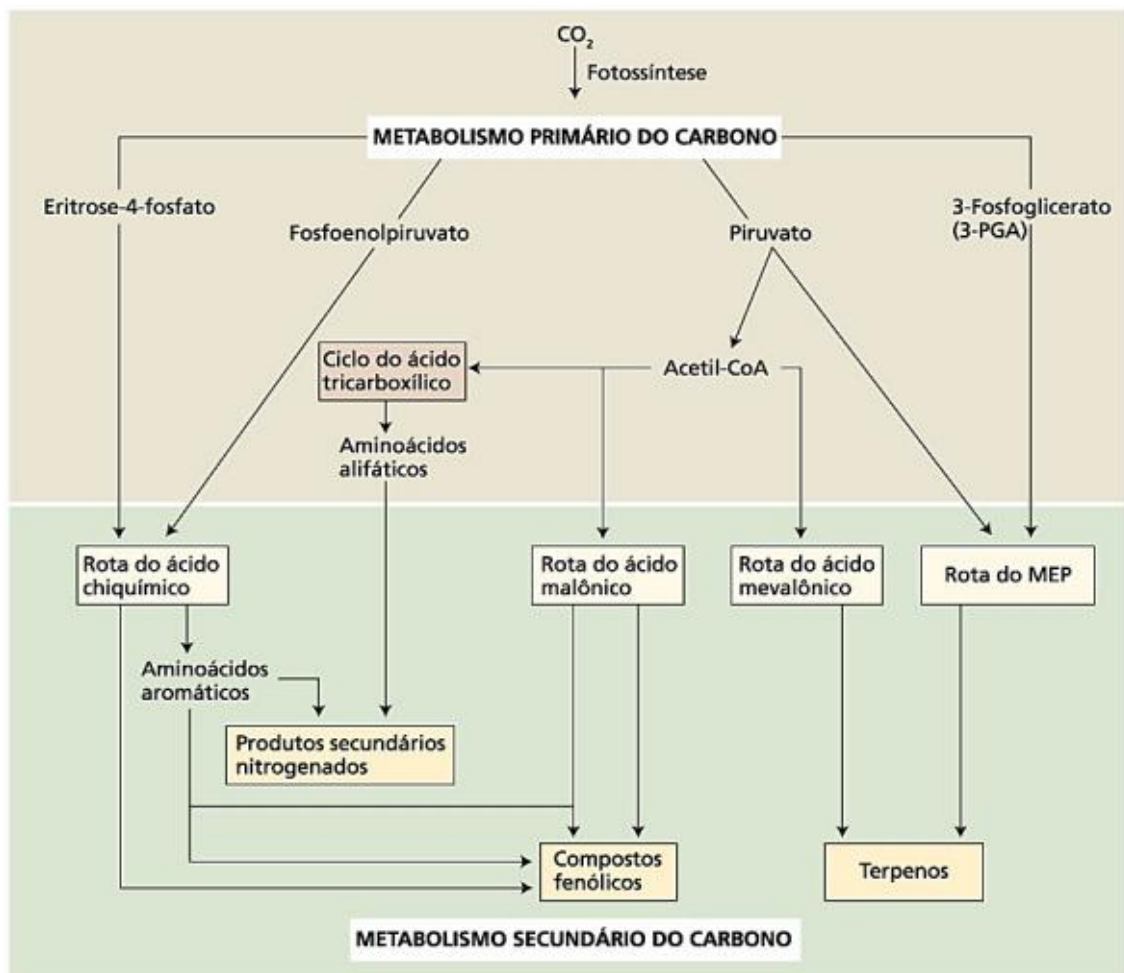
As plantas, no entanto, também apresentam grande variedade de compostos orgânicos que parecem não ter função direta no seu crescimento e desenvolvimento, mas conferem alguma vantagem às células vegetais, sendo conhecidos como metabólitos secundários. Estes, porém, não são comuns a todos os vegetais sendo característicos apenas de determinados grupos taxonômicos (CHEN; CHEN, 2000).

Existe uma estreita relação entre o metabolismo secundário e a resposta de defesa vegetal. As plantas respondem ao ataque de patógenos, insetos, herbívoros, ou outros fatores de estresse, ativando uma série de mecanismos de defesa que incluem, entre outros, a indução da biossíntese de metabólitos secundários como fitoalexinas, respostas de hipersensibilidade e formação de barreiras estruturais defensivas, como a deposição de lignina na parede celular (MERT-TÜRK, 2002; CASTRO, 2005). Dessa forma, muitos produtos do metabolismo secundário tem função ecológica importante, sendo responsáveis pela sobrevivência da planta no meio que a cerca. Igualmente, produtos secundários também possuem ação protetora em relação a estresses abióticos como aqueles associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição à UV e deficiência de nutrientes minerais (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Resumidamente, o processo celular geral e princípio regulador da biossíntese de metabólitos secundários de plantas têm início quando um sinal extracelular ou intracelular é percebido por um receptor na superfície da membrana plasmática ou endomembrana. A percepção deste sinal elicitor inicia uma rede de transdução de sinal que leva à ativação ou biossíntese *de novo* de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes biossintéticos envolvidos no metabolismo secundário das plantas. As enzimas resultantes, então, catalisam a biossíntese de metabólitos secundários alvo (ZHAO et al., 2005).

Os metabólitos secundários se dividem em três grupos quimicamente distintos: compostos fenólicos, terpenos e compostos nitrogenados (TAIZ; ZEIGER, 2006), porém todos podem ter sua origem resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato (Figura 3).

Figura 3 – Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário.



Fonte: (TAIZ; ZEIGER, 2006).

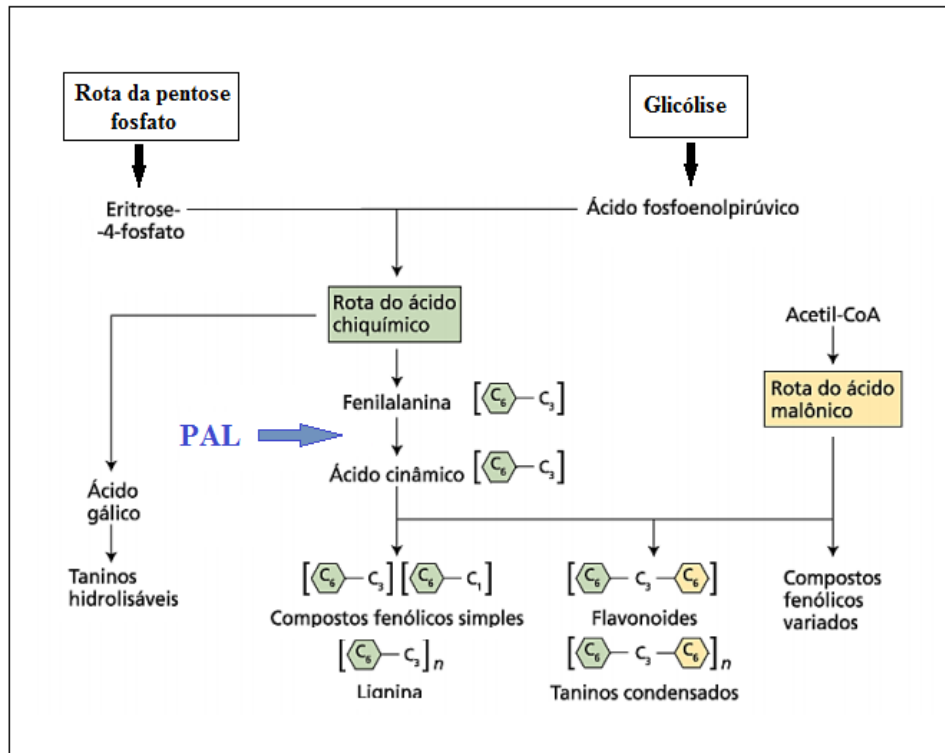
Dentre os metabólitos secundários produzidos pelos vegetais, os compostos fenólicos representam um dos grupos mais importantes que desempenham atividade protetora nas plantas. Estes compostos desempenham um importante papel no crescimento e reprodução, fornecendo proteção contra patógenos e predadores (NASS, 2007). Outros apresentam função no suporte mecânico, como atrativo de polinizadores ou dispersores de sementes, na proteção contra a radiação ultravioleta ou reduzindo o crescimento de plantas competidoras adjacentes, além de contribuírem também, para a coloração e características sensoriais de frutas e outros vegetais (ALASALVAR et al., 2001).

Há ainda outros efeitos biológicos atribuídos, no entanto, ao consumo dos compostos fenólicos devido ao grande potencial dessas substâncias como antioxidantes. Estas moléculas atuam como sequestradoras de radicais livres, como o superóxido O_2^- e espécies reativas de oxigênio (SOKMEN et al., 2005), prevenindo a peroxidação de lipídeos agindo na prevenção de doenças que envolvam a ação de radicais livres e a oxidação de lipoproteínas, como problemas cardiovasculares, arteriosclerose e trombose (MANACH et al., 1998; WANG; ZHANG, 2005), além de agirem modulando respostas fisiológicas em animais, como a vasodilatação e a inflamação (RICE-EVANS; PARCKER, 2003).

Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos no reino vegetal e se caracterizam estruturalmente por possuírem um anel aromático, contendo um ou mais substituintes hidroxila, variando de simples moléculas fenólicas a compostos altamente polimerizados. Tal classe de compostos naturais encontra-se frequentemente conjugada a açúcares e ocasionalmente presentes em proteínas, alcaloides e terpenos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

A classe mais abundante de compostos fenólicos secundários em plantas é derivada da fenilalanina, produzida na via do ácido chiquímico, a partir do fosfoenolpiruvato (da glicólise) e eritrose 4-fosfato (da via pentose-fosfato), através da eliminação de uma molécula de amônia para a formação do ácido cinâmico (Figura 4). Essa reação é catalisada pela fenilalanina amônia-liase (PAL). A atividade desta enzima pode aumentar em decorrência de determinados fatores ambientais, tais como infecções por fungos, baixos níveis de nutrientes e luz, ocorrendo a síntese de importantes substâncias fenólicas como flavonóides, ligninas e os ácidos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Figura 4 – Principais rotas de formação de compostos fenólicos



Fonte: Adaptado de Taiz e Zeiger (2006).

1.2.3.1 Elicitores e o estímulo às respostas de defesa

Os agentes e fatores capazes de estimular respostas de defesa no vegetal a partir da ativação de seu metabolismo secundário são chamados de elicitores. Geralmente os elicitores são classificados com base na sua origem e estrutura molecular. Referem-se a produtos químicos de várias fontes, bióticos ou abióticos, bem como fatores físicos, que podem desencadear uma resposta em organismos vivos, resultando no acúmulo de metabólitos secundários. Cada tipo de elicitor de acordo com suas características pode induzir respostas específicas que dependem da interação elicitor-planta (VASCONSUELO; BOLAND, 2007).

Quimicamente, segundo Taiz e Zeiger (2006), os elicitores bióticos são formados por moléculas complexas como carboidratos, glicoproteínas, polipeptídeos, enzimas ou lipídeos, podendo ser de origem endógena (porções da própria planta) ou exógena (agentes microbianos). Os elicitores endógenos são formados por fragmentos de material constituinte da parede celular da planta, liberados pela ação de enzimas. Já os elicitores exógenos, de origem microbiana, podem ser formados por estruturas intactas ou parte de fungos e células bacterianas. Por outro lado, os elicitores abióticos não tem origem biológica e são agrupados em fatores físicos e compostos químicos. Neste caso, a ativação do metabolismo envolve

danos mecânicos, irradiação com luz ultravioleta e alguns metais pesados (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

A eficácia da elicitação como uma ferramenta para melhorar a produção de metabolitos secundários depende de uma complexa interação entre o elicitor e a célula da planta. Há evidências de que o mesmo elicitor pode estimular o metabolismo secundário em diferentes culturas de células e, por outro lado, que certas culturas de plantas são sensíveis a diversos elicitores. O tratamento de uma determinada cultura com diferentes elicitores irá resultar na acumulação dos mesmos compostos, uma vez que estes são específicos de cada cultura de planta. No entanto, mesmo que a classe do metabólito dependa das espécies de planta, a cinética de indução ou nível de acumulação varia com os diferentes elicitores (VASCONSUELO; BOLAND, 2007).

A concentração do elicitor é um fator que afeta fortemente a intensidade da resposta e a dose eficaz varia de acordo com a espécie da planta. Já se demonstrou que os níveis de elicitores, os quais exercem efeitos estimulatórios em determinados sistemas de plantas, quando aplicados a outros são desprovidos de atividade, refletindo diferente sensibilidade do componente molecular envolvido na elicitação. Por exemplo, em culturas de células de *Rubia akane* Nakai, a quitosana induz uma máxima produção de antraquinona numa concentração de 20 mg L⁻¹ (JIN et al., 1999), enquanto que 200 mg L⁻¹ deste elicitor é a concentração ótima para aumentar a produção de mentol por células cultivadas de *Mentha piperita* (CHANG et al., 1998) e produção de antraquinona em suspensões de células de *Rubia tinctorum* (VASCONSUELO et al., 2003). Kombrink e Hahlbrock (1986) usando células cultivadas de salsa (*Petroselinum crispum*) mostraram que um elicitor fitopatogênico induziu pronunciados efeitos sobre a formação de derivados de cumarina (fitoalexina) dependendo da sua concentração. Além disso, essa resposta foi precedida em todos os casos por aumentos proporcionais nas atividades de duas enzimas do metabolismo dos fenilpropanóides.

A percepção do sinal é a primeira etapa da cascata de transdução do sinal elicitor e o reconhecimento de diferentes estímulos é fundamental para a capacidade das plantas responderem através da ativação de quinases, geração de espécies reativas de oxigênio, fluxo de íons e acidificação do citoplasma (VASCONSUELO; BOLAND, 2007).

Após a percepção dos sinais elicitores, os receptores da planta são ativados e em seguida, por sua vez, são ativados os seus efetores, tais como canais iônicos, proteínas de ligação GTP (proteínas G) e proteínas quinases. Os efetores ativados transferem os sinais elicitores para mensageiros secundários que amplificam o sinal elicitor a outras reações em cascata (EBEL; MITHOEFER, 1998; BLUME et al., 2000).

A sequência de eventos que ocorre na resposta de defesa induzida por elicitores pode ser organizada da seguinte forma: percepção do elicitador pelo receptor, fosforilação e desfosforilação reversível de proteínas da membrana plasmática e proteínas citosólicas, despolarização da membrana plasmática, efluxo de Cl^- e K^+ / H^+ influxo, alcalinização extracelular e acidificação citoplasmática, ativação das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), ativação da NADPH oxidase e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), expressão de gene de defesa imediata, produção de etileno e jasmonato, expressão do gene de resposta de defesa tardia, e acumulação de metabolitos secundários (ZHAO et al., 2005).

1.2.3.2 Compostos fenólicos em uvas

As uvas são consideradas uma das maiores fontes de compostos fenólicos quando comparadas a outras frutas e vegetais. Em enologia, assumem papel de grande importância uma vez que estão relacionados, direta ou indiretamente, com a qualidade do vinho, assim como do suco e de outros produtos derivados da uva. Esses compostos são responsáveis pela cor, corpo e adstringência dos produtos (KENNEDY, 2008).

A grande diversidade entre cultivares resulta em uvas com diferentes características, tanto de sabor quanto de coloração, o que certamente está associado aos teores e perfil de compostos fenólicos, isto faz com que se prestem bem à caracterização varietal. Apesar das características ambientais sob as quais se desenvolvem os frutos terem grande influência na quantidade de alguns compostos fenólicos, a natureza e a proporção destas substâncias obedecem a um determinante genético que as torna mais ou menos constantes (CALÒ et al., 1994). Estas substâncias são sintetizadas nas células das uvas em estreita dependência do seu patrimônio enzimático, que por sua vez é uma expressão da informação codificada a nível dos genes (CRAVERO; DI STEFANO, 1990).

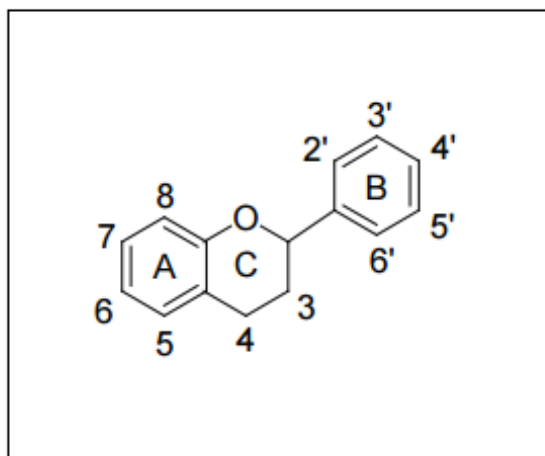
Nas uvas, essa vasta família de compostos pode ser dividida em duas classes: compostos flavonóides e não flavonóides.

1.2.3.2.1 Flavonóides

Os flavonóides são compostos que consistem em 15 átomos de carbono, dispostos em uma configuração C6-C3-C6. Essencialmente, os compostos fenólicos classificados como flavonóides possuem uma estrutura básica e comum composta por dois anéis aromáticos A e

B, ligados por um anel pirano C (Figura 5). O grau de insaturação e de oxidação do anel pirano distingue as famílias pertencentes à classe dos flavonoides, sendo em grande parte os responsáveis pelas características de cor e estrutura dos vinhos. São eles os flavonóis, flavanóis e as antocianinas. Estas substâncias podem ser encontradas na forma livre, glicosilada, acilada, e polimerizados com outros flavonoides e/ou não flavonoides (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006, FLAMINI, 2013).

Figura 5 – Estrutura genérica de uma molécula de flavonóide



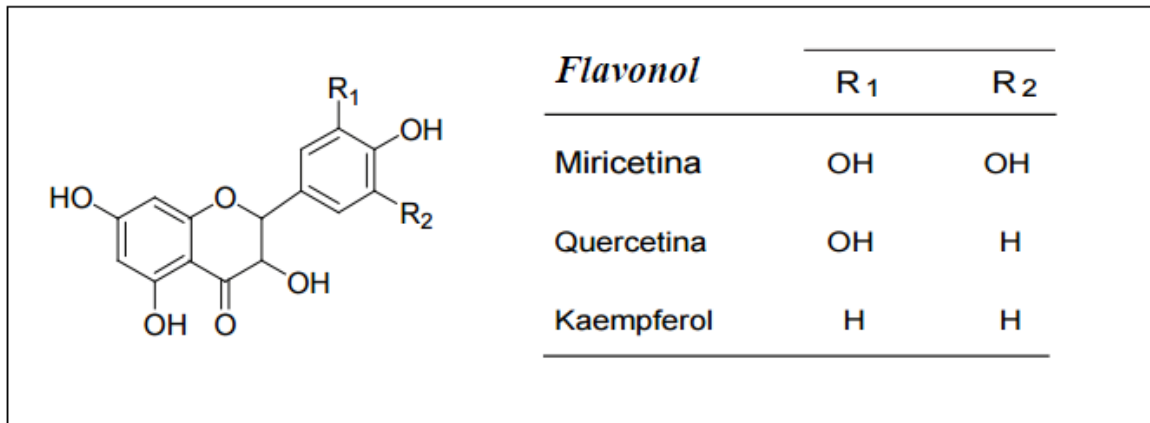
Fonte: (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Flavonóis

Os flavonóis são compostos que se caracterizam pela presença de uma insaturação no anel heterocíclico e um grupamento hidroxila na posição 3. A estrutura básica e as agliconas que constituem os mais importantes flavonóis encontram-se na figura 6, representando o kaempferol, quercetina e miricetina. Estes flavonóides são sintetizados predominantemente na casca da uva e nela encontram-se na forma de glicosídeos, porém, por serem facilmente hidrolisáveis, nos vinhos podem ser encontrados na forma de agliconas (FANG et al., 2007, KENNEDY, 2008).

Embora se trate de uma família minoritária em uvas, os flavonóis tem papel importante na evolução da cor de vinhos tintos por participar de processos de co-pigmentação com as antocianinas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Figura 6 – Estrutura geral dos flavonóis e suas agliconas com os respectivos radicais substituintes

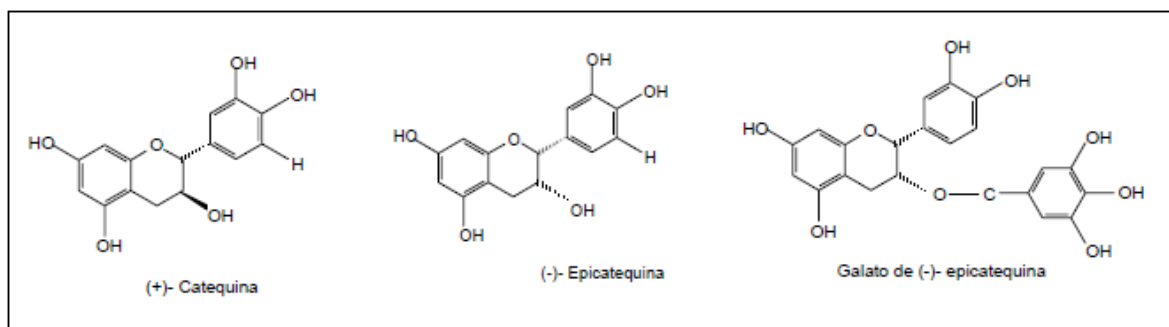


Fonte: Adaptado de Matsubara e Rodriguez-Amaya (2006).

Flavanóis

Nesta importante classe de polifenóis, os principais representantes encontrados na uva são os flavan-3-óis e as proantocianidinas. Os primeiros caracterizam-se por possuírem um anel heterocíclico saturado, dando origem a (+)-catequina e a (-)-epicatequina que são epímeros no carbono 3. Estas se encontram na uva e no vinho principalmente no estado livre, e em pequenas quantidades na forma de galato de epicatequina (Figura 7).

Figura 7 – Estrutura dos flavan-3-óis



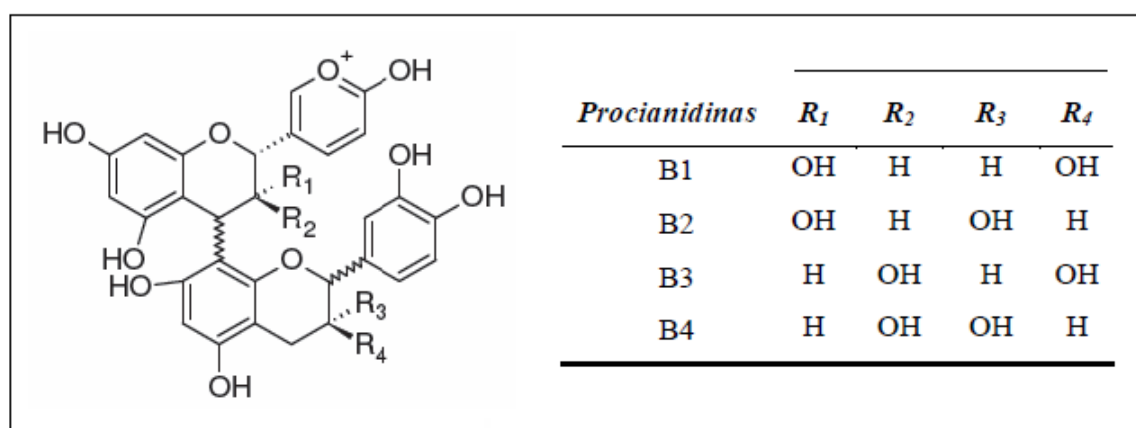
As proantocianidinas são oligômeros de flavan-3-óis e encontram-se nas partes sólidas das uvas, como engaxe, casca e semente. Também conhecidas por taninos condensados, as proantocianidinas são assim nomeadas por liberarem antocianidinas quando aquecidas em

meio fortemente ácido. Na dependência de liberarem cianidina ou delphinidina, estas moléculas recebem o nome de procianidinas ou prodelfinidinas. As primeiras são polímeros de catequina e epicatequina e as demais são constituídas por galocatequinas e epigalocatequinas (Figura 8). No entanto, as proantocianidinas das uvas e dos vinhos são, sobretudo, procianidinas (FLAMINI, 2013, VIDAL et al.,2004).

Os taninos contribuem fortemente para as características sensoriais do produto. O amargor e a adstringência conferida por essas substâncias estão ligados à estrutura dos taninos, e em particular ao seu grau de galoilação e de polimerização de flavan-3-ol (FLAMINI, 2013).

Segundo Ribéreau-Gayon e colaboradores (2006), o tipo de tanino difere nas distintas partes em que são encontrados nas uvas. Nas cascas, os taninos são mais complexos e sofrem pouca variação no seu grau de polimerização. A concentração de estruturas dímeras e trímeras, que já é baixa no momento da mudança de cor, decresce ainda mais durante o amadurecimento. Já os taninos das sementes (procianidinas) possuem relativamente um baixo grau de polimerização que aumenta conforme amadurecem. Enquanto nos engaces são procianidinas não coloidais, polimerizadas e com reatividade similar aos taninos das sementes.

Figura 8 – Estrutura geral das proantocianidinas com os principais derivados e seus respectivos substituintes



Fonte: (SPACIL; NOVÁKOVÁ; SOLIDH, 2008).

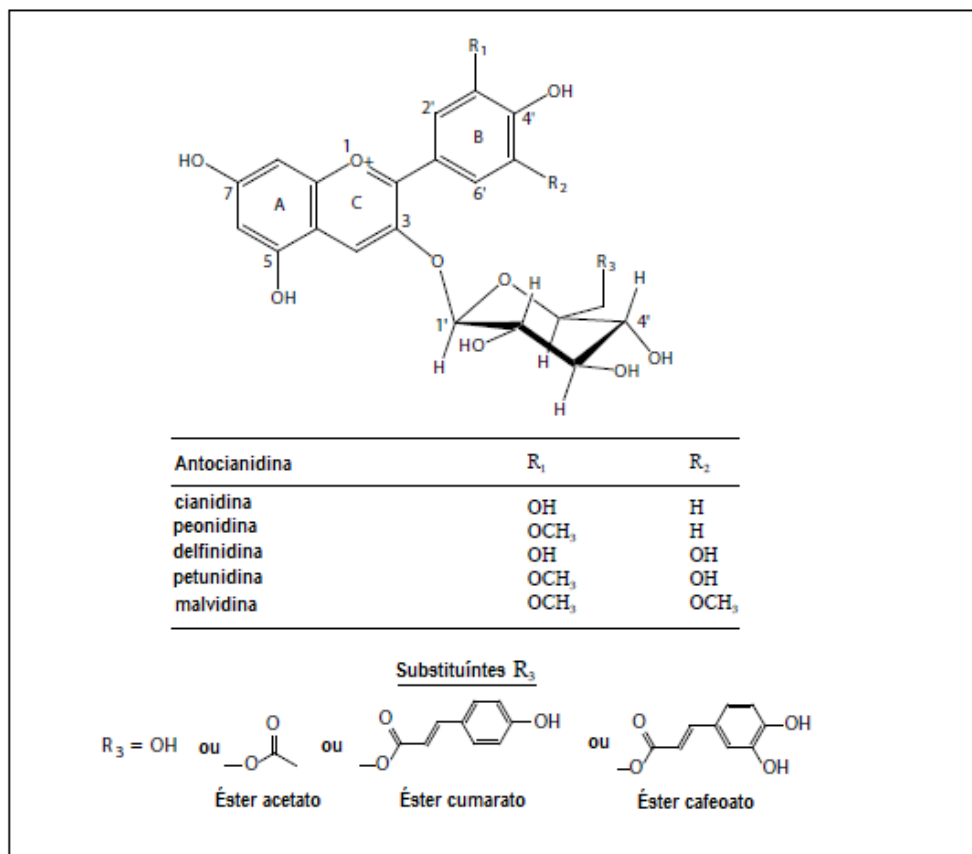
Antocianinas

Antocianinas são os pigmentos vermelhos da uva que se encontram nos vacúolos das células da casca de uvas tintas, e em menor proporção na polpa de variedades tintureiras. São

substâncias polidroxí e polimetoxi derivadas do cátion *flavílium*. Elas podem se diferenciar pelo número de grupos hidroxí (oxidrila) e o grau de metilação destes grupos presentes no anel lateral, pelo número e a natureza dos açúcares ligados à molécula, além do número e natureza das cadeias alifáticas ou aromáticas esterificadas com os açúcares (KENNEDY, 2008).

Nas uvas podemos encontrar 5 agliconas (antocianidinas) que diferem entre si pelos radicais de substituição do anel B, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina (Figura 9). Entre estas cinco antocianinas, a malvidina é a molécula dominante em todas as variedades de uva. A maior parte destas antocianinas são glicosiladas na posição 3-OH (3-*O*-monoglicosiladas) e, em menor extensão, em ambas as posições 3-OH e 5-OH (3,5-*O*-diglicosiladas). Esta glicosilação lhes confere mais estabilidade e solubilidade (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003). Nas variedades viníferas, as antocianinas ocorrem exclusivamente como 3-glicosídeo e em espécies americanas e híbridas, como 3,5-diglicosídeo (FLAMINI, 2013).

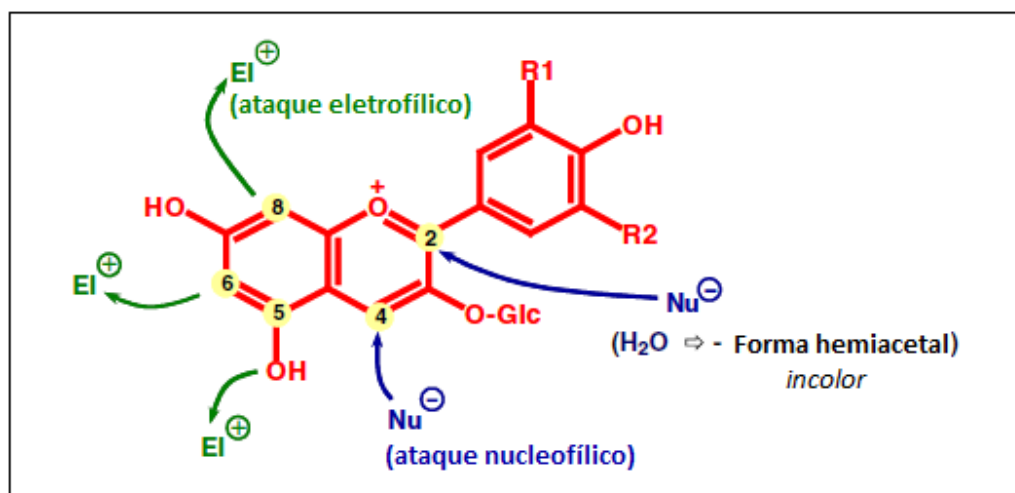
Figura 9 – Antocianinas encontradas em *Vitis vinifera*



Fonte: Adaptado de Kennedy (2008).

As moléculas de antocianinas são carregadas positivamente em virtude da presença de duas ligações duplas no anel C (originando carga positiva no oxigênio), e por isso são facilmente atacadas por grupos nucleofílicos, razão pela qual são muito raras na forma livre (Figura 10). Além disso, e apesar da sua positiva carga, as antocianinas se revelam capazes de reagir com compostos eletrofílicos através dos seus grupos hidroxil e carbonos 6 e 8 do anel floroglucinol provavelmente envolvendo a forma hemiacetal descarregada. A existência do grupo 5-OH é muito importante para a reatividade destes pigmentos com outros compostos que ocorrem durante o processamento e envelhecimento de alimentos ricos em antocianina (DE FREITAS; MATEUS, 2010).

Figura 10 - Representação esquemática da principal posição reativa da estrutura de antocianinas



Fonte: Adaptado de De Freitas; Mateus (2006).

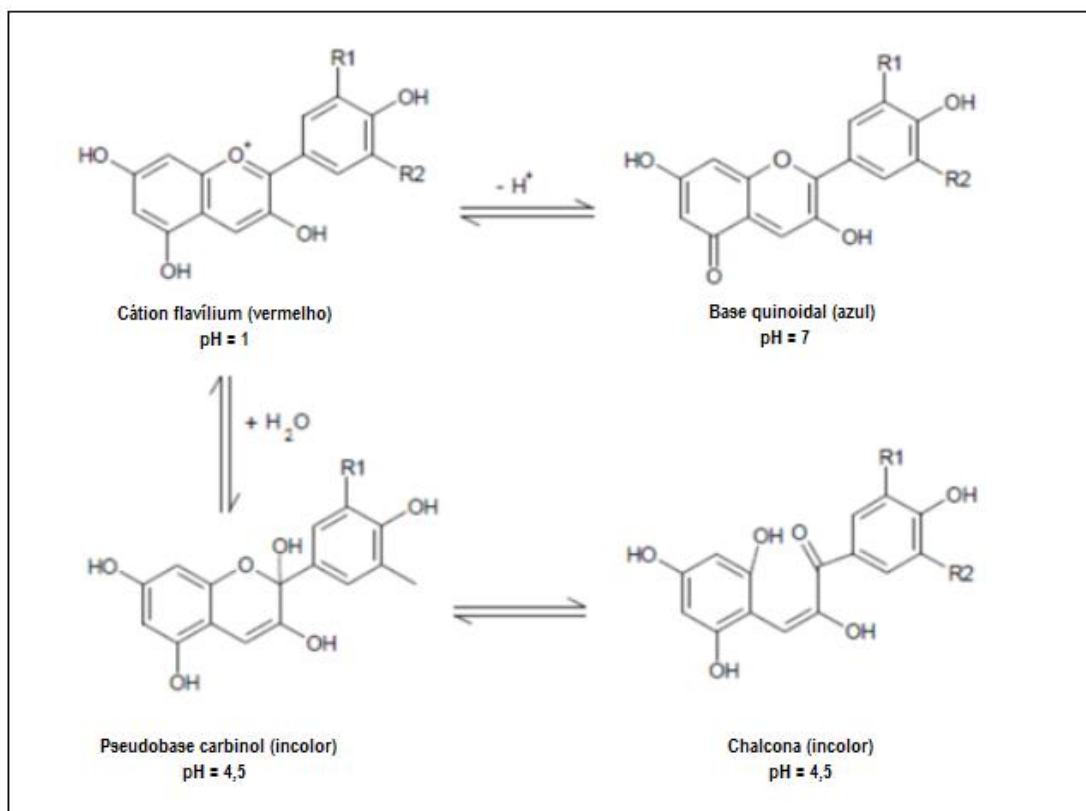
A cor das antocianinas varia conforme as estruturas químicas. Geralmente a cor varia do rosa ao azul com o aumento dos grupos hidroxila e um efeito inverso se observa quando se substituem estes grupos por grupos metoxi. A cor também varia em função das condições físico-químicas do meio. Em meio aquoso, as antocianinas existem em diversas formas presentes numa série de equilíbrios reversíveis e dependentes do pH (Figura 11) (RIBÉREAU- GAYON et al., 2006).

A estabilidade das antocianinas também é afetada pela ocorrência do fenômeno de copigmentação, que ocorre devido às associações moleculares entre pigmentos e outras

moléculas orgânicas presentes na solução, conhecidas como cofatores (BOULTON, 2001). Estas reações promovem a estabilidade das formas estruturais coloridas das antocianinas, aumentando assim sua cor (BIMPILAS et al., 2016).

Os cofatores incluem uma variedade de compostos, como ácidos fenólicos, flavonoides (especialmente derivados de flavonóis e flavonas), aminoácidos, alcaloides e até mesmo as próprias antocianinas (auto-associação) (RUSTIONI et al., 2012). O complexo não covalente formado entre as estruturas coloridas das antocianinas e o copigmento é responsável pela intensificação e mudanças na cor da solução inicial. Este fenômeno envolve reações de complexação, geralmente com baixa energia (pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas), tanto entre as várias formas de antocianinas, quanto entre essas e outros compostos fenólicos, que muitas vezes são incolores (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Figura 11 – Alteração na estrutura das antocianinas em diferentes valores de pH



Fonte: Adaptado de Rodríguez-Saona e Wrolstad (2001).

A copigmentação pode representar em média, 30 a 50% da cor em vinhos tintos jovens (BOULTON, 2001). Ao longo do armazenamento ou envelhecimento há um decréscimo nas antocianinas copigmentadas e um aumento nas polimerizadas (DOBREI et al., 2010;

HERMOSÍN GUTIÉRREZ et al., 2005) com consequente modificação nas características de cor do produto.

As principais moléculas envolvidas na produção de pigmentos poliméricos são as antocianinas, flavan-3-ol (monômeros ou dímeros) e acetaldeído. A molécula de flavan-3-ol, possui um caráter nucleofílico, o qual torna essa molécula ideal para reagir com antocianinas. As procianidinas, mantem o caráter nucleofílico, permitindo a reação com as antocianinas. O acetaldeído é produzido por uma reação de oxidação ou é liberado pelas leveduras durante o processo de fermentação (SCOLLARY, 2010).

1.2.3.2.2 Não flavonóides

Os compostos não flavonóides da uva compreendem os ácidos fenólicos, denominados ácidos benzoico e cinâmico, além de outros derivados como os estilbenos, classe a qual pertence o resveratrol (Figura 12).

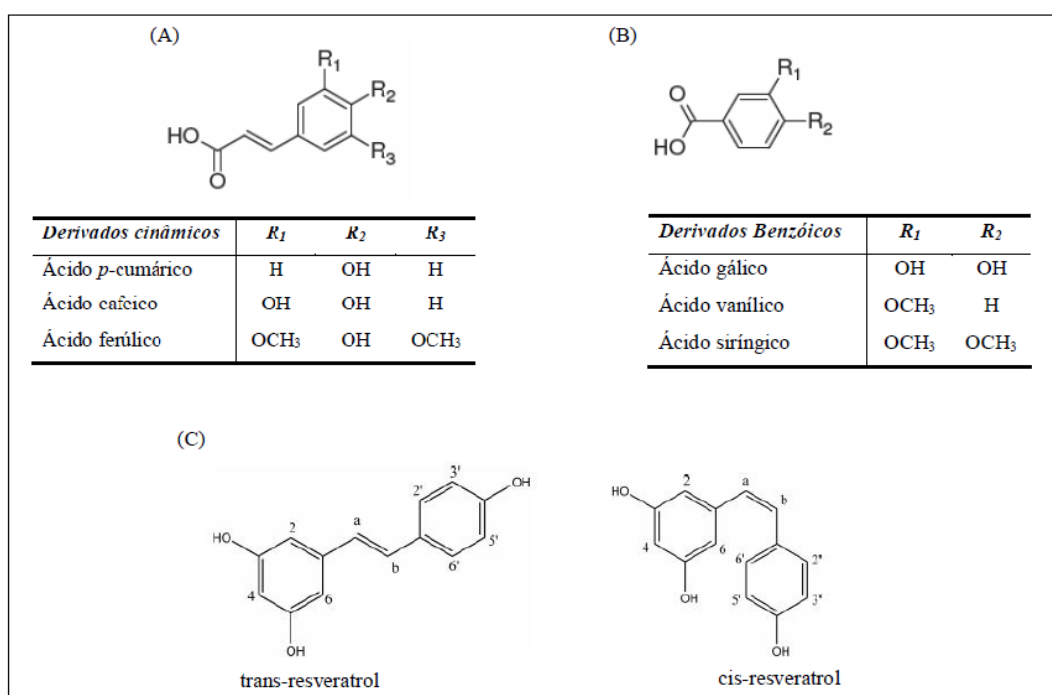
Na uva os maiores representantes desse tipo de compostos são os ácidos hidroxicinâmicos, encontrados nos vacúolos das células da polpa e casca, sob a forma de ésteres tartáricos. Os mais comuns entre esses ácidos são os ácidos ferúlico, p-cumárico e cafeico. Estes compostos desempenham papel importante nas oxidações que conduzem ao acastanhamento de mostos e vinhos, participando também em reações com antocianinas, agindo como copigmentos (SCOLLARY, 2010). Estes compostos, ricos em grupos hidroxil, são as primeiras substâncias fenólicas a serem oxidadas pelas enzimas fenoloxidásicas, nas respectivas quinonas. Estas quinonas envolvem-se em reações que conduzem ao aparecimento de compostos, com colorações que variam do amarelo ao castanho nos mostos.

Embora não exerçam uma influência direta no gosto dos vinhos, os ácidos hidroxicinâmicos estão implicados no aparecimento de fenóis voláteis produzidos por ação de alguns micro-organismos (bactérias e leveduras do gênero *Brettanomyces*) levando a alterações aromáticas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006) no produto. Estes compostos estão comumente esterificados com açúcares, álcoois e ácidos orgânicos. As formas livres destes ácidos não são encontradas nas uvas, podendo ser detectadas no início do processo de maceração, devido à ocorrência de reações enzimáticas hidrolíticas (SCOLLARY, 2010).

Quanto aos derivados do ácido benzóico, os mais importantes são os ácidos vanílico, siríngico e salicílico, os quais aparecem ligados às paredes celulares e, principalmente, o ácido gálico que se encontra sob a forma de éster dos flavanóis. Outros ácidos benzóicos existentes, porém em menor quantidade, são o protocatéico, o gentísico, e o p-

hidroxibenzoico. Estes ácidos encontram-se nas uvas na forma de ésteres e no decurso da elaboração e conservação do vinho, são lentamente hidrolizados, apresentando-se na forma de compostos livres. Vinhos que passam por envelhecimento em barricas apresentam elevados níveis de derivados hidroxibenzoicos, principalmente de ácido elágico (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Figura 12 – Estrutura genérica de compostos não flavonóides mais comuns em uvas: (A) derivados do ácido cinâmico; (B) derivados do ácido benzoico; (C) estilbenos



Fonte: (SPÁCIL; NOVÁKOVÁ; SOLIDH, 2008).

Entre os estilbenos, o composto majoritário encontrado em uvas e produtos derivados é o resveratrol (3,5,4-trihidroxistilbeno), que apesar de existir na forma *cis*, aparece predominantemente na uva na sua forma *trans*. Esta substância é uma fitoalexina sintetizada pela videira em decorrência de uma situação de stress, como o ataque de patógenos. O teor desse estilbeno pode variar de acordo com a variedade da uva, fatores climáticos e práticas agrícolas, assim como também é dependente das tecnologias de vinificação utilizadas (CHO et al., 2006; MORENO; CASTRO; FALQUÉ, 2008). O trans-resveratrol é encontrado nos vinhos tintos em concentrações muito variadas. Essa substância antioxidante concentra-se nas

células da película da uva, por isso seu teor é maior nos vinhos tintos, os quais passam por período maior de maceração durante a vinificação.

1.2.3.2.3 Influência do clima na concentração de compostos fenólicos

A composição química das uvas é dependente de vários fatores. Assim como em outras culturas, é de amplo conhecimento que a cultivar, clima, solo, disponibilidade de água, práticas culturais e grau de maturação tem um efeito significativo sobre a concentração de nutrientes e metabólitos das uvas (CORDON, 2008, FERRER-GALLEGO et al., 2012).

Muitos desses fatores estão intimamente interligados sendo difícil isolá-los experimentalmente. Adicionado a isso, a variação genética entre espécies e variedades de plantas resulta numa diversidade enorme no teor e composição de flavonóides. No entanto, apesar da variabilidade conferida por esses fatores, as maiores influências sobre o conteúdo de flavonóides de qualquer cultivar se dão pelo local da cultura e condições climáticas em que essa é submetida. Em termos de clima, os maiores fatores de interferência na produção de metabólitos são predominantemente a temperatura e a luz solar (DOWNEY, DOKOOZLIAN; KRSTIC, 2006).

A temperatura desempenha papel direto e importante na formação dos compostos fenólicos, sobretudo das antocianinas. Em zonas frias e de fraca insolação (latitudes e/ou altitudes elevadas) é menor a concentração de antocianinas, sendo aquelas geralmente desfavoráveis à produção de vinhos tintos de grande qualidade. Por outro lado, temperaturas elevadas, até 35° C, e grandes amplitudes térmicas diurnas (dias quentes, noites frias) são favoráveis à síntese de antocianinas, originando vinhos com mais cor (MAGALHÃES, 2008).

Segundo Tarara e colaboradores (2008), temperaturas a partir de 30° C tem como efeito a diminuição da síntese de antocianinas, podendo mesmo chegar a ser uma inibição completa e irreversível quando se atingem temperaturas muito elevadas. Da mesma forma, temperaturas baixas (14 - 9° C dia e noite, respectivamente) não conduzem a grandes concentrações de antocianinas (COMBE, 1987).

Apesar do mecanismo responsável pelas mudanças na quantidade e composição de antocianinas em climas quentes permanecer incerto, a possibilidade de que esse fato envolva a degradação de antocianinas e/ou inibição da biossíntese de antocianinas é fortemente suportada por vários trabalhos. Além da redução no teor total de antocianinas, ocorre uma variação em relação à composição destas, havendo uma alta proporção de compostos malvidina e cumaril-glicosídeos em relação à região mais fria (CORDON, 2008).

Segundo Condor (2008), à medida que aumenta a exposição dos frutos a luz solar, o desenvolvimento e a composição dos frutos aumentam, assim como a qualidade dos vinhos. Contudo, em regiões de climas quentes, essa afirmação nem sempre é verdadeira. De acordo com Bergqvist et al. (2001), a composição de um grão de uva é influenciada pelo efeito da exposição a luz solar tanto direta (quantidade e qualidade de luz) quanto indireta (mediada pela temperatura). Estudos realizados por esses autores, em regiões quentes, mostraram que a cor dos grãos foi negativamente afetada pela exposição excessiva a luz solar; os resultados indicam que em zonas quentes deve-se optar por práticas de manejo do vinhedo que proporcionem exposição dos cachos a luz difusa e não a exposição direta de luz solar.

1.2.3.2.4 Maturação fenólica de uvas

O momento da colheita da uva é um dos aspectos fundamentais que exercem influência sobre a qualidade do futuro vinho, assim como de outros produtos da uva. Um dos fatores levados em maior consideração para decidir o melhor ponto para a colheita é a maturidade tecnológica da fruta. Este parâmetro está ligado principalmente à concentração de açúcar, acidez titulável e pH (NOGALES-BUENO et al., 2014).

Apesar da medida de sólidos solúveis totais ser um parâmetro já bem estabelecido, um apropriado teor de açúcar não é suficiente para garantir a qualidade das uvas e, por conseguinte, a dos vinhos tintos. Um dos principais fatores que afetam a qualidade desse produto é o grau maturação fenólica das uvas no momento da colheita. A medida da maturação fenólica mostra o grau de amadurecimento da casca, polpa e sementes levando em conta a sua composição fenólica (FERRER-GALLEGO et al., 2012).

Durante o amadurecimento, ocorrem mudanças na composição fenólica da casca e sementes da uva, as quais apresentam tendências distintas. Geralmente assume-se que as antocianinas se acumulam até um máximo e depois diminuem. No entanto, as procianidinas das sementes da uva apresentam um máximo no *veraison* e, em seguida, diminuem e mantêm-se relativamente constantes até o momento da colheita (KENNEDY; MATTHEWS; WATERHOUSE, 2000, DE FREITAS; GLORIES; MONIQUE, 2000), embora uma tendência oposta também já tenha sido encontrada (KATALINIC; MALES, 1997).

Segundo Bautista-Órtin (2005), o controle da maturidade fenólica baseia-se no monitoramento das seguintes situações que ocorrem durante a maturação da uva: nas sementes, a quantidade de taninos extraíveis diminui; nas cascas, ocorre a acumulação de

antocianinas e uma degradação das paredes celulares da casca, facilitando a extração destes compostos.

1.2.4 Uso do ultrassom na ciência e tecnologia de alimentos

Recentemente, o uso do ultrassom (US) em combinação com o processamento de alimentos tem se mostrado uma das áreas de pesquisa mais promissoras no campo da engenharia alimentar moderna. O US permite que alguns processos alimentares sejam realizados em segundos ou minutos com alta reprodutibilidade, reduzindo o custo de processamento, facilitando a manipulação, dando maior pureza ao produto final, eliminando pós-tratamento das águas residuais e consumindo apenas uma fração do tempo e energia normalmente necessárias para os métodos convencionais. Vários processos tais como o congelamento, corte, secagem, branqueamento, esterilização e extração têm sido largamente aplicados na indústria alimentícia (PATIST; BATES, 2008; CHEMAT, 2011; CHANDRAPALA et al., 2012).

Além das aplicações já existentes, há uma lista cada vez maior de usos potenciais do US na indústria de alimentos e bioprocessamento, incluindo, por exemplo, a homogeneização, inativação de micro-organismos, inativação/ativação de enzimas, limpeza de superfície, despolimerização, cristalização, separação de biocomponentes, produção de nanopartículas, transferência de massa, entre outros (FENG, BARBOSA-CÁNOVAS, WEISS, 2010).

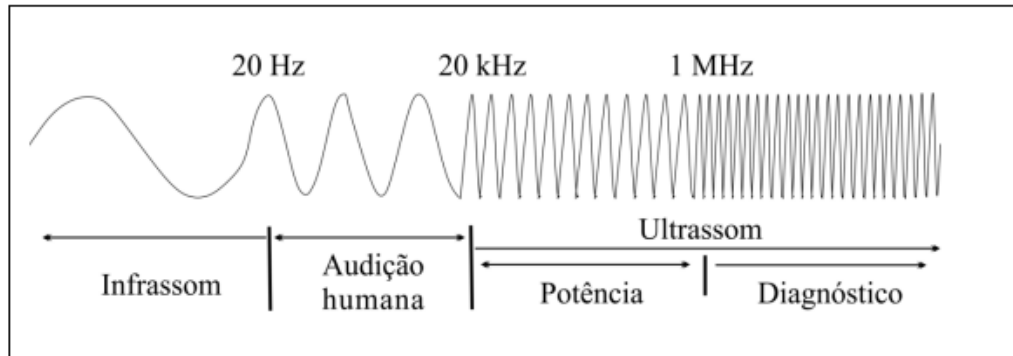
As vantagens da utilização do US no processamento de alimentos inclui uma mistura e micro-mistura mais efetiva, rápida transferência de massa e energia, reduzidos gradientes térmicos e de concentração, redução da temperatura, extração seletiva, tamanho reduzido do equipamento, resposta mais rápida ao controle do processo de extração, início mais rápido, produção aumentada e eliminação de etapas de processamento. Dessa forma, há inúmeras e potenciais aplicações para o US na indústria de alimentos (CHEMAT et al., 2011).

1.2.4.1 Definição e classificação do US

US são ondas mecânicas que necessitam um meio elástico para se propagar. A diferença entre o som e o US encontra-se na frequência da onda difundida, enquanto ondas sonoras são audíveis por humanos numa faixa de frequência entre 16 Hz e 16 – 20 kHz, o US tem frequências entre 20 kHz e 10 MHz.

Este espectro ultrassônico pode ser dividido em duas subfaixas (Figura 13), a primeira é classificada como US de potência e está situada na faixa de 20 kHz a 1 MHz e, a segunda, chamada US de diagnóstico, alcança frequências acima de 1 MHz (FENG; BARBOSA-CÁNOVAS; WEISS, 2010).

Figura 13 – Espectro do som



Fonte: Adaptado de Feng; Barbosa-Cánovas; Weiss, 2010.

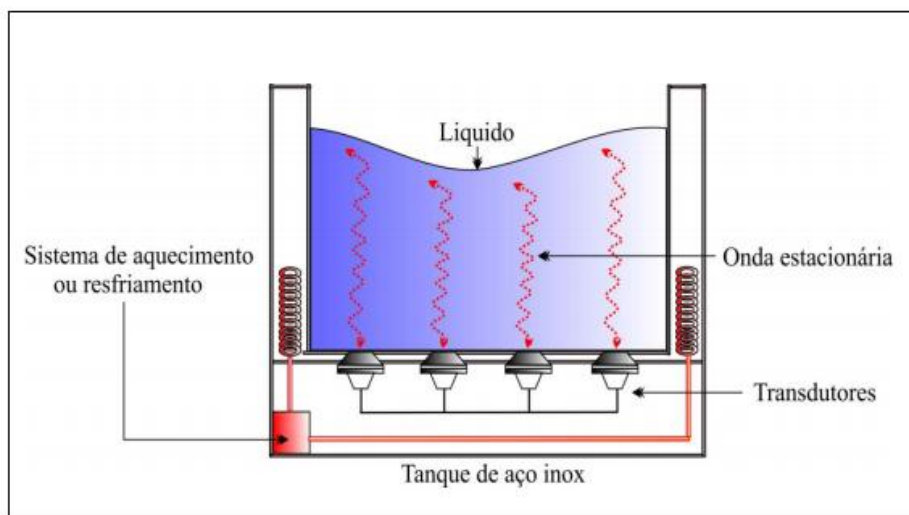
Na indústria alimentícia, o US pode ter seu uso dividido em diferentes faixas de frequência. Até recentemente, muitas das aplicações de US em tecnologia de alimentos envolvia análises não-destrutivas a quais se referiam particularmente à avaliação da qualidade de alimentos. Tais aplicações usam altas frequências (100 kHz a 1 MHz) e baixas potências ($<1 \text{ W cm}^{-2}$) de US. Nestas condições o US é mais comumente aplicado como técnica analítica para provimento de informações sobre determinadas propriedades físico-químicas de alimentos, tais como firmeza, maturação, teor de açúcar, acidez, etc (DEMIRDÖVEN; BAYSAL, 2009). Por outro lado, os níveis de potência utilizados em aplicações de baixa frequência (16 a 100 kHz) são maiores ($10 \text{ a } 1000 \text{ W cm}^{-2}$) podendo ser usadas para alterar, tanto fisicamente quanto quimicamente, as propriedades do alimento (MCCLEMENTS, 1995).

1.2.4.2 Principais sistemas de aplicação de ultrassom na indústria de alimentos

O US é produzido a partir de um transdutor, que converte a energia elétrica em energia mecânica sonora com frequências ultrassônicas. Os sistemas de aplicação de US mais utilizados na tecnologia de alimentos são os banhos ultrassônicos e as sondas. Os banhos (Figura 14) possuem o transdutor unido à base ou às paredes do tanque e a energia ultrassônica é cedida diretamente ao líquido que preenche o recipiente e transfere essa energia

ao alimento que esta imerso. No sistema de sondas (Figura 15), o sinal acústico é amplificado e dirigido diretamente ao alimento através da haste metálica, sem necessidade de adição de um meio líquido entre alimento e sonda (LEADLEY; WILLIAMS, 2008).

Figura 14 – Banho ultrassônico



Fonte: (POVEY; MASON, 1998), adaptado por Carvalho (2014).

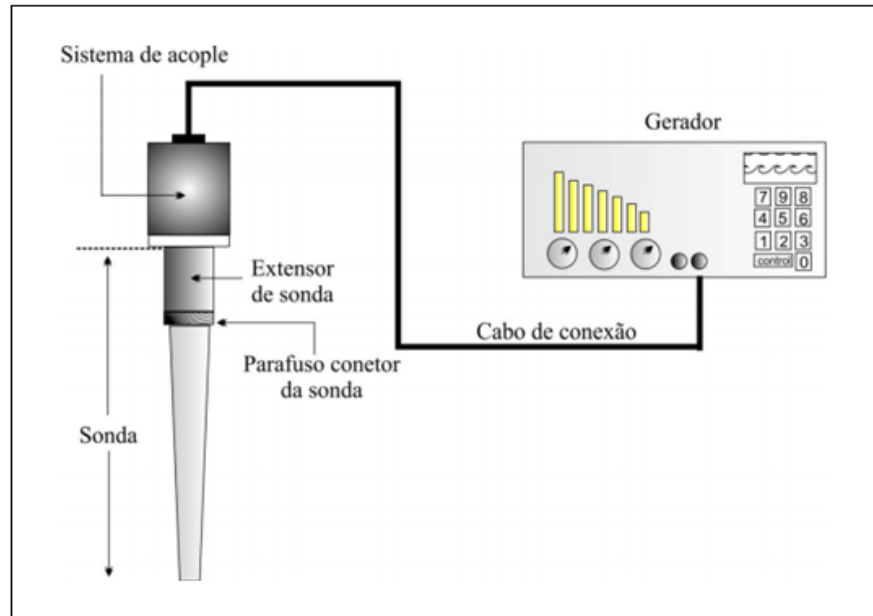
Desses sistemas, provavelmente o banho ultrassônico seja um dos mais econômicos, acessíveis e de simples utilização (MULET et al., 1999). No entanto, apresenta algumas desvantagens, cabendo ressaltar a dificuldade para medir a intensidade ultrassônica real produzida. Ademais, outro inconveniente desses equipamentos em comparação a outros sistemas é a pouca potência que são capazes de transmitir ao meio. Somado a isso, a intensidade ultrassônica dentro do banho pode variar dependendo da posição da amostra, resultando em um parâmetro muito importante a ser controlado (POVEY; MASON, 1998; CAPOTE; DE CASTRO, 2007)

1.2.4.3 Efeitos do ultrassom em meio líquido

Os efeitos do US em sistemas líquidos são principalmente relacionados ao fenômeno de cavitação acústica (Figura 16). O US é propagado através de uma série de ondas de compressão e rarefação que percorrem o meio (MASON et al., 2005). A uma potência suficientemente elevada, o ciclo de rarefação pode exceder as forças de atração das moléculas do líquido e formar bolhas de cavitação a partir de núcleos de gás existentes no fluido. Estas bolhas, distribuídas por todo o líquido, crescem durante o período de alguns ciclos até um

tamanho crítico no qual se tornam instáveis e violentamente colapsam (BARBOSA-CÁNOVAS; RODRÍGUEZ, 2002; CÁRCEL et al., 2012).

Figura 15 – Sistema de sonda de ultrassom



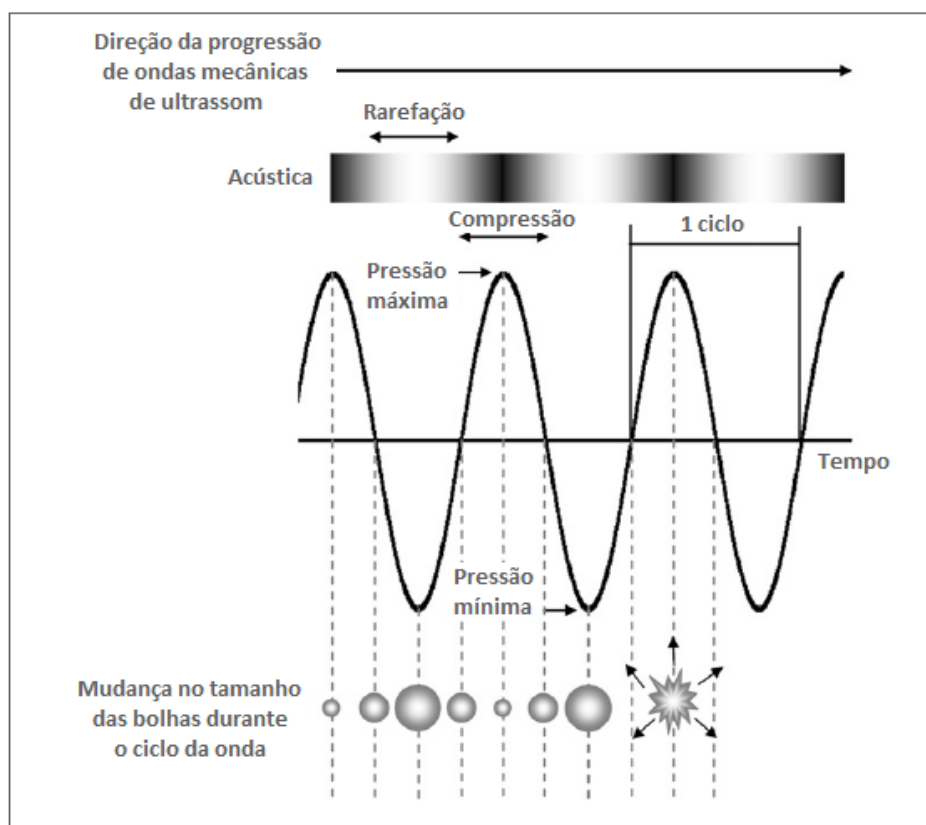
Fonte: (LINGYU YU; GIURGIUTIU, 2009), adaptado por Carvalho (2014).

A implosão das bolhas de cavitação leva a um aumento da temperatura local podendo atingir até 5000 K e pressões de até 1000 atm, as quais produzem altas ondas de força de cisalhamento (PIYASENA et al., 2003) e efeito esterilizante localizado. Quando essas bolhas colapsam sobre a superfície de um material sólido, a alta pressão e a temperatura liberada geram microjatos dirigidos para a superfície do sólido. Estes microjatos são responsáveis pelo efeito desengordurante do US em superfícies metálicas, sendo amplamente utilizado na limpeza de materiais. Outra aplicação dos microjatos na indústria alimentícia é a extração de componentes vegetais. Uma bolha de cavitação pode ser gerada perto da superfície do material da planta, que pela ocasião da implosão gera um microjato em direção à matriz do vegetal. A alta pressão e temperatura envolvida neste processo destruirão as paredes celulares da matriz da planta e seu conteúdo pode ser liberado para o meio. Essa é uma ferramenta muito interessante na extração de ingredientes de produtos naturais (CHEMAT et al., 2011).

Outro fenômeno resultante da variação no tamanho das bolhas e subsequente colapso é o desenvolvimento de forte correntes de microagitação, associado com gradientes de alta velocidade e tensões de cisalhamento que alteram as características do meio (SUSLICK, 1988). Além disso, parte da energia acústica pode ser absorvida como calor, contudo,

dependendo das condições de operação e substrato, as temperaturas atingidas não ultrapassam os 70 °C (VILLAMIEL; DE JONG, 2000). Outro importante efeito é que as moléculas de água podem ser quebradas gerando radicais livres altamente reativos ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H} + \cdot\text{OH}$) que podem reagir e modificar outras moléculas (RIESZ; KONDO, 1992). Esta ampla gama de mecanismos envolvidos no tratamento com US pode induzir efeitos físicos e químicos com várias aplicações potenciais na indústria de alimentos.

Figura 16 – Cavitação acústica



Fonte: Adaptado de Soria e Villamiel (2010).

1.2.4.4 Uso do ultrassom na extração de compostos vegetais

A extração por US é uma técnica já bem estabelecida e amplamente utilizada (ASHOKKUMAR, 2015, CHANDRAPALA et al., 2012, CHEMAT; HUMA; KHAN, 2011). Nesse campo, o US surgiu como um método alternativo de relevância industrial, barato, reprodutível, simples e eficiente para melhorar o processo de extração de compostos bioativos (SORIA; VILLAMIEL, 2010).

A extração assistida por US é uma tecnologia potencial emergente que pode acelerar a transferência de massa. As ondas ultrassônicas interagem com o material vegetal alterando suas propriedades físico-químicas e os efeitos cavitacionais aumentam a liberação de compostos extraíveis, melhorando o transporte de massa através da ruptura das paredes celulares vegetais (ALBU; JOYCE; PANIWNKY, 2004, BHASKARACHARYA; KENTISH; ASHOKKUMAR, 2009, VILKHU; MAWSON; SIMONS, 2008). Além disso, as condições operatórias suaves geralmente empregadas na extração por US não mostram alterações significativas nas propriedades estruturais/moleculares e funcionalidade da maioria dos bioativos, sendo este aspecto de extrema importância no caso de componentes alimentares sensíveis ao calor (SORIA; VILLAMIEL, 2010).

Uma das grandes vantagens do US é seu significativo efeito sobre a taxa de vários processos na indústria química e de alimentos, onde atenção especial tem sido dada à utilização de US na extração de produtos naturais que levaria horas ou dias por meio de métodos convencionais (CHEMAT; HUMA; KHAN, 2011). Com o uso do US, extrações podem ser concluídas em minutos com elevada reprodutibilidade, reduzindo o consumo de solvente, simplificando a manipulação e processamento, originando um produto final com maior pureza, eliminando pós-tratamento de resíduos e consumindo apenas uma fração de energia normalmente necessária para um método de extração convencional, tal como extração por Soxhlet, maceração ou destilação a vapor. Várias classes de componentes alimentares tais como aromas, pigmentos, antioxidantes e outros compostos orgânicos e minerais tem sido eficientemente extraídos e analisados a partir de uma variedade de matrizes (principalmente tecidos animais, alimentos e materiais vegetais) (CHEMAT; HUMA; KHAN, 2011, SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012, VILKHU; MAWSON; SIMONS, 2009).

1.2.4.5 Uso do ultrassom como elicitador abiótico

Além de considerado um meio atrativo na ciência e tecnologia de alimentos devido aos efeitos promissores na área de processamento e preservação (KNORR et al., 2004), o US também atua como uma ferramenta física eficaz na manipulação de organismos e células animais e vegetais (MILLER et al., 1998). O US é um tipo especial de estímulo físico que possui uma gama de efeitos biológicos tendo como base primária o fenômeno de cavitação. Estas formações de gás, ou bolhas de vapor, aumentam a permeabilidade da membrana, desnaturam DNA e proteína e modificam a morfologia celular, podendo ainda estimular ou inibir atividades biológicas, como as enzimáticas, bio-conversões, biossínteses celulares e

alterações nas membranas e outras estruturas celulares (JOERSBO; BRUNSTEDT, 1992; SAKAKIBARA et al., 1996; LIN et al., 2001; LIU et al., 2003; CHEN et al., 2008).

A utilização de baixa intensidade de US vem demonstrando ter efeitos subletais devido ao processo de cavitação, o qual aumenta a permeabilidade da membrana, desnatura DNA e proteínas e modifica a morfologia da célula (MILLER et al., 1998).

Segundo Wu e Ge (2004), US de baixa energia pode transitoriamente causar ERO, produção de ácido jasmônico e taxol, assim como um ferimento ou tratamento elicitador. Lin et al. (2001) demonstraram que a exposição de *Panax ginseng* ao US aumentou o metabólito secundário saponina em até 50% a 75% em relação ao controle, durante um período de armazenamento de 2 a 3 dias. Eles atribuem este resultado a cavitação acústica e seus eventos hidrodinâmicos secundários, como demonstrado pela produção de H₂O₂. Esta substância está ligada a respostas de defesa contra o ataque de patógenos e atua como mensageiro secundário na sinalização de subseqüentes reações de defesa em plantas (APOSTOL et al., 1989).

Wu e Lin (2002) em estudo sobre a aplicação de US em cultura de células de *Panax ginseng* demonstraram que a sonicação das células vegetais induziu eventos característicos da resposta de defesa de plantas contra infecções patogênicas e tratamento elicitador. O US causou um rápido aumento nos níveis da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), polifenoloxidase e peroxidase. A PAL está localizada num ponto de ramificação entre o metabolismo primário e secundário, assim a reação que ela catalisada é um passo regulatório importante na formação de muitos compostos fenólicos (ZHAO et al., 2005). O tratamento com US estimulou a síntese de saponinas pelas células de *ginseng*, sem provocar qualquer perda líquida no rendimento em biomassa da cultura de células.

Trabalhos mais recentes, como o realizado por Nascimento et al. (2008), o uso do US elevou o teor de compostos fenólicos em café despulpado. Já segundo Rudolf e Resurreccion (2005), em pesquisa com amendoins, este tipo de tratamento não aumentou a quantidade dos compostos fenólicos nem sua atividade antioxidante, porém, foi efetivo no aumento dos níveis de *trans-resveratrol*. Em estudos com a mesma leguminosa, Sales e Resurreccion (2010) observaram um maior conteúdo de antioxidantes e compostos polifenólicos em resposta ao US.

Yu e colaboradores (2016) estudaram o efeito da aplicação de US em alface romana sob condições de 1, 2 e 3 minutos a 26W/L de potência e frequência de 25 kHz. As alfaces foram armazenadas em temperatura ambiente por até 150 horas pós-tratamento, período em que foram avaliados os níveis de compostos fenólicos totais e atividade da enzima PAL. Imediatamente após a aplicação, não foi observado diferença significativa entre amostras

tratadas e controle. Após 30 horas, as amostras de alface tratadas com 1 minuto de US apresentaram concentração mais baixa de compostos fenólicos. No entanto, após 60 horas houve um acréscimo significativo de 22,50% nos compostos das amostras sonicadas por 1 minuto, concomitantemente a um aumento na atividade da enzima PAL. Os resultados desse estudo indicam que a geração e acumulação de compostos fenólicos em resposta ao tratamento exige tempo.

Comarella et al. (2012) demonstrou que a aplicação de US em uvas da cultivar Isabel ocasionou um aumento de até 83% no teor de polifenóis totais do suco, resultando também numa melhora da qualidade sensorial do produto. Tal efeito é relatado pelos pesquisadores como possível consequência da indução do metabolismo de defesa celular da fruta em resposta ao uso do US. A ação elicitora do US em uvas foi comprovado por trabalho de Hasan e Baek (2013), que demonstrou um aumento de resveratrol nas cascas e folhas dessa fruta em decorrência do aumento da expressão do gene resveratrol sintase como resposta à aplicação de US. Em outro estudo realizado por Hasan e colaboradores (2014), foi possível obter suco de uva enriquecido com resveratrol após tratamento de uvas com US seguido de período de incubação. No entanto, a sonicação da fruta também levou a uma diminuição na concentração de antocianinas e compostos fenólicos. A degradação dessas substâncias foi atribuída a possíveis reações químicas ocorridas durante a sonicação, envolvendo o combate de EROs resultantes do processo de cavitação pelas substâncias fenólicas da uva, as quais possuem conhecida atividade antioxidante.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar a aplicação pós-colheita de ultrassom em uvas e os efeitos sobre o conteúdo de compostos fenólicos resultante no suco da cultivar Isabel e vinho da cultivar Cabernet Sauvignon.

1.3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a extratibilidade de antocianinas e concentração de compostos fenólicos em uvas tratadas.
- Analisar nos sucos e vinhos a concentração de compostos fenólicos e cor dos produtos.
- Identificar e quantificar antocianinas individuais nos sucos.
- Analisar sensorialmente os atributos dos vinhos elaborados a partir de painel de julgadores treinados.
- Avaliar o comportamento de uvas de variedades viníferas e americanas frente aos efeitos causados pela aplicação do ultrassom.
- Estudar o efeito da safra e estado de maturação sobre a resposta da fruta frente à aplicação do ultrassom.

ARTIGOS

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de três artigos. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se compondo os próprios artigos.

Artigo 1 - Ultrasound in the postharvest treatment of grapes: impact on the extractability and phenolic composition of juice and wine.

Artigo submetido na Revista Brasileira de Fruticultura.

Artigo 2 - Study of ultrasound irradiation on grapes: effect on anthocyanin profile of Isabella juice.

Artigo 3 – Perfil sensorial de vinhos de uvas Cabernet Sauvignon submetidas a tratamento com ultrassom

23 **ULTRASOUND IN THE POSTHARVEST TREATMENT OF GRAPES:**
24 **IMPACT ON THE EXTRACTABILITY AND PHENOLIC COMPOSITION OF**
25 **JUICE AND WINE**

26
27 **ABSTRACT** - Ultrasound has gained attention from the food industry since its properties,
28 which involve chemical and physical reactions, enable a wide range of commercial
29 applications. One of the most explored ones is the optimization of the bioactive compounds
30 extraction such as phenolic compounds, which are important in defining the chemical and
31 sensory characteristics of wine and other oenological products. This study evaluates the
32 application of ultrasound in American and vinifera grapes and its effect on the extractability
33 of the fruit and concentration of phenolic compounds in the produced juice and wine. The
34 results show that the ultrasound is not only able to facilitate the extraction as suggested that
35 it may be acting as elicitor agent, leading to a significant increase in the anthocyanin
36 concentration in Isabella grapes and its respective juice; in Cabernet Sauvignon grapes the
37 degradation of these substances might occur. However, the observed effects are influenced
38 by the vintage conditions and characteristics of each cultivar, which makes it difficult to
39 draw a conclusion regarding the best treatment conditions.

40 **Index terms:** acoustic cavitation, sonication, extraction, anthocyanins.

41
42 **INTRODUCTION**

43
44 Ultrasound (US) is a form of energy generated by sound waves at higher frequencies
45 than those the human ear is able to perceive (> 20 kHz). At the frequency adjustment, the
46 US can be used in various industrial applications, including the food industry, which offers
47 a range of advantages in terms of productivity, yield and selectivity (CHEMAT et al., 2011).

48 The effect of US on liquid systems is primarily related to the phenomenon of
49 cavitation, which involves the formation, growth and collapse of bubbles that generate
50 localized mechanical and chemical energy (KNORR et al., 2004). When these bubbles
51 collapse on the surface of a solid material, they produce microjets that are directed to the
52 surface of the solid, being this the primary effect observed in the cleaning of materials and
53 extraction of plant compounds (CHEMAT et al., 2011).

54 The US also acts as an effective physical tool in the manipulation of organisms and
55 plant cells (MILLER et al., 1998). The US is a special type of physical stimulation that has a
56 range of biological effects, and it may instigate some activities, such as microbiological and
57 enzymatic bioconversions (BARTON et al., 1996; SAKAKIBARA et al., 1996) as well as
58 cellular biosynthesis (JOERSBO; BRUNSTEDT, 1992).

59 In works with application of US in plant cell cultures, an increase in the production
60 of certain secondary metabolites was observed (LIN et al., 2001; WU; GE, 2004; WU; LIN,
61 2002). The studies have demonstrated that the sonication of plant cells induced
62 characteristic events of plant defense response against pathogenic infections, thus acting as
63 an elicitor treatment. Some of these biological effects may be, according to the authors,
64 involved in the results observed in more recent works, where the post-harvest application of
65 US in peanuts (RUDOLF; RESURRECCION, 2005; SALES; RESURRECCION, 2009) and
66 grapes (AUTOR., 2012; HASAN; BAEK, 2013; HASAN et al., 2014) raised the content of
67 phenolic substances.

68 The grape is one of the largest sources of phenolic compounds from fruits and the
69 variety and concentration of these substances is of great importance in products such as
70 juice and wine as they are directly or indirectly related with its quality, being responsible for
71 its color, body and astringency (HERAS-ROGER et al., 2016). However, the concentration
72 of these compounds in such products is not always directly related to the phenolic content in
73 grapes, since their extraction depends, among other factors, on the phenolic ripening
74 conditions of these grapes, which comprise the total phenols concentration, their structure
75 and their extractability (BAUTISTA-ÓRTIN et al., 2005). From the oenological point of
76 view, extractability, or extraction potential, depends on the cells capacity to degrade the cell
77 walls by enzymes as they mature, thus, releasing such substances, especially anthocyanins.
78 The extractability measurement can be performed by determining the cell maturation index,
79 also called anthocyanins extractability index (EA%) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

80 Thus, this study aims to evaluate the application of different doses of US in
81 American and vinifera grape varieties regarding the effects on the extractability of phenolic
82 compounds on the fruit, and their concentration in the juice and wine produced during
83 different vintages. Distinct periods of US post-application storage were also evaluated, as a
84 way of investigating the time needed to observe the effects on the fruit.

85

MATERIALS AND METHODS

86

87

88

89

90

91

92

For the experiment, grape samples of the American cultivar Isabella were used, from the municipality of Itaara/RS (29°36'35"S, 53°45'53"W), during the 2013, 2014 and 2015 vintages, and vinifera grapes of the cultivar Cabernet Sauvignon coming from Santana do Livramento/RS (30°53'27 "south latitude, 55°31'58" west longitude), 2014 and 2015 vintages.

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

The samples sonication was performed in ultrasonic bath (Unique –USC 5000, tank dimensions: 504 x 300 x 150 mm, 21 L of capacity, Indaiatuba SP, Brasil) with 270 W rated power and frequency of 40 kHz. The experiment was run in triplicate and the sample units consisted of 1.8 kg of berries carefully destemmed to prevent the disruption of the skin. Exposure times to US of 0, 3, 5, 7 and 10 minutes were tested, followed by a period of post-application storage of 1, 3 and 5 days for treated and control samples (without US), in order to verify the time required to observe the physiological effects of US on the grapes. To this end, after the sonication, the content of 1.8 Kg of samples were divided into equal parts, to form the respective sample to each storage period (1, 3 and 5 days). Both steps were carried out under 20°C. After this period the samples were taken for freezing until the time of processing and/or analysis.

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

The determination of extractability and phenolic compounds of the grape was made through the analysis of the phenolic potential (phenolic ripeness) described by Ribéreau-Gayon et al. (2006) and Saint-Cricq et al. (1998). The technique uses an acid medium to facilitate the extraction of the anthocyanins and tannins from the skin and from the seed. The total content of anthocyanin is extracted and solubilized in a solution with pH 1.0, while in a solution with pH 3.2 the extractable anthocyanins are quantified, simulating normal processing conditions (vinification and juice preparation). The difference between the results obtained in both solutions reflects the fragility of the membrane and reveals the cell maturation index also called anthocyanins extractability index (EA%). Once crushed, the grapes were macerated for 4 hours in solutions of pH 1.0 or 3.2. From the filtered and centrifuged macerate, the index of total polyphenols, by measuring the absorbance at 280 nm (TPI), and potential and extractable anthocyanins (ApH 1.0 and ApH 3.2, respectively) were determined by the bisulfite bleaching method, with results expressed in mg L⁻¹ of malvidin-3-glucoside (RIBÉREAU-GAYON; STONESTREET, 1965). From these

118 measurements the cell maturation index (EA%) and the percentage of tannin in the skin
119 (dpell%) and seeds (Mp%) were calculated.

120 The juice was made from the cultivar Isabella, following the method described and
121 modified by “Autor (2012)” based on the cold sulphurous maceration process. The wine of
122 Cabernet Sauvignon grapes was obtained by the microvinification process suggested by
123 Miele and Rizzon (2006) with some adjustments. In these products, total polyphenol (TP)
124 according to Singleton and Rossi (1965) and the results expressed in equivalent gram of
125 gallic acid per liter (GAE g L⁻¹) were evaluated. The total anthocyanins (ANTC) were
126 determined according to Ribéreau-Gayon and Stonestreet (1965), by bleaching with sodium
127 bisulfite method, and the results were expressed in g L⁻¹ of malvidin-3-glucoside. The
128 procyanidin content (PROC) followed the hydrolysis method in an acid medium at 100°C
129 described by Ribéreau-Gayon et al. (2006) expressed in g L⁻¹ of cyanidin chloride. The
130 color intensity (A420+A520+A620) and hue (A420/A520) of the wines were determined
131 using the method described by Glories (1984).

132 For the statistical analysis the SAS - Statistical Analysis System, 9.0, was used. The
133 results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the differences between the
134 treatment means were verified by means of the Tukey test (p <0.05).

135

136 **RESULTS AND DISCUSSIONS**

137

138 **Phenolic potential of grapes submitted to the US**

139 Table 1 shows the results of the determination of the phenolic potential of Isabella
140 grapes, treated and untreated with US during the harvests of 2013 to 2015. In assessing the
141 potential anthocyanins (ApH 1.0) it is observed that the application of US influences the
142 levels of these substances according to the time of exposure to which the grapes were
143 submitted and, probably, to the initial ripening conditions in which they were harvested. In
144 the 2014 samples, there was a significant increase in the concentration of potential
145 anthocyanins (ApH 1.0) in almost all sonicated samples. The increase in the anthocyanin
146 content in relation to the control sample (0 min of US) reached 70% using 10 min of
147 sonication, and storage period of 1 day (1d) post-treatment. In the harvest of 2013, the same
148 sonication time (10 min) promoted an increase of 43% in the potential anthocyanins content
149 in samples with 1 day of storage, which continued to increase until the 5th day. However,

150 lower doses were not effective to induce the same response observed at 10 min exposure,
151 and could even result in deleterious effect on the concentration of anthocyanins. The same
152 negative effect was also observed at sonicated samples in the 2015 harvest. In the most
153 samples, treatments and controls, there was a tendency for anthocyanins degradation until
154 the 3rd day of storage and again a concentration of these pigments until the 5th day post-
155 treatment.

156 Though the grapes from the different harvests were collected with a very close
157 industrial ripeness point (average of Brix 16.5°, pH 3.5 and total acidity of 7.0 g. L⁻¹), it is
158 likely that a distinct initial state of phenolic ripeness between these grapes, as evidenced by
159 the anthocyanin values (ApH 1.0 and ApH 3.2) and cell maturity of control samples, have
160 influenced the intensity of the response against the US action.

161 The content of extractable anthocyanins (ApH 3.2) of Isabella grapes (Table 1) was
162 equal to or of lesser value compared to control in most sonicated samples in the years 2014
163 and 2015. Significant increases ($p < 0.05$) in the concentration of these substances were
164 more evident in the 2013 harvest, with US applications of 5 and 10 minutes verified in
165 samples with 1 day of storage, and times of 3 and 10 minutes of US in samples with 5 days
166 of post-treatment storage. For most of these samples, the higher content of extractable
167 anthocyanins, is associated with a lower cellular maturity index, since the smaller the value
168 of this index, that is, the smaller the difference between the content of anthocyanins pH 1.0
169 and pH 3.2, the higher the extractability of these substances. This fact shows an increase in
170 the fragility of the membranes which is probably related to the effects of the US in liquid
171 systems, especially the acoustic cavitation phenomenon.

172 The US is propagated through a series of compression and rarefaction waves which
173 travel through the medium (MASON et al., 2005). At a sufficiently high power, the
174 rarefaction cycle may exceed the forces of attraction of the fluid molecules and form
175 cavitation bubbles from existing gas nuclei in the fluid. These bubbles, distributed
176 throughout the liquid, grow during the period of a few cycles until they reach a critical size
177 at which they become unstable and collapse violently. When these bubbles collapse on the
178 surface of a solid material, for example a plant, the high pressure and the temperature
179 released produce microjets that are directed to the vegetable matrix destroying its cell walls
180 and facilitating the release of their contents to the environment (CHEMAT et al., 2011),
181 thus increasing their extractability.

182 With the cavitation, water molecules can be broken generating free radicals and
183 reactive species (OH^\bullet , H_2O_2) as a result of high temperature and pressure generated in the
184 place of the collapse of the gas bubbles (GOGATE; KABADI, 2009). Anthocyanins, as well
185 as other phenolic compounds, have significant antioxidant activity. So, it is possible that
186 they are fighting the reactive species produced during the sonication.

187 Oxidation reactions involving hydrogen peroxide, the cause of discoloration in
188 anthocyanins (MALACRIDA; MOTTA, 2006), can lead to the deterioration of these
189 flavonoids, making it difficult to establish an effective dose of US and explain the losses
190 observed in the anthocyanin levels in some of the treated samples. A similar result was
191 found in a study by Hasan et al. (2014), where the lowest concentration of phenolic
192 compounds and anthocyanins in juice from sonicated grapes has also been attributed to
193 degradation by H_2O_2 formed during application of US.

194 The behavior observed in the sample of sonicated Isabella grapes which did
195 not have their extractability increased by the influence of the US and which exhibited
196 higher content of potential anthocyanins compared to the control samples, like most
197 treatments in 2014, may suggest that the US, in certain doses, is also playing elicitor
198 action, by acting as a source of abiotic stress on the grapes.

199 Lin et al. (2001) demonstrated that the exposure of *Panax ginseng* to US increased
200 secondary metabolite up to 50% to 75% compared to control, during a storage period of 2 to
201 3 days. Wu and Lin (2002) demonstrated that the sonication of *Panax ginseng* cells induced
202 characteristic events of plant defense response against pathogenic infections and elicitor
203 treatment. The US caused a rapid increase in the levels of the enzyme phenylalanine
204 ammonia-lyase (PAL), polyphenol oxidase and peroxidase. The PAL is located at a
205 branching point between the primary and secondary metabolism, thus the reaction it
206 catalyzes is an important regulatory step in the formation of many phenolic compounds
207 (ZHAO et al., 2005).

208 In a study of Yu et al. (2016), lettuce treated with US exhibited an increase in the
209 PAL activity after a storage of 60 hours, resulting in the production of phenolic compounds
210 and increased antioxidant capacity. These same biological effects may be involved,
211 according to the authors, in the increased content of phenolic compounds (SALES;
212 RESURRECCION, 2010) and *trans*-resveratrol (RUDOLF; RESURRECCION, 2005;
213 SALES; RESURRECCION, 2009) in peanuts submitted to sonication. "Aitor (2012)" in

214 their research about the effects of the US application in grapes suggested that the increase of
215 up to 83% in phenolic compounds of juice were due to elicitor effect of the US. Hasan and
216 Baek (2013) also demonstrated that application of US in grapes led to *trans*-resveratrol
217 accumulation in the fruit peel. The result was positively correlated with increased
218 expression of resveratrol synthase gene, suggesting that up-regulation of the gene and the
219 consequent increase in the enzyme activity by US treatment was responsible for the increase
220 in the amount of *trans*-resveratrol. According to previous studies, the intensity of the
221 response produced by the plant is dependent on the concentration of the applied elicitor
222 (VASCONSUELO; BOLAND, 2007), similarly, the dose used may be related to the
223 time required for triggering this response.

224 The anthocyanins content does not seem to be directly related to the content of total
225 polyphenols, expressed in Table 1 by TPI, since not always the highest anthocyanin values
226 correspond to the highest polyphenols indexes. The increase in the TPI, due to the
227 application of US, was specific and more significant in grapes of the 2013 harvest, with
228 times of 10 min of sonication, in samples with 1 and 3 days post-treatment storage.

229 As to the results of ratio of tannins in the grapes skin (dpell%) and seed (Mp%),
230 shown in Table 1, they only refer to an estimate taking the total content of phenols into
231 account. Some treatments with US provided higher tannin values ($p < 0.05$) in the skins,
232 which is possibly related to the increase in extractability, as a result, the tannin content in
233 the seeds was smaller in these same samples. These substances are concentrated in the solid
234 parts of the grape cluster, and in the berry are mainly found in the seeds. The effect of the
235 ultrasonic waves is more intensely located in the pellicle (skin) and adjacent cells, being
236 attenuated as it advances inside the berry, where the seeds are. In grapes, a greater
237 proportion of tannins in the skins, as well as, a smaller proportion of them in the seeds is
238 associated with improved fruit ripening conditions (KENNEDY, 2008).

239 Table 2 shows data on the phenolic potential of Cabernet Sauvignon grapes
240 submitted to US treatment in 2014 and 2015. The potential anthocyanins content (ApH 1.0),
241 in both harvests, was lower in sonicated grapes in relation to the control sample, in the
242 period of 1 day of storage. In 2015, sonicated samples and stored for 3 days, had higher
243 anthocyanin content, but only in relation to the control with the same storage period (3
244 days).

245 The use of the US on Cabernet Sauvignon grapes also did not appear to benefit the
246 extraction of anthocyanins, since there were few positive and significant changes in the
247 concentration of extractable anthocyanins (ApH 3.2) and in the cell maturation index during
248 the two seasons. However, the significant increase in the content of these substances in
249 some samples under US treatment, resulted from the weakening of the tissues, which
250 increased the extractability evidenced by a lower EA% in these grapes.

251 The total polyphenol index of Cabernet grapes (Table 2), suffered little influence
252 from the treatment with the US as well as the proportion of tannins on the skin and seeds,
253 since these are estimates calculated from the value of TPI.

254 According to the phenolic potential results, the influence of sonication on Cabernet
255 Sauvignon grapes was smaller in relation to that presented on the Isabella grape. In part, this
256 may be related to differences in the skin geometry and composition, as vinifera grapes are
257 smaller and have thicker and denser skins than the Americans, which would require greater
258 sonication energy to promote embrittlement of the membranes.

259 It is also known that the concentration and composition of the phenolic compounds in
260 red grapes vary with the species, cultivars, fruit ripening time and a wide range of
261 procedures and conditions, such as the vineyard management, climate, amount of solar
262 radiation and degree of maturation (DOWNEY et al., 2006). The Cabernet Sauvignon
263 cultivar comes from the region with the most favorable climatic conditions to the phenolic
264 maturity of the grapes and is conducted under system that provides increased insolation of
265 clusters. This suggests that there was better ripening conditions at harvest, providing better
266 development of their phenolic potential still in the field and reducing their response to
267 subsequent stimuli, besides to promote a greater combat to free radicals from sonication.
268 This is in agreement with Yu et al. (2016), which states that the phenolic content in plants is
269 defined by the interaction between factors that promote the production of phenolic
270 compounds and those that consume them.

271 **Phenolic composition and color of juices and wines from grapes submitted to the US**

272 In spite of being important sources of phenolic compounds, products such as juice
273 and wine do not necessarily have the same concentration of polyphenols as the grape from
274 which they are originated. The processing type and the steps involved in it, especially
275 regarding the maceration conditions, influences the extraction and therefore, the phenol
276 concentration of the product (GIL et al., 2012; KENNEDY, 2008).

277 The concentration of phenolic compounds and color indexes of grape juices made
278 from Isabella grapes subjected to different doses of US are shown in Table 3. In the 2013
279 vintage there was a significant increase in the total polyphenol content (TP) for juice of
280 grapes sonicated for 3 minutes with a 1 day storage period. For this dose of US, the increase
281 was of approximately 29% compared to control. In the 2014 vintage, all juice samples from
282 sonicated grapes with 1 day post-treatment storage showed a significant increase in the
283 concentration of TP (17 to 22% increase), as well as most of the doses in the other periods
284 of storage. In 2015 the most significant result occurred with 5 minutes of sonication during
285 the first day of storage.

286 The total polyphenol concentration (TP) in the juice samples not always proved to be
287 directly related to the total polyphenol index (TPI) of the grape from which it is originated.
288 These results may occur due to the nature of the compound. Unlike the analysis performed
289 in the juice, which determines the number of hydroxyls (potentially oxidizable groups), the
290 results in the grapes (Table 1) were obtained through a less specific technique, comprising
291 only dilution and reading at 280 nm, resulting in the direct measurement in absorbance units
292 (TPI) which is based on energy absorption by the aromatic rings present in the molecule.
293 The specificity of the analysis may, in part, explain the behavior observed since there is
294 difference in the number of hydroxyls among the phenolic compounds present in the grapes.

295 A significant increase in the juice anthocyanin content (Table 3) due to the
296 application of US in the grapes was only observed in the harvests of 2013 and 2014, and
297 more significantly in samples with higher post-treatment storage period (5 days). In these
298 samples, the increase in 2013 was approximately 15% with 10 min of US application,
299 compared to the control with the same storage period (5 days) and 25% increase taking the
300 control sample with 1 day of storage into account. In 2014, the sonication of grapes for 3
301 min resulted in juice with a concentration of anthocyanins 67% higher compared to the
302 control sample stored for the same period (5 days) and up to 112% higher when compared
303 to the control with less storage period (1 day).

304 The processing of the grape for juice obtainment mainly involves a longer period of
305 maceration with the skins (3 days), which can result in a more efficient extraction of the
306 skin pigment in comparison with the extraction carried out for the determination of
307 anthocyanins in the phenolic potential evaluation (4 hours). The extraction efficiency is
308 reflected not only in a higher concentration of anthocyanins in the juices in general, but may

309 also explain the higher significant difference in the content of these pigments in samples in
310 which the US had a positive effect.

311 For most juices from sonicated Isabella grapes there were no significant changes in
312 the procyanidin content, which was repeated in all the tested harvests. However, in 2015,
313 juice samples from grapes treated and stored for 5 days exhibited a higher concentration of
314 procyanidins compared with samples with lower storage period which may occur because of
315 a better extractability, as the lower values of EA% found during the three crops demonstrate
316 (Table 1). The smaller amounts of tannins ($p < 0.05$) presented by some treatments with US
317 may be associated with other events during the preparation of the juice, as well as the
318 interaction with other substances that are not considered and quantified by the technique
319 used.

320 In the determination of the color indexes (intensity and hue) of the Isabella grape
321 juices (Table 3), only sonicated samples (3, 5 and 10 min) from the 2014 and 2015 vintages
322 with 1 day of storage showed significant change. A greater intensity of color was observed.
323 The color development in the juice as well as in the wine, is influenced by many factors
324 involving complex reactions, therefore, it is not the direct product of their anthocyanins
325 content, as demonstrated by the results obtained for the juice of the Isabella grape.

326 Table 4 presents the results of the evaluation of phenolic compounds and color
327 indexes of wines produced from Cabernet Sauvignon grapes submitted to treatment with
328 US. In comparison with control samples (not sonicated), there were no beneficial and
329 significant changes in the concentration of polyphenols and anthocyanins in wines from
330 treated grapes. The application of US on the grapes from the 2014 harvest resulted in a
331 decrease ($p < 0.05$) in the anthocyanin content of the wines, in which all tested doses
332 negatively affected the concentration of these pigments, similar to what was observed in the
333 analysis of the grape. In the 2015 harvest, the use of US in the fruit did not cause significant
334 changes in the wine anthocyanin concentration, except for samples of grapes sonicated for 7
335 and 10 minutes and stored for 1 day where there was a higher concentration of these
336 substances.

337 Despite the reduction in the anthocyanin content, few changes were observed in the
338 color indexes (intensity and hue) of these wines. Such behavior may be based on the fact
339 that in young wines the steady state of anthocyanins may vary, so the color of a red wine
340 may be more related to the degree of ionization of the anthocyanins than to their content in

341 the wine. Moreover, the color of anthocyanin solutions depends on other factors such as
342 temperature, pH and sulfite content.

343 The wines content of procyanidins in both vintages, decreased ($p < 0.05$) in most of
344 the samples from sonicated grapes with 1 and 3 days of storage, whereas the samples treated
345 and stored for 5 days had virtually no changes in this parameter.

346 One of the main applications of the US reported in the literature is to facilitate the
347 extraction process of a wide variety of food components (oil, protein, polysaccharides) as
348 well as bioactive plant ingredients such as phenolics and antioxidants (AWAD et al., 2012;
349 CARRERA et al., 2012; COCITO et al., 1995; VILKHU et al., 2008). However, this effect
350 may be related to the fact that some of these studies use US combined with solvents and/or
351 auxiliary processing steps such as grinding and heating or, perform the application on the
352 product (wine) already in production process (FERRARETTO et al., 2013), which could
353 facilitate the extraction.

354 Some other works published did not achieve the same positive result with the use of
355 US. Zhang et al. (2016) when testing the effects of US on the physicochemical properties of
356 red wine found that there was a decrease in the content of total phenolic compounds. In
357 accordance with the data found in our study, other authors also found a decrease in the
358 concentration of anthocyanins, because of the juice sonication of vinifera grapes (TIWARI
359 et al., 2010). Testing the amplitude and time of irradiation on the prepared product (juice),
360 the authors state that in prolonged treatments and in treatments with higher levels of energy,
361 there is a chemical decomposition of the anthocyanin. The degradation observed was
362 attributed to the extreme physical conditions occurring inside the cavitation bubbles during
363 the collapse and various sonochemical reactions that occur simultaneously or isolatetly. The
364 sonolysis of water may be responsible for the degradation since cavitation induces the
365 formation of hydroxyl radicals which lead to chemical decomposition (CASTELLANOS et
366 al., 2001). Thus, it is necessary to study when applying the stimulus to the production or
367 accumulation of phenolic compounds exceeds their consumption.

368

369

CONCLUSION

370

371 The application of US in grapes promoted an elevation of the levels of phenolic
372 compounds both in the juice and fruit of the Isabella cultivar, especially in the total

373 anthocyanin content. However, the effect observed did not occur in all the vintages tested,
374 showing that the initial state of ripeness is determining in the response to the treatment with
375 US, which also makes it impossible to define the most effective dose. The analysis of
376 samples under the same treatment, but with different post-sonication storage time, reveals
377 that the time needed for observing the response to US varies according to the phenolic
378 compound analyzed. The results suggest that for this cultivar, besides the increase in
379 extractability, there might be a physiological defense response occurring, with US acting as
380 elicitor agent in the activation of the grape secondary metabolism. The Cabernet Sauvignon
381 grape showed a distinct behavior in comparison to the American cultivar, not presenting
382 significant improvements in the concentration of phenolic compounds in response to
383 treatment with US, besides that, there was degradation of anthocyanins.

384

385

REFERENCES

386

387 AWAD, T.S et al. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of
388 food: A review. **Food Research International**, Toronto, v. 48, p. 410-427, 2012.

389

390 BARTON, S.; BULLOCK, C.; WEIR, D. The effects of ultrasound on the activities of some
391 glycosidase enzymes of industrial importance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18,
392 n. 3, p. 190-194, 1996.

393

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

397

398 CARRERA, C. et al. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes.
399 **Analytica Chimica Acta**, v. 732, p. 100-104, 2012.

400

401 CASTELLANOS, M. M. et al. ESR-spin trapping study on the sonochemistry of liquids in
402 the presence of oxygen. Evidence for the superoxide radical anion formation, **Ultrasonic
403 Sonochemistry**, v. 8, p. 17-22, 2001.

404

- 405 ZHAO, J.; DAVIS, L.C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to
406 production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 283-333,
407 2005.
- 408
- 409 CHEMAT, F.; HUMA, Z.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology:
410 Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 813-835,
411 2011.
- 412
- 413 COCITO, C.; GAETANO, G.; DELFINI, C. Rapid extraction of aroma compounds in must
414 and wine by means of ultrasound. **Food Chemistry**, v. 52, p. 311-320, 1995.
- 415
- 416 AUTOR. 2012.
- 417
- 418 DOWNEY, M. O. et al. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid
419 composition of grapes and wine: A review of recent research. **American Journal of**
420 **Enology and Viticulture**, v. 53, n. 3, p. 257-268, 2006.
- 421
- 422 FERRARETTO, et al. Ultrasounds application in winemaking: grape maceration and yeast
423 lysis. **Italian Journal of Food Science**, v. 2, p. 160-168, 2013.
- 424
- 425 GIL, M. et al. Influence of Grape Maturity and Maceration Length on Color, Polyphenolic
426 Composition, and Polysaccharide Content of Cabernet Sauvignon and Tempranillo Wines.
427 **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7988-8001, 2012.
- 428
- 429 GLORIES, Y. La couleur des vins rouges. 2^a partie: mesure, origine et interpretation.
430 **Connaissance de la vigne et du vin**, v. 18, n. 4, p. 253-271, 1984.
- 431
- 432 GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. A review of applications of cavitation in biochemical
433 engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 60-72, 2009.

- 434 HASAN, MD. M.; BAEK, K. H. Induction of Resveratrol Biosynthesis in Grape Skins and
435 Leaves by Ultrasonication Treatment. **Korean Journal of Horticultural Science &**
436 **Technology**, v. 31, n. 4, p. 496-502, 2013.
- 437
- 438 HASAN, MD. M.; YUN, H. K.; KWAK, E. J.; BAEK, K. H. Preparation of resveratrol-
439 enriched grape juice from ultrasonication treated grape fruits. **Ultrasonics Sonochemistry**,
440 v. 21, p. 729–734, 2014.
- 441
- 442 HERAS-ROGER, J.; DÍAZ-ROMERO, C.; DARIAS-MARTÍN, J. A comprehensive study
443 of red wine properties according to variety. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1224-1231, 2016.
- 444
- 445 JOERSBO, M.; BRUNSTEDT, J. Sonication: a new method for gene transfer to plants.
446 **Physiologia Plantarum**, v. 85, p. 230-234, 1992.
- 447
- 448 KENNEDY, J. A. Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. **Ciência e**
449 **Investigación Agrária**, v. 35, n. 2, p. 107-120, 2008.
- 450
- 451 KNORR, D. et al. Applications and potential of ultrasonics in food processing. **Trends in**
452 **Food Science & Technology**, v. 15, p. 261-266, 2004.
- 453
- 454 LIN, L. et al. Ultrasound-induced physiological effects and secondary metabolite (saponin)
455 production in *Panax ginseng* cell cultures. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 27, n.
456 8, p. 1147-1152, 2001.
- 457
- 458 MASON, T. et al. Application of ultrasound. In D. W. Sun (Ed.), **Emerging technologies**
459 **for food processing**. California: Elsevier Academic Press, 2005, p.323-350.
- 460
- 461 MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Antocianinas em suco de uva: composição e
462 estabilidade. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 1,
463 p. 59-82, 2006.
- 464

- 465 MIELE, A; RIZZON, L. A. Efeito de elevadas produtividades do vinhedo nas características
466 físico-químicas e sensoriais do vinho Merlot. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 271-278, 2006.
467
- 468 MILLER, D. L. et al. Sonoporation of erythrocytes by lithotripter shock waves in vitro.
469 **Ultrasonics**, v. 36, p. 947-952, 1998.
470
- 471 RIBÉREAU-GAYON, P. et al. The Chemistry of wine. In: **Handbook of Enology**. 2 ed.
472 England: John Wiley and Sons, 2006, v. 2, 451 p.
473
- 474 RIBÉREAU-GAYON, P.; STONESTREET, E. Le dosage des tanins du vin rouge et
475 détermination de leur structure. **Chimie Analytique**, v. 48, p. 188-192, 1965.
476
- 477 RUDOLF, J. R.; RESURRECCION, A. V. A. Elicitation of Resveratrol in Peanut Kernels
478 by Application of Abiotic Stresses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53,
479 p. 10186-10192, 2005.
480
- 481 SAINT-CRICQ, N.; VIVAS, N.; GLORIES, Y. Maturité phénolique: définition et contrôle.
482 **Revue Française d'Oenologie**, v. 173, p. 22-25, 1998.
483
- 484 SAKAKIBARA, M. et al. Influence of ultrasound irradiation on hydrolysis of sucrose
485 catalyzed by invertase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 444-448, 1996.
486
- 487 SALES, J. M.; RESURRECCION, A. V. A. Maximising resveratrol and piceid contents in
488 UV and ultrasound treated peanuts, **Food Chemistry**, v. 11, p. 7674-7680, 2009.
489
- 490 SALES, J. M.; RESURRECCION, A. V. A. Maximizing phenolics, antioxidants and
491 sensory acceptance of UV and ultrasound-treated peanuts. **Food Science and Technology**,
492 v. 43, p. 1058-1066, 2010.
493
- 494 SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A.. Colorimetry of phenolics with phosphomolybdic-
495 phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3,
496 p. 144-158, 1965.

- 497 TIWARI, B. K. et al. Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red
498 grape juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, p. 598-604, 2010.
499
- 500 VASCONSUELO, A.; BOLAND, R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of
501 secondary metabolites in plants. **Plant Science**, v. 172, p. 861-875, 2007.
502
- 503 VILKHU, k. et al. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the
504 food industry – a review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p.
505 161-169, 2008.
506
- 507 WU, J.; GE, X. Oxidative burst, jasmonic acid biosynthesis, and taxol production induced
508 by low-energy ultrasound in *Taxus chinensis* cell suspension cultures. **Biotechnology and**
509 **Bioengineering**, v. 85, p. 714-721, 2004.
510
- 511 WU, J.; LIN, L. Elicitor-like effects of low-energy ultrasound on plant (*Panax ginseng*)
512 cells: induction of plant defense responses and secondary metabolite production. **Applied**
513 **Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 51-57, 2002.
514
- 515 YU, J.; ENGESETH, N. J.; FENG, H. High intensity ultrasound as an abiotic elicitor -
516 Effects on antioxidant capacity and overall quality of romaine lettuce. **Food and**
517 **Bioprocess Technology**, v. 9, p. 262–273, 2016.
518
- 519 ZHANG, Q. A. et al. Preliminary study of the effect of ultrasound on physicochemical
520 properties of red wine, CyTA - **Journal of Food**, v. 14, n. 1, p. 55-64, 2016.

Table 1. Phenolic potential of Isabella grapes submitted to different exposure times of Ultrasound (US) and post-treatment storage periods in 2013, 2014 and 2015 vintages.

Time of US	2013			2014			2015		
	1d**	3d	5d	1d	3d	5d	1d	3d	5d
Potential anthocyanins (ApH 1.0)									
0 min	351.2cB	266.6aC	570.4cA	347.6eC	365.8eB	404.8dA	476.6aA	301.6eC	420.0aB
3 min	386.2bB	262.4aC	438.0eA	388.4dB	429.4bA	385.6eB	364.6cC	473.0aA	374.0dB
5 min	313.2dB	233.4bC	578.6bA	498.8bA	452.0aB	497.6bA	456.8bA	317.6dB	320.2eB
7 min	292.2eB	206.4dC	560.0dA	436.4cB	388.4dC	479.4cA	229.2eC	396.0bA	383.8cB
10 min	504.6aB	214.6cC	619.4aA	591.4aB	407.2cC	566.4aA	353.2dB	343.0cC	395.2bA
Extractable anthocyanins (ApH 3.2)									
0 min	197.8bA*	192.4aA	190.2bA	140.6cA	140.0abA	133.0aA	135.4bC	156.4aB	215.2aA
3 min	156.4cC	176.2bB	211.6aA	152.2bA	150.4aA	102.6bB	154.6aB	105.0bC	175.0bcA
5 min	246.2aA	169.2cC	184.4cB	146.4bcA	138.8abA	143.0aA	121.2bcB	110.2bB	216.4aA
7 min	155.8cB	162.8dAB	185.0cA	123.6dA	132.2bcA	129.4aA	134.8bB	119.6bB	161.6cA
10 min	224.6aA	164.4cdB	213.4aA	187.2aA	121.4cB	112bB	117.0cB	82.8cC	185.4bA
Cell maturation index (EA%)									
0 min	43.7bB	27.8bC	66.7bA	59.5cB	61.7dB	67.1cA	71.6aA	48.2dB	48.8cB
3 min	59.5aA	32.9aC	51.7dB	60.8cC	64.9cdB	72.1bA	57.6cB	77.8aA	53.2bC
5 min	21.4cC	27.5bB	68.1aA	70.6aA	69.3abA	71.3bA	73.5aA	65.3cB	33.7dC
7 min	46.7bB	21.2cC	67.0bA	71.6aA	66.0bcB	73.0bA	41.2dC	69.8bA	57.9aB
10 min	55.5aB	23.4cC	65.5cA	68.3bB	70.2aB	80.2aA	66.6bB	75.8aA	53.1bC
Total polyphenols index (TPI)									
0 min	46.8cB	38.5cC	54.0aA	23.1abA	17.4cB	23.1cA	33.9bB	40.3aA	32.9aB
3 min	51.8bA	43.3bcB	47.7abAB	21.5bcB	16.9cC	30.4aA	28.4cA	27.7cAB	25.2bB
5 min	36.0dB	47.5bA	46.2bA	19.7cB	20.8bB	26.7bA	41.1aA	38.1abA	32.2aB
7 min	44.1cB	43.9bcB	50.7abA	20.0cB	27.0aA	18.8dB	38.3aA	38.2abA	33.0aB
10 min	58.5aA	55.4aA	48.8abB	24.2aA	20.6bB	15.2eC	34.7bA	35.4bA	27.6bB
Skin tannins (dpell%)									
0 min	16.9bB	20.0aA	14.1bC	2.5bB	32.2aA	23.1bB	16.0bB	15.5aB	26.1aA
3 min	12.1dB	16.3bA	17.8aA	28.3abB	35.6aA	14.2cC	21.8aB	15.1aC	27.8aA
5 min	27.3aA	14.3bB	16.0abB	29.8aA	26.8bA	21.4bB	11.8cB	11.6bcB	26.4aA
7 min	14.1cdA	14.9bA	14.6bA	24.7bA	19.6cB	27.6aA	14.1bcB	12.5bB	19.6bA
10 min	15.3bcA	11.9cB	17.5aA	31.0A	23.6bB	29.5aA	13.6cB	9.4cC	27.0aA
Seed tannins (Mp%)									
0 min	83.1cB	80.0cC	85.9aA	75.5aA	67.8cB	76.9bA	84.0bA	84.5bA	73.9bB
3 min	87.9aA	83.7bB	82.2bB	71.7abB	64.4cC	85.8aA	78.2cB	84.9bA	72.2bC
5 min	72.7dB	85.7bA	84.0abA	70.2bB	73.2bB	78.6bA	88.2aA	88.4aA	73.6bB
7 min	85.9abA	85.1bA	85.4aA	75.3aB	80.4aA	72.4cB	85.9abA	87.5aA	80.4aB
10 min	84.7bcB	88.1aA	82.5bB	69.0bB	76.4bA	70.5cB	86.4aB	90.6aA	73.0bC

* Means followed by the same lower case letter in the same column and capital letter on the same line do not differ by the Tukey test at 5% level of significance. ** Days of storage after treatment. Values of ApH1.0 and ApH3.2 expressed in mg.L⁻¹ of malvidin-3-glucoside.

Table 2. Phenolic potential of Cabernet Sauvignon grapes submitted to different exposure times of Ultrasound (US) and post-treatment storage periods in 2014 and 2015 vintages.

Time of US	2014			2015		
	1d**	3d	5d	1d	3d	5d
Potential anthocyanins (ApH1.0)						
0 min	833.6aA*	689.0aC	725.6bB	616.0aA	432.2eC	487.6bB
3 min	740.8bB	659.8bC	786.4aA	579.2bcA	522.6bB	467.2cC
5 min	657.6cB	644.6cC	700.0bA	567.6cA	500.0cB	498.8abB
7 min	652.8cB	598.4dC	692.4bA	567.0cA	460.8dB	417.0dC
10 min	574.6dB	647.0cA	586.0cB	580.4bA	539.6aB	501.0aC
Extractable anthocyanins (ApH3.2)						
0 min	361.0aA	200.6cC	285.2abcB	424.0bcA	304.0eB	306.8bB
3 min	287.2cdA	176.8dB	276.4cA	408.4cA	324.4dB	288.8cC
5 min	317.6bA	245.6bB	252.0dB	418.8bcA	351.8bB	333.6aC
7 min	252.6dB	285.2aA	299.2abA	435.8bA	360.4aB	287.0cC
10 min	288.2bcA	192.4cB	308.6aA	456.8aA	333.6cB	307.4bC
Cell maturation index (EA%)						
0 min	56.7bcB	70.9bA	60.6abB	31.1aB	29.7bB	37.1aA
3 min	62.4aB	73.2aA	64.8aB	29.5abB	37.9aA	38.2aA
5 min	51.9cdC	61.9cB	64.0aA	26.2bcC	29.6bB	33.1bA
7 min	61.3abA	52.3dB	56.8cAB	23.2cdB	21.8cB	31.19bA
10 min	49.8dB	70.2bA	47.3dC	21.3dC	38.2aB	38.6aA
Total polyphenol index (TPI)						
0 min	29.0aB	35.7aA	35.1aA	44.7abA	31.9aB	34.2cB
3 min	29.3aB	34.0abA	31.5abAB	35.5bA	37.8aB	32.0bcA
5 min	30.9aA	31.9abA	25.8cB	36.7abA	38.5aB	43.5aA
7 min	29.5aA	30.7bA	30.3bA	45.1abA	40.5aB	37.4bcB
10 min	30.7aA	30.7bA	30.0bcA	47.9aA	24.9bC	39.4abB
Skin tannins (dpell%)						
0 min	49.8aA	22.5cdC	32.6bB	38.0aA	31.8cB	36.0aA
3 min	38.0bA	20.8dB	35.2abA	38.4aA	34.3bcB	30.1bC
5 min	40.9bA	30.9bB	39.3abA	38.0aA	36.6bA	30.7bB
7 min	34.2cA	37.2aA	39.7abA	38.7aA	35.6bA	30.7bB
10 min	37.6bA	25.1cB	41.3aA	38.2aB	44.6aA	31.2bC
Seed tannins (Mp%)						
0 min	50.2cC	77.5abA	67.4aB	62.0aB	68.2aA	64.0bB
3 min	62.0bB	79.2aA	64.8abB	61.6aC	65.7abB	69.9aA
5 min	59.1bB	69.1cA	60.7abB	62.0aB	63.4bB	69.3aA
7 min	65.8aA	62.8dA	60.3abA	61.3aB	64.4bB	69.3aA
10 min	62.4abB	74.9bA	58.7bB	61.8aB	55.4cC	68.7aA

*Means followed by the same lower case letter in the same column and capital letter on the same line do not differ by the Tukey test at 5% level of significance. ** Days of storage after treatment. ApH1.0 and ApH3.2 results expressed in mg.L⁻¹ of malvidin-3-glucoside.

Table 3. Phenolic compounds and color indices in juices from Isabella grapes submitted to different exposure times of Ultrasound (US) and post-treatment storage periods in 2013, 2014 and 2015 vintages.

Time of US	2013			2014			2015		
	1d**	3d	5d	1d	3d	5d	1d	3d	5d
Total polyphenol (TP)									
0 min	1.49cA*	1.64aA	1.70abA	1.82bB	1.80bB	2.53aA	1.78cB	1.79bB	2.30aA
3 min	1.92aA	1.70aAB	1.50bB	2.19aA	2.05abA	2.05bA	1.74cB	1.56bB	1.99bA
5 min	1.59bcA	1.51aA	1.57bA	2.14aAB	1.86abB	2.36abA	2.44aA	2.21aA	1.87bB
7 min	1.66bA	1.65aA	1.77abA	2.22aA	1.76bB	2.26abA	2.06bA	1.66bB	1.85bAB
10 min	1.33dB	1.64aB	1.87aA	2.15aB	2.15aB	2.49aA	2.03bAB	2.25aA	1.91bB
Total anthocyanins (ANTC)									
0 min	0.72aA	0.74bcA	0.78cA	0.56cA	0.59bA	0.71dA	0.58aA	0.54abA	0.53abA
3 min	0.66abB	0.68cB	0.87abA	0.74abB	0.54bC	1.19aA	0.60aA	0.56aA	0.55aA
5 min	0.73aB	0.79abB	0.87abA	0.84aB	0.67abB	1.08bA	0.58aA	0.54abA	0.54aA
7 min	0.70aB	0.82aA	0.82bcA	0.71bB	0.69abB	0.96bcA	0.62aA	0.45cB	0.45bcB
10 min	0.61bB	0.85aA	0.90aA	0.63bcB	0.81aA	0.86dA	0.64aA	0.48bcB	0.44cB
Procianidins (PRO)									
0 min	6.43aA	5.01bcB	6.01aA	4.72bB	5.48abAB	5.86abA	3.37abC	4.21aB	4.89bA
3 min	5.50bcA	5.38abA	4.96bA	4.70bA	4.70bA	5.13bA	3.56aB	3.62bB	5.04bA
5 min	5.39bcA	5.30bcA	5.50abA	5.40abA	5.00abA	5.68abA	2.99bC	3.57bB	5.58aA
7 min	5.81bA	5.73aA	5.75aA	5.48abA	5.06abA	5.87abA	3.62aB	3.85abB	5.14bA
10 min	5.21cA	4.97cA	5.89aA	5.69aA	5.74aA	6.50aA	3.64aB	3.91abB	5.21abA
Color intensity (CI)									
0 min	10.57abB	13.14abA	12.55bA	5.00cB	6.53aA	6.85aA	1.98dB	4.00aA	4.12aA
3 min	11.57aB	10.33cB	14.92aA	7.12aA	6.45aA	7.36aA	3.02abB	3.34bAB	3.50bA
5 min	11.02aB	13.81aA	9.26cB	6.28abA	6.69aA	7.03aA	2.65cA	2.93cdA	2.64dA
7 min	9.00bB	13.70aA	11.86bA	6.82abAB	6.58aB	7.67aA	3.27aA	3.24bcA	3.55bA
10 min	11.94aA	11.72bcA	12.36bA	6.01bB	6.68aB	7.98aA	2.83bcA	2.71dB	3.05cA
Color hue (CH)									
0 min	0.64aA	0.43aB	0.46abB	0.68aA	0.57aB	0.56aB	0.24bC	0.37bB	0.47abA
3 min	0.58bA	0.46aB	0.42bB	0.58bA	0.56aA	0.52aA	0.15cC	0.31bB	0.43bA
5 min	0.55bcA	0.47aB	0.48aB	0.52bA	0.58aA	0.53aA	0.39aB	0.37bB	0.47abA
7 min	0.60aA	0.43aB	0.46abB	0.53bA	0.56aA	0.59aA	0.25bB	0.48aA	0.50aA
10 min	0.50cA	0.46aA	0.47abA	0.55bA	0.57aA	0.52aA	0.23bB	0.47aA	0.47abA

*Means followed by the same lower case letter in the same column and capital letter on the same line do not differ by the Tukey test at 5% level of significance. ** Days of storage after treatment. Values of TP in g.L⁻¹ of gallic acid, ANTC in g.L⁻¹ of malvidin-3-glucoside and PRO in g.L⁻¹ of cyanidin chloride.

Table 4. Phenolic compounds and color indices in wines from Cabernet Sauvignon grapes submitted to different exposure times of Ultrasound (US) and post-treatment storage periods in 2014 and 2015 vintages.

Time of US	2014			2015		
	1d**	3d	5d	1d	3d	5d
Total polyphenol (TP)						
0 min	2.16aA*	1.90bB	2.12aA	2.33abB	2.77aA	2.56aAB
3 min	2.25aA	2.04abA	2.05abA	2.10cC	2.72aA	2.36aB
5 min	2.06aA	2.08aA	2.14aA	2.25bB	2.50bA	2.48aAB
7 min	2.11aA	2.06abA	2.18aA	2.29abA	2.28cA	2.390aA
10 min	2.13aA	2.06abAB	1.89bB	2.42aA	2.37bcA	2.48aA
Total anthocyanins (ANTC)						
0 min	0.43aA	0.42aA	0.42aA	0.25bB	0.31abA	0.31aA
3 min	0.41abA	0.35bB	0.34bB	0.27abA	0.30bA	0.30aA
5 min	0.37bcA	0.34bA	0.35bA	0.27abB	0.35aA	0.32aA
7 min	0.38bcA	0.35bA	0.31cB	0.28aA	0.31bA	0.31aA
10 min	0.34cA	0.34bA	0.31cA	0.28aA	0.31abA	0.31aA
Procianidins (PRO)						
0 min	1.99aB	2.38aA	2.17aAB	1.53aB	1.65aB	2.23bA
3 min	2.00aA	2.06bA	2.07abA	1.29bB	1.23bB	2.28abA
5 min	1.93abA	1.70cdB	2.11abA	1.06cB	1.30bB	2.49abA
7 min	1.78cA	1.92bcA	1.91bA	1.17bcB	1.22bB	2.42abA
10 min	1.84bcAB	1.64dB	1.98abA	1.57aB	1.54aB	2.58aA
Color intensity (CI)						
0 min	10.98aA	10.92aA	12.05aA	8.32aA	8.18aA	7.99aA
3 min	9.77abA	10.73aA	11.31abA	7.70aA	7.53abA	7.50aA
5 min	9.51abA	10.27abA	10.09bcA	7.94aA	7.60abA	7.85aA
7 min	8.82bA	9.65abA	10.37abcA	7.64aA	7.44bA	7.45aA
10 min	9.61abA	9.02bA	9.06cA	7.77aA	7.54bA	7.20aA
Color hue (CH)						
0 min	0.65bcA	0.65aA	0.64bA	0.77ns	0.71	0.72
3 min	0.64cA	0.66aA	0.65bA	0.72	0.74	0.75
5 min	0.66bA	0.65aA	0.65bA	0.74	0.71	0.73
7 min	0.66abA	0.65aA	0.64bA	0.71	0.73	0.75
10 min	0.68aA	0.65aA	0.68aA	0.72	0.72	0.75

*Means followed by the same lower case letter in the same column and capital letter on the same line do not differ by the Tukey test at 5% level of significance. ** Days of storage after treatment. Values of TP in g.L⁻¹ of gallic acid, ANTC in g.L⁻¹ of malvidin-3-glucoside and PRO in g.L⁻¹ of cyanidin chloride.

3 ARTIGO 2

STUDY OF ULTRASOUND IRRADIATION ON GRAPES: EFFECT ON ANTHOCYANIN PROFILE OF ISABELLA JUICE

Carine Glaucia Comarella^{1*}, Taísa Ceratti Treptow¹, Vivian Caetano Bochi¹, Eliseu Rodrigues², Eduarda da Rosa Machado¹, Cláudia Kaehler Sautter¹, Neidi Garcia Penna¹

¹ Department of Food Science and Technology, Universidade Federal de Santa Maria/UFSM, Santa Maria, Brazil.

² Institute of Food Science and Technology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS, Brazil.

*Corresponding author at: Department of Food Science and Technology, Rural Sciences Center, Universidade Federal de Santa Maria, Roraima Avenue 1000, Santa Maria, 97105-900, RS, Brazil. E-mail: carineglaucia@yahoo.com.br.

ABSTRACT

Isabella grape is the most used cultivar for juice processing in Brazil and this beverage is much appreciated by consumers. However, it often requires blending with other deep colored red grape to intensify product color. Ultrasound (US) is already widely used in order to facilitate the extraction of bioactive compounds, and some studies have also reported that it able to stimulate the synthesis of phenolic compounds. Thus, US could be an alternative process to enrich juice color. Therefore, the objective of this study was to evaluate the US application as postharvest technique in Isabella grapes to enhance anthocyanin content juice. Effects on anthocyanin composition during different harvesting years were also evaluated. At the best treatment condition determined in the first studied crop year by results of juice monomeric anthocyanin, the HPLC-DAD-MS/MS analysis was performed with samples from three crop years (2013 to 2015). A total of 33 anthocyanins were identified in juices of Isabella grapes with similar profile as previously published for this cultivar. In 2013 juice samples, sonication of grapes with different times of US resulted in significantly higher concentrations of monomeric anthocyanins when these grapes remained stored at room temperature for up to 1 day after treatment. In these conditions, application of 5 minutes of US was more effective. In all other harvesting, the effect of US at the same conditions was less expressive by results of HPLC-PDA-MS/MS. However, by colorimetric assay it was possible to perceive that best set of US treatment conditions varies among harvesting years. Moreover, the initial level of these compounds in control samples was also different. Finally, the different findings observed in each year of experiment suggests that the US effect on anthocyanins is strongly influenced by phenolic maturation degree in grape before treatment.

Keywords: Extractability. Elicitor. Maturation. Sonication. Processing. HPLC.

1. Introduction

The Isabella grape, known as Isabel in Brazil, is the most widely cultivated in this country and represents approximately 48% of processed grapes. Isabella is an American grape cultivar and like others *Vitis labrusca* and their hybrids are the main grapes for processing in Brazil [1]. Production diversification could include products as table wines, vinegars and jams, but the juice is among the most accepted products [2].

Juice intense color is considered as an indicator of quality since it has a great influence on sensory acceptability [3]. As major natural pigments from grapes that are extract during juice making are the anthocyanins. These compounds are secondary products from metabolism with great importance for fruit resistance and surveillance in adverse weather conditions and against biological and physical aggressors [4]. Final concentration of anthocyanin pigments in juices is not only dependent of the initial concentration of these compounds in grapes, but also it is strongly dependent juice extraction efficiency. Ultrasound (US) has been recently reported as an attractive technology in food science and technology by presenting a wide range of chemical and physical effects in food matrices. The ability to facilitate the extraction of bioactive plant ingredients [5, 6] is one of the most studied properties. Major US effects that are relevant in liquid systems is the phenomenon of cavitation, which involves the formation, growth, and collapse of bubbles formed with gases dissolved in the medium. When implode, these bubbles generate localized pressure which causes disruption of plant tissue, improving the release of intracellular substances [7].

Some studies also show that the US when applied in some plant cell cultures can act as elicitor agent, activating defense responses, and promoting the synthesis of secondary metabolites [8-10]. More recent studies point out the same elicitor effect due

to the application of US in peanuts [11-13]. Similarly, in grapes for juice production it has caused the accumulation of phenolic substances [14-16].

Despite the potential extractor effect of US, a recent study has shown a significant reduction of anthocyanins in juice when fruits were previously irradiated [14]. Due to controversy published data on this subject, we believe that not just measurement on total content of anthocyanins by spectrophotometric measurement is proper to accurately determine US effects on juice's anthocyanins. Thus, the determination of anthocyanin structures that could have its synthesis stimulated and found at increased levels in juice should be measured by more sensitive and selective techniques as by the use of chromatographic and mass spectrometric analytical tools.

Moreover, we also assume that both an extractor effect as a possible elicitor action of the US, under these treatment conditions (sonication of fresh fruit), can be influenced by the initial conditions of the grape maturation, since this affects the phenolic compounds concentration and controls the disruption of the skin cells [17, 18]. Thus, it would be appropriate to evaluate the effects of US application on grapes from different harvests.

The objective of this study is to evaluate the US postharvest application in Isabella grapes about the effects on the anthocyanin composition of the juice through analysis by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-DAD-MS/MS) during 2013, 2014 and 2015 harvests. The evaluation of the US effect over the crops was carried from the best treatment conditions based on monomeric anthocyanins results.

2. Materials and methods

2.1 Grapes and treatments

Samples of Isabella cultivar grape (*Vitis labrusca*) from the municipality of Itaara/RS (29°36'35"S, 53°45'53"W) during 2013, 2014 and 2015 harvests was used to experiment.

The samples sonication was performed in ultrasonic bath (Unique - USC 5000, tank dimensions: 504 x 300 x 150 mm, capacity: 21L, Indaiatuba SP, Brazil) with 270 W rated power and frequency of 40 kHz. Each samples units (1.8 kg of berries) was submerged in the tank with distilled and deionized H₂O, suspended in a basket of stainless steel. US tested exposure times were 3, 5, 7 and 10 minutes. A sample unit was not subjected to the treatment with US and was named as control. All groups were subjected to storage periods of 1, 3 and 5 days after treatment, maintaining a control unit for each tested period. This step was performed in order to verify the time required to observe the physiological effects of US on the grapes. To this end, after the sonication, the content of each sampling unit is divided in equal parts to form the respective sample for each storage period (1, 3 and 5 days).

Entire the experiment was conducted in triplicate and after the end of each experimental condition (US x storage time), the grape samples followed for freezing in liquid nitrogen until the time of processing for juice.

2.2 Grape processing for juice

In preparation of juices, the grapes were washed and crushed then placed in 500 ml amber glass bottles to be heated in a water bath (15 minutes, 85 °C) for juice extraction. After cooling to until 50 °C at room temperature, was added enzyme

Lafase® Fruit, following the dosage recommended by the manufacturer. After 4 hours of enzyme incubation, potassium metabisulphite at 260 ppm was added. Reassembly was performed for 3 days, twice a day under controlled temperature (25 °C). After this period, the mixture of juice and mashed grape was pressed and filtered to recover an initial juice. This juice was stored in bottles and heated at 50 °C for partial removal of sulphite. Then, the beverage was cooled at 5 °C during 1 week to cold stabilization and precipitation of potassium bitartrate crystals. At the end of this period, juices aliquots were transferred to eppendorfs and kept at -80°C until chromatographic analysis.

2.3 Analysis of total monomeric anthocyanin contents

The monomeric anthocyanin content in Isabella grape juices was measured using the pH differential absorbance method [19]. Concentration of anthocyanins were calculated using the molecular weight (449.2 g mol⁻¹) and the extinction coefficient ($\epsilon_{1\text{cm}} = 26,900$) of cyaniding-3-glucoside.

2.4 HPLC-DAD and HPLC-PDA-MSⁿ analysis

The selection of samples to be analyzed by chromatographic method were made by the results obtained in the colorimetric measurement of total monomeric anthocyanin content in samples from the first harvesting years (2013). Thus the best set of US exposure time and post-treatment storage period was fixed for the analyses of all studied years.

2.4.1 Identification of anthocyanins in juices samples

In order to obtain a separated fraction of anthocyanin free of other polyphenols, sugars, and organic acids, juice samples were previously purified by solid phase extraction in C-18 cartridges (Strata[®], 500 mg of octadecylsilyl resin, Phenomenex, Torrance, EUA) as described by Rodriguez-saona and Wrolstad [20] with some modifications as performed by Bochi et al. [21]. For the recovery of anthocyanins were used acidified methanol (0.35% v/v of formic acid, 85%, Merck[®]) and drying by rotaevaporator (Rotavapor[®] R-300, Buchi, Labortechnik, Germany) at 39°C during 10 minutes. The dried fraction of anthocyanins was dissolved in acidic water (0.35% v/v of formic acid) to obtain a known volume (2 mL) and then filtered (0.22 µm, PTFE syringe filters, 25 mm, Simplepure, Allcrom, SP, Brazil) previously to injection.

The separation was conducted in HPLC-PDA equipment Prominence 20 A (Shimadzu, Japan) equipped with degasser (DGU20A5 prominence, Shimadzu, Japan), column oven (CTO-20A prominence, Shimadzu, Japan) and coupled to a PDA detector (SPDM-20A prominence, Shimadzu, Japan). The reverse phase column (C18, 2.6 µm, 100 mm x 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, USA) was thermostated at 38°C. For the separation, it was used two mobile phases in gradient elution. The mobile phase named as (A) consisting of acidified solution (3% v/v of formic acid, 85%, Merck[®]) in ultrapure water (Milli-Q Gradient System, Millipore Corporation, Massachusetts, EUA) and (B) pure acetonitrile (HPLC grade, Merck, Darmstadt, Germany). Flow rate was set at 0.9 mL min⁻¹. The conditioning of the column was performed with 10% of B and 90% of A. During first 20 minutes a linear gradient of B was performed until 30% of B, than B was increased to 80% in 5 minutes (from 20 to 25 minutes) and column was kept for 2 minutes (from 25 to 27 minutes) at an isocratic condition. In the next two minutes, the concentration of B was decreased to 10% (from 27 to 29 minutes) and

maintained under these conditions (10 % of B) until 34 minutes. All eluted compounds were monitored from 250-800 nm.

A ion trap mass spectrometer (Esquire 6000, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) equipped with an electrospray interface operating in positive mode was connected to the HPLC system described above. The ESI conditions were as follows: capillary voltage of +4.5kV, nebulizer gas pressure at 30 psi, dry gas at 11 mL min⁻¹, and gas temperature at 310 °C. A capillary exit voltage was set at 70 V. MRM experiments were performed in a full scan range of 200 to 1000 m/z of all fragments formed from 3 major parent ions per second.

2.4.2 Quantification of anthocyanin in juice samples

The Prominence HPLC Shimadzu 20A and the conditions already described in section 2.4.1 were used for separation in quantification analysis of individual anthocyanins. Prior to injection, samples of juices were filtered (0.22µm, PTFE, Phenomenex). A standard curve of malvidin-3-glucoside (Oenin chloride, 97%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A) was developed for quantification and used to determine linearity and limits of detection (LoD) and quantification (LoQ) as preconized by ICH [22].

2.5 Data Statistical Treatment

One-way analyzes of variance (ANOVA) was used to determine the effect of US on total monomeric anthocyanin content. The storage period after the treatment had the unique purpose to observe the needed time for development of physiological response

to each treatment (US time) tested. Similarly, for anthocyanin profile results determined by HPLC-PDA, each harvesting years was considered as an independent experiment. Thus, results were submitted to the same treatment one-way ANOVA and mean comparison by Tukey test that was performed at 5% of probability error. To this end, STATISTICA 9.0 software was used (STATISTICA Copyright © StatSoft. Inc., 1984-2009, Tulsa, USA) and the results expressed as the average of three replicates.

3. Results

3.1 Total monomeric anthocyanin content

Statistical treatment of data showed that the US dosages by time of exposure, the post-treatment storage time, and the interaction of both variables had significant effect on results of total monomeric anthocyanins content for all studied years. Thus, results are shown in Table 1 as the average followed by the standard deviation of data.

In 2013, all US application times tested in grapes resulted in the increased of the monomeric anthocyanins concentration in Isabella juice elaborated with grapes that remained in storage for up to 1day. In these condition, concentration of these pigments after 5 minutes of US application resulted in the highest content of juice anthocyanins, that were at least 2.03 folds greater than the values obtained in control juices (grape not sonicated). The effect of US has decreased as the post-treatment storage time increases. Thus, for samples that were kept during 3 days at storage controlled conditions, the significant differences between control and treated samples during 5 and 7 minutes in US bath were still perceived. Intermediate values for final anthocyanin concentration

were found in juices made with samples that had 5 days of storage, however no significant differences between control and US treated samples were observed.

Behavior of the anthocyanin concentration in juices of 2014 in answer to the same treatment conditions used in the first year of experiment had some differences than that previously observed. ANOVA revealed same significant effects than before. Nonetheless, at this time juices produced with untreated grapes had initial higher content of anthocyanins than in the previous experiment, different treatment best conditions, and even in the longest post-treatment grape storage time the US effect could still be perceived. Thus, for the shortest (1 day) and the longest (5 days) post-treatment storage time, juices with the highest content of monomeric anthocyanins were obtained with just 3 minutes of sonication. The increment was up to 13.1 and 43.7% in relation to control samples in same post-treatment storage time, one day and five days of storage period, respectively. No increment in anthocyanin juice levels were observed when samples were storage for 3 days, and a significant decrease of these pigments were determined at the longest US exposure time (10 minutes).

Initial levels of anthocyanins in 2015 samples (control groups) were lower than values found in the previous harvesting years. Therefore, anthocyanin levels have changed in a different manner in relation to US exposure time and post-treatment grape storage time. For this set of samples a longer sonication time (7 minutes) was necessary to increase anthocyanins that it was observed in the first day of storage period. The total percentage of increment in this sample was up to 21.2% in comparison with US untreated samples. Moreover, in 2015 samples there is a decrease in the anthocyanin levels or no US effect in a longer post-treatment storage times (3 and 5 days).

Treatment condition in grapes from 2013 harvesting year that presented the best and most significant result as the influence of US on juice monomeric anthocyanins

were 5 min of US exposure time with 1 day of post-treatment grape storage time. Then, it was used as a reference condition to compare and evaluate the repeatability of results among vintages regarding the identification and quantification of individual anthocyanins by HPLC/DAD/MSⁿ analysis.

3.2 Tentative identification of anthocyanin and its derivative pigments.

The method developed in a HPLC-DAD-MSⁿ equipment enabled the elucidation of 33 different anthocyanins from the juices obtained from Isabella grapes (Table 2). Although the use of HPLC columns with core-shell C-18 functionalized silica particles, recognized by its high selectivity, separation of all anthocyanin in samples was not completed solved and some co-eluting compounds have remained. However, by means of extraction of ion chromatograms obtained from the MS² mode it was possible to identify the composition of each co-eluted peak and the majority of all compounds in samples. A total of 8 peaks were detected as composed by more than one anthocyanin and its related pigments. However, in some cases these peaks were majorly composed of one compound. These details will be high lightened during the following paragraphs when peak by peak identification results is exposed.

Identification was determined by combined information obtained from the mass spectral data and compound fragmentation pattern, the expected elution order for anthocyanins in reverse phase chromatography, and by the maximum bands observed in the UV-visible spectrum of pure peak.

It was observed a complex composition anthocyanins in which all five commonly found aglycones (malvidin, mv; cyaniding, cy; delphinidin, dp; peonidin, pn and petunidin, pt) were detected as being part of these structures with different patterns

of substitution (Table 2). Most anthocyanins found are consisted of malvidina-3-glucoside derivatives, and the monomer was identified as a pure peak at 7.04 minutes (peak **6**). Total area of malvidin-3-glucoside alone represents almost 45% of detected peaks total area, being this compounds the major anthocyanin in Isabella grapes independent of applied treatment conditions in grape (Table 3).

As expected the first set of eluted pigments from a C-18 reverse phase columns were glucosylated anthocyanins in which diglucosylated compounds had a shorter retention time than same aglycon structure linked to one monosaccharide moiety. All non-acylated anthocyanin have eluted until 7.04 minutes and the first 3.44 minutes were majorly composed of structures with more than one glucoside molecule. Identification was possible due to the detection of m/z values that correspond to characteristic fragments of anthocyanin aglycon structure part (287 for cy, 317 for pt, 303 for dp, 301 for pn, and 331 for mv) formed by a neutral losses of 162 m/z values from the molecular ions, and identified as a sugar hexoside molecules. The four diglucosylated molecules (peaks **1** and **3**) have showed two neutral losses of 162 m/z and two major fragments in mass spectra that correspond to the aglycon structure part and the monoglucosylated anthocyanin structure part (449, 479, 463, 493 m/z fragment values that correspond to cianidin-3-glucoside, petunidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, and malvidin-3-glucoside, respectively).

Acylated anthocyanin with *p*-coumaric and acetic were also observed in all juice samples by fragmentation losses of 308 and 204 which correspond, respectively, to the linkage of these acids with a hexoside molecule. The *p*-coumaroyl derivatives were more abundant and appeared linked to 3-glucoside of all identified anthocyanin aglycones. Moreover, it was also found in anthocyanin structures containing 5-glucoside linkages in peonidin-3-glucoside (peak **11**) and malvidin-3-glucoside (peak

12 and **15**). The acetyl group was found only with monoglycosylated derivatives of petunidin, peonidin and malvidina (peaks **9**, **13** and **14**).

Direct condensation products are formed by reaction of flavonols and condensed tannin fragments with anthocyanin. It could be found when both compounds are available in the media. These compounds are expected to elute from reverse-phase columns with shorter retention times than its precursor anthocyanin monomer. It is in agreement with proposed tentative identification for Isabella grape juices since anthocyanin monomer that have formed peonidin-3-glucoside-catechin and malvidin-3-glucoside-catechin have eluted as peaks **5** and **6** at 6.21 and 7.04 minutes while the condensation products have a retention time of 2.89 minutes. The peak **13** corresponds to malvidin-3-(*p*-coumaroyl)glucoside-C and it is also a direct condensation product with a shorter retention time than its possible precursors (peak **19** or **22**). Its identification was possible by the presence of the molecular ion with 927 *m/z* and the fragment 619 *m/z* formed by the release of *p*-coumaroyl-glucoside group (loss of 308 amu). Major fragment in peak **13** is the 619 amu possibly formed by the aglycon (malvidin, *m/z* 331) linked to catechin (*m/z* 290) with a loss of a hydrogen for linkage during condensation.

As minor compounds in PDA chromatograms, a total of five acetaldehyde mediated condensation products and two pyranoanthocyanins were tentatively identified based on the detection of their respective molecular ions and characteristic fragments. Peaks **10**, **11**, and **13** contained ethyl bridge linking a molecule of malvidin-3-glucoside to an (epi)catechin. At the same manner, in peak **20** a catechin was linked to a malvidin-3-coumaroylglucoside. Differentiation of isomers was based on the comparison of the relative retention times obtained for structures having catechin or epicatechin [23].

Thus, for each pair of isomer, the second with the longest retention times are expected for epi-isomers with similar proportion to its precursor.

Pyranoanthocyanins are formed by cycloaddition of anthocyanins to hydroxycinnamic acids or yeast metabolites [24]. In case of this Isabella juice a reaction of anthocyanin was with acetaldehyde from the yeast action, indicating that there was some fermentative activity during the processing of juice, a fact that also explains the presence of acetaldehyde-mediated condensation products. Peaks **8** and **18** were assigned as corresponding to pyranoanthocyanins (B-type) of malvidin-3-glucoside and malvidin-3-coumaroyl-glucoside, respectively. It was assumed by the detection of pyrano-malvidin fragments (355 m/z) formed by the loss of glucose and p-coumaric-glucose in MS² mass spectra.

Only one peak remained without identification, because we did not find a logical mass spectrum fragmentation pattern that allowed the elucidation of chemical structure of this substance in peak **7**. Nonetheless, we assumed that it possible is an anthocyanin or an anthocyanin derivate compound because of the characteristic maximum absorbance at 515 nm (Table 2).

3.3 Quantification of identified anthocyanin pigments from Isabella juice samples

In 2013 experiment, treatment of Isabella grapes with 5 minutes of sonication resulted in a significant increase of all quantified anthocyanins in juice (Table 3). Pigment in the highest concentration was malvidin-3-glucoside in all samples and the increment in concentration due to treatment was 99 % in comparison with the control sample.

Samples produced with treated grapes from 2014 harvesting year have showed less one anthocyanin (21 peaks) than in control (22 peaks, Table 3, Figure 1). Moreover, from all quantified compounds 12 of them were at significantly lower concentration than in the reference control group of samples.

In the last experiment (2015), no differences in number of quantified peaks were observed and from the 22 detected compounds at least 10 of them were in higher concentration than in control group of juice samples ($p < 0.05$). Moreover, the major anthocyanin in Isabella juices (malvidin-3-glucoside) was into the group of anthocyanin that was positively affected by US treatment.

4. Discussion

4.1 Total monomeric anthocyanin content in Isabella juice samples

In the reviewed literature, there is no previous report about anthocyanin concentration in Isabella grape juice that was produced with fruits from different harvesting years, but from same area and management practices.

It is already known that Isabella grapes are extensively used for juice production in south of Brazil due to plant resilience to common fungus grape diseases and great juice making yields [24, 26]. However, pure Isabella grape juice beverages are poorly colored and it is common the usage of blends with other intense red-purple colored grapes [26, 27]. In the light of this technological issue, there are some previous reports on this specie about the usage of exogenous application of a plant-anthocyanin regulator isomer ((S)-cis-abscisic acid (S-ABA)) to increase grape color intensity [28] as well as

improvements by the use of steam in juice making process to increase extractability [29].

AS this fruits still have an active metabolism and intact cell structures, at some extension, it was hypothesized that the US irradiation could alter plant cell membrane increasing juice making extractability and/or induces fruit to a stress condition that influences the polyphenol's synthesis. Thus, for the first time, the usage of sonication under different exposure time (3, 5, 7, and 10 minutes) in entire Isabella grapes that were cultivated in a same crop area and during three different vintages is being tested. This experimental design is relevant to determine the effect of environment conditions on the initial grape pigment concentration and how it could be affected by treatment with US.

As detailed in Table 1, total monomeric anthocyanin content in untreated samples (control groups) was different among years. It possible is a result of weather conditions by which this fruits were managed. Moreover, it is the major reason by which the effect of US has changed among the experimental years resulting in different best conditions to achieve the highest pigment content. It is interesting to highlight that untreated juice samples (282.83 – 523.17 mg of malvidin-3-glucoside/L of juice) have a greater content of total monomeric anthocyanins than a previous two years vintages reported with the same cultivar (102.9 mg of malvidin-3-glucoside/L of juice) [28]. Moreover, juice berries from 2014 harvesting year have a greater content than previous values reported for a juice blend with 'Bordo' grapes [26]. Since polyphenol's content is strongly affected not only for the grape cultivar, but also by a set of factor during crop management as the soil composition, climate conditions, and agricultural practices [30] these differences are acceptable and justify the need to perform the experiment in different vintages, but in a same crop management area and practices.

US action in liquid systems is mainly associated to acoustic cavitation which includes the formation, the growing, and the explosion of gasses bubbles previously dissolved and dispersed in the media. When these bubbles collapse on the surface of a plant for example, the high temperature and pressure generated produce microjets that are directed to the vegetable matrix destroying their cell walls and facilitating the release of its contents into the medium [6].

The samples behavior along the storage period (1, 3 and 5 days) analyzed for each isolated treatment and used as a way of monitoring the time needed to observe the effects of US also showed no continuity throughout to the different harvests. Yu et al. [31] has shown in a work with Romaine lettuce that total level of polyphenols is a result of factors that could promote synthesis or consume already formed compounds. Thus, the oscillation on lettuce polyphenols content that was perceived after the US treatment was considered as a consequence of the interaction of these antioxidants with reactive oxygen species (ROS). These free radicals (OH^\bullet , H_2O_2) could be produced during cavitation as a result of breaking water molecules due to the increase in pressure and temperature during collapse of gas bubbles [32]. Anthocyanins, as other grape polyphenols, could act as antioxidants and it could be accepted that if free radicals are formed during treatment it could be neutralized by anthocyanins. Thus, results in different post-treatment storage times may be a consequence not only of a possible elicitor effect, an increase in extractability during juice making, but also a balance with the consumption of these compounds by free radicals depletion

Yu et al [31] has observed an elicitor effect of US on Romaine lettuce due to the increase in PAL activity after 60h of storage which has resulted in increased production of phenolic compounds as secondary metabolites and, consequently, enhanced antioxidant potential of vegetable material. Hasan and Baek [15] have also shown that

US can act as an elicitor in grapes by the positive correlation *trans-resveratrol* accumulation in fruit's skin and the increased resveratrol synthase gene expression.

Thus, it could be accepted that US could also act as an elicitor in this work. Furthermore, as previously discussed, plant answer to stress is dependent of elicitor intensity or dosage [33]. Moreover, final concentration of a phytochemical is dependent of plant adaptation time for defense answer to an adverse condition or damage. Thus, it should be considered as having relationship to the behavior of some dosages of US with different storage times after treatment.

4.2 Anthocyanin profile from Isabella juice samples: effect of ultrasound treatment in grapes.

The anthocyanin profile is considered as a chemotaxonomic characteristic for grape varieties which is transferred to the products elaborated from them, like grape juices and wine [34]. The five expected grape anthocyanidins (cyanidin, petunidin, peonidin, delphinidin, and malvidina) were easily identified with different patterns of glycosylation, acylation, and condensation with other compounds present in the media. Therefore, a total of 22 peaks were separated (Table 3) in which 33 compounds were tentatively identified by combined information from tandem mass spectrometry and diode array detection (Table 2). Malvidin-3-glc was detected as the major anthocyanin in this juice grape cultivar corresponding to more than 40% of total quantified peak area (Table 3). It is in agreement with previous report for Isabella grape juice [26] and a skin extract [35].

Isabella is a American grape cultivar (*V. labrusca*), thus, the occurrence of anthocyanidin 3,5-diglucosides is expected [35], and the 3,5-diglucosides of cyanidin,

petunidin, peonidin and malvidin were identified. Moreover, diglucosylated structures of p-coumaroyl derivatives of delphinidin and malvidin were also found in the two isomer forms. Three of these compounds (dp-3-cmglc-5-glc, mv-3-cis-cmglc-5-glc, and mv-3-trans-cmglc-5-glc) were already reported in Isabella wines [36] and only two of them (mv-3-glc-5-cis-cmglc and mv-3-glc-5-trans-cmglc) were found in juice [28]. Finally, this work is reporting for the first time the presence of the isomer Pn-3-cis-cmglc-5-glc in Isabella grape juice.

In all harvesting years a total of 7 anthocyanin-derivate pigments were found. These compounds are pyranoanthocyanins (peaks **8** and **18**) and acetaldehyde-mediated condensation products (peaks **10**, **11**, **13**, and **20**) that are formed by the reaction of anthocyanins with fermentation products. In Isabella wines these pigments were already reported [36] in greater amounts and chemical diversity than in juice with the same grape cultivar [28]. Almost all anthocyanins formed by complexation with fermentation products (pyranoanthocyanins and acetaldehyde mediated condensation products) were in higher concentration in juices produced with sonicated samples than in untreated ones (control), for 2013 and 2015 harvesting years (Table 3). However, for this class of pigments, only peaks **8** (2013 and 2015 years), **10** (2013 year), and **20** (2015 year) have no co-elution and were identified Mv-3-glc-acetaldehyde, Mv-3-glc-8-ethyl-C, and Mv-3-cmglc-8-ethyl-C, respectively. This increase could be understood by the increase of major precursor for these compounds, malvidin-3-glucoside, which was also increased due treatment in 2013 and 2015 harvesting years. Moreover, it could not be excluded that US irradiation could also increase extractability of these anthocyanin-derivate pigments as already present in entire grape berry.

It is well known that anthocyanidin 3-glucosides are very unstable compounds that easily react, from the first stages of winemaking, with a wide variety of compounds

occurring in must and wine, including those produced by yeast metabolism [37]. The resulting anthocyanin-derived red pigments show differences in color characteristics and are less reactive compounds [38].

Even that grape mash is not submitted to fermentation process during juice making, this biological process could have happen due to the presence of native microorganism in the grape skin. Moreover, berry has a higher content of soluble sugars that could be delivered in small amounts during harvesting that was used as substrate in metabolic fermentation of native microorganisms.

In 2013 harvesting years, it is possible to perceive a significant increase in all quantified compounds (Table 3) a fact that was not repeated in 2014 and had a lower intensity in grapes of 2015 harvest. As demonstrated in previous work there is a highly influence of ripeness degree on the amounts of anthocyanins [39]. Furthermore, it is commonly accepted that the cell wall degradation by pectolytic enzymes increases the extractability of anthocyanins from grape skins during ripening [39]. It could be denotative that US irradiation should be adjusted to berry characteristics possible linked not just to the commercial maturity, but also its phenolic maturation and cell-wall resistivity.

5. Conclusion

The US effect on juice anthocyanins is dependent of treatment conditions and the grape berry characteristic possible linked to maturation in a wider aspect that do not comply only commercial maturity. However, when it is applied to a right extension of time (dosage), results on anthocyanin content increment which may be a promising technological tool to increase juice quality by these pigments that are linkage with

beverage color and antioxidant potential. Future studies are necessary to link the exact fruit enzyme status before and after US treatment and clarify the real contribution in increasing extractability *versus* the elicitor effect.

Acknowledgements

Authors are thankful to a doctoral fellowship from Ministry of Education of Brazilian government (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brazil) and to the Universidade Federal do Rio Grande do Sul for allowing the realization of part of the analysis in the Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA).

References

- [1] L.Y Yamamoto, R. Koyama, A.M Assis, W.F.S Borges, I.R. Oliveira, S.R. Roberto. Color of berry and juice of 'Isabel' grape treated with abscisic acid in different ripening stages. *Pesq. Agropec. Brasil.* 50 (2015) 1160-1167.
- [2] R. Koyama, A.M Assis, L.Y. Yamamoto, S.H. Prudencio, S.R. Roberto. Sensory analysis of 'Isabel' grape juice submitted to the application of abscisic acid. *Rev. Bras. Frut.* 37 (2015) 893-901.
- [3] P. Bridle, C.F. Timberlake. Anthocyanins as natural food colors – selected aspects, *Food Chem.* 58 (1997) 103–109.
- [4] J. Zhao, L.C. Davis, R. Verpoorte. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 23 (2005) 283–333.
- [5] M. Ashokkumar. Applications of ultrasound in food and bioprocessing. *Ultrason. Sonochem.* 25 (2015) 17–23.
- [6] F. Chemat, Z. Huma, M.K. Khan. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.* 18 (2011) 813–835.

- [7] D. Knorr, B.I.O Ade-omowaye, V. Heinz. Nutritional improvement of plant foods by non-thermal processing. *P. Nutr. Soc.* 61 (2002), 311–318.
- [8] J. Wu, X. Ge. Oxidative burst, jasmonic acid biosynthesis, and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus chinensis* cell suspension cultures. *Biotechnol. Bioeng* 85 (2004) 714-721.
- [9] J. Wu, L. Lin. Elicitor-like effects of low-energy ultrasound on plant (*Panax ginseng*) cells: induction of plant defense responses and secondary metabolite production. *Appl. Microbiol. Biot.* 59 (2002) 51-57.
- [10] L. Lin et al. Ultrasound-induced physiological effects and secondary metabolite (saponin) production in *Panax ginseng* cell cultures. *Ultrasound Med. Biol.* 27 (2001) 1147-1152.
- [11] J.M. Sales, A.V.A. Resurreccion. Maximizing phenolics, antioxidants and sensory acceptance of UV and ultrasound-treated peanuts. *Food Sci. Technol.* 43 (2010) 1058-1066.
- [12] J.M. Sales, A.V.A. Resurreccion. Maximising resveratrol and piceid contents in UV and ultrasound treated peanuts, *Food Chem.* 11 (2009) 7674–7680.
- [13] J.R. Rudolf, A.V.A. Resurreccion. Elicitation of Resveratrol in Peanut Kernels by Application of Abiotic Stresses. *J. Agr. Food Chem.* 53 (2005) 10186-10192.
- [14] MD.M. Hasan, H.K. Yun, E.J. Kwak, K.H. Baek. Preparation of resveratrol-enriched grape juice from ultrasonication treated grape fruits. *Ultrason. Sonochem.* 21 (2014) 729–734.
- [15] MD.M. Hasan, K.H. Baek. Induction of Resveratrol Biosynthesis in Grape Skins and Leaves by Ultrasonication Treatment. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 31 (2013) 496-502.
- [16] C.G Comarella, C.K. Sautter, L.C. Ebert, N.G. Penna. Polifenóis totais e avaliação sensorial de suco de uvas Isabel tratadas com ultrassom. *Braz. J. Food Technol.* (2012) 69-73.
- [17] J.M. Hernández-Hierro, N. Quijada-Morín, J.C. Rivas-Gonzalo, M.T. Escribano-Bailón. Influence of the physiological stage and the content of soluble solids on the anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grapes. *Anal. Chim. Acta* 732 (2012) 26–32.
- [18] N. Kontoudakis, M. Esteruelas, F. Fort, J.M. Canals, V. Freitas, F. Zamora. Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality. *Food Chem.* 124 (2011) 767–774.
- [19] M.M. Giusti, R.E. Wrolstad. Characterization and measurement of anthocyanins by UV–Vis spectroscopy. In R. E. Wrolstad (Ed.), *Current protocols in food analytical chemistry (unit F 1.2)*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

- [20] L.E. Rodriguez-Saona, R.E. Wrolstad. Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F1. (2001) 1-11.
- [21] Bochi, V. C., Godoy, H. T., & Giusti, M. M. Anthocyanin and other phenolic compounds in Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) fruits. *Food Chemistry*, 176, (2015) 234-243.
- [22] ICH Harmonized Tripartite Guidelines. Validation of analytical procedures: Text and Methodology. Q2 (R1), 1, 2005.
- [23] E. Boido, C. Alcalde-Eon, F. Carrau, E. Dellacassa, J.C. Rivas-Gonzalo. Aging effect on the pigment composition and color of *Vitis vinifera* L. Cv. Tannat wines. Contribution of the main pigment families to wine color. *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 6692–6704.
- [42] D. Blanco-Vega, S. Gómez-Alonso, I. Hermosín-Gutiérrez. Identification, content and distribution of anthocyanins and low molecular weight anthocyanin-derived pigments in Spanish commercial red wines. *Food Chem.* 158 (2014) 449–458.
- [25] P.S. Ritschel, S.S. Sebben. (Ed.). *Embrapa Uva e Vinho: novas cultivares brasileiras de uva*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010. 64p
- [26] I.M. Toaldo, F.A. Cruz, T.L. Alves, J.S. Gois, D.L.G. Borges, H.P. Cunha, E.L. Silva, M.T. Bordignon-Luiz. Bioactive potential of *Vitis labrusca* L. grape juices from the Southern Region of Brazil: Phenolic and elemental composition and effect on lipid peroxidation in healthy subjects. *Food Chem.* 173 (2015) 527–535.
- [27] U.A. Camargo, J. D. G. Maia, P.S. Ritschel. *Novas cultivares brasileiras de uva*. Bento Gonçalves. Embrapa Uva e Vinho, 2010. 64 p.
- [28] L.Y. Yamamoto, A.M. Assis, S.R. Roberto, Y.R. Bovolenta, S.L. Nixdorf, E. García-Romero, S. Gómez-Alonso, I. Hermosín-Gutiérrez. Application of abscisic acid (S-ABA) to cv. Isabel grapes (*Vitis vinifera* × *Vitis labrusca*) for color improvement: Effects on color, phenolic composition and antioxidant capacity of their grape juice. *Food Res. Int.* 77 (2015) 572–583.
- [29] M.L. Mendes Lopes, M.A.L. Miguel, E. Fialho, V.L. Valente-Mesquita. Grape juice obtained using steam extraction and other small-scale extraction methods: phenolic content, antioxidant capacity and stability during storage. *Int. J. Food Sci. Technol.* 51 (2016) 1696-1702.
- [30] R. Ferrer-Gallego, J.M. Hernández-Hierro, J.C. Rivas-Gonzalo, M.T. Escribano-Bailón. Influence of climatic conditions on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv. Graciano. *Anal. Chim. Acta*, 732 (2012) 73–77.

- [31] J. Yu, N. J. Engeseth, H. Feng. High intensity ultrasound as an abiotic elicitor - Effects on antioxidant capacity and overall quality of romaine lettuce. *Food Biop. Technol.* 9 (2016) 262–273.
- [32] P.R. Gogate, A.M. Kabadi. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Bioch. Eng. J.* 44 (2009) 60-72.
- [323] A.Vasconsuelo, R. Boland. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sci.* 172 (2007) 861–875.
- [34] I. Hermosín-Gutiérrez, E. García-Romero. Antocianos de variedades tintas cultivadas en La Mancha: perfiles varietales característicos de la uva y de los vinos monovarietales, y evolución durante la maduración de la baya. *Alimentaria*, 41 (2004) 127–139.
- [35] R. Flamini, D. Tomasi. The Anthocyanin content in berries of the hybrid grape cultivars Clinton and Isabella. *Vitis.* 39 (2000) 79–81.
- [36] S.L. Nixdorf, I. Hermosín-Gutiérrez. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity. *Anal. Chim. Acta* 659 (2010) 208–215.
- [37] M. Monagas, B. Bartolomé. (2009). Anthocyanins and anthocyanin-derived compounds. In M. V. Moreno-Arribas, & M. C. Polo (Eds.), *Wine chemistry and biochemistry*. New York: Springer Science + Business Media LLC, 2009, p. 439–462.
- [38] V. De Freitas, n. Mateus. Chemical transformations of anthocyanins yielding a variety of colours (review). *Environ. Chem. Lett.* 4 (2006) 175–183.
- [39] J.M. Hernández-Hierro, N. Quijada-Morín, L. Martínez-Lapuente, Z. Guadalupe, B. Ayestarán, J.C. Rivas-Gonzalo, M.T. Escribano-Bailón. Relationship between skin cell wall composition and anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo at different grape ripeness degree. *Food Chem.* 146 (2014) 41–47.

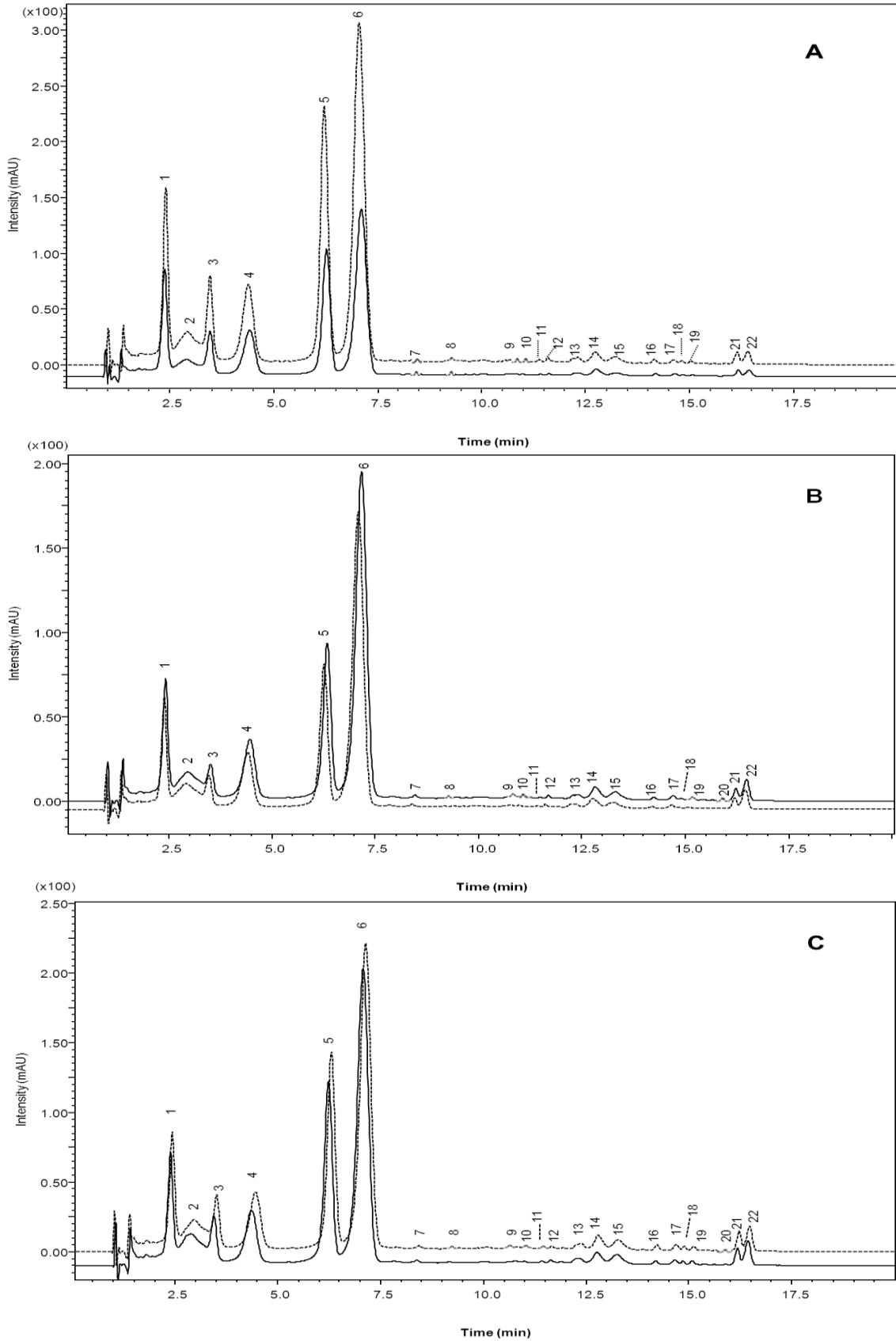


Figure 1 – Chromatographic separation of anthocyanins and related pigments detected in Isabella juice samples from grapes submitted to postharvest treatment with 5 minutes of Ultrasound and 1 day of storage period after sonication. A, B and C are from experiments performed in the harvests of 2013, 2014 and 2015, respectively. Continuous line corresponds to the juice obtained from control grapes and the dashed line is from juice produced with treated grapes.

Table 1. Monomeric anthocyanins in Isabella grapes juices produced with berries that were submitted to ultrasound (US) postharvest treatment.

US Exposure Time (minutes)*	Harvesting Year								
	2013			2014			2015		
Storage time (days)**	1	3	5	1	3	5	1	3	5
Zero***	321.1 ^{dC} ± 12.1	379.7 ^{bcB} ± 9.0	482.4 ^{aA} ± 12.1	481.8 ^{bcB} ± 8.0	523.2 ^{aA} ± 15.8	421.5 ^{dC} ± 14.7	304.7 ^{bbB} ± 9.8	339.4 ^{aA} ± 18.8	282.8 ^{aB} ± 9.0
3 min	455.9 ^{cA} ± 14.5	359.2 ^{cB} ± 26.2	480.9 ^{aA} ± 1.9	544.7 ^{aB} ± 5.7	541.0 ^{aB} ± 27.4	605.6 ^{aA} ± 22.0	328.3 ^{baA} ± 14.5	328.6 ^{aA} ± 8.7	304.1 ^{aA} ± 23.6
5 min	654.3 ^{aA} ± 10.0	470.4 ^{aC} ± 9.1	502.7 ^{aB} ± 16.6	474.2 ^{cAB} ± 4.7	499.3 ^{aA} ± 21.3	437.7 ^{dcB} ± 21.8	326.7 ^{baA} ± 16.1	324.8 ^{aA} ± 22.6	292.0 ^{aA} ± 4.8
7 min	544.6 ^{baA} ± 53.6	458.1 ^{aA} ± 28.3	517.3 ^{aA} ± 32.7	467.0 ^{cB} ± 11.5	490.8 ^{aB} ± 10.4	529.0 ^{baA} ± 12.0	369.3 ^{aA} ± 1.9	299.5 ^{aB} ± 12.0	236.3 ^{bbB} ± 17.8
10 min	505.7 ^{bcA} ± 0.8	408.3 ^{bbB} ± 3.0	501.3 ^{aA} ± 28.2	508.1 ^{baA} ± 17.4	410.2 ^{bbB} ± 15.1	494.3 ^{bcA} ± 40.7	332.2 ^{baA} ± 16.2	305.2 ^{aA} ± 8.8	237.3 ^{bbB} ± 6.9

Results were expressed as mg equivalents as malvidin-3-glucoside/L of juice and it is shown as the average ± the standard deviation (n=3). Lower case letters in column and upper case letters in line means significant differences (p<0.05) by the post-hoc Tukey test. *Treatment was performed in entire berries immersed in ultrasonic bath and dosage was determined by the exposure time at 270 W/40 kHz.

After US treatment, berries were kept at 20 °C during the different tested times of storage. *US untreated samples considered as control and evaluated at same times and conditions of post-treatment time of storage.

Table 2. Tentative identification of anthocyanins and derived anthocyanins pigments in Isabella juices produced with grapes submitted to ultrasound (US) postharvest treatment.

Peak	Rt (min)	M ⁺	MS ² (Product ions)	λ_{\max} (nm)	Pigment family (Tentative Identification)	Harvesting year					
						2013		2014		2015	
						Experimental groups					
Control		JUS*		Control		JUS					
Anthocyanins											
<i>Diglucosylated compounds</i>											
1	2.39	611	449, 287	279, 520	Cy-3,5- diglc	*	nd	nd	nd	nd	nd
1	2.39	641	479, 317	279, 523	Pt-3,5-diglc	*	*	*	*	*	*
3	3.44	625	463, 301	279, 517	Pn-3,5-diglc	*	*	*	*	*	*
3	3.44	655	493, 331	279, 515	Mv-3,5-diglc	*	*	*	*	*	*
<i>Monoglucosylated compounds</i>											
2	2.89	465	303	278,524	Dp-3-glc	*	*	*	*	*	*
3	3.44	449	287	279, 516	Cy-3-glc	*	*	*	*	*	*
4	4.37	479	317	278, 524	Pt-3-glc	*	*	*	*	*	*
5	6.21	463	301	279, 516	Pn-3-glc	*	*	*	*	*	*
6	7.04	493	331	275, 525	Mv-3-glc	*	*	*	*	*	*
<i>Acylated compounds</i>											
9	10.74	521	317	277, 529	Pt-3-acglc	*	*	*	nd	*	*
11	11.37	771	609, 301	279, 530	Pn-3- <i>cis</i> -cmglc-5-glc	nd	nd	nd	*	*	*
12	11.58	801	639, 493, 331	278, 532	Mv-3- <i>cis</i> -cmglc-5-glc	*	*	*	*	*	*
13	12.30	505	301	279, 520	Pn-3-acglc	*	*	*	*	*	*
14	12.72	535	331	279, 529	Mv-3-acglc	*	*	*	*	*	*
14	12.72	611	303	279, 529	Dp-3-cmglc	*	*	*	nd	*	*
15	13.23	771	609, 463, 301	279, 525	Pn-3- <i>trans</i> -cmglc-5-glc	*	*	*	*	*	*
15	13.23	801	639, 493, 331	279, 525	Mv-3- <i>trans</i> -cmglc-5-glc	*	*	*	*	*	*
16	14.15	595	287	282, 524	Cy-3-cmglc	*	*	*	nd	*	*
17	14.62	625	317	280, 531	Pt-3-cmglc	*	*	*	*	*	*
18	14.81	609	301	281, 524	Pn-3- <i>cis</i> -cmglc	*	*	*	*	*	*

19	15.04	639	331	279, 531	Mv-3- <i>cis</i> -cmglc	*	*	*	*	*	*
21	16.14	609	301	282, 521	Pn-3- <i>trans</i> -cmglc	*	*	*	*	*	*
22	16.40	639	331	281, 531	Mv-3- <i>trans</i> -cmglc	*	*	*	*	*	*
<i>Direct condensation products</i>											
2	2.89	751	589, 437	278, 516	Pn-3-glc-C	*	*	*	*	*	*
2	2.89	781	619, 467	273, 524	Mv-3-glc-C	*	*	*	*	*	*
13	12.30	927	619, 467, 373	279, 522	Mv-3-(p-coumaroyl)glc-C	nd	nd	*	nd	*	*
<i>Acetaldehyde-mediated condensation products</i>											
10	10.95	809	647, 519, 357	279, 531	Mv-3-glc-8-ethyl-C	*	*	*	*	*	*
11	11.37	521	331	279, 530	Mv-3-glc-8-ethyl	*	*	*	nd	*	*
11	11.37	809	647, 519, 357	279, 530	Mv-3-glc-8-ethyl-C	*	*	*	*	*	*
13	12.30	809	647, 519, 357	279, 521	Mv-3-glc-8-ethyl-EC	nd	nd	*	nd	*	*
20	15.80	955	665, 357	279, 537	Mv-3-cmglc-8-ethyl-C	nd	nd	*	nd	*	*
<i>Pyranoanthocyanins</i>											
8	9.13	517	355	277, 501	Mv-3-glc-acetaldehyde	*	*	*	*	*	*
18	14.81	663	355	279, 511	Mv-3-cmglc-acetaldehyde	*	*	*	nd	*	*
<i>Unknown</i>											
7	8.35	nd	nd	276, 515	Unknown	*	*	*	*	*	*

Rt: retention time (min); M⁺: positive charged molecular ion; MS²: fragmentation of M⁺. Results presented in the control experimental group are from juice samples produced with Isabella grapes without ultrasound irradiation but with one day of storage at 20 °C previous to processing. *JUS experimental group are results obtained from juice made with ultrasound irradiated Isabella grapes (5 minutes in water bath at 270 W/40 kHz) and same storage time and conditions previous to processing also used in control; nd – not detected, Dp-delphinidin, Cy-cyanidin, Pt-petunidin, Pn-peonidin, Mv-malvidin, C-catechin, EC-epicatechin, glc-glucoside, cm-coumaroyl, ac-acetyl.

Table 3. Quantification of individual anthocyanins by HPLC-PDA from Isabella juices produced with grapes submitted to ultrasound (US) postharvest treatment.

Peak number	2013		2014		2015	
	Control	US	Control	US	Control	US
1	31.94±2.05	52.42±5.34*	21.70±1.41	18.01±0.71*	25.61±0.47	28.50±1.18
2	11.50±0.12	23.39±1.51*	13.95±0.58	14.46±1.04	21.95±2.04	20.40±0.49
3	16.13±0.76	28.66±2.48*	7.35±0.55	7.17±0.20	14.49±0.93	15.35±0.33
4	29.79±0.81	50.15±4.20*	23.82±1.94	23.14±0.25	29.20±2.00	28.55±0.68
5	60.50±2.08	119.09±680*	49.11±1.92	45.22±0.69*	69.03±1.92	73.84±2.57
6	112.43±2.91	223.93±14.54*	143.40±5.23	130.74±0.60*	153.29±1.49	167.71±0.56*
7	0.28±0.04	0.65±0.07*	0.36±0.08	0.40±0.04	0.55±0.01	0.47±0.02*
8	0.08±0.01	0.15±0.02*	0.09±0.01	0.08±0.00	0.14±0.01	0.18±0.01*
9	0.20±0.01	0.46±0.04*	0.35±0.01	0.25±0.01*	0.28±0.01	0.32±0.02*
10	0.08±0.00	0.38±0.02*	0.16±0.04	0.18±0.00	0.15±0.01	0.16±0.01
11	0.14±0.02	0.31±0.01*	0.13±0.01	0.14±0.01	0.19±0.01	0.24±0.01*
12	0.27±0.03	0.85±0.05*	0.31±0.07	0.33±0.01	0.37±0.03	0.40±0.03
13	1.06±0.04	2.65±0.20*	1.59±0.16	0.79±0.03*	1.81±0.13	2.26±0.13*
14	3.00±0.23	4.86±0.56*	4.55±0.28	2.12±0.08*	5.65±0.23	7.17±0.03*
15	1.40±0.06	2.42±0.19*	4.81±0.46	1.32±0.23*	4.25±0.29	5.43±0.39*
16	0.52±0.05	1.06±0.14*	0.62±0.10	0.12±0.02*	0.88±0.07	0.94±0.05
17	0.55±0.05	0.85±0.14*	1.39±0.24	0.59±0.04*	1.09±0.12	1.23±0.09
18	0.24±0.01	0.35±0.01*	0.44±0.05	0.13±0.01*	0.53±0.05	0.52±0.02
19	0.21±0.02	0.44±0.05*	0.22±0.00	0.24±0.03	0.72±0.06	0.63±0.05
20	nd	nd	0.14±0.01	nd	0.05±0.00	0.06±0.00*
21	1.60±0.19	2.92±0.36*	5.43±0.38	1.60±0.23*	3.63±0.34	8.55±0.12*
22	2.04±0.09	4.20±0.23*	10.86±0.63	3.68±0.64*	6.85±0.63	6.60±0.31

Results are mean \pm standard deviation of three independent micro juice making processes (n=3). *Means that the average is statistically different than control for each experiment ($p < 0.05$). Concentration in malvidin-3-glucoside (mg L^{-1}). Control results were from juices produced with grapes do not treated by ultrasound irradiation and storage during one day at 20 °C. US are juice samples produced with ultrasound irradiated samples during 5 minutes of exposure time in an ultrasound bath (270 W/40 kHz) and storage during one day at the same conditions than control as the incubation time.

4 ARTIGO 3

PERFIL SENSORIAL DE VINHOS DE UVAS CABERNET SAUVIGNON SUBMETIDAS A TRATAMENTO COM ULTRASSOM

Carine Glaucia Comarella^{1*}, Taísa Ceratti Treptow¹, Álisson Oliveira¹, Tássia L. Pereira
Silveira¹, Claudia Kaehler Sautter¹, Neidi Garcia Penna¹

RESUMO

O ultrassom (US) é uma tecnologia alternativa a processos convencionais que apresenta grande versatilidade na indústria alimentícia. Dentre suas propriedades mais exploradas está a de facilitar a extração de compostos bioativos em matrizes vegetais, tais como compostos fenólicos. Estudos recentes apontaram a capacidade do US de elevar o teor de compostos fenólicos em produtos derivados da uva. Estas substâncias são importantes na definição das características sensoriais de vinhos, sendo os principais responsáveis pela cor, adstringência e amargor destes produtos. No entanto, os efeitos dessa técnica sobre a qualidade sensorial de produtos como vinho ainda não foram avaliados. Este trabalho teve por objetivo avaliar o perfil sensorial e aceitação de vinhos Cabernet Sauvignon produzidos a partir de uvas submetidas a diferentes tempos de aplicação de US na safra de 2014. Na avaliação do painel treinado, os vinhos foram caracterizados por meio de 18 descritores sensoriais que, no entanto, só apresentaram diferenças significativas quanto a intensidade em 8 destes termos. A discriminação dos vinhos ocorreu quanto aos atributos relativos a aspectos visuais, olfativos e gustativos, não havendo diferenças significativas perceptíveis quanto às sensações bucais. Em relação a vinhos provenientes de uvas não submetidas a tratamento, a aplicação de 5 e 7 minutos de US na fruta deu origem a vinhos com menor e maior intensidade do aroma madeirizado, respectivamente, e maior aroma de frutas vermelhas. Quanto ao grau de aceitabilidade destes vinhos, somente apresentou diferença aquele produzido com uvas sonicadas por 5 minutos, o qual atingiu pontuação mais baixa que a respectiva amostra controle.

¹ Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria. Avenida Roraima, 1000. Bairro Camobi. CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

* Autor correspondente. E-mail: carineglaucia@yahoo.com.br.

1 INTRODUÇÃO

Os polifenóis são produzidos no metabolismo secundário das plantas e na videira se distribuem por diversos órgãos, sendo extraídos das bagas durante a vinificação. Nos vinhos estas substâncias determinam a cor, adstringência, amargor e corpo, além de influenciar outros aspectos relacionados ao sabor e aroma (GONZÁLEZ-NEVES et al., 2015). As técnicas de vinificação exercem importante influência sobre a concentração de compostos fenólicos e conseqüentemente sobre as características sensoriais do vinho (KENNEDY, 2008). A eficiência da etapa de maceração é fator limitante na extração dos polifenóis da uva, a qual pode ser facilitada, em menor ou maior grau, pelo estado de fragilidade das paredes das células das cascas (GIL et al., 2012, HERNÁNDEZ-HIERRO et al., 2014).

O ultrassom (US) tem a propriedade de desestruturar membranas, devido ao fenômeno de cavitação acústica que causa a explosão de microbolhas formadas pela presença de gases dissolvidos no meio líquido, favorecendo a extração de compostos bioativos quando aplicado em matrizes vegetais (CHEMAT et al., 2011). Além disso, o US já mostrou capacidade de promover a síntese de substâncias fenólicas através da ativação do metabolismo secundário de uvas (HASAN; BAEK, 2013, HASAN et al., 2014). Tal metabolismo também está envolvido na produção de outras substâncias que são importantes no desenvolvimento de aromas varietais da uva, os terpenos (BAYONOVE, 2000). Mais recentemente, o uso do US também vem sendo testado durante o processo de vinificação com o intuito de acelerar a maturação do vinho, visto que acelera reações químicas que naturalmente acontecem durante o envelhecimento da bebida (ZHANG et al., 2016). Apesar do potencial promissor na área da enologia, não foram encontrados estudos sobre o perfil sensorial de vinhos em que houve o emprego do US na uva ou durante o processo de vinificação.

Um dos métodos mais adequados para o levantamento do perfil sensorial de vinhos é a Análise Descritiva Quantitativa (ADQ). Com esta técnica é possível caracterizar o produto com descritores que permitem o máximo de informação sobre as propriedades sensoriais, sendo possível medir a intensidade da sensação percebida para cada um dos descritores escolhidos. Segundo Stone e Sidel (2004), entre as vantagens da ADQ sobre outros métodos de avaliação estão a confiança no julgamento de uma equipe pequena de julgadores treinados, desenvolvimento de uma linguagem descritiva objetiva mais próxima à linguagem do consumidor, além dos resultados obtidos poderem ser analisados estatisticamente. Dentre as variedades viníferas, a Cabernet Sauvignon é uma das mais renomadas para a produção de vinhos finos (BURIN, 2010). O vinho desta cultivar caracteriza-se por apresentar cor

vermelha com reflexos violáceos acentuados, riqueza em taninos e complexidade de aroma e buquê. Nesse contexto, o intuito deste trabalho foi avaliar o perfil sensorial e aceitação de vinhos Cabernet Sauvignon elaborados a partir de uvas submetidas a diferentes tempos de aplicação de US na safra de 2014.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras e tratamentos

As amostras de uvas Cabernet Sauvignon foram colhidas em Santana do Livramento/RS (30°53'27" latitude sul, 55°31'58" longitude oeste) na safra 2014, e conduzidas até o Núcleo de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL) da Universidade Federal de Santa Maria, onde foi realizado o experimento.

A sonicação das amostras de uva foi realizada em equipamento de banho ultrassônico (Unique - USC 5000, dimensões do tanque: 504 x 300 x 150 mm, capacidade para: 21L, Indaiatuba SP, Brasil) com 270 W de potência nominal e frequência de 40 kHz. Cada unidade amostral composta por 1,8 Kg de bagas desengaçadas foi acomodada em cesto de aço inox e submersa no tanque em H₂O destilada e deionizada. Os tempos de exposição ao US utilizados foram de 3, 5 e 7 minutos. Segundo estudo prévio, estes são os tempos de sonicação que apresentaram melhor resultado na concentração de polifenóis totais no vinho de uvas tratadas. O período de resposta fisiológica para cada tempo de aplicação de US pode variar e, neste caso, os tratamentos apresentaram efeito mais expressivo após 1, 3 e 5 dias de incubação a 20°C, para as sonicações de 3, 5 e 7 minutos, respectivamente. Dessa forma, para cada tratamento foi conduzida uma amostra controle (não sonicada) com igual período de incubação. Deste experimento originaram-se 6 amostras que podem ser descritas da seguinte forma: amostra controle e tratamento (3 min de US) com 1 dia de incubação, controle e tratamento (5 min de US) com 3 dias de incubação e por fim, amostra controle e tratamento (7 min de US) com 5 dias de incubação, que posteriormente irão originar os vinhos codificados como V1 a V6, respectivamente. Todas estas amostras foram conduzidas em triplicata, e após o término de cada condição experimental foram congeladas em nitrogênio líquido até o momento da vinificação.

2.2 Vinificação

A vinificação de uvas Cabernet Sauvignon foi desenvolvida com base no método sugerido por Miele e Rizzon (2006) com algumas adaptações. Após o esmagamento, cada mosto originado foi transferido para fermentador de 2 litros e adicionado de metabissulfito de potássio. Posteriormente foi acrescentada enzima Lafase[®] He Grand Cru (5 g 100 kg⁻¹, Laffort[®]) e então inoculada a levedura starter Zymaflore FX10[®] (20 g hL⁻¹, Laffort[®]) juntamente com o aditivo Superstart[®] (30 g hL⁻¹, Laffort[®]). Após 24 horas da inoculação foi adicionado Bioactiv[®] (40 g hL⁻¹, Laffort[®]). Os vinhos foram engarrafados após 3 meses de estabilização, momento em que também foram coletadas alíquotas para a realização das análises físico-químicas.

2.3 Análise de parâmetros de identidade e qualidade do vinho

Os principais parâmetros de identidade e qualidade enológica foram avaliados segundo metodologia sugerida pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

A leitura do pH foi realizada através de método potenciométrico com medidor de leitura digital (Digimed[®] DM -22). Acidez total por titulometria com hidróxido de sódio 0,1N até ponto de viragem em pH 8.2 e resultados expressos em gramas de ácido tartárico/100mL. A acidez volátil por volumetria após destilação por arraste de vapor, expressa em gramas de ácido acético/100 mL. A concentração de dióxido de enxofre total foi medida por iodimetria e expressa em mg de SO₂ total/L. Teor alcoólico foi determinado por destilação no Destilador Eletrônico Enoquímico Gilbertini com arraste de vapor e posterior mensuração com Alcoômetro de Gay Lussac, expressos em %. Os açúcares totais foram determinados seguindo a técnica redutométrica de Somogy, adaptada por Nelson (1944).

2.4 Análise Descritiva Quantitativa

De acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde, nº 196/96, a realização da análise sensorial foi condicionada a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM tendo sido registrada sob o número 16555513.8.0000.5346.

A análise sensorial foi realizada em amostras com 9 meses de garrafa, as quais durante este período permaneceram armazenadas na posição horizontal, em temperatura ambiente, em local seco e arejado, sob o abrigo da luz.

A metodologia utilizada foi a descrita por Stone e Sidel (2004), com algumas modificações. A equipe de provadores foi formada por painel previamente treinado, que

passaram por testes para avaliação da capacidade de discriminação sensorial (reconhecimento dos gostos básicos e sensação bucal e teste discriminativo tipo triangular). Os provadores pré-selecionados passaram pra fase de treinamento sensorial segundo Behrens e Silva (2000). Após serem familiarizados com um conjunto de aromas com descritores propostos por Noble et al. (1987) denominado “Terminologia Padrão Modificada de Aromas em Vinho” (roda de aromas) foram submetidos a um teste de memória sensorial, sendo selecionados os provadores que obtiveram 90% de acerto em três repetições deste teste.

Desta primeira seleção, 17 provadores que apresentaram disponibilidade de participação foram novamente submetidos a um teste de memória sensorial, havendo em seguida o desenvolvimento da terminologia descritiva. Para o levantamento dos termos foram utilizadas amostras de vinhos elaborados com uvas Cabernet Sauvignon de mesma procedência e safra das usadas no presente estudo. Nesta etapa, os provadores receberam uma ficha de avaliação onde deveriam descrever sobre a aparência, aroma, sabor e sensações bucais. Após a análise individual das amostras, com a equipe reunida e coordenada pelo analista sensorial, discutiu-se e definiu-se cada um dos atributos percebidos, sendo selecionados os termos em consenso que obedeceram aos critérios de serem representativos para as amostras e serem percebidos pela maior parte da equipe. A seleção resultou em 18 atributos selecionados, para os quais foram definidas amostras referência e os provadores treinados para a avaliação das mesmas por mais duas sessões, onde foram lembradas as definições de cada atributo. Detalhes sobre os atributos selecionados, definições e amostras referências são listados na Tabela 1.

Utilizando a ficha de avaliação e a lista com a terminologia descritiva, definições e referências desenvolvidas na etapa anterior, a intensidade de cada atributo foi avaliada utilizando-se escala não estruturada de nove centímetros, com os termos de intensidade para cada atributo ancorados em seus extremos. Esta escala foi utilizada da esquerda para a direita, de menor intensidade para o de maior intensidade.

As avaliações de cada julgador foram submetidas à análise estatística de variância (ANOVA). Os critérios de seleção da equipe final de provadores foram seu poder discriminativo, reprodutibilidade nos julgamentos e consenso com a equipe. Os níveis de significância (p) dos valores de $F_{amostra}$ e $F_{repetição}$ foram computados para cada provador, em cada atributo. Foram selecionados 8 provadores que mostraram boa capacidade discriminatória ($p_{amostra} < 0,50$), boa reprodutibilidade ($p_{repetição} \geq 0,05$) e consenso com a equipe na maior parte dos atributos avaliados (FARIA; YOUTSUYANAGY, 2002).

Os julgadores avaliaram as amostras dos vinhos em três repetições seguindo um delineamento de blocos incompletos casualizados, totalizando 6 sessões. Os testes foram realizados em cabines individuais sob luz branca, em sala climatizada, e as amostras servidas de forma monádica em taças de vidro codificadas com números aleatórios de três dígitos. Foram servidos 30 mL de vinho acompanhado de água mineral e biscoito tipo água e sal.

Tabela 1. Termos descritores, definições e referências utilizadas na avaliação de vinhos Cabernet Sauvignon

Descritor	Definição	Referência
<u><i>Aparência</i></u>		
Cor vermelho rubi	Cor vermelha característica de vinhos tintos	Fraco: 30 mL de vinho base (1)* + 70 mL de água Forte: 30 mL vinho base (1) + 15 gotas de corante vermelho
Formação de lágrimas	Lágrimas que escorrem pela parede da taça após a sua agitação	Pouco: aguardente 40% vol. diluída na proporção 1:9 Muito: aguardente 40% vol.
Translúcido	Capacidade de passagem de luz em diferentes intensidades, porém de maneira difusa	Translúcido: vinho base Opaco: suco de uva
<u><i>Aroma</i></u>		
Madeirizado	Notas de café, defumado, torrado, medicinal, bacon, carvalho, cedro	Nada: Vinho base (2) Forte: Vinho base (3)
Herbáceo/ vegetal	Aroma que lembra grama cortada, pimentão, azeitona verde, azeitona preta, palha, chá, tabaco	Nenhum: Água Forte: Azeitonas verdes, cubos de pimentão verde, grama cortada
Alcoólico	Aroma característico de etanol	Fraco: Solução aquosa de etanol a 5% Forte: Solução aquosa de etanol a 20%
Frutas vermelhas	Aroma adocicado que lembra a mistura de frutas vermelhas frescas.	Nenhum: Água Forte: Mistura de ameixa, morango, framboesa e mirtilo triturados na proporção de 1:1:1:1
Frutas maduras	Aroma característico de frutas maduras, passadas ou secas	Nenhum: Água Forte: ameixa madura, uvas passas e ameixa seca na proporção de 1:1:1:1
Caramelizado/ adocicado	Aroma de caramelo, baunilha	Nenhum: Água Forte: Açúcar mascavo caramelizado
Floral	Aroma característico de flores, como violeta ou rosas	Nenhum: Água Forte: 50 mL de água + 1 gota de aroma artificial de rosas (Bella Luna)
<u><i>Sabor</i></u>		
Frutado	Sabor associado a frutas	Fraco: Vinho base (4) Forte: 50 mL de vinho base (4) adicionado de 5 g de pedaços de morango, mirtilo, ameixa e framboesa na proporção de 1:1:1:1.
Madeirizado	Sabor associado à madeira, café, tabaco, tostado	Pouco: Vinho base (2) Muito: Vinho base (5)

Gosto

Ácido	Característico de solução de ácido cítrico. Associado à presença de ácidos no vinho	Fraco: Solução de ácido cítrico grau alimentício 0,02% Forte: Solução de ácido cítrico grau alimentício 0,9%
Amargo	Gosto amargo característico de solução de cafeína	Fraco: Solução de cafeína grau alimentício 0,01% Forte: Solução de cafeína grau alimentício 0,1%

Sensações bucais

Adstringência	Sensação de “secura”, “amarração”, “travor” e “aspereza” percebida na cavidade bucal. Associada à presença dos taninos	Fraco: Vinho base (1) Forte: 20 mL de vinho base (1) adicionado de 1 mL de solução de infusão de sementes de uva
Pungente	Sensação que remete ao álcool na boca, a pimenta, ao gengibre, ao mentol, a acidez	Fraco: Vinho base (1) Forte: Vinho base (1) adicionado de raspas de gengibre.
Persistência	Sensação após deglutição do vinho (retrogosto)	Pouco: Vinho base (2) Muito: Vinho base (5)
Corpo	Sensação de opulência ou densidade do vinho tinto percebida na boca	Pouco: Vinho base (2) Muito: Vinho base (5)

*Vinho base (1): Tinto seco Cabernet Sauvignon Salton Classic/Safra 20134 Vinho base (2): Tinto seco Merlot Almadén/Safra 2013; Vinho base (3): Tinto seco Merlot (Panul)/Safra 2013; Vinho base (4): Tinto seco Tannat Los Teros/Safra 2013; Vinho base (5): Tinto seco Merlot Reserva Panul/Safra 2012

2.4 Teste sensorial de aceitação

O teste foi aplicado a toda equipe de julgadores pré-selecionados (17 avaliadores) através de escala hedônica estruturada verbal, numérica, bipolar de 7 pontos (IAL, 2008), onde o indivíduo deveria expressar o grau de gostar ou desgostar do produto de forma globalizada. A escala utilizada continha os termos definidos situados entre “gostei muitíssimo” e “desgostei muitíssimo” contendo um ponto intermediário “nem gostei, nem desgostei”. O delineamento e apresentação das amostras seguiram as mesmas condições descritas no item 2.3.

2.5 Análise Estatística

Os resultados das análises físico-químicas e testes sensoriais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação de médias por teste HSD (*Honestly Significant Difference*) de Tukey, considerando um nível de significância de 5%. Para tal foi utilizado o programa STATISTICA 9.0 (STATISTICA Copyright[©] StatSoft. Inc., 1984-2009, Tulsa, USA), sendo os resultados expressos como a média de três repetições.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição geral dos vinhos Cabernet Sauvignon submetidos à avaliação sensorial é apresentada na Tabela 2. Conforme estabelece a legislação brasileira em relação aos padrões de identidade e qualidade de vinhos tintos secos (BRASIL, 1988, 2014), todas as amostras apresentaram conformidade com as normas. Os valores de pH, acidez total e acidez volátil também estão em acordo com os mensurados em trabalhos anteriores para vinhos da mesma cultivar (FALCÃO, 2007; SANTOS, 2006).

Não foram observadas diferenças significativas quanto ao pH e teor alcoólico destes vinhos, porém algumas variações ($p < 0,05$) ocorreram nos demais parâmetros avaliados. Apesar de se tratarem de vinhos provenientes de uvas submetidas a diferentes condições de tratamento pré-processamento, é provável que as variações nos teores de acidez total e volátil, anidrido sulfuroso e açúcares totais sejam em função do processo de vinificação que é realizado de forma independente em cada uma das amostras.

Tabela 2. Composição geral de vinhos Cabernet Sauvignon elaborados com uvas submetidas a tratamento pós-colheita com ultrassom na safra de 2014

Análises	Amostras					
	V1	V2	V3	V4	V5	V6
pH	3,6 ^{ns}	3,53	3,50	3,49	3,47	3,43
Álcool %	10,73 ^{ns}	10,53	11,10	11,13	11,53	10,73
Acidez Total	0,8bc	0,89a	0,81bc	0,84b	0,80bc	0,78c
Acidez Volátil	0,04d	0,06a	0,05c	0,05c	0,05c	0,05c
SO ₂ Total	51,60c	50,83c	64,57b	51,20c	63,73b	77,37a
Açúcares Totais	1,13d	2,57a	2,07b	2,19b	1,98bc	1,65c

As amostras codificadas correspondem a vinhos elaborados a partir de uvas submetidas aos seguintes tempos de sonicação (em minutos) e período de armazenamento a 20°C pós-tratamento (em dias): V1 - 0 min/1 dia; V2: 3 min/1 dia; V3 - 0 min/3 dias; V4 - 5 min/3 dias; V5 - 0 min/5 dias; V6 - 7 min/5 dias.

Os valores de Acidez Total são expressos em g% de ácido tartárico, Acidez Volátil em g% de ácido acético, Sulfito (SO₂) Total em mg L⁻¹ e Açúcares Totais em g L⁻¹.

Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e *ns* - não houve diferença significativa.

A caracterização sensorial dos vinhos Cabernet Sauvignon foi resumida a 18 atributos que descrevem aspectos relacionados à aparência, aroma, sabor, gosto e sensações bucais percebidas pelos provadores. O perfil dos vinhos segundo a avaliação destes atributos está representado na Figura 1.

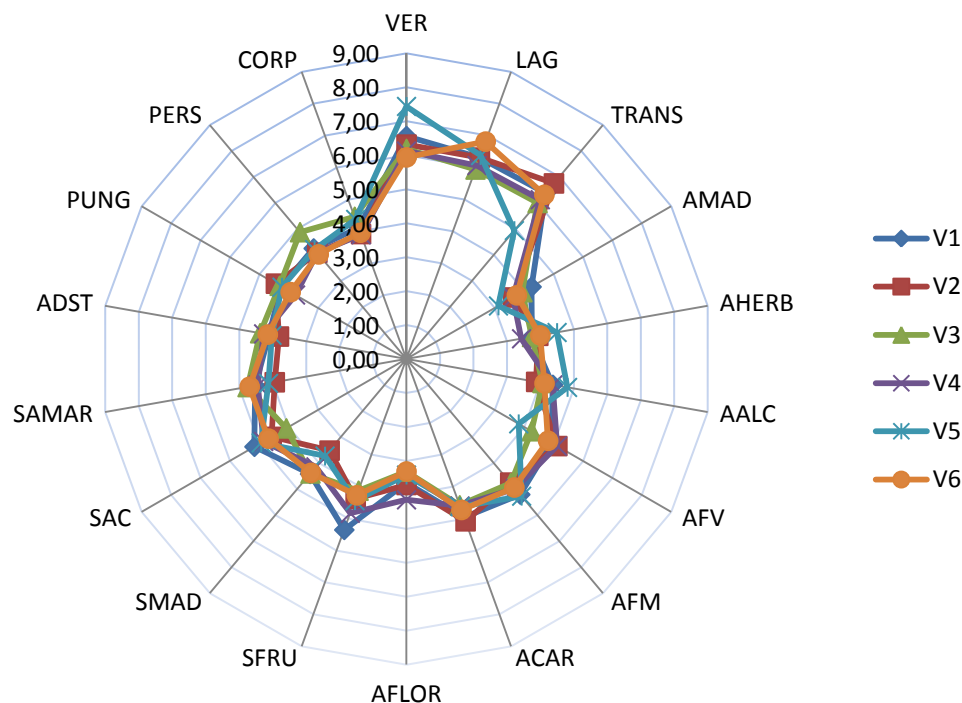
Na literatura, podemos encontrar um perfil sensorial para os vinhos Cabernet Sauvignon que se caracteriza principalmente pelos descritores de aromas de fruta, frutas vermelhas, condimento, vegetativo, queimado, floral, caramelo, químico, café, animal, cacau, banana, manga, cereja, cassis, ameixa, eucalipto, baunilha, fruta cozida, pimentão, e os descritores de sabor vegetativo, de fruta, pimenta do reino, gosto amargo e adstringência (BINDON et al., 2014, HEYMANN; NOBLE, 1987; MANFROI et al., 2010, SANTOS, 2006, SIVERTSEN et al., 2001.).

Do total de termos levantados pela equipe treinada, pelo menos 13 estão em consenso com trabalho realizado por Santos (2006), o qual descreveu sensorialmente 11 vinhos Cabernet Sauvignon varietais de diversas regiões do Brasil. Entre os aromas que se encontram em acordo está o de frutas vermelhas, frutas maduras, floral, álcool, madeirizado e herbáceo. Para os dois últimos, a definição adotada em consenso com os provadores englobou termos que no estudo de Santos (2006) foram avaliados isoladamente. Trata-se dos aromas de café e tostado, aqui agrupados como madeirizado, e o aroma de pimentão, englobado pelo termo herbáceo/vegetal. Tais termos foram assim definidos para facilitar a avaliação dos julgadores.

Ainda numa análise comparativa, os sabores madeirizado e frutas vermelhas também foram elencados no trabalho realizado por Santos (2006), assim como gosto amargo e ácido, sensação adstringente e cor vermelha. No presente estudo, a coloração dos vinhos foi definida mediante um único descritor, a cor vermelha rubi. Já na utilizada por Santos (2006) e Bindon et al. (2014) a avaliação da cor utilizou os descritores cor vermelha e cor violeta violeta.

Segundo a análise estatística de variância (ANOVA), a discriminação das 6 amostras de vinho Cabernet Sauvignon somente ocorreu em 8 dos atributos elencados pelo painel treinado. Diferenças significativas ($p < 0,05$) somente foram percebidas nos descritores de aparência (cor vermelho rubi, translucido), aroma (madeirizado, herbáceo/vegetal, frutas vermelhas), sabor (frutas vermelhas) e gosto (ácido e amargo). Para os descritores relacionados às sensações bucais não foram percebidas diferenças entre as amostras, demonstrando que estes atributos não foram eficientes para diferenciar os vinhos. No entanto, considerando que a análise das amostras foi realizada por painel de julgadores com treinamento para identificar e quantificar os termos descritores, e os vinhos submetidos à avaliação serem oriundos de uvas da mesma safra e local, é provável que o tratamento com

US aos quais as uvas foram submetidas não tenha influenciado de forma mais intensa as características sensoriais dos vinhos, de modo que estes não apresentaram diferença estatística em alguns dos atributos analisados.



Figural. Perfil sensorial de vinhos Cabernet Sauvignon provenientes de uvas submetidas a diferentes tratamentos com Ultrassom na safra de 2014.

As amostras codificadas correspondem a vinhos elaborados a partir de uvas submetidas aos seguintes tempos de sonicação (em minutos) e período de armazenamento a 20°C pós-tratamento (em dias): V1 - 0 min/1 dia; V2: 3 min/1 dia; V3 - 0 min/3 dias; V4 - 5 min/3 dias; V5 - 0 min/5 dias; V6 - 7 min/5 dias.

Atributos avaliados Aparência - VER: cor vermelho rubi; LAG: lágrimas; TRANS: translúcido. Aroma - AMAD: madeirizado; AHERB: herbáceo/vegetal; AALC: alcoólico; AFV: frutas vermelhas; AFM: frutas maduras; ACAR: caramelizado/adocicado; AFLOR: floral. Sabor - SFRU: frutas vermelhas; SMAD: madeirizado. Gosto - SAC: ácido, SAMAR: amargo. Sensações bucais - ADST: adstringente; PUNG: pungente; PERS: persistência; CORP: corpo.

Na Tabela 3 se encontram as médias dos valores de intensidade para os atributos que apresentam diferença estatística entre os vinhos avaliados. Em relação ao aspecto visual, as maiores diferenças foram encontradas no último conjunto de amostras (V6, V5), referente ao vinho proveniente de uvas sob tratamento com maior tempo de sonicação (7 minutos) e período de armazenamento pós-tratamento (5 dias) e a respectiva amostra controle (vinho de uvas não sonicadas, porém armazenadas durante 5 dias). Para estas amostras foram encontrados o maior e o menor valor de intensidade de coloração entre todos os vinhos avaliados, referindo-se a amostra controle (V5) e proveniente de tratamento (V6),

respectivamente. Os vinhos de uvas tratadas com US apresentaram tendência a ser mais translúcidos, no entanto, uma diferença significativa quanto à intensidade deste atributo entre amostra controle e tratada, só foi percebida novamente entre os vinhos nomeados V5 e V6.

Os atributos de aparência são muito importantes na avaliação sensorial, pois formam primeira impressão a respeito do produto e influenciam as decisões de compra e consumo. Neste ponto, talvez a cor seja a característica que mais imediatamente impressiona o provador e o consumidor. Os vinhos tintos têm sua coloração fundamentalmente determinada pela presença de antocianinas que estão presentes na casca da uva e lhes conferem uma coloração vermelho intenso. Com a maturação e envelhecimento do vinho tinto, a cor evolui do vermelho vivo para um vermelho acastanhado, correspondendo a um decréscimo do teor em antocianinas monoméricas e a um incremento em pigmentos poliméricos (KENNEDY, 2008).

Tabela 3. Pontuações médias dos atributos sensoriais para os quais foram observadas diferenças significativas entre as amostras de vinhos Cabernet Sauvignon provenientes de uvas submetidas a diferentes tratamentos com Ultrassom na safra de 2014.

Atributos	Amostras					
	V1	V2	V3	V4	V5	V6
Aparência						
Cor vermelho rubi	6,56b	6,31bc	6,19cd	6,12cd	7,44a	5,94d
Translúcido	6,37ab	6,75a	6,00b	6,12b	4,94c	6,31ab
Aroma						
Madeirizado	4,25a	3,62bc	3,94ab	3,62bc	3,12c	3,75ab
Herbáceo/vegetal	3,75b	3,94ab	3,75b	3,43b	4,50a	4,00ab
Frutas vermelhas	4,94a	5,12a	4,25b	5,12a	3,81b	4,81a
Sabor						
Frutas vermelhas	5,35a	4,37b	4,12b	4,83ab	4,43b	4,27b
Gosto						
Ácido	5,17a	4,58ab	4,08b	4,85ab	4,93a	4,69ab
Amargo	4,52ab	3,94b	4,75a	4,43ab	4,12ab	4,69a

As amostras codificadas correspondem a vinhos elaborados a partir de uvas submetidas aos seguintes tempos de sonicação (em minutos) e período de armazenamento a 20°C pós-tratamento (em dias): V1 - 0 min/1 dia; V2: 3 min/1 dia; V3 - 0 min/3 dias; V4 - 5 min/3 dias; V5 - 0 min/5 dias; V6 - 7 min/5 dias.

Os atributos foram avaliados através de escalas com valores de intensidade variando de 0 a 9.

Na análise olfativa dos vinhos, o aroma percebido em maior intensidade pelos provadores foi o que remete a frutas vermelhas, seguido pelo herbáceo/vegetal. Vinhos de *Vitis vinifera* L. como o Cabernet Sauvignon são conhecidos por apresentar uma "dicotomia

de atributos sensoriais" sendo notavelmente distinguidos pela presença de características vegetais e frutadas (HEYMANN; NOBLE, 1987; PRESTON et al., 2008). Apesar de escassas publicações a respeito, geralmente aceita-se que os atributos vegetativos sejam dominantes em vinhos Cabernet Sauvignon elaborados a partir de uvas colhidas mais precocemente, enquanto atributos frutados são muitas vezes mais intensos em vinhos produzidos com uvas de colheita mais tardia (BINDON et al., 2014). As uvas utilizadas neste experimento tiveram sua colheita antecipada em algumas semanas devido às condições climáticas da época, que devido a um período chuvoso que se iniciava foram colhidas com uma concentração de SST próxima a de 20°Brix, o que possivelmente tenha resultado numa média de intensidade do aroma herbáceo próxima a das notas frutadas.

Apesar dos atributos de aromas verificados nos vinhos terem apontado alguma diferença estatística, é perceptível que as variações são pequenas e mais restritas a comparação entre vinhos de uvas tratadas e respectivas amostras controle. Para o descritor aroma de frutas vermelhas, observou-se que os vinhos provenientes de uvas sonicadas mantiveram-se entre as maiores notas de intensidade, apresentando valores significativamente mais altos os vinhos oriundos de uvas com 5 e 7 minutos de sonicação. Para estes mesmos tratamentos, a intensidade do aroma herbáceo/vegetal tendeu a ser menor, porém sem relevância estatística. Já para o descritor madeirizado, definido neste trabalho por aromas que lembram principalmente notas de café, torrado, defumado, carvalho e medicinal, tratamentos com 3 e 7 minutos de sonicação resultaram em vinhos com a menor e a maior média ($p < 0,05$) quando comparadas as dos respectivos controles.

Na avaliação do sabor dos vinhos, a amostra proveniente de tratamento com 3 minutos de US apresentou média de intensidade significativamente menor para o atributo sabor de frutas vermelhas quando comparada a amostra não tratada. As demais não apresentaram diferenças. Para os gostos ácido e amargo não foram percebidas diferenças entre controle e tratamento, somente algumas poucas variações entre amostras com períodos diferentes de armazenamento pós-tratamento.

Os resultados obtidos na análise descritiva dos vinhos demonstrou principalmente que a aplicação de US em uvas Cabernet Sauvignon originou vinhos com características globais usualmente encontradas para esta cultivar, sobressaindo aromas que remetem à frutas vermelhas e madeirizadas, dependendo da dose aplicada na uva. Apesar de não ser objeto da pesquisa, não foi relatada ocorrência de gosto ou aromas indesejáveis nos vinhos analisados. Conforme demonstrado em estudos anteriores, a aplicação de US no processamento de leite levou a um decréscimo na qualidade sensorial do produto devido ao desenvolvimento de *off*

flavors (MOHAMMADI et al., 2014, MARCHESINI et al., 2012). O mesmo foi observado por Chemat et al., (2004) durante a utilização do US na emulsificação de óleo de girassol, que levou ao desenvolvimento de odor metálico e rançoso no produto. No entanto, Comarella et al. (2012) em pesquisa sobre os efeitos da sonicação de uvas Isabel, demonstrou que os sucos elaborados a partir destas uvas tiveram melhor aceitação dos provadores em comparação a suco de uvas não tratadas com US.

Segundo aponta os resultados obtidos no teste de aceitação realizado nos vinhos (Figura 2) houve bastante semelhança entre o grau de aceitabilidade das amostras. A média apresentada pela maioria dos vinhos, provenientes de tratamento ou não, corresponde na escala verbal ao termo gostei ligeiramente. Diferenças significativas somente foram percebidas entre controle e tratamento para amostras provenientes de uvas armazenadas durante um período de 3 dias, no qual o vinho elaborado com uvas sonicadas durante 5 minutos apresentou o menor grau de aceitabilidade. A necessidade da colheita antecipada das uvas utilizadas no experimento, que apesar de apresentarem grau de maturidade tecnológica satisfatório, possivelmente não favoreceu uma maturação fenólica adequada, afetando também as características sensoriais dos vinhos analisados.

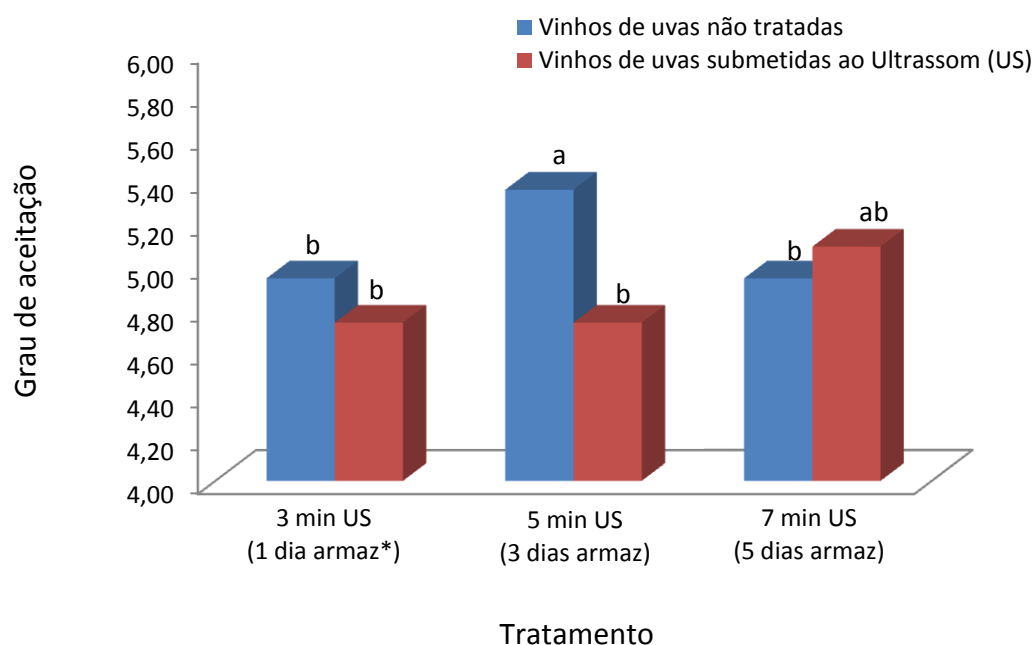


Figura 2. Média das notas de aceitação de vinhos Cabernet Sauvignon elaborados a partir de uvas submetidas a diferentes tratamentos com Ultrassom na safra de 2014.

Os tratamentos correspondem, na ordem em que são representados na figura, a uvas submetidas a 3, 5 e 7 minutos de sonicação, seguidos por 1, 3 e 5 dias de armazenamento pós-tratamento*, respectivamente.

4 CONCLUSÃO

A análise sensorial descritiva de vinhos Cabernet Sauvignon provenientes de uvas submetidas ou não a diferentes tratamentos pós-colheita com US demonstrou que estes são melhores descritos e discriminados pelos atributos definidos com os termos cor vermelha rubi, translúcido, aromas madeirizado, herbáceo/vegetal e de frutas vermelhas, sabor de frutas vermelhas, e gosto ácido e amargo. Entre os diferentes tratamentos com US, poucas foram as diferenças observadas quanto à intensidade dos atributos avaliados, sendo que os mesmos apresentaram maiores diferenças quando comparados as respectivas amostras controle. Nestas circunstâncias vinhos elaborados com uvas sonicadas durante 5 e 7 minutos apresentaram maior intensidade de aroma de frutas vermelhas, enquanto o último também apresentou maior intensidade no aroma madeirizado. O grau de aceitabilidade entre as amostras de vinho mostrou-se bastante semelhante, tendo a maioria recebido uma média equivalente ao grau gostei ligeiramente, sendo que o vinho Cabernet Sauvignon que apresentou maior aceitabilidade entre os provadores foi o proveniente de uvas com 7 minutos de sonicação.

5 REFERÊNCIAS

BEHRENS, J. H.; SILVA, M. A. A. P. Perfil sensorial de vinhos brancos varietais brasileiros através de análise descritiva quantitativa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 1, p. 60-67, 2000.

BINDON, K.; HOLT, P.; WILLIAMSON, P.; VARELA, C.; HERDERICH, M.; FRANCIS, I. L. Relationships between harvest time and wine composition in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon 2. Wine sensory properties and consumer preference. **Food Chemistry**, v. 154, p. 90–101, 2014.

BAYONOVE, C. El aroma varietal: el potencial aromático de la uva. In: FLANZY, C. (Coordenador). *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. Mundi Prensa. p. 137-146, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Portaria nº 229 de 25 de outubro de 1988. **Normas referentes à complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho**. Publicado no Diário Oficial da União, 31 out.1988. Seção 1, p. 20948.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 8.198/2014, de 20 de fevereiro de 2014. Regulamenta a Lei nº 7.678 de 8 de novembro de 1988. **Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho**. Publicado no Diário Oficial da União, 21 fev. 2014. Edição extra, p. 1.

BURIN, V. M. **Caracterização de clones da variedade Cabernet Sauvignon**: uvas e vinhos de São Joaquim, Santa Catarina. 2010. 158 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2010.

CHEMAT, F.; GRONDIN, I.; COSTES, P.; MOUTOUSSAMY, L.; SING, A. S. C.; SMADJA, J. High power ultrasound effects on lipid oxidation of refined sunflower oil. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, n. 5, p. 281–285, 2004.

CHEMAT, F.; HUMA, Z.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 813-835, 2011.

COMARELLA, C.G.; SAUTTER, C.K; EBERT, L.C.; PENNA, N.G. Polifenóis totais e avaliação sensorial de suco de uvas Isabel tratadas com ultrassom. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 69-73, 2012.

FALCÃO, L. D. Caracterização analítica e sensorial de vinhos Cabernet Sauvignon de diferentes altitudes de Santa Catarina. 2007. 175 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2007.

FARIA, E. V.; YOTSUYANAGI, K. **Técnicas de Análise Sensorial**. Campinas: ITAL/LAFISE, 2002. 116 p.

GIL, M.; KONTOUDAKIS, N.; GONZÁLEZ, H.; ESTERUELAS, M.; FORT, F.; CANALS, J. M.; ZAMORA, F. Influence of grape maturity and maceration length on color, polyphenolic composition, and polysaccharide content of Cabernet Sauvignon and Tempranillo wines. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 60, p. 7988–8001, 2012.

GONZÁLEZ-NEVES, G.; FAVRE, G.; PICCARDO, D.; FERRER, M.; ECHEVERRÍA, G. Efecto de técnicas alternativas de maceración sobre el color y composición de vinos tintos de seis variedades de uva. **Agrociencia Uruguay**. v. 19, n.1, p.57-68, 2015.

HASAN, MD. M.; BAEK, K. H. Induction of Resveratrol Biosynthesis in Grape Skins and Leaves by Ultrasonication Treatment. **Korean Journal of Horticultural Science & Technology**, v. 31, n. 4, p. 496-502, 2013.

HASAN, MD. M.; YUN, H. K.; KWAK, E. J.; BAEK, K. H. Preparation of resveratrol-enriched grape juice from ultrasonication treated grape fruits. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, p. 729–734, 2014.

HEYMANN, H.; NOBLE, A. C. Descriptive analysis of commercial Cabernet Sauvignon wines from California. **American Journal of Vitiviniculture**, v. 38, n. 1, p. 41-44, 1987.

HERNÁNDEZ-HIERRO, J. M.; QUIJADA-MORÍN, N.; MARTÍNEZ-LAPUENTE, L.; GUADALUPE, Z.; AYESTARÁN, B.; RIVAS-GONZALO, J. C.; ESCRIBANO-BAILÓN, M. T. Relationship between skin cell wall composition and anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo at different grape ripeness degree. **Food Chemistry**, v.146, p. 41–47, 2014.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 4. Ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 1020. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf. Acesso em: 14 fev 2012.

KENNEDY, J. A. Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 35, n. 2, p. 107-120, 2008.

MANFROI, V.; COSTA, G. P.; GUERRA, C. C.; ZANUS, M. C.; FIALHO, F. B.; ROMBALDI, C. V. Aplicação de taninos enológicos na elaboração de vinho Cabernet Sauvignon e seus efeitos sobre a qualidade sensorial. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, 2010.

MARCHESINI, G.; BALZAN, S.; MONTEMURRO, F.; FASOLATO, L.; ANDRIGHETTO, I.; SEGATO, S.; et al. Effect of ultrasound alone or ultrasound coupled with CO₂ on the chemical composition, cheese-making properties and sensory traits of raw milk. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 391–397, 2012.

MIELE, A; RIZZON, L. A. Efeito de elevadas produtividades do vinhedo nas características físico-químicas e sensoriais do vinho Merlot. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 271-278, 2006.

MOHAMMADI, V.; GHASEMI-VARNAMKHASTI, M.; EBRAHIMI, R.; ABBASVALI, M. Ultrasonic techniques for the milk production industry. **Measurement: Journal of the International Measurement Confederation**, v. 58, p. 93–102, 2014.

NELSON, N. A fotometric adaptaion of Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-80, 1944.

NOBLE, A. C.; ARNOLD, R. A.; BUECHSENSTEIN, J.; LEACH, E. J.; SCHMIDT, J. O.; STERN, P. M. Modification of a Standardized System of wine aroma terminology. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 38, p. 143-151, 1987.

PRESTON, L. D.; BLOCK, D. E.; HEYMANN, H.; SOLEAS, G.; NOBLE, A. C.; EBELER, S. E. Defining vegetal aromas in Cabernet Sauvignon using sensory and chemical. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 59, n. 2, p. 137-145, 2008.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Cabernet Sauvignon para elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, p.192-198, 2002.

SANTOS, B. A. C. **Compostos voláteis e qualidade dos vinhos secos jovens varietal Cabernet Sauvignon produzidos em diferentes regiões do Brasil**. 2006. 176 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. 2006.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SIVERTSEN, H. K.; FIGENSCHOU, E.; NICOLAYSEN, F.; RISVIK, E. Sensory and Chemical changes in Chilean Cabernet Sauvignon wines during storage in bottles at different temperatures. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 81, p. 1561-1572, 2001.

STONE, H.; SIDEL, J. L. Descriptive Analysis. In: STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. San Diego: Elsevier Academic Press, p. 215-235, 2004.

ZHANG, Q-A.; SHEN, Y.; FAN, X-H.; MARTÍN, J. F. G. Preliminary study of the effect of ultrasound on physicochemical properties of red wine, **CyTA - Journal of Food**, v. 14, n. 1, p. 55-64, 2016.

5 DISCUSSÃO

A qualidade sensorial de produtos enológicos como suco e vinho, além dos benefícios à saúde associados ao consumo destas bebidas, está relacionada à presença de compostos fenólicos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Por sua vez, a concentração de fenóis nos produtos está tanto ligada aos teores na fruta, quanto à capacidade de extração e transferência desses compostos. Além disso, durante e após o processamento, reações químicas entre essas substâncias podem levar a alterações no perfil fenólico do produto (KENNEDY, 2008). Dessa forma, a avaliação do potencial do US como ferramenta tecnológica para aumentar a qualidade de suco e vinho, por meio do enriquecimento com substâncias fenólicas, está condicionado a diversos fatores que devem considerar não só as propriedades e efeitos provocados pela ação das ondas ultrassônicas mas também àqueles ligados às condições da uva.

Os efeitos do US parecem estar ligados basicamente a dois aspectos. Sua ação mecânica sobre as paredes celulares da uva e ação química sobre compostos fenólicos por meio da formação de radicais livres. Ambos são decorrentes do fenômeno da cavitação acústica. Tal fenômeno compreende a formação, crescimento e colapso de bolhas de gás dissolvido no meio líquido. A alta temperatura e pressão geradas no local de rompimento das bolhas ocasiona a formação de microjatos que ao atingirem a superfície do vegetal danificam as paredes das células, facilitando a liberação do conteúdo intracelular. A alta energia liberada, também promove a dissociação de moléculas da solução levando à formação de radicais livres (CHEMAT et al, 2011).

Os resultados obtidos na avaliação do potencial fenólico de uvas submetidas a diferentes tempos de sonicação, demonstra a capacidade do US de facilitar a extração de substâncias fenólicas, em particular a de antocianinas, pela diminuição do índice de maturação celular dessas uvas (IMC%). No entanto, o que se observou foi que apesar dos efeitos serem dependentes do tempo de sonicação aplicado, as melhores condições de tratamento detectadas em determinada safra, podem não apresentar os mesmos resultados em outra. Conforme demonstrado na avaliação do perfil de antocianinas de suco de uvas Isabel submetidas à mesma condição de tratamento durante três safras consecutivas, a variação dos resultados observada em cada ano deve-se mais a diferenças na concentração de cada antocianina e pigmentos relacionados identificados do que no perfil geral destes.

Sabe-se que na medida em que ocorre o amadurecimento da uva há uma diminuição da rigidez das paredes das células da casca (HERNÁNDEZ-HIERRO et al., 2012), e as

condições, sobretudo climáticas, sob as quais a uva se desenvolve refletem diretamente sobre a maturação da fruta. Dessa forma, o estado de fragilização das membranas no momento da colheita tende a influenciar a eficiência do US como agente extrator, promovendo a disparidade nos resultados ao longo das safras.

A rigidez da casca ainda pode estar relacionada à diferença do desempenho do US entre cultivares distintas. Para a variedade vinífera Cabernet Sauvignon, de modo geral, a aplicação do US não promoveu melhoria na concentração de compostos fenólicos do vinho, o que pode ser percebido também na avaliação do potencial fenólico da uva. Por possuir casca mais espessa do que cultivares americanas, pode ser necessária uma maior energia de sonicação para promover resultados mais satisfatórios como os observados em maior intensidade na cultivar Isabel. Na safra de 2015, ano em que a uva Cabernet Sauvignon apresentou naturalmente um maior potencial de extração evidenciado pelo menor valor de IMC% de amostras controle (não sonicadas), o US mostrou efeito positivo sobre a extratibilidade. Tal fato também leva a considerar que outros fatores relacionados à ação do US influenciam no resultado final sobre a concentração de compostos fenólicos. A formação de radicais livres durante a cavitação acústica parece ser um deles.

Nesse contexto, podemos ter o US atuando de duas maneiras. A primeira hipótese considera que a formação de radicais livres, assim como a perturbação mecânica ocasionada pela aplicação do US podem atuar como fatores de estresse para a uva. O estresse abiótico em plantas pode desencadear respostas de defesa que, entre outras, estimulam a produção de substâncias fenólicas pela ativação do metabolismo secundário vegetal (ZHAO et al., 2005). Estudos realizados por Hasan e Baek (2013) e Hasan et al. (2014) comprovam a ação elicitora do US sobre uvas, assim como Yu et al. (2016) observaram para a alface romana. A segunda hipótese trata-se de que os radicais livres formados durante a cavitação estejam sendo combatidos pelas substâncias fenólicas da uva. Tal situação também foi descrita no trabalho de Yu e colaboradores (2016). Assim como foi observado no presente estudo, a análise de amostras sonicadas que permaneceram armazenadas por diferentes períodos de tempo após a aplicação do US, e que por aqueles autores é designado período de incubação, demonstrou uma oscilação nos teores de compostos fenólicos ao longo do tempo avaliado. Deste fato pode-se inferir que para cada dose aplicada de US é necessário um tempo específico para a o desenvolvimento da resposta, de forma que esta seja suficiente para promover uma síntese maior do que a quantidade de compostos fenólicos que se degradam em função do combate aos radicais livres. Da mesma forma, este deve ser o motivo de observarmos diferentes tendências na evolução de antocianinas, taninos e polifenóis totais ao longo do período de

armazenamento após o tratamento. No momento em que estas substâncias apresentam capacidade antioxidante distinta uma das outras, cada classe de compostos tende a apresentar velocidade de reação e comportamento diferente frente aos efeitos do US.

A interação entre as substâncias antioxidantes e as espécies reativas também pode estar contribuindo para que a cultivar Cabernet Sauvignon não responda ao US da mesma maneira que a cultivar Isabel. Apesar da forte influência dos fatores edafoclimáticos, a composição de antocianinas e outros compostos fenólicos na uva, dependem primeiramente de fatores genéticos (ABE et al., 2007). Variedades viníferas geralmente possuem uma maior concentração de polifenóis que variedades americanas de forma que, em concentrações mais altas dessas substâncias, os tempos de aplicação de US testados podem não terem sido suficientes para promover uma síntese de fenólicos capaz de superar a quantidade envolvida nas reações de oxidação/redução. A formação de radicais livres durante a sonicação também já foi apontada como a causadora de aromas e gostos indesejáveis em leites e óleos vegetais (MOHAMMADI et al., 2014, CHEMAT et al., 2004), porém, a avaliação sensorial dos vinhos Cabernet Sauvignon provenientes de uvas sonicadas revelou que o uso do US, de modo geral, resultou em vinhos com características semelhantes ao de uvas não tratadas, e com maior intensidade de aromas de frutas vermelhas e notas madeirizadas. Na análise de aceitação destes vinhos, a maioria apresentou grau de aceitação similar aos demais não tratados com US.

Diante do exposto, fica evidente que a elucidação e domínio dos mecanismos sob os quais o US atua sobre células vegetais como as da uva, só será possível mediante estudos mais aprofundados. É necessário um conhecimento prévio das características, assim como do estado fisiológico da uva e, a partir destes, de como se dará o desencadeamento da resposta para que se possa prever se a aplicação do US é adequada em determinada situação e qual a melhor condição de tratamento para se alcançar o efeito almejado.

6 CONCLUSÃO

A aplicação pós-colheita de US em uvas influencia a extratibilidade e concentração de antocianinas da fruta dependendo do tempo de sonicação utilizado, podendo aumentar consideravelmente estes parâmetros em uvas da cultivar Isabel.

A utilização do US permite obter sucos de uvas com maior teor de compostos fenólicos, sobretudo de antocianinas, e maior intensidade de cor conforme o tempo de sonicação utilizado. A influência do US sobre as antocianinas e pigmentos relacionados é maior sobre a concentração do que sobre o perfil destas substâncias.

Em vinhos, a sonicação de uvas Cabernet Sauvignon pode promover acentuada degradação de antocianinas. No aspecto sensorial do produto, pode apresentar maior intensidade dos aromas de frutas vermelhas e madeirizado, não demonstrando maiores benefícios quanto à qualidade sensorial e aceitação destes vinhos.

Os efeitos do US em uvas são influenciados pelas características e condições de maturação da fruta, podendo não haver reprodutibilidade nos resultados em diferentes safras. Isto implica na necessidade de estudos mais aprofundados para que se possam estabelecer com confiabilidade as melhores condições de aplicação do US.

REFERÊNCIAS

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

AGEITEC. Agência Embrapa de informação tecnológica. **Cultivares**. 2016. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/uva_para_processamento/arvore/CONT000g5f8cou802wx5ok0bb4szwyx060i6.html. Acesso em: 20 de julho de 2016.

ALASALVAR, C.; GRIGOR, J. M.; ZHANG, D.; QUANTICK, P. C.; SHAHIDI, F. Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1410–1416, 2001.

ALBU, S.; JOYCE, E.; PANIWNKY, L et al. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, p. 261–265, 2004.

APOSTOL I.; HEINSTEIN P. F.; LOW P. S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction. **Plant Physiology**, v. 90, n. 1, p. 109–116, 1989.

ASHOKKUMAR, M. Applications of ultrasound in food and bioprocessing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 25, p. 17–23, 2015.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191–203, 2006.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; RODRÍGUEZ, J. J. Update on nonthermal food processing technologies: pulsed electric field, high hydrostatic pressure, irradiation and ultrasound. **Food Australia**, v. 54, p. 513-518, 2002.

BAUTISTA-ÓRTIN, A. B. **Técnicas enológicas para la obtención de vinos e Monastrell com alto contenido polifenólico**. 2005. 346 f. Tese (Doutorado) – Universidade de Murcia, Espanha, 2005.

BERGQVIST, J.; DOKOOZLIAN, N.; EBISUDA, N. Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the Central San Joaquin Valley of California. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 52, pg. 1-6, 2001.

BHASKARACHARYA, R. K; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. Selected Applications of Ultrasonics in Food Processing. **Food Engineering Reviews**, v. 1, p. 31–49, 2009.

BIMPILAS, A.; PANAGOPOULOU, M.; TSIMOGIANNIS, D.; OREOPOULOU, V. Anthocyanin copigmentation and color of wine: The effect of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors. **Food Chemistry**, v. 197, p. 39–46, 2016.

BLUME, B.; NQRNBERGER, T.; NASS, N.; SCHEEL, D. Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. **Plant Cell**, v. 12, p. 1425-40, 2000.

BOULTON, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 52, p. 67–87, 2001.

CALÒ, A.; TOMASI, D.; CRAVERO, M.C.; DI STEFANO, R.. Contributo alla caratterizzazione e classificazione varietale (*Vitis* sp), attraverso la determinazione degli antociani e degli acidi idrossicinnamoi tartarici della buccia di varietà a bacca rossa. **Annali dell'Istituto Sperimentale per L'Enologia Asti**, v. 25, n. 1054, p. 47-61, 1994.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; RITSCHER, P. S. **Novas cultivares brasileiras de uva**. Bento Gonçalves. Embrapa Uva e Vinho, 2010. 64 p.

CAMARGO, H. A. Porta-enxertos e cultivares – Sistema de Produção 2, Versão Eletrônica, janeiro/2003. Uvas Americanas e Híbridas para Processamento em Clima Temperado. **EMBRAPA UVA E VINHO**, 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvaAmericanaHibridaClimaTemperado/cultivar.htm>. Acesso em: 4 abr 2014.

CAPOTE, F. P.; DE CASTRO, D. L. **Analytical applications of ultrasound**. Salt Lake City: Elsevier Science, 2007.

CÁRCEL, J.A. et al. Food process innovation through new technologies: use of ultrasound. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 2, p. 200-207, 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877411002949>. Acesso em: 25 maio 2015.

CARVALHO, G. R. **Influência da aplicação de ultrassom em desidratação osmótica de carne bovina**. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2014.

J. CHANDRAPALA, C. OLIVER, S. KENTISH, M. ASHOKKUMAR, Ultrasonics in food processing, *Ultrason. Sonochem.* 19 (2012) 975–983 (Use of power ultrasound to improve extraction and modify phase transitions in food processing, *Food Rev. Int.* 29 (2013) 67–91; Ultrasonics in food processing – food quality assurance and food safety, **Trends in Food Science & Technology**, v. 26, p. 88–98, 2012.

CHANG, J. H.; SHIN, J. H.; CHUNG, I. S.; LEE, H. J. Improved menthol production from chitosan-elicited suspension culture of *Mentha piperita*, **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 1097–1099, 1998.

CHEMAT, F.; HUMA, Z.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 813-835, 2011.

CHEMAT, F.; GRONDIN, I.; SING, A. S. C.; SMADJA, J. Deterioration of edible oils during food processing by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, n. 1, p. 13–15, 2004.

CHEN, H.; CHEN, F. Effects of yeast elicitor on the grown and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 837-840, 2000.

CHEN, B.; HUANG, J.; WANG, J.; HUANG, L. Ultrasound effects on the antioxidative defense systems of *Porphyridium cruentum*. **Colloid Surface B: Biointerfaces**, v. 61, p. 88–92, 2008.

CHO, Y.J.; CHUN, H.S.; LEE, S.K.; MIN, H.Y. Ultrasonication-assisted extraction of resveratrol from grapes. **Journal of Food Engineering**, v.77, p. 725-730, 2006.

COMBE, B. Influence of temperature on composition and quality of grapes. **Proceedings of the symposium on grapevine canopy and vigor management**, p. 23-35, 1987.

CRAVERO, M. C. e Di Stefano, R. (1990). I composti fenolici e l'origine varietale delle uve. *Riv. Vitic. Enol.*, **1**: 33-44.

COMARELLA, C.G.; SAUTTER, C.K; EBERT, L.C.; PENNA, N.G. Polifenóis totais e avaliação sensorial de suco de uvas Isabel tratadas com ultrassom. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 69-73, 2012.

CORDON, N. **The influence of viticultural treatments on the accumulation of flavonoid compounds in grapes and their contribution to wine quality**. 2008. 237 p. Tese (Doutorado) – University of Adelaide, Austrália, 2008.

DEBASTIANI, G.; LEITE, A. C.; WEIBER, C. A.; BOELHOUWER, D. I. Cultura da uva, produção e comercialização de vinhos no Brasil: origem, realidades e desafios. **Revista Cesumar Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**, v. 20, n. 2, p. 471-485, 2015.

DE FREITAS, V; MATEUS, N. Chemical transformations of anthocyanins yielding a variety of colours (Review). **Environmental Chemistry Letters**, v. 4, p. 175–183, 2006.

DE FREITAS V. A. P.; GLORIES Y.; MONIQUE A. Development changes of procyanidines in grapes of red *Vitis vinifera* varieties and their composition in respective wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 51, p. 397- 403, 2000.

DEMIRDÖVEN, A.; BAYSAL, T. The use of ultrasound and combined technologies in food preservation. **Food Reviews International**, v. 25, p. 1-11, 2009.

DOBREI, A.; POIANA, M. A.; SALA, F.; GHITA, A.; GERGEN, I. Changes in the chromatic properties of red wines from *Vitis vinifera* L. cv. Merlot and Pinot Noir during the course of aging in bottle. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, v. 8, p. 20–24, 2010.

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

EBEL, J.; MITHOEFER, A. Early events in the elicitation of plant defense. **Planta**, v. 206, p. 335–348, 1998.

EMBRAPA. A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas. 2014. Disponível em: <http://www.cnpqv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura>. Acesso em: 20 de jul 2016.

EMBRAPA. **Desempenho da vitivinicultura brasileira em 2015**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/9952204/artigo-desempenho-da-vitivinicultura-brasileira-em-2015>. Acesso em 20 de julho de 2016.

FANG, F.; LI, J. M.; PAN, Q. H.; HUANG, W. D. Determination of red wine flavonoids by HPLC and affect aging. **Analytical, Nutrition and Clinical Methods**, v.101, p. 428-433, 2007.

FENG, H.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.; WEISS, J. **Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing**. Oxford: Springer, 2010, 678p.

FERRER-GALLEGO, R.; HERNÁNDEZ-HIERRO, J. M.; RIVAS-GONZALO, J. C.; ESCRIBANO-BAILÓN, M. T. Influence of climatic conditions on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv. Graciano. **Analytica Chimica Acta**, v. 732, p. 73–77, 2012.

FLAMINI, R. Recent applications of mass spectrometry in the study of grape and wine polyphenols. **ISRN Spectroscopy**, 2013. 45 p.

GIOVANNINI, E. **Uva agroecológica**. Porto Alegre: Renascença, 2001. 136 p.

HAMINIUK, C. W. I.; MACIEL, G. M.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; PERALTA, R. M. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 2023–2044, 2012.

HASAN, MD. M.; BAEK, K. H. Induction of Resveratrol Biosynthesis in Grape Skins and Leaves by Ultrasonication Treatment. **Korean Journal of Horticultural Science & Technology**, v. 31, n. 4, p. 496-502, 2013.

HASAN, MD. M.; YUN, H. K.; KWAK, E. J.; BAEK, K. H. Preparation of resveratrol-enriched grape juice from ultrasonication treated grape fruits. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, p. 729–734, 2014.

HERMOSÍN GUTIÉRREZ, I.; SÁNCHEZ-PALOMO LORENZO, E.; VICARIO ESPINOSA, A. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. **Food Chemistry**, 92, p. 269–283, 2005.

HERNÁNDEZ-HIERRO, J. M.; QUIJADA-MORÍN, N.; RIVAS-GONZALO, J. C.; ESCRIBANO-BAILÓN, M. T. Influence of the physiological stage and the content of soluble solids on the anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grapes. **Analytica Chimica Acta**, 732, p. 26–32, 2012.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1821–1835, 2011.

JIN, H.; SHIN, J.; KIM, J.; CHUNG, S.; LEE, H.. Effect of chitosan elicitation and media components on the production of anthraquinones colorants in Madder (*Rubia akane* Nakai) cell culture. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 4, p. 300–304, 1999.

JOERSBO, M.; BRUNSTEDT, J. Sonication: a new method for gene transfer to plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, p. 230–234, 1992.

KATALINIC, V.; MALES, P. Compositional changes in grape polyphenols throughout maturation. **Journal of Wine Research**, v. 8, n. 3, p. 169-177, 1997.

KENNEDY, J. A.; MATTHEWS, M. A.; WATERHOUSE, A. L. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. **Phytochemistry**, v. 55, p. 77–85, 2000.

KENNEDY, J. A. Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 35, n. 2, p. 107-120, 2008.

KNORR, D.; ZENKER, M.; HEINZ, V.; LEE, D. U. Applications and potential of ultrasonics in food processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 261–266, 2004.

KOMBRINK, E.; HAHLBROCK, K. Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. **Plant Physiology**, v.1 p.216–221, 1986. Disponível em: <http://www.plantphysiol.org/content/81/1/216.full.pdf+html>. Acesso em: 14 abr. 2015.

LAROUSSE DO VINHO. Consultoria Charlotte Marc e Ricardo Castilho. São Paulo: Larousse do Brasil, 2004. 381 p.

LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. **A Viticultura do Semi-Árido Brasileiro**, EMBRAPA Semi-Árido, Petrolina, 2000. 366 p.

LEADLEY, E.; WILLIAMS, A. Procesado com pulsos electricos, ultrasonidos de potencia y otras tecnologias emergentes. In: BRENNAM, J.G. **Manual del procesado de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, p.203-237, 2008.

LIN, L.; WU, J.; HO, K-P.; QI, S. Ultrasound-induced physiological effects and secondary metabolite (saponin) production in *Panax ginseng* cell cultures. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 27, n. 8, p. 1147–1152, 2001.

LIN, L.; WU, J.; HO, K-P.; QI, S. Ultrasound-induced physiological effects and secondary metabolite (saponin) production in *Panax ginseng* cell cultures. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 27, n. 8, p. 1147–1152, 2001.

LINGYU YU; GIURGIUTIU, V. Multi-mode Damage Detection Methods with Piezoelectric Wafer Active Sensors. **Journal of Intelligent Material Systems and Structures**, Michigan, v. 20, n. 11, p. 1329-1341, 2009.

LIU, Y.; TAKATSUKI, H.; YOSHIKOSHI, A.; WANG, B.; SAKANISHI, A. Effects of ultrasound on the growth and vacuolar H1-ATPase activity of aloe arborescens callus cells. **Colloid Surface B: Biointerfaces**, v. 32, p.105–116, 2003.

MAGALHÃES, N. **Tratado de Viticultura. A Videira, a Vinha e o Terroir**. Publicações Chaves Ferreira, Lisboa. 605 pp, 2008.

MANACH, C.; MORAND, C.; CRESPIY, V.; DEMIGNÉ, C.; TEXIER, O.; RÉGÉRAT, F.; RÉMÉSY, C. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. **FEBS Letters**, v. 426, p. 331-336, 1998.

MASON, T., RIERA, E., VERCET, A., & LOPEZ-BUESA, P. Application of ultrasound. In D. W. Sun (Ed.), **Emerging technologies for food processing**. California: Elsevier Academic Press, p.323-350, 2005.

MATSUBARA, S, RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 380-385, 2006.

MCCLEMENTS, D.J. Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 293- 299, 1995.

MERT-TÜRK, F., Phytoalexins: defence or just a response to stress? **J. Cellular and Molecular Biology**, v.1, p.1–6, 2002.

MILLER, D. L.; WILLIAMS, A. R.; MORRIS, J. E.; CHRISLER, W. B. Sonoporation of erythrocytes by lithotripter shock waves in vitro. **Ultrasonics**, v. 36, p. 947–952, 1998.

MORENO, A.; CASTRO, M.; FALQUÉ, E. Evolution of trans- and cis-resveratrol content in red grapes (*Vitis vinifera* L. cv Mencía, Albarello and Merenzao) during ripening. **European Food Research and Technology**, v. 227, p. 667-674, 2008.

MOHAMMADI, V., GHASEMI-VARNAMKHAZI, M., EBRAHIMI, R., ABBASVALI, M. Ultrasonic techniques for the milk production industry. Measurement: **Journal of the International Measurement Confederation**, 58, p. 93–102, 2014.

MULET, A.; BENEDITO, J.; BON, J.; SANJUÁN, N. Low intensity ultrasonics in food technology. **Journal of Food Engineering**, v. 5, n. 4, p. 285-297, 1999.

NASS, L. L. Recursos genéticos vegetais. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos Vegetais e Biotecnologia**, 2007. 858p.

NASCIMENTO, L. C.; LIMA, L. C. O.; PICOLLI, R. H.; FIORINI, J. E.; DUARTE, S. M. S.; SILVA, J. M. S. F.; OLIVEIRA, N. M. S.; VEIGA, S. M. O. M. Ozônio e ultra-som: 60 processos alternativos para o tratamento do café despulpado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 282-294, 2008.

NOGALES-BUENO, J.; HERNÁNDEZ-HIERRO, J. M.; RODRÍGUEZ-PULIDO, F. J.; HEREDIA, F. J. Determination of technological maturity of grapes and total phenolic

compounds of grape skins in red and white cultivars during ripening by near infrared hyperspectral image: A preliminary approach. **Food Chemistry**, v. 152, p. 586–591, 2014.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismo de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATHI, H.; AMORIN, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. Pompéia: Ceres, cap. 22, p. 417-453, 1995.

PATIST, A.; BATES, D. Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.9, p.147–154, 2008.

POMMER, C. V.; TERRA, M. M.; PIRES, E. J. P. Cultivares de videira. In: POMMER, C. V. Ed. **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes. p. 109-294, 2003.

POVEY, J. W.; MASON, T. J. **Ultrasound in Food Processing**. Oxford: Springer, 1998.

PIYASENA, P. et al. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, p. 207-216, 2003.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÉCHE, B.; LONVAUD, A. **Handbook of Enology: the microbiology of wine and vinifications**. 2ed. Wiley & Sons, 2006. 429 p.

RIBEREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOIEU, D. **Tratado de enologia; Química del vino. Estabilización y tratamientos**. Hemisferio Sur, 2003.

RICE-EVANS, C. A.; PARCKER, L. **Flavonoids in health and disease**. Marcel Dekker. Inc. New York. p.1-41, 2003.

RICHTER, G. T. **Nitrogênio total em pecíolo de videiras e nitrogênio amoniacal, assimilável e total em uvas e mostos**. 2008. 101p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2008.

RIESZ, P., & KONDO, T. Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. **Free Radical Biological Medicine**, v. 13, p. 247-270, 1992.

RIZZON, L. A.; MIELE, A.; MENEGUZZO, J. Avaliação da uva cv. Isabel para a elaboração de vinho tinto. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 115-121, 2000.

RODRIGUEZ - SAONA, L. E.; WROLSTAD, R. E. Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. **Current protocols in food analytical chemistry**, 2001.

ROMBALDI, C. V.; BERGAMASQUI, M.; LUCCHETTA, L.; ZANUZO, M.; SILVA, J. A. Produtividade e qualidade de uva, cv. Isabel, em dois sistemas de produção. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 89-91, 2004.

RUDOLF, J. R.; RESURRECCION, A. V. A. Elicitation of Resveratrol in Peanut Kernels by Application of Abiotic Stresses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 10186-10192, 2005.

RUSTIONI, L., BEDGOOD, D. R., FAILLA, O., PRENZLER, P. D., & ROBARDS, K. Copigmentation and anti-copigmentation in grape extracts studied by spectrophotometry and post-column-reaction HPLC. **Food Chemistry**, v. 132, p. 2194–2201, 2012.

SAKAKIBARA, M.; WANG, D.; TAKAHASHI, R.; TAKAHASHI, K.; MORI, S. Influence of ultrasound irradiation on hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 444–448, 1996.

SALES, J. M.; RESURRECCION, A. V. A. Maximizing phenolics, antioxidants and sensory acceptance of UV and ultrasound-treated peanuts. **Food Science and Technology**. v. 43, p. 1058-1066, 2010.

SCOLLARY, G. R. Tannin review. Grape and wine research and development corporation, p.1-132, 2010. Disponível em http://www.gwrdc.com.au/webdata/resources/project/GWR_0905.pdf. Acesso em: 22 jan 2016.

SHIRSATH, S. R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. **Chemical Engineering and Processing**, v. 53, p. 10– 23, 2012.

SOKMEN, M.; ANGELOVAB, M.; KRUMOVA, E.; PASHOVA, S.; IVANCHEVA, S.; SOKMEN, A.; SERKEDJIEVA, J.. In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. **Life Sciences**, v. 76, p. 2981–2993, 2005.

SORIA, A. C.; VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 323-331, 2010.

SPÁCIL, Z.; NOVÁKOVÁ, L.; SOLIDH, P. Analysis of phenolic compounds by high performance liquid chromatography. **Talanta**, v.76, p.189-199, 2008.

SUSLICK, K. S. **Homogeneous sonochemistry**. In K. S. Suslick (Ed.), *Ultrasound: Its chemical, physical, and biological effects*. New York: VCH Publishers, p.123-163, 1988.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 722p.

TARARA, J.; LEE, J.; SPAYD, S.; SCAGEL, C. Berry temperature and solar radiation alter acylation, proportion, and concentration of anthocyanin in Merlot grapes. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 59, p. 235-27, 2008.

TASCHETTO, S. Uva Isabel, safra 2015. Fotografia, color. Foto de uva Isabel, safra 2015 cultivada em vinhedo localizado no Sítio Araucária, Itaara, RS, Brasil.

VASCONSUELO, A.A.; GIULETTI, A.M.; PICOTTO, G.; RODRIGUEZ-TALOU, J.; BOLAND, R. Involvement of the PLC/PKC pathway in chitosan-induced anthraquinone production by *Rubia tinctorum* L. cell cultures. **Plant Science**, v. 165, p. 429–436, 2003.

VASCONSUELO, A.; BOLAND, R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. **Plant Science**, v. 172, p. 861–875, 2007.

VIDAL, S.; FRANCIS L.; NOBLE, A.; KWIATKOWSKI, M.; CHEYNIER, V.; WATERS, E. Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 57–65, 2004.

VILLAMIEL, M.; DE JONG, P. Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins, and native enzymes of milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 472-478, 2000.

VILKHU, K.; MAWSON, R.; SIMONS, L et al. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—a review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, p. 161–169, 2008.

WANG, L. E ZHANG, H. A theoretical study of the different radical-scavenging activities of catechin, quercetin, and a rationally designed planar catechin. **Bioorganic Chemistry**, v. 33, p. 108-115, 2005.

WU, J.; GE, X. Oxidative burst, jasmonic acid biosynthesis, and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus chinensis* cell suspension cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v.85, p.714–721, 2004.

WU, J.; LIN, L. Elicitor-like effects of low-energy ultrasound on plant (*Panax ginseng*) cells: induction of plant defense responses and secondary metabolite production. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 59, p. 51-57, 2002.

YU, J.; ENGESETH, N. J.; FENG, H. High intensity ultrasound as an abiotic elicitor - Effects on antioxidant capacity and overall quality of romaine lettuce. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, p. 262–273, 2016.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 283–333, 2005.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do estudo: Ultrassom como elicitor abiótico em uvas e seus efeitos sobre os compostos fenólicos do suco e vinho.

Pesquisador(es) responsável(is): Prof^ª. Dr^ª. Neidi Garcia Penna

Instituição/Departamento: Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos.

Telefone para contato: (55) 3220-8254

Local da coleta de dados: Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Laboratório de Análise Sensorial

Prezado(a) Senhor(a):

Você está sendo convidado(a) a provar um produto com teor alcoólico e após responder às perguntas deste questionário de forma totalmente voluntária. Antes de concordar em participar desta pesquisa e responder este questionário, é muito importante que você compreenda as informações e instruções contidas neste documento. Os pesquisadores deverão responder todas as suas dúvidas antes que você se decida a participar. Você tem o direito de desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha direito.

Objetivo do estudo. Avaliar os efeitos da aplicação pós-colheita de ultrassom em uvas, e sua influência nas características sensoriais do suco e vinho elaborados a partir destas.

Procedimentos. Sua participação nesta pesquisa consistirá apenas em provar as amostras de vinho e o preenchimento deste questionário de acordo com suas opiniões sobre este produto.

Benefícios. Esta pesquisa trará maior conhecimento sobre o tema abordado, sem benefício direto para você.

Riscos. A realização desta degustação pode oferecer riscos a indivíduos que possuem intolerância ou hipersensibilidade a substâncias comumente presentes no vinho, podendo ocasionar quadros de alergia, náuseas e desconforto abdominal, bem como os relacionados ao consumo de bebida alcoólica, como tontura, dor de cabeça, mal estar geral, diminuição dos reflexos e coordenação motora.

Sigilo. As informações fornecidas por você terão sua privacidade garantida pelos pesquisadores responsáveis. Os sujeitos da pesquisa não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

Ciente e de acordo com o que foi anteriormente exposto, estou de acordo em participar desta pesquisa, assinando este consentimento em duas vias, ficando com a posse de uma delas.

.....
Participante

Santa Maria,, de de 20....

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

.....
Pesquisador responsável

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato: Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM - Cidade Universitária - Bairro Camobi, Av. Roraima, nº1000 - CEP: 97.105.900 Santa Maria – RS. Telefone: (55) 3220-9362 – Fax: (55)3220-8009 Email: comiteeticapesquisa@smail.ufsm.br. Web: www.ufsm.br/CEP

APÊNDICE B – FICHA DE ESCALA NÃO ESTRUTURADA PARA AVALIAÇÃO SENSORIAL DE VINHOS CABERNET SAUVIGNON

Nome _____ Data: ___/___/___

Código da amostra: _____

DESCRITOR

Aparência

1. Cor vermelho rubi:

_____ | _____
Fraco | Forte

2. Formação de lágrimas:

_____ | _____
Pouco | Muito

3. Translúcido:

_____ | _____
Pouco(opaco) | Muito(Translúcido)

Aroma

5. Herbáceo/vegetal:

_____ | _____
Nada | Forte

6. Alcoólico:

_____ | _____
Fraco | Forte

7. Frutas vermelhas:

_____ | _____
Nada | Forte

8. Frutas maduras:

_____ | _____
Nada | Forte

9. Caramelizado/adocicado:

_____ | _____
Nada | Forte

10. Floral:

_____ | _____
Nada | Forte

Sabor

11. Frutado:

_____ | _____
Nada | Forte

12. Madeirizado:

_____ |
 Nada | Forte

13. Ácido:

_____ |
 Fraco | Forte

14. Amargo:

_____ |
 Fraco | Forte

Sensações Bucais

15. Adstringência:

_____ |
 Fraco | Forte

16. Pungente:

_____ |
 Fraco | Forte

17. Persistência:

_____ |
 Fraco | Forte

18. Corpo:

_____ |
 Fraco | Forte

Comentários: _____

Teste de Aceitação

Avalie globalmente esta amostra de vinho tinto e aponte o seu grau de gostar ou desgostar utilizando a escala abaixo.

(7) Gostei extremamente

(6) Gostei moderadamente

(5) Gostei ligeiramente

(4) Não gostei nem desgostei

(3) Desgostei ligeiramente

(2) Desgostei moderadamente

(1) Desgostei extremamente

----- ()

Amostra