

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

**COMPOSTOS FENÓLICOS EM UVAS E VINHOS DA
VARIEDADE MERLOT**

TESE DE DOUTORADO

Aline de Oliveira Fogaça

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**COMPOSTOS FENOLICOS EM UVAS E VINHOS TINTOS DA
VARIEDADE MERLOT**

Aline de Oliveira Fogaça

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

Orientador: Prof. PhD. Carlos Eugenio Daudt

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Fogaça, Aline de Oliveira
Compostos fenólicos em uvas e vinhos da variedade merlot / Aline de Oliveira Fogaça.-2012.
140 p.; 30cm

Orientador: Carlos Eugenio Daudt
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, RS, 2012

1. Antocianinas 2. Taninos 3. Copigmentação 4. Maturação fenólica I. Daudt , Carlos Eugenio II. Título.

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

**COMPOSTOS FENÓLICOS EM UVAS E VINHOS DA VARIEDADE
MERLOT**

elaborada por
Aline de Oliveira Fogaça

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. PhD. Carlos Eugenio Daudt
(Presidente/Orientador)

Prof^a. Dr^a. Neidi Garcia Penna

Prof. Dr. Gustavo González-Neves

Prof. Dr. Plinho F. Hertz

Prof. Dr. Roger Wagner

Santa Maria, 23 de abril de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Carlos Daudt não somente pela orientação deste trabalho, mas por todos os ensinamentos ao longo dessa caminhada, que na verdade iniciou em 2001 com uma bolsa de iniciação científica, passou por um mestrado e chegou ao doutorado! Obrigada por todos os conselhos, orientações e ensinamentos. Obrigada pela confiança depositada em mim.

A Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade.

Ao Centro Universitário Franciscano pelo apoio nas análises e aos colegas, especialmente a Silvana Bertagnolli, companheira de dúvidas e preocupações analíticas.

A Vinícola Velho Amâncio pela cedência das instalações e apoio na realização deste trabalho.

Aos professores da banca de qualificação: Gustavo González Neves, Juliano Barin, Neidi Penna e Roger Wagner, obrigada pela ajuda com o projeto.

A Vinícola Valmarino, Rigo Agropecuária e Irmãos Camponogara pela cedência das amostras.

Ao prof. Roger Wagner, obrigada pelos ensinamentos de estatística e ajuda com as análises no Pirouette.

As alunas e colegas de experimentos Tássia Silveira, Florência Sainz Perez e Leci Santos, pela ajuda na realização das análises.

A minha família, pelo apoio e incentivo durante a realização do curso. Um agradecimento especial a minha mãe, pela ajuda incansável nos momentos de correria, pelo exemplo de responsabilidade e apoio incondicional, mesmo nos momentos mais difíceis,

Ao Alisson, obrigada por tudo, pelo companheirismo na busca e na coleta de amostras, pela ajuda nos experimentos, pelo apoio nos momentos de preocupação, na verdade, por ser companheiro de todas as horas.

A todos os amigos pela convivência e apoio.

A todos, o meu muito obrigado.

RESUMO

Tese de doutorado

Programa de Pós – Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Universidade Federal de Santa Maria

COMPOSTOS FENÓLICOS EM UVAS E VINHOS DA VARIEDADE MERLOT

Autora: Aline de Oliveira Fogaça

Orientador: PhD. Carlos Eugenio Daudt

Local e data da defesa : Santa Maria, 23 de abril de 2012.

O objetivo principal deste trabalho foi realizar um estudo dos compostos fenólicos em uvas e vinhos da variedade tinta *Vitis vinifera* Merlot, cultivadas em vinhedos dos municípios de Dom Pedrito (região da Campanha Gaúcha) e de Bento Gonçalves (região da Serra Gaúcha). Para tanto os seguintes aspectos foram avaliados: maturação fenólica e industrial de uvas amostradas; correlação entre o potencial fenólico estimado nas uvas com a composição fenólica e a cor dos vinhos resultantes; mudanças nos teores de compostos fenólicos dos vinhos elaborados e efeito do tipo de maceração sobre os compostos fenólicos dos vinhos. O estudo foi realizado por três safras: 2009, 2010 e 2011. Após a análise da maturação fenólica e industrial, amostras destas uvas foram vinificadas em pequena escala, com diferentes técnicas de maceração. Os vinhos foram analisados após o engarrafamento e durante o envelhecimento em relação ao conteúdo de compostos fenólicos. As uvas e os vinhos da variedade tinta Merlot apresentaram diferenças de acordo com a localização do vinhedos, sendo que as características das uvas foram mais importantes para o vinho resultante do que as técnicas de vinificação empregadas. Foram encontradas diferenças importantes no conteúdo e no comportamento dos compostos fenólicos entre as duas regiões representadas nesse estudo, tanto em relação a uva quanto ao vinho. As uvas cultivadas nos vinhedos do município de Dom Pedrito atingem uma maturação celular adequada, no entanto, o teor de antocianinas é menor e o teor de taninos nas sementes é superior a 50%, comportamento oposto as uvas cultivadas no município de Bento Gonçalves. A análise do potencial fenólico das uvas permite estimar o conteúdo de polifenóis totais, a porcentagem da cor devido a antocianinas poliméricas e a quantidade de procianidinas presentes no vinho a ser elaborado com uvas dessa variedade. Em relação a técnica de vinificação para a região de Dom Pedrito, recomenda-se o uso de maceração estendida (15 dias no mínimo), porém há uma tendência de elevação do valor de pH do vinho resultante; o esmagamento total ou não da uva não irá influenciar esse aspecto. Durante o envelhecimento, os vinhos apresentaram resultados de acordo com a região de origem da uva, sendo que os vinhos de Dom Pedrito apresentam uma maior velocidade de polimerização; as diferenças entre os tempos de maceração diminuem com o envelhecimento do vinho para todos os vinhos analisados nesse estudo. As principais diferenças entre os vinhos dos dois municípios estudados deve-se a intensidade de cor, ao conteúdo de antocianinas, a porcentagem de cor devido a antocianinas poliméricas e ao teor de polifenóis totais nos vinhos. Estes fatos permitem afirmar, em parte, que os vinhos Merlot da Serra Gaúcha podem ser envelhecidos por mais tempo e que os vinhos Merlot oriundos da Campanha Gaúcha podem e devem ser consumidos mais jovens.

Palavras – chaves : Antocianinas. Taninos. Copigmentação. Maturação fenólica

ABSTRACT

Thesys of Doctorate

Post-Graduate Program in Food Science and Techonology

Federal University of Santa Maria, RS, Brasil

PHENOLIC COMPOUNDS IN MERLOT GRAPES AND WINES

Author : Aline de Oliveira Fogaça

Adviser: PhD. Carlos Eugenio Daudt

Place and data of defese: Santa Maria, April, 2012.

The main aim of this work was to evaluate the phenolic compounds of Merlot grapes and wines, from vineyards located at Dom Pedrito (Campanha Gaúcha) and Bento Gonçalves (Serra Gaúcha). The following aspects were evaluated: fenolic and industrial ripeness; correlation between the grapes' phenolic potencial and the wine' phenolics; changes in phenolic compounds during the aging of the wines; impacto of maceration time of wine phenolic composition. The study was conducted for three years: 2009, 2010 and 2011. After grape ripeness evaluations, grape samples were harvested, crushed and fermented , with three different maceration techniques. The phenolic composition of the wines were analyzed after bottling and during aging. The vineyard localization have a great influence on Merlot wine phenolic composition; the grape characteristics was most important than maceration techniques to the wine composition. Important differences, among this two regions, have been found in the content and in the composition of phenolic compounds in the grapes and wines. Dom Pedrito grapes achieved a good cellular maturity, however, when compared with Bento Gonçalves grapes, the anthocyanin content is lower and the quantity of seeds tannins are higher than 50%. The phenolic potential allowed to estimate the total phenolic content, color due polymeric anthocyanins and procyanidin content of Merlot wines. Extended maceration (15 days) are recommended to Dom Pedrito grapes, however it is observed an increase in the pH value; the total crushing of grapes or not will not influence this aspect. During the aging, the results are dependent of vineyard location; Dom Pedrito wines showed a greater polimerization velocity and the differences among maceration times decreased for all wines studied. The main differences among wines from this two regions were color intensity, anthocyanin content, color due polymeric anthocyanin and total phenolic conten of the wines. These facts allows to state that Merlot wines from Serra Gaúcha could be aging for a periodo greater than Campanha Gaúcha wines.

Keywords: Anthocynins. Tannins. Copigmentation. Phenolic ripeness

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Objetivos	15
1.1.1 Objetivos específicos	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Compostos Fenólicos	17
2.1.1 Flavonóides.....	18
2.1.2 Não Flavonóides	19
2.2 Compostos fenólicos em uvas	23
2.2.1 Biossíntese de fenóis em uvas	25
2.2.2 A influência do clima	27
2.2.3 Maturação fenólica de uvas	29
2.3 Compostos fenólicos em vinhos	33
2.3.1 Extração de compostos fenólicos durante a vinificação	33
2.3.2 Métodos para aumentar a extração de cor.....	36
2.4 Principais reações dos compostos fenólicos em uvas e vinhos.....	38
2.4.1 Reações das antocianinas	38
2.4.2 Copigmentação em Vinhos.....	40
2.4.3 Formação de pigmentos poliméricos estáveis.....	43
2.5 Análise de Compostos Fenólicos.....	49
2.5.1 Metodologias.....	49
2.6 Métodos por Espectrofotometria	50
2.6.1 Compostos Fenólicos.....	50
2.6.2 Antocianinas.....	53
2.6.3 Análise de Copigmentação	55
2.6.4 Não Flavonóides.....	56
2.6.5 Taninos.....	56
3. ARTIGOS	61
3.1 ARTIGO 1: Potencial Fenólico de uvas da variedade Merlot e sua correlação com a composição fenólica dos vinhos	61
Resumo.....	62
Abstract.....	63
Introdução	63
Material e Métodos	65
Resultados e Discussão	67
Conclusões	71
Referências Bibliográficas	72
3.2 ARTIGO 2: Copigmentation and color of Brazilian Merlot wines: I. Influence of skin contact time.....	79
Abstract.....	79
Résumé	80
Introduction.....	81
Materials And Methods	83
Results and Discussion	84
Conclusion	90
References	91
3.3 ARTIGO 3: Evolução dos Compostos Fenólicos e da cor em vinhos tintos da variedade Merlot.....	93
Resumo.....	93

Abstract.....	94
Introdução	94
Material e Métodos.....	96
Resultados e Discussão	97
Conclusões	101
Referências Bibliográficas	102
3.4 ARTIGO 4: Phenolic compounds in Merlot wines from two wine regions of Rio Grande do Sul, Brazil	104
Abstract.....	111
Introduction	111
Material and Methods	112
Results and Discusion	113
References.....	116
4. DISCUSSÃO.....	125
5. CONCLUSÕES.....	129
6. REFERENCIAS	131

1 INTRODUÇÃO

A idéia deste estudo surgiu a partir de uma demanda do setor vitivinícola brasileiro atual. O Rio Grande do Sul, principal produtor brasileiro de uvas e de vinhos finos, elaborou, na safra 2011, 47,6 milhões de litros de vinho fino. A uva da variedade tinta Merlot destaca-se como importante variedade nesse cenário, perdendo apenas para a variedade tinta Cabernet Sauvignon (MELLO, 2012).

A Campanha Gaúcha, localizada na região da Metade Sul do estado do Rio Grande do Sul, possui um excelente potencial para a produção de uvas viníferas, devido ao clima favorável para estas cultivares. Ao longo dos últimos anos, tem consolidado-se como região produtora de vinhos finos brasileiros. O clima desta região apresenta maior insolação e menor quantidade de chuva no período da maturação da uva e na época da vindima, quando comparada com a Serra Gaúcha. Esta condição é essencial para a produção de vinhos finos de qualidade, conforme confirmado por inúmeros pesquisadores (DAUDT et al., 1973; MOTTA, 2003) e até mesmo pela indústria vinícola brasileira.

Entretanto, duas questões principais surgiram: por quê os vinhos desta nova região apresentam menor intensidade de cor e por quê estes estão prontos para serem comercializados mais rapidamente do que os vinhos elaborados na tradicional região brasileira vitivinícola, a Serra Gaúcha.

Regiões com clima quente, tais como a Campanha Gaúcha, podem produzir uvas com altos teores de açúcares, o que pode resultar em vinhos excessivamente alcoólicos, além de uma suposta deficiência em cor, fato já relatado por pesquisadores da região de Mendoza, Argentina (CATANIA; AVAGNINA, 2007) e da Espanha (KOUNTOUidakis et al., 2008). Catania e Avagnina (2007) relatam que, em regiões de clima quente, a maturação da polpa é mais rápida que a dos demais componentes do grão e se chega a uma maturidade tecnológica com as sementes e a casca ainda imaturas, obtendo-se vinhos herbáceos e com pouca cor, ou seja, a maturação dita tecnológica ocorre antes da maturação fenólica das uvas, conceito definido por Glories (2001). Podemos dizer que a deficiência de cor e o excesso de álcool nos vinhos ocorrem devido à dificuldade de se estabelecer o ponto de colheita mais adequado.

Estudos realizados por Daudt e Polenta (1999), com uvas viníferas provenientes das regiões acima mencionadas, mostraram que estas realmente apresentam diferenças em relação à quantidade de compostos fenólicos (Tabela 1). Porém, os mesmos autores afirmam que a

análise das causas destas diferenças exige um estudo mais complexo e aprofundado. Santos (2011), analisando amostras de vinhos tintos da variedade Cabernet Sauvignon, observou que há uma diferença significativa de tonalidade entre os vinhos elaborados nas diferentes regiões do Rio Grande do Sul. Os compostos fenólicos em uvas e vinhos são alvo de um grande número de estudos em todo o mundo. Há uma farta disponibilidade de artigos sobre quantificação destes compostos em uvas e vinhos. Entretanto, no Brasil, os estudos ainda são escassos.

Tabela 1 – Fenóis totais, flavonóides e não-flavonóides (mg.L^{-1} ácido gálico), em vinhos tintos da variedade Cabernet Sauvignon, de duas diferentes regiões.

Região	Fenóis Totais	Flavonóides	Não Flavonóides
Serra Gaúcha	1.970,0	1.786,0	109,1
Campanha Gaúcha	1.410,0	1.323,0	87,3

Fonte: adaptado de Daudt e Polenta (1999).

O mercado consumidor de vinhos finos está cada vez mais exigente, sendo a qualidade dos vinhos imprescindível. Analisando o mercado brasileiro, pode-se dizer que o consumidor procura vinhos tintos mais jovens (02 a 04 anos), encorpados, com pouca acidez e com muita cor. A Campanha Gaúcha destaca-se nesse cenário por produzir vinhos com pouca acidez e baixa adstringência, mas deficientes em cor e muito alcoólicos.

A cor tem um papel determinante na qualidade sensorial de um vinho, sendo talvez a característica que mais imediatamente impressiona o provador e o consumidor. Resultante da presença de vários compostos, a cor é devida, no vinho tinto, essencialmente à presença de compostos fenólicos, em particular as antocianinas, responsáveis por um largo espectro de cores, indo do laranja ao violeta, passando pelo vermelho. A cor dos vinhos tintos é também devida a composição de pigmentos denominados poliméricos (RICARDO DA SILVA et al., 2003). Entretanto, a composição química de um vinho é extremamente complexa, com os pigmentos poliméricos sofrendo mudanças desde o momento em que as uvas são esmagadas, durante a fermentação, durante a prensagem e, por fim, durante o envelhecimento (ZIMMAN et al., 2004).

Um entendimento mais completo e profundo sobre as diferenças entre regiões produtoras de uvas e vinhos, das características dos vinhos resultantes e das técnicas mais

adequadas à realidade das regiões justifica-se no cenário vinícola mundial. Espera-se com esse trabalho chegar a resultados práticos, úteis as vinícolas brasileiras.

A proposta deste trabalho foi estudar os compostos fenólicos em uvas e vinhos da variedade tinta *Vitis vinifera* Merlot cultivadas no Rio Grande do Sul; para tanto, foram escolhidos vinhedos localizados em duas importantes regiões vitivinícolas do estado: Serra Gaúcha (representado pelo município de Bento Gonçalves) e Campanha Gaúcha (município de Dom Pedrito).

Os fenóis são um grupo amplo e diverso de compostos, com várias metodologias descritas para sua determinação, uma das principais dificuldades é o grande número de compostos com alto peso molecular. Um exemplo é a pesquisa de compostos poliméricos via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando coluna C18 com fase reserva, essa metodologia tem seu uso limitado porque esses compostos tipicamente são eluídos juntos, como uma banda larga (envelope), o que dificulta sua avaliação (Versari et al., 2008). A falta de padrões para o estudo das procianidinas é outro problema, uma vez que ainda não há padrões comerciais disponíveis.

A finalidade deste estudo era responder aspectos práticos, que sejam úteis as vinícolas no sentido de melhorar o entendimento das características das uvas e dos vinhos produzidos, auxiliando na decisão de alguns procedimentos, dessa forma, optou-se pelo estudo de grupos fenólicos e não pela análise de compostos isolados.

1.1 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi realizar um estudo dos compostos fenólicos em uvas e vinhos da variedade tinta *Vitis vinifera* Merlot cultivadas em vinhedos localizados no município de Dom Pedrito (região da Campanha Gaúcha) e no município de Bento Gonçalves (região da Serra Gaúcha).

1.1.1 Objetivos específicos

* Avaliar a maturação fenólica e industrial de uvas amostradas.

* Avaliar a correlação entre o potencial fenólico estimado nas uvas com a composição fenólica e a cor dos vinhos resultantes.

* Acompanhar as mudanças nos teores de compostos fenólicos e na cor de vinhos elaborados

* Avaliar o efeito do tipo de maceração sobre os compostos fenólicos e cor dos vinhos elaborados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são compostos que apresentam um ou mais grupos hidroxilas ligados a um anel aromático, sendo o hidrogênio da hidroxila fenólica lábil, o que torna os fenóis ácidos fracos. O termo fenóis refere-se a um grupo químico de compostos amplo e diverso, que pode ser classificado de várias maneiras (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

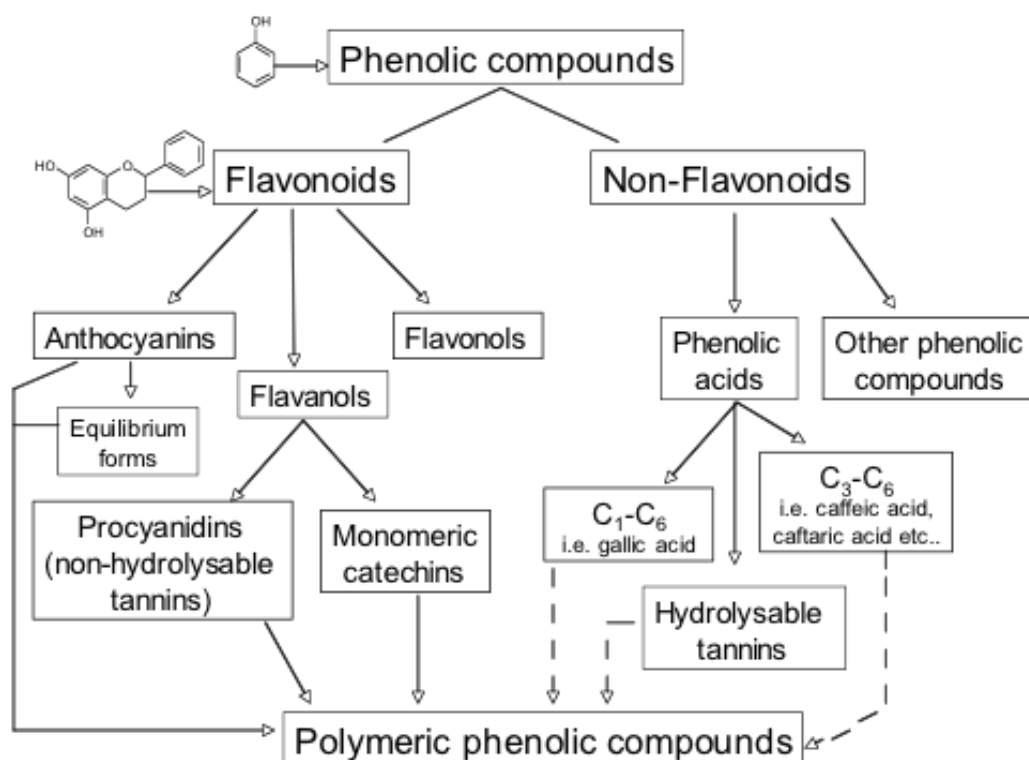


Figura 1 - Diversidade de compostos fenólicos no vinho. Fonte: Scollary (2010).

No vinho, há uma diversidade muito grande de compostos fenólicos, e pode-se dividir os compostos fenólicos em dois grandes grupos: flavonóides e não flavonóides (Figura 1) (SCOLLARY, 2010).

2.1. 2 Flavonóides

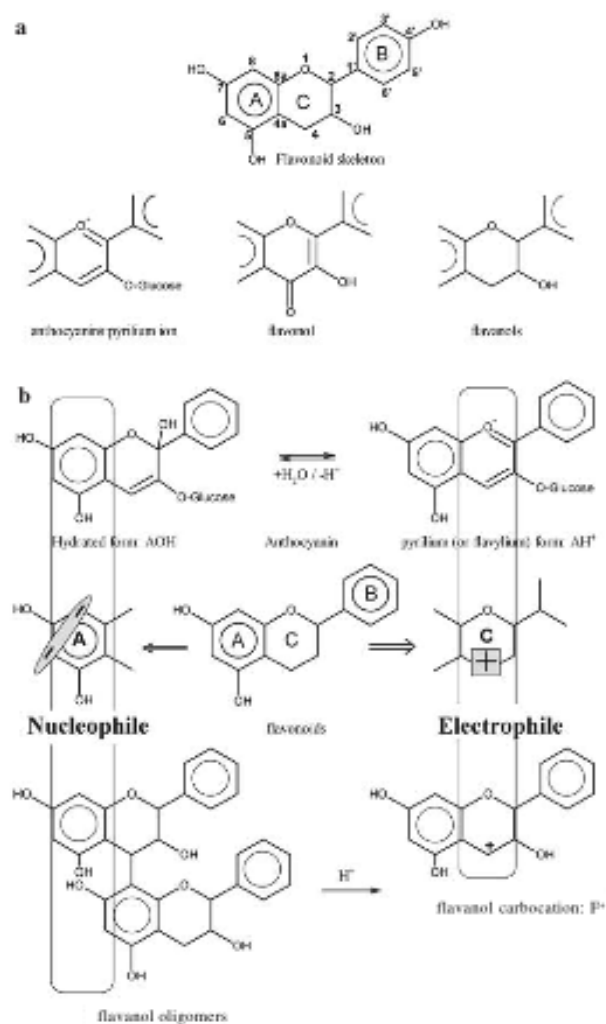


Figura 2 – Esqueleto de um flavonóide e as variações na estrutura no anel C (a). Reações levando a espécies eletrofílicas e nucleofílicas entre antocianinas e flavonóis (b). Fonte: Fulcrand et al. (2006)

A família dos flavonóides é a mais importante entre os polifenóis das uvas, tanto em quantidade como em qualidade. Sua estrutura é composta por dois anéis aromáticos polihidroxilados A e B, conectados a um anel pirano central C (figura 2a). O anel C pode ser mais ou menos saturado; o número de duplas ligações (insaturação) determina a classe de flavonóides (Figura 2b). Quando o anel C é completamente insaturado, corresponde ao cátion pirilium e é a estrutura das antocianinas; quando é completamente saturado dá origem a uma classe de compostos que incluem estruturas monoméricas e poliméricas (FULCRAND et al.,

2006). Os taninos são compostos fenólicos complexos devido a sua natureza polimérica, composta por diferentes sub-unidades de flavan-3-ol ligadas entre si (KENNEDY et al., 2000). O quadro 1 apresenta os principais flavonóides encontrados em uvas e vinhos, bem como a representação de sua estrutura (SCOLLARY, 2010).

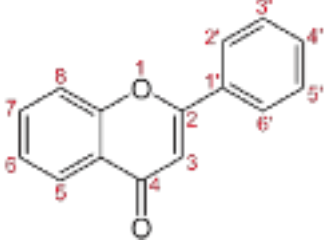
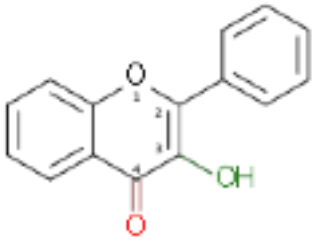
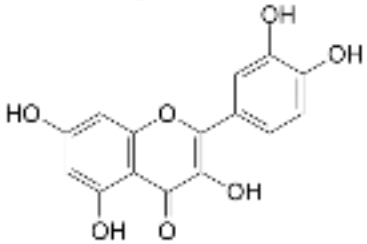
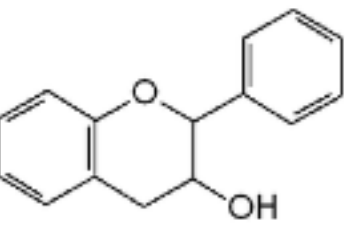
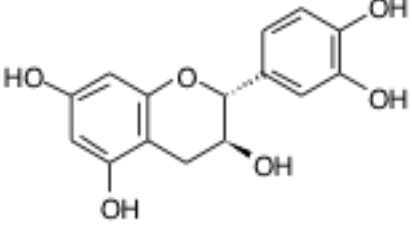
2.1.2 Não Flavonóides

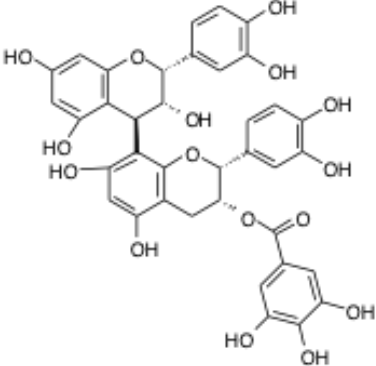
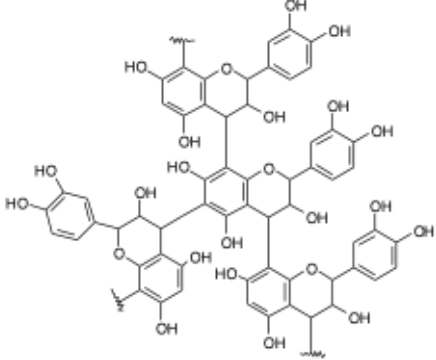
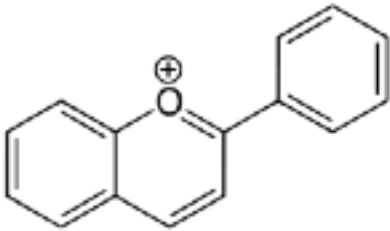
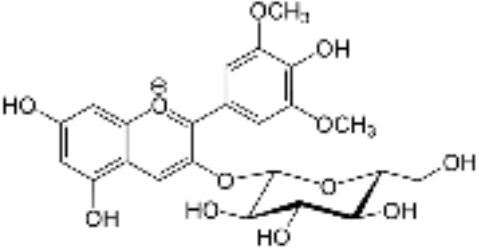
Os compostos chamados de não flavonóides são os ácidos fenólicos do vinho (Quadro 2), originalmente derivados da polpa da uva, baseados na estrutura do fenol e contendo também um grupo carboxil $-COOH$ (SCOLLARY, 2010).

As uvas e os vinhos contem ácidos benzóicos e cinâmicos, na ordem de $100-200 \text{ mg.L}^{-1}$ no vinho tinto e $10-20 \text{ mg.L}^{-1}$ no vinho branco. São incolores em soluções alcoólicas diluídas, mas tornam-se amarelos devido a oxidação. Do ponto de vista organoléptico, estes compostos não apresentam nenhum aroma ou sabor característicos. No entanto, são precursores de fenóis voláteis produzidos por ação de alguns microrganismos (leveduras do gênero *Brettanomyces* e bactérias) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

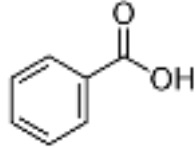
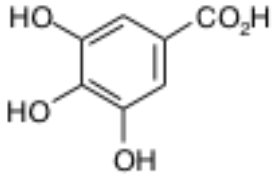
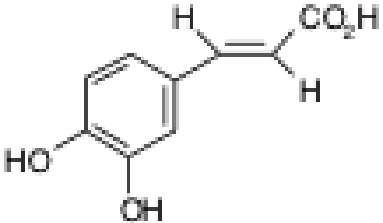
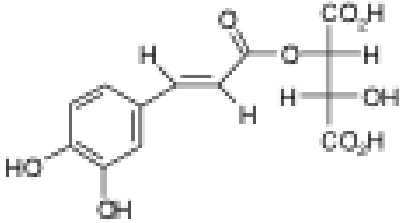
Estes compostos podem participar de várias reações de desenvolvimento e estabilização da cor, incluindo (SCOLLARY, 2010):

- conversão do grupo carboxil ($-COOH$) em um grupo aldeído ($-CHO$) e participação das reações de condensação com compostos fenólicos do tipo catequina;
- reação direta com antocianinas para gerar piroantocianinas;
- descarboxilação durante o processo fermentativo e reação com antocianinas;
- quebra oxidativa, formando aldeídos reativos que irão reagir com compostos fenólicos do tipo catequina.

Composto	Descrição	Estrutura Básica	Exemplos
Flavona	Estrutura básica dos flavonóis, caracterizada por um oxigênio cetona na posição 4.		
Flavonol	3-hidroxi-flavona -on refere-se a dupla ligação no oxigênio (posição 4) e -ol refere-se a hidroxila (posição 3)		<p data-bbox="1765 480 1912 507">Quercetina</p> 
Flavan-3-ol	Caracterizado por um grupo -OH na posição 3 Proantocianidinas são dímeros, trímeros ou cadeias maiores de polímeros de flavan-3-ol.		<p data-bbox="1749 853 1935 880">(+) - catequina</p> 

Procianidinas	São dímeros de flavan-3-ol		<p>Procianidina B2 3- galato</p> 
Taninos condensados	<p>Constituídos por moléculas de flavan-3-ol ligadas</p> <p>Conhecidas por vários nomes: taninos não hidrolisáveis, taninos, proantocianidinas, taninos da uva; taninos do vinho</p>		
Antocianinas	<p>Baseadas no esqueleto do cátion flavilium</p> <p>Contem uma molécula de glicose ligada na posição 3</p> <p>Denominadas antocianidinas na ausência da molécula de glicose</p>		

Quadro 1 – Principais flavonóides encontrados em uvas e vinhos.

Composto	Descrição	Estrutura Básica	Exemplos
Ácidos fenólicos - I	A estrutura básica é o ácido benzóico, o exemplo é baseado na estrutura C6-C1		Ácido gálico 
Ácidos fenólicos - II	Este exemplo é baseado na estrutura C6-C3 Outros nomes: ácidos hidroxicinâmicos Fenilpropanoides		Ácido cafeíco 
Ésteres de ácidos fenólicos	Caracterizados por uma ligação éster entre a unidade -COOH de um ácido hidroxicinâmico e um -OH do grupo do ácido tartárico		Ácido caftárico 

Quadro 2 – Principais compostos não flavonóides encontrados em uva e vinhos.

Os ácidos hidrocínâmicos também são chamados de fenilpropanóides, referindo-se ao lado C3 da cadeia (propil) ligada ao anel aromático (fenil). Em vinhos e sucos de uva jovens, as formas livres desses ácidos ocorrem em pequenas quantidades, pois existem preferencialmente na forma de ésteres de ácido tartárico; um aumento na forma livre é verificado durante o envelhecimento (SCOLLARY, 2010).

2.2 Compostos fenólicos em uvas

A figura 3 apresenta a distribuição dos compostos fenólicos em um grão de uva. O principal composto presente nas cascas das uvas são as antocianinas e as proantocianidinas (taninos condensados). Na literatura, o termo 'tanino' é usado para identificar uma classe de compostos que são formados no grão da uva. Esses taninos são extraídos da uva durante o processo de vinificação e são quimicamente modificados durante o processo. Vários termos são utilizados para descrever os taninos, tais como taninos condensados, taninos não hidrolisáveis, procianidinas, proantocianidinas, taninos da uva e taninos do vinhos (SCOLLARY, 2010).

As antocianinas estão localizadas nos vacúolos das células da casca, e conforme as uvas amadurecem, aumenta o espaço ocupado por elas, em detrimento do citoplasma. Há um gradiente de concentração positivo de fora para dentro das uvas, as células mais perto da polpa são mais pigmentadas do que as próximas a epiderme (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Na semente, o principal composto fenólico são as proantocianidinas (Figura 4). Entretanto, há uma diferença entre os taninos presentes nas cascas e nas sementes (SOUQUET et al, 1996; KENNEDY et al., 2007).

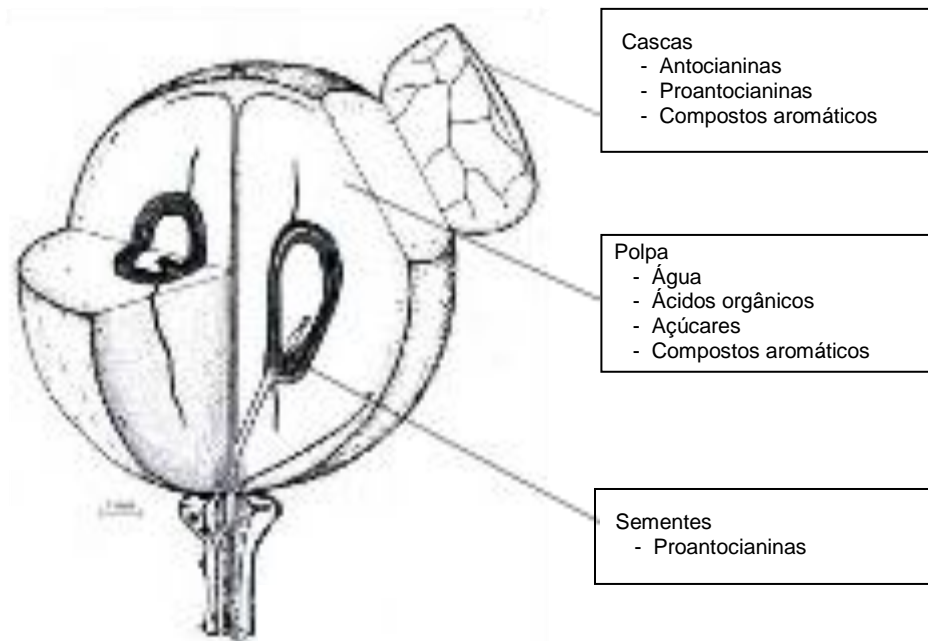


Figura 3 – Distribuição dentro de uma grão de uva dos compostos importantes para a qualidade do vinho. Fonte: Kennedy, 2008.

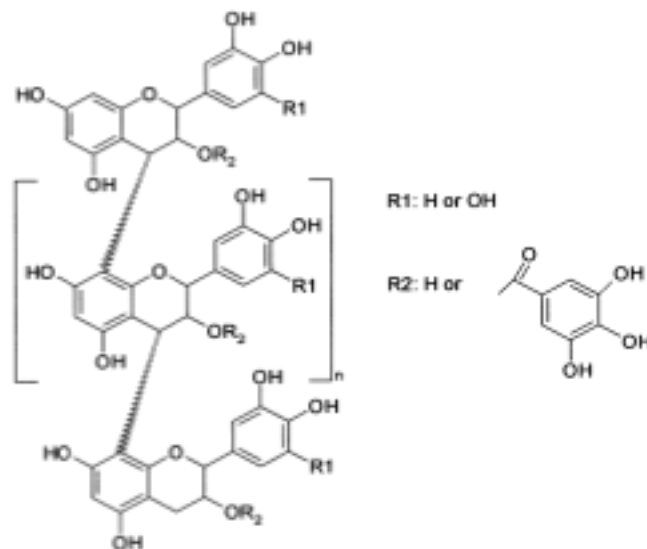


Figura 4 – Estrutura de um tanino (proantocianidina) de grãos de uvas *Vitis vinifera*. Fonte: (Geny et al., 2003).

Nas sementes, os taninos são posicionados nas camadas internas e externas para defender o embrião. Durante o período de amadurecimento os taninos das camadas mais

externas são sempre mais polimerizados que os da camada interna. Com o decorrer do tempo essa diferença torna-se mais importante, devido a um aumento significativo no grau de polimerização dos taninos da camada mais externa da sementes; os taninos serão liberados para o meio externo se a cutícula for solubilizada (GENY et al., 2003).

De acordo com Ribéreau-Gayon et al. (2006), no início dos anos 70 foram identificados os diferentes tipos de taninos nas cascas, sementes e engaços. As seguintes conclusões foram resumidas, de acordo com as pesquisas nessa área:

- os taninos das sementes são procianidinas, com relativamente baixo grau de polimerização no momento da mudança de cor das uvas, o qual aumenta durante o amadurecimento;

- os taninos das cascas possuem estrutura mais complexas e sofrem pouca variação no seu grau de polimerização. A quantidade de dímeros e trímeros, já baixa no momento da mudança de cor, decresce durante o amadurecimento.

- os taninos dos engaços são polimerizados, procianidinas não coloidais, com reatividade similar aos taninos das sementes.

A importância destes taninos é que os mesmos são responsáveis por algumas das principais propriedades organolépticas do vinho (adstringência, escurecimento e turbidez) e estão envolvidos nos processos de envelhecimento dos vinhos (RICARDO-DA-SILVA et al., 1993).

2.2.1 Biossíntese de fenóis em uvas

A síntese dos compostos fenólicos é uma consequência colateral da formação e acumulação de açúcares no grão da uva (BAUTISTA-ÓRTIN, 2005).

Progressos significativos foram obtidos no entendimento de quando e como os flavonóides são formados na uvas, incluindo a síntese de antocianinas e a formação de taninos condensados. As subunidades dos taninos, (+)- catequina e (-)-epicatequina, são sintetizados por duas enzimas, antocianidina redutase (ANR) e leucoantocianidina redutase (LAR). Entretanto, a questão de como as subunidades são convertidas em taninos ainda não foi entendida. Um ponto crítico é o estudo da expressão de genes sobre diferentes condições ambientais (SCOLLARY, 2010).

Estudos realizados por CSIRO Plant Industry, na Austrália, permitiram entender melhor alguns pontos importantes sobre a biossíntese de taninos, embora haja ainda muitas perguntas abertas. O síntese de taninos ocorre no início do processo de maturação dos grãos (Figura 5), o tamanho do grão é ilustrado pela curva verde, mostrando as duas fases do desenvolvimento do grão entre a fixação do fruto e o “*veraison*”, e após o “*veraison*” quando os grãos estão amadurecendo. Há duas fases importantes: a acumulação de taninos e a maturação. Nas cascas, a acumulação de taninos inicia próximo ao florescimento e está completa antes do “*veraison*”. Nas sementes, a acumulação de taninos inicia também no florescimento e está completa 2 semanas após o “*veraison*”. A maturação dos taninos ocorre durante o amadurecimento do grão, e resulta em progressiva descréscimo da extratibilidade dos taninos, coincidindo com a percepção de perda de textura do grão da uva (KENNEDY et al., 2007).

O conteúdo de polifenóis na semente decresce dramaticamente durante o amadurecimento, com um decréscimo de 90% no conteúdo de monômeros de flavan-3-ol e 60% de decréscimo no teor de procianidinas (KENNEDY et al., 2000). Durante o amadurecimento, também ocorre a ligação dos taninos com proteínas da superfície interna do tonoplasto e com polissacarídeos da parede celular (AMRANI et al., 1994), o que resulta na diminuição da extratibilidade destes (HANLIN et al., 2009).

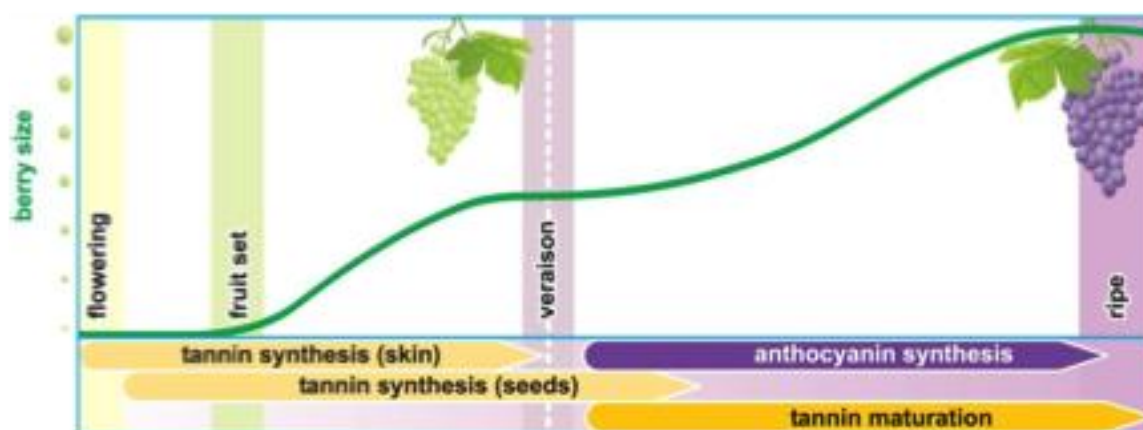


Figura 5 – Produção de antocianinas e taninos durante o desenvolvimento e maturação de um grão de uva. Fonte: Kennedy et al. (2007)

Iniciando no “*veraison*”, o acúmulo de antocianinas nos grãos aumenta durante o amadurecimento, porém, há evidências de que o teor de antocianinas pode reduzir ao final do desenvolvimento do grão (KENNEDY et al., 2002)

2.2.2 A influência do clima

Há tempos sabe-se que o clima influencia o teor de compostos fenólicos em uvas. Winkler et al. (1974) já dizia que em climas quentes o acúmulo de antocianinas é inibido nas cascas de uvas tintas.

Há uma forte influência das condições ambientais e viticulturais na rota dos flavonóides, incluindo luz, temperatura, tipo de solo, água, estado nutricional e manejo do dossel vegetativo. Dentre vários fatores que podem influenciar a composição e o conteúdo de flavonóides em uma cultivar de uva é a localização do vinhedo e o clima na região de cultivo (DOWNEY et al. , 2006).

A figura 6 representa a relação entre as antocianinas e a qualidade do vinho em climas quentes e frios. O eixo X representa a qualidade do vinho, onde E = baixa qualidade e A = alta qualidade. O eixo Y representa a cor do vinho ou da uva (antocianinas). Em regiões quentes, a cor apresenta um comportamento linear com a qualidade do vinho, enquanto que em regiões frias é obtido um limite de cor e um aumento na cor não representa um aumento na qualidade do vinho (CORDON, 2008).

Entretanto, ressalta-se que o conceito de vinho de qualidade é subjetivo, sendo que a qualidade geral de um vinho será influenciado por muitas variáveis. Atualmente há o conceito de que a medida que aumenta a exposição dos frutos a luz solar, o desenvolvimento e a composição dos frutos, bem como a qualidade do vinho, aumenta (CONDOR, 2008; SMART, 1985). Potter et al. (2010) observou que a prática da desfolha, em vinhedos da região da Campanha, pode favorecer a qualidade geral de vinhos Cabernet Sauvignon, especialmente porque essa técnica potencializa a produção dos polifenóis e a cor em vinhos tintos.

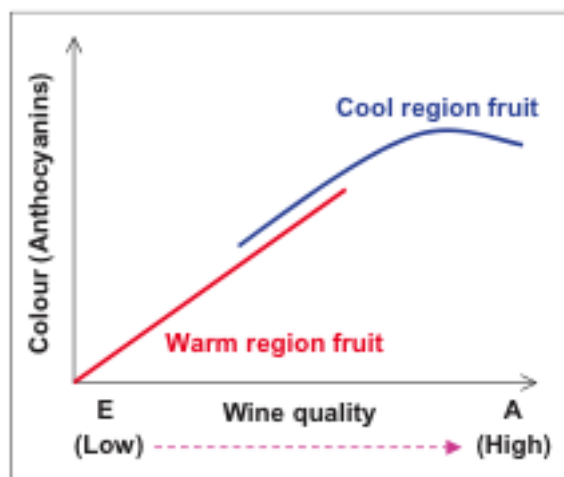


Figura 6 – Representação esquemática mostrando a relação entre qualidade do vinho e antocianinas. Fonte: Cordon (2008).

Por outro lado, em regiões com climas mais quentes, essa afirmação nem sempre é correta. De acordo com Bergqvist et al. (2001), além de regular a fotossíntese, a luz solar fornece energia radiante, o que aquece a superfície das plantas. 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 a luz solar.

Cordon (2008) trabalhando com uvas da variedade Shiraz, na Austrália, em duas regiões distintas (uma de clima quente e outra de frio), observou que a temperatura teve uma maior influência na síntese e acumulação de antocianinas do que as mudanças na exposição dos cachos a luz solar. Enquanto que o mecanismo responsável pelas mudanças na quantidade e composição de antocianinas em climas quentes permanece incerto; a explicação 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 conteúdo total de antocianinas, ocorre uma variação em relação a composição destas, havendo uma alta proporção de compostos malvidina e cumaril-glicosídeos em relação a região mais fria; já o conteúdo total de taninos permaneceu igual em ambas as regiões.

Gil-Muñoz et al. (2011), trabalhando com a variedade Monastrell na Espanha, também observaram que as condições edafoclimáticas são importantes na biossíntese de antocianinas.

De acordo com Kliewer e Torres (1972), a síntese de compostos fenólicos é inibida em temperaturas acima dos 35°C; entretanto se durante a maturação ocorre uma alternância de temperaturas altas e baixas entre o dia e a noite, a acumulação de antocianinas e taninos é favorecida. Amostras de uvas da variedade Cabernet Sauvignon, cultivadas em condições controladas, em altas temperaturas (35°C durante o dia / 25°C a noite), reduziram significativamente a concentração de antocianinas nas cascas das uvas, modificando também a composição de antocianinas (YAMANE et al., 2006).

2.2.3 Maturação fenólica de uvas

A maturação de uma uva pode ser definida como a idade fisiológica dos grãos na planta, sendo que o desenvolvimento do grão é coordenado com o desenvolvimento da semente. Do ponto de vista enológico, o “*veraison*” pode ser dividido em sub estágios baseados no metabolismo do grão e no transporte contínuo de substâncias para a videira. Durante o “*veraison*”, água, açúcares e compostos nitrogenados são transportados para o grão via floema, e a sacarose é então hidrolizada a glicose e frutose no grão (BISSON, 2001).

A definição da maturação ótima de uma uva depende do estilo de vinho a ser elaborado. Tradicionalmente, o ponto de colheita ótimo era determinado pelo conteúdo de açúcar, acidez titulável e pH da uva no momento do esmagamento (BISSON, 2001; KENNEDY et al., 2002).

De acordo com Ribéreau-Gayon et al. (2006), as uvas atingem a maturação fenólica quando vários fatores estão em equilíbrio. A maturação tecnológica (relação açúcar/ácido), aromática e fenólica são variáveis independentes que devem ser levadas em conta no momento da colheita das uvas.

É possível definir a composição fenólica das uvas de acordo com o grau de maturação, levando em consideração a alta concentração de compostos fenólicos, e as propriedades dos taninos, especialmente aqueles com reatividade com proteínas. Uma uva madura é caracterizada por cascas ricas em antocianinas e taninos complexos e inativos, e sementes com um baixo conteúdo de taninos polimerizados que reagem fortemente com proteínas. Por outro lado, uvas imaturas, possuem baixas concentrações de antocianinas nas cascas e taninos

relativamente simples que não perderam sua reatividade, e sementes com uma alta concentração de taninos pouco polimerizados, entretanto altamente reativos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

O controle da maturidade fenólica baseia-se nos seguintes itens (BAUTISTA-ÓRTIN, 2005):

- nas cascas, observa-se durante a maturação, a acumulação de antocianinas e taninos; suas concentrações atingem o máximo próximo da maturidade tecnológica se as condições edafoclimáticas são adequadas;

- as membranas das células da casca se degradam, permitindo a extração de antocianinas e taninos;

- nas sementes, a quantidade de taninos extraíveis diminuem durante o processo de maturação.

O potencial de extração das antocianinas depende do estado de maturação que controla a ruptura das células da casca da uva. Se todas as outras condições continuarem iguais, quando as uvas estiverem perfeitamente maduras ou levemente sobremaduras, o conteúdo de antocianinas no vinho será maior do que era na maturação, embora esses pigmentos tendam a decrescer nas uvas. Tanto a cor quando a quantidade de fenóis totais estarão no seu máximo (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Há várias metodologias disponíveis para análise de maturação de uvas, especialmente em relação ao teor de antocianinas, tais como Saint Cricq (SAINT CRICQ et al., 1998), Lamadon (LAMADON, 1995) e Fragoso-Garcia (FRAGOSO-GARCIA et al., 2009).

Gil-Muñoz et al. (2011) comparando vários métodos (HPLC, Lamadon, Saint-Cricq e Fragoso-Garcia), observaram uma alta correlação entre eles em termos de quantificação de antocianinas nas uvas. A metodologia por HPLC é uma ferramenta valiosa para identificar e quantificar com precisão diferentes antocianinas individuais em uma amostra. Entretanto, essa metodologia não é comum em vinícolas, e entre os três métodos espectrofotométricos testados, a metodologia descrita por Fragoso-Garcia apresentou resultados superiores as metodologias descritas por Saint Cricq e Lamadon; ressalta-se que a metodologia Fragoso-Garcia determina apenas a quantidade total de antocianinas.

González-Nevez et al. (2010d) observaram uma alta correlação entre os índice de polifenóis nas uvas e a cor e os compostos fenólicos nos vinhos resultantes, sugerindo que a estimativa da riqueza polifenólica e extratibilidade de antocianinas das uvas pode ajudar a melhorar o manejo do processo de vinificação e ajudar a prever as características cromáticas e composição global de polifenóis em um vinho.

Descrição da metodologia

Atualmente, um dos métodos mais utilizados e simples para avaliação da maturação fenólica é o método proposto por Glories e Augustin em 1993 e descrito por Saint Cricq et al. (1998).

O princípio do método consiste em extrair rapidamente as antocianinas das cascas, utilizando meio ácido para facilitar a extração. Além disso, é recomendado que as uvas sejam esmagadas e diluídas pela metade. O esmagamento das sementes resulta na extração parcial dos taninos das sementes, e sua quantificação é necessária para estimar a qualidade da uva. As soluções utilizadas são ácidas, pH 1 (HCl 0,1 N) e pH 3,2 (solução de 5 g.L⁻¹ de ácido tartárico parcialmente neutralizado) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

O meio ácido rompe a membrana fosfolipídica das células, quebrando as ligações protéicas e conseqüentemente, liberando o conteúdo dos vacúolos. O conteúdo total de antocianinas é então extraído e solubilizado na solução com pH 1,0. No pH de 3,2 a extração é comparável com o que ocorre nos tanques de fermentação. A diferença entre os resultados obtidos nas duas soluções, com diferentes pH, reflete a fragilidade da membrana, e relaciona-se com o potencial de extração dos pigmentos, indicando assim, o nível de maturação das uvas (SAINT CRICQ et al., 1998; RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Ressalta-se que antocianinas e taninos são extraídos sob condições similares, uma alta extração de antocianinas também resulta em uma alta extração de taninos. Como a relação entre a densidade ótica a 280 nm (IPT) e a quantidade de antocianinas extraídas a pH 3,2 está entre 35 e 45 para uvas maduras de todas as variedades estudadas (Merlot, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Syrah, Tempranillo, etc), um valor médio de 40 é utilizado. Uma vez que a concentração dos compostos (IPT) e antocianinas a pH 3,2 tenha sido determinada, é possível calcular a proporção de compostos fenólicos derivados das cascas e, por diferença, das sementes (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Resumidamente, a metodologia e o cálculo dos índices são descritos abaixo (RIBÉREAU-GAYON et al. 2006; SAINT CRICQ et al., 1998). As análises são realizadas a partir de duas macerações das uvas inteiras trituradas, realizadas durante 4 horas, com soluções de pH 1,0 e 3,2, respectivamente. Os macerados são então filtrados e centrifugados. O teor de polifenólicos é determinado através da medição da absorbância a 280 nm (IPT), enquanto que as antocianinas são quantificadas utilizando o método de Ribéreau-Gayon e Stonestreet (1965) (ApH 1,0 e ApH 3,2).

- **ApH 1,0** : representa o potencial total de antocianinas.

- **ApH 3,2**: representa as antocianinas extraíveis.

- **Índice de maturação celular (IMC%)**: $IMC(\%) = \frac{ApH1,0 - ApH3,2}{ApH1,0} \times 100$

- **Conteúdo de taninos nas cascas (TC)**: $TC = \frac{ApH3,2 \times 40}{1000}$

- **Conteúdo de taninos nas sementes (TS)**: $TS = IPT - TC$

- **Porcentagem de taninos das cascas (%TC)**: $\%TC = \frac{TC}{IPT} \times 100$

- **Porcentagem de taninos das sementes (%TS)**: $\%TS = \frac{TS}{IPT} \times 100$

Quanto menor o valor de IMC %, ou seja, quanto menor a diferença entre o conteúdo de antocianinas a pH1 e a pH3,2, mais facilmente as antocianinas serão extraídas. Os valores variam entre 70 e 20, dependendo da variedade de uva e maturidade. A variedade tinta Cabernet Sauvignon, que é mais fraca, sempre apresenta valores maiores que a Merlot. O valor de IMC% decresce com o passar da maturação. Alguns manejos no vinhedo, tais como raleamento de cachos ou remoção tardia de folhas, facilita a maturação e decresce os valores do índice de maturação celular, dessa forma, o conteúdo de antocianinas e a cor dos vinhos aumenta, mesmo que o conteúdo de antocianinas das uva não aumente (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). A diferença de extratibilidade de antocianinas entre uvas pode ser explicada pela diferença no conteúdo de pectina e celulose das células e bem como de alguns polissacarídeos (ORTEGA-REGULES et al, 2006).

A porcentagem de taninos nas sementes (%TS) também é chamada de índice de maturidade das sementes, e representa a porcentagem de taninos extraídos das sementes nas condições de análise, os quais correlacionam-se com o caráter adstringente de um vinho. Quanto maior a proporção de taninos nas sementes, maior o risco de se ter um impacto negativo no vinho (SAINT-CRICQ et al., 1998).

Sartori (2011), trabalhando com uvas Malbec e Shiraz cultivadas na região central do Rio Grande do Sul, encontrou uma forte correlação entre o teor de antocianinas sensíveis ao bissulfito no vinho e o teor de antocianinas extraíveis na uva.

González-Neves et al. (2003) observaram que os valores médios de IMC% obtidos em uvas da variedade Cabernet Sauvignon e Merlot, cultivadas no Uruguai, não foram estatisticamente diferentes. No mesmo sentido, Glories (2001), afirma que o IMC% de uvas Cabernet Sauvignon são sempre altos, uma vez que esta variedade tem a casca mais espessa e difícil de degradar. Por outro lado, os valores de %TS mostram que as sementes de Cabernet Sauvignon são mais pobres em taninos (GONZALEZ-NEVES et al., 2003).

González-Neves et al. (2010a) sugerem algumas modificações nos cálculos dos índices, considerando as diluições utilizadas, para tanto, considera-se a porcentagem de polpa e a densidade do mosto em cada amostra.

Trabalhando com uvas da variedade Tannat, no Uruguai, por três anos consecutivos, González-Neves et al. (2010a) verificaram que a análise da maturação fenólica não permitiram definir o momento ótimo da colheita, mas proporcionaram dados relevantes para a avaliação enológica da uva e para gestão das vinificações.

Kontoudakis et al. (2011) sugere que a heterogeneidade das uvas em um vinhedo influencia a composição final e qualidade de um vinho, e por isso deve ser considerada no momento da colheita.

2.3 Compostos fenólicos em vinhos

2.3.1 Extração de compostos fenólicos durante a vinificação

Uma vez que as uvas tenham sido colhidas, a composição fenólica do vinho torna-se dependente do processamento dentro da vinícola. Uma vez que as antocianinas estão localizadas nos tecidos das cascas, a fermentação e a maceração tem um profundo efeito na quantidade de antocianinas presentes no vinho (KENNEDY, 2008).

A extração de compostos fenólicos nem sempre está diretamente relacionada com o conteúdo de fenóis da uva, uma vez que uvas ricas em compostos fenólicos nem sempre resultam em vinhos com muita cor. Três fatores são indispensáveis para entender esse

fenômeno: a localização dos compostos fenólicos nas cascas, sua evolução durante a maturação e sua extratibilidade (BAUTISTA-ÓRTIN, 2005).

De acordo com Kennedy et al. (2007), os seguintes fatores são importantes no processo de extração de antocianinas: temperatura, tamanho e tipo da molécula, gradiente de concentração, permeabilidade celular, área superficial e composição do meio extrator (por exemplo a concentração de etanol).

Ribéreau-Gayon et al. (2006) divide o processo de maceração em três partes, conforme a figura 7:

1. maceração antes da fermentação, geralmente curta (algumas horas ou alguns dias), é o primeiro período antes do início da fermentação alcoólica;

2. maceração durante a fermentação alcoólica, com duração de alguns dias (entre 2 a 7 dias), dependendo da condições;

3. maceração pós-fermentação, é a que continua após a fermentação alcoólica estar completa e é específica para vinhos com alto potencial de envelhecimento. Sua duração é variável, de alguns dias a semanas.

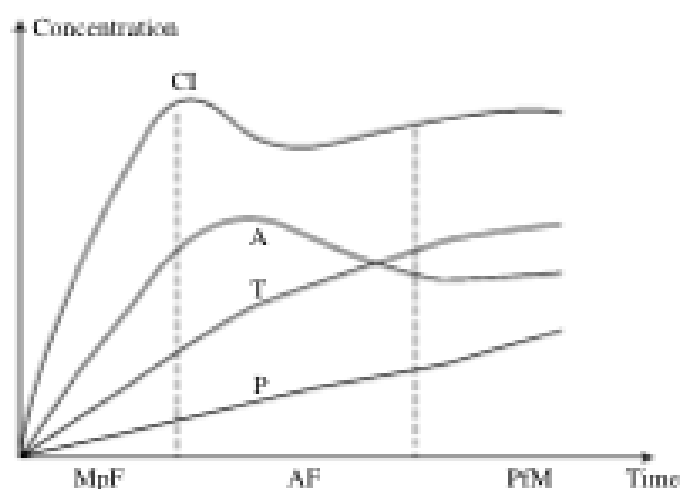


Figura 7 - Influência da maceração na extração de vários compostos das uvas. A – antocianinas; T – taninos; P – polissacarídeos; CI – intensidade de cor; MpF – maceração antes da fermentação; AF – fermentação alcoólica; PfM – maceração pós fermentação.

Fonte: Ribéreau-Gayon et al. (2006).

As antocianinas são extraídas no início, principalmente na fase aquosa. Quando o conteúdo alcoólico atinge um certo nível, um decréscimo é observado. Nesse estágio a extração de antocianinas das uvas está quase completa e vários mecanismos interferem no decréscimo da quantidade das mesmas, tais como adsorção de antocianinas em sólidos

(leveduras, borras), modificações em sua estrutura (formação de complexos taninos-antocianinas) e, possivelmente, reações de quebra (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Estudos mostram que o tempo e temperatura são as duas variáveis críticas que determinam a quantidade de antocianinas presentes no vinho (ARON E KENNEDY, 2007).

Os taninos das cascas são extraídos com as antocianinas, porém a extração contínua por períodos mais longos devido a localização dos taninos nas células das cascas. Os taninos das sementes são solubilizados quando a cutícula é dissolvida no etanol, ou seja, no meio da fermentação alcoólica e continua na maceração pós fermentativa (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Em relação aos taninos, há uma preferência em relação a origem destes: casca versus sementes. O conceito mais aceito é que os taninos das cascas são mais “maduros” do que os encontrados nas “sementes”, sendo por isso preferidos. Um explicação para o aumento da qualidade dos taninos em relação a maturação dos frutos é que há um aumento na proporção de taninos da casca (KENNEDY et al., 2007). Pastor del Rio e Kennedy (2006) observaram que vinhos elaborados com uvas extremamente maduras apresentaram um aumento na proporção de taninos derivados das sementes, sendo esta observação inconsistente com a explicação geral utilizada pela indústria do vinho para o aumento na qualidade dos taninos.

Os polissacarídeos são extraídos principalmente no início da maceração e parcialmente precipitam na presença do álcool. Manoproteínas de leveduras podem ser solubilizadas durante a maceração pós fermentação (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

A intensidade de cor atinge um máximo no início da maceração e aumenta em alguns casos. Durante a primeira fase, correspondente a extração de matéria corante das uvas, as antocianinas são copigmentadas a um certo nível com fenóis simples. A intensidade de cor poderá intensificar-se novamente na terceira fase, devido a formação de novos complexos taninos-antocianinas bem como novos copigmentos antocianinas-taninos, se estes compostos estiverem presentes em quantidades suficientes. A produção de álcool na segunda fase quebra esses copigmentos. Na terceira fase, a intensidade de cor poderá aumentar novamente devido a formação de complexos taninos-antocianinas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

O final da fermentação alcoólica e a maceração pós fermentação são caracterizadas tanto pela extração profunda dos componentes da uva quanto pelas modificações nas estruturas dos pigmentos (polimerização de taninos e formação de complexos de taninos-antocianinas). Este fenômeno possui grande efeito na impressão organoléptica, de acordo com o tipo de uvas e sua composição (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

González-Neves et al. (2007) avaliaram o efeito da variedade sobre o teor de compostos fenólicos, comparando os resultados obtidos em vinificações de Tannat, Cabernet Sauvignon e Merlot. O conteúdo de polifenóis totais (280 nm) aumentou durante a maceração, até chegar a um certo equilíbrio, enquanto que as antocianinas chegaram a um máximo e depois diminuíram, nos mostos das três variedades. A evolução em percentagem de cada forma de antocianinas durante a vinificação parece ser independente da variedade, embora cada variedade tenha sua concentração e seu perfil de antocianinas típicos. As proporções de cianidina e de peonidina diminuíram durante os primeiros dias, com um aumento das proporções de delfidinina e petunidina. As proporções de cumaratos aumentaram logo após os primeiros dias de maceração em todos os mostos. Entretanto, as proporções definitivas de cada forma antocianica é alcançada muito rapidamente e permanece quase constante depois do terceiro dia de maceração.

2.3.2 Métodos para aumentar a extração de cor

Várias técnicas de vinificação tem sido testadas com o objetivo de aumentar a extração de pigmentos e melhorar a estabilidade da cor, em diversas variedades de uvas tintas.

González-Neves et al. (2008), durante duas safras (2006 e 2007) realizaram ensaios de vinificação com uvas Tannat, usando 4 técnicas de vinificação: maceração tradicional (7 dias), maceração pré fermentativa em frio, extração diferida de antocianos e maceração estendida (15 dias). Após comparou-se a extração de polifenóis totais e antocianos, através de análises diárias durante todo o tempo de maceração. O conteúdo de polifenóis teve um aumento inicial importante em todas as vinificações, com exceção da maceração pré fermentativa em frio, onde ocorreu uma difusão mais lenta desses compostos. O conteúdo de antocianos nos mostos aumentaram rapidamente e alcançaram um valor máximo, ocorrendo posteriormente uma diminuição, em todos os tratamentos realizados. Os autores ressaltam o fato que as características da matéria prima condicionam fortemente o efeito da técnica de vinificação. No caso dos vinhos elaborados com maceração estendida observa-se uma quantidade significativamente menor de antocianinas (especialmente no ano de 2007), o que pode ser consequência de uma maior incidência de perdas por adsorção e fixação sobre as leveduras e partes sólidas das uvas, como consequência do contato mais prolongado entre o líquido e as borras.

González-Neves et al. (2010b; 2010c) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes técnicas de vinificação sobre a composição de pigmentos em vinhos tintos da variedade Tannat e sua evolução durante um ano; foram utilizadas quatro técnicas: maceração tradicional, maceração pré fermentativa a frio, extração diferida de antocianos e maceração estendida. As macerações apresentaram efeitos diferentes sobre a formação de pigmentos derivados das antocianinas originais da uva, sendo que a pré maceração a frio se destacou, pois foi a maceração que mais promoveu a formação de pigmentos derivados das antocianinas, entretanto é necessária a análise ao longo do envelhecimento do vinho. Por fim, os autores concluíram que o perfil de pigmentos de um vinho depende principalmente mais da idade do que das técnicas utilizadas para a vinificação. De Santis e Frangipane (2010) encontraram resultados semelhantes para a variedade Merlot, uma vez que a maceração pré fermentativa a frio aumentou o teor de compostos fenólicos nos vinhos.

Sacchi et al. (2005) publicaram uma revisão sobre a influência dos métodos de vinificação sobre a extração de compostos fenólicos em vinhos tintos. Segundo os autores, a prática da maceração estendida prolonga o contato das cascas com o mosto após o término da fermentação alcoólica. Baseado no conhecimento do perfil de extração das antocianinas e taninos, espera-se que a maceração estendida aumente o conteúdo de taninos, mas não o conteúdo de antocianinas.

Um estudo realizado no Brasil com uvas da variedade Merlot por Ide (1992) mostrou que, para a variedade Merlot, a máxima extração de antocianinas ocorreu aos 8 dias de maceração. Tem sido demonstrado que o período prolongado de maceração durante a fermentação, 10 contra 4 ou 5 dias, aumenta a concentração de antocianinas e taninos nos vinhos no momento do engarrafamento e que estes vinhos contem mais pigmentos poliméricos após 1 ano na garrafa (GOMEZ-PLAZA et al., 2001). Girardello (2012), trabalhando com uvas Malbec e Shiraz cultivadas na região central do Rio Grande do Sul, observou que macerações longas (14 dias) proporcionam maiores concentrações de polifenóis totais e taninos nos vinhos; as macerações curtas (7 dias), de forma geral, proporcionam maiores concentrações de antocianinas.

2.4 Principais reações dos compostos fenólicos em uvas e vinhos

Várias reações de flavonóides ocorrem durante a vinificação e o envelhecimento de vinhos, produzindo uma grande variedade de produtos incolores e pigmentos, sua quantidade depende de inúmeros fatores. Compostos fenólicos apresentam basicamente um núcleo aromático e vários compostos apresentam mais que um grupo hidroxila, alterando sua reatividade (FULCRAND et al., 2006).

Durante o envelhecimento dos vinhos na presença de oxigênio, a absorbância na região do vermelho (520nm) de um vinho tinto diminui, bem como a absorbância na região do amarelo/marrom (420 nm) aumenta. Essas mudanças refletem a progressiva mudança das antocianinas das uvas por pigmentos poliméricos mais estáveis, o que pode representar até 50% da intensidade de cor de vinhos com 1 ano de envelhecimento (SOMERS, 1971).

2.4.1 Reações das antocianinas

Antocianinas são usualmente representadas por suas formas coloridas, os cátions flavilium. Devido a carga positiva, os cátions flavilium não são estáveis, e há dois caminhos pelo qual podem ser tornar espécies neutras, equilíbrio ácido base e hidratação (FULCRAND et al., 2006).

A cor de uma solução de antocianinas é diretamente ligada ao pH. Em meio ácido elas são vermelhas, perdendo a cor com o aumento do pH. A perda máxima de cor é observada em valores de pH próximos a 3,2 e 3,5. A cor varia de violeta a azul em valores de pH acima de 4,0, até tornar-se desvanecido e amarelo em meio neutro ou alcalino (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

A cor reflete o equilíbrio entre 4 grupos de estruturas das antocianinas, estudadas por Brouillard et al. (1978, 1979), são elas: cátion flavilium (vermelho), base quinona (azul), base carbinol (incolor) e chalcona (amarela). Duas reações irão ocorrer: reação de equilíbrio ácido base e hidratação, as quais são descritas na figura 8.

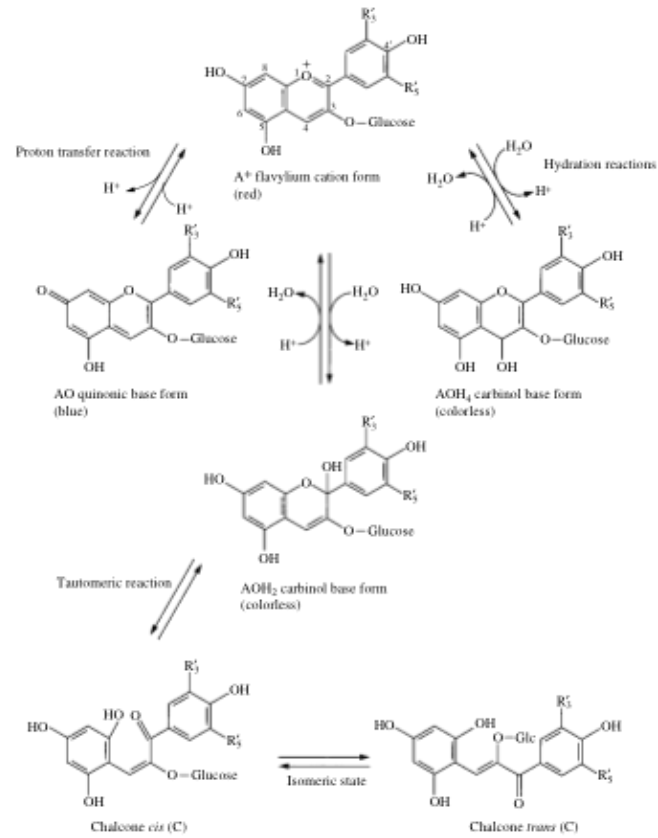


Figura 8 – As várias formas de uma antocianinas. Fonte : Ribéreau-Gayon et al., 2006

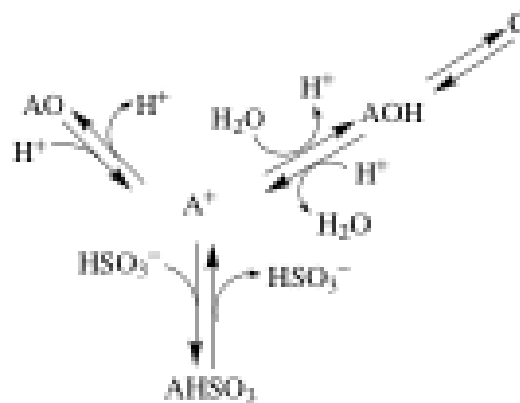


Figura 9 – Branqueamento de uma solução de antocianina devido ao pH e a adição de dióxido de enxofre. Fonte : Ribéreau-Gayon et al. (2006)

Uma solução de antocianinas é fortemente branqueada pela presença de dióxido de enxofre, a reação ocorre entre o ânio bissulfito (HSO_3^-) e o cátion flavilium, provavelmente no carbono 2 por reação de hidratação, e o produto formado (AHSO_3) é incolor (figura 9) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

2.4.2 Copigmentação em Vinhos

O fenômeno de copigmentação e seu comportamento como um equilíbrio dinâmico é de fundamental importância para o entendimento das limitações do potencial de cor, extração de antocianinas e retenção de pigmentos em um vinho (Boulton, 2001).

De acordo com Ribéreau-Gayon et al. (2006), a cor de uma solução de antocianinas depende de muitos fatores, tais como pH, SO_2 , temperatura, etc., mas também da presença da reação de copigmentação. Esse fenômeno é responsável pelo fato dos pigmentos apresentarem uma cor maior do que é esperado de acordo com a sua quantidade presente (BOULTON, 2001).

Embora conhecida há muito tempo, a reação de copigmentação tem sido estudada apenas recentemente a nível molecular (MAZZA, 1995). Sabe-se que 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 (MAZZA; BROUILLARD, 1990; ASEN et al., 1972).

A copigmentação envolve fenômenos de complexação, geralmente com baixa energia (pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas), tanto entre as várias formas de antocianinas quanto entre antocianinas e outros compostos fenólicos, muitas vezes incolores (cumarinas, ácidos fenólicos, flavonóis, flavanois, etc.) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). De acordo com Mazza e Brouillard (1990), as moléculas capazes de agir como copigmentos abrangem uma grande variedade de compostos estruturalmente não relacionados, tais como flavonóides, outros polifenóis, alcalóides, aminoácidos e as próprias antocianinas.

Consequentemente, a reação de copigmentação é provavelmente o principal mecanismo de interação molecular envolvido nas variações de cor e adstringência durante produção e o envelhecimento de vinhos (MAZZA, 1995).

A copigmentação depende de muitos fatores: tipo e concentração das antocianinas, tipo e concentração dos copigmentos, pH e temperatura (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

O aumento na intensidade e estabilidade da cor, resultante da copigmentação é devido a uma mudança no equilíbrio da hidratação para as forma flavilium, as quais são presas pelos cofatores, ou forma bases quinônicas nos complexos antocianinas-copigmento (Figura 10).

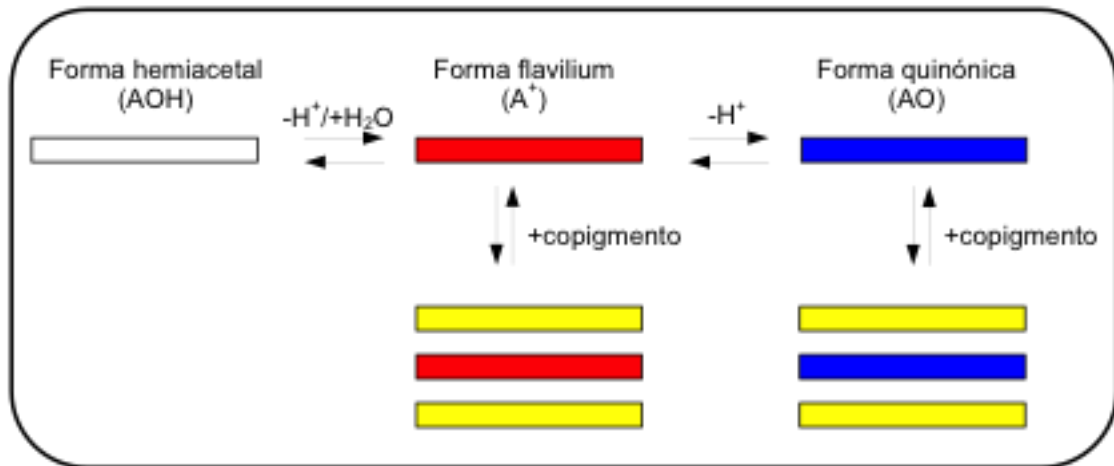


Figura 10 – Princípio do processo de copigmentação . Fonte : Bautista-Órtin (2005).

Somers e Evans (1979) atribuem a cor violeta escura de sucos obtidos por prensagem a quente de uvas tintas a complexos envolvendo o flavium (A^+) e a base quinóide (AO), juntamente com outros compostos. Um vez que o álcool começa a ser produzido durante o processo fermentativo, o mosto muda de cor para um vermelho brilhante, devido a quebra das ligações formadas pela copigmentação. A adição de álcool a uma solução aquosa de antocianinas copigmentadas reduz o efeito da copigmentação (MAZZA; BROUILLARD, 1990). Entretanto, a copigmentação irá ocorrer em solução hidroalcoólicas onde a água é o principal componente da mistura.

Somers e Evans (1979) sugeriram que os complexos antocianinas –copigmentos são formados por associação eletrostática das formas vermelhas e azuis das antocianinas, as quais são estabilizadas por interações de cargas e por pontes de hidrogênio com os fenóis. Entretanto, evidências mais recentes indicam que a copigmentação é uma interação molecular entre as estruturas coloridas das antocianinas e os copigmentos (MAZZA, 1995). A principal função da copigmentação é controlar a hidratação do cátion flavilium para a pseudobase carbinol (MAZZA; BROUILLARD, 1990). Além disso, outras evidências disponíveis indicam que o fenômeno de copigmentação é devido a agrupamento do núcleo aromático das antocianinas e o copigmento. Há poucas evidências para suportar o conceito de que a copigmentação é devido a pontes de hidrogênio.

De acordo com Liao et al. (1992) a copigmentação das antocianinas é o primeiro passo para a formação de pigmentos mais estáveis, menos sensíveis a perdas.

Mirabel et al. (1999) trabalhando com um solução modelo de vinho com malvidina-3-glicosídeo e (-)- epicatequina como copigmento, concluíram que a copigmentação na solução modelo de vinho levou a formação de novos pigmentos, tipicamente envolvidos no processo de envelhecimento dos vinhos.

Saucier et al. (2004) estudou a interação entre taninos e antocianinas por espectrofotometria UV-visível, para entender tanto o fenômeno de copigmentação quanto as reações de polimerização; em relação a copigmentação, taninos agem como copigmentos não importando o tamanho da cadeia, embora monômeros sejam mais eficientes. Mesmo que outros copigmentos estejam presentes no vinho, devido a grande quantidade de taninos no vinho, eles influenciam grande parte da cor do vinho.

A importância da copigmentação na determinação de cor em vinhos

Vários métodos foram desenvolvidos para quantificar a cor em vinhos tintos, normalmente levando em consideração a natureza ionizável e “descolorante” das antocianinas para distinguir das formas poliméricas que são menos sensíveis ao pH e a descoloração com bisulfito (BOULTON, 2001). Uma das metodologias mais utilizadas é a desenvolvida por Somers e Evans (1977); no entanto, Boulton (2001) ressalta que essa metodologia tenta explicar a cor do vinho em termos apenas de antocianinas monoméricas e pigmentos poliméricos (BOULTON, 2001).

As antocianinas copigmentadas podem ser consideradas estando em um equilíbrio dissociável com antocianinas livres e com compostos cofatores livres. A diluição da amostra a pH constante e força iônica resulta em uma progressiva dissociação das formas copigmentadas. Em altas diluições, como por exemplo 19:1 ou 24:1, virtualmente todas as antocianinas copigmentadas retornaram ao equilíbrio de ionização envolvendo o cátion flavilium, a pseudobase e as formas chalconas. Essa perda de cor com a diluição pode ser utilizada para calcular a fração de cor devido a copigmentação (BOULTON, 2001).

2.4.3 Formação de pigmentos poliméricos estáveis

Este tema tem sido muito estudado, sendo os primeiros estudos realizados por Somers (1971). Até o momento, mais de 1.000 novos pigmentos derivados foram detectados em vinhos tintos (ou em sistemas modelo de vinho tinto), embora a contribuição de alguns deles ainda seja questionável. As principais moléculas envolvidas na produção de pigmentos poliméricos são: antocianinas, flavan-3-ol (monômeros ou dímeros) e acetaldeído (SCOLLARY, 2010).

As principais características estruturais das antocianinas são: a presença de carga positiva residual, a qual dá um caráter eletrofílico ao cátion flavilium; a presença de uma unidade de glicose na posição 3; as diferentes formas devido as reações de hidratação influem na reatividade e a reatividade com dióxido de enxofre (mais precisamente com o íon sulfito) que resulta em uma perda de cor. Por outro lado, a molécula de flavan-3-ol, possui um caráter nucleofílico, o qual torna essa molécula ideal para reagir com antocianinas. As procianidinas (dímeros de flavan-3-ol), 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).

Vários autores descrevem esses mecanismos, sendo todos bem entendidos atualmente (RIBÉREAU-GAYON et al. 2006; SCOLLARY, 2010; FULCRAND et al., 2006; CHENYER, 2006). Dentre várias reações, as de condensação de antocianinas e taninos são importantes, podendo ocorrer três tipos de reações.

a) Reação direta de antocianinas com compostos fenólicos do tipo flavan-3-ol

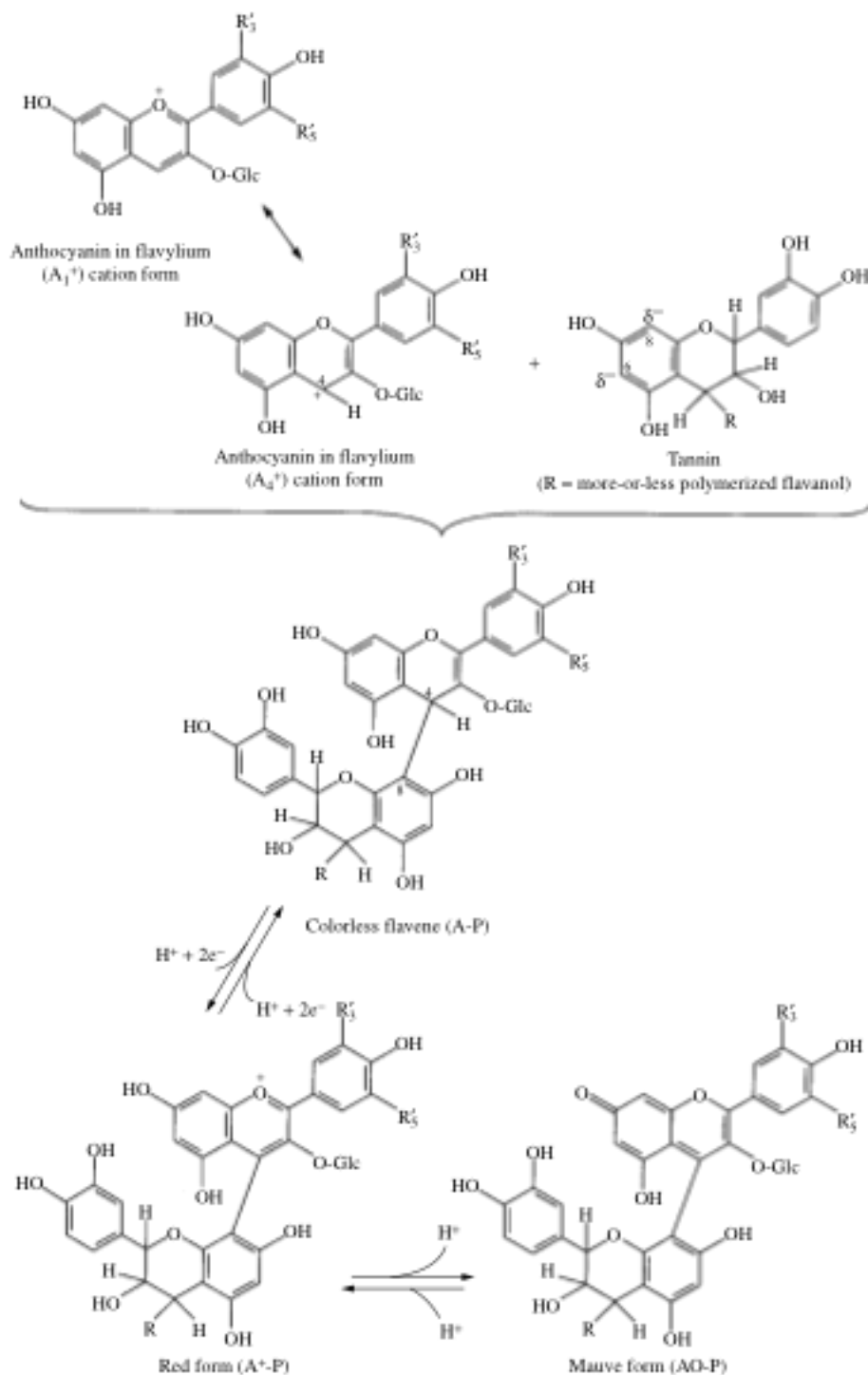


Figura 11 – Condensação direta de antocianinas e taninos, tipo A – F.
Fonte: Ribéreau-Gayon et al. (2000).

Esta reação precisa que a antocianinas estejam na forma de cátion flavilium (A^+). A reação irá ocorrer entre a posição 4 do cátion flavilium e a posição 8 (também é possível que ocorra na posição 6) do flavan-3-ol, para produzir uma molécula incolor flavene, este tipo de

composto é representado por $A^+ - F$, quando A^+ representa a antocianina (cátion flavilium) e F representa o flavan-3-ol. A mesma reação pode ocorrer com um dímero de procianidina. A presença de oxigênio ou um meio oxidante é necessário para que o composto flavene recupere a cor (figura 11).

Numa variação do mecanismo acima descrito, a forma carbinol de uma antocianina (AOH) pode reagir com o cátion flavilium (A^+). Ou seja, a condensação ocorre entre moléculas de antocianinas. O mecanismo é parecido com o descrito acima, resultando na quebra da ligação na posição 4 do cátion flavilium e da posição 8 da forma carbinol.

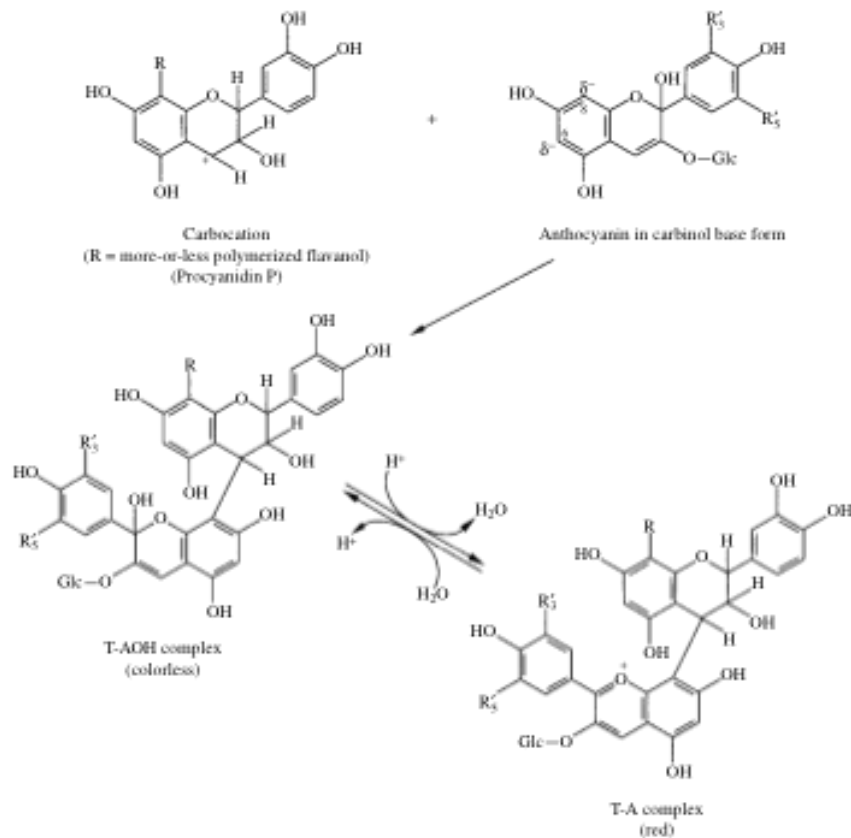


Figura 12 – Reação de condensação direta, tipo F – A.
Fonte: Ribéreau-Gayon et al. (2006)

A terceira forma de condensação entre antocianinas e flavanols é resultado da degradação de um tanino condensado no meio ácido do vinho. A ruptura da molécula de um flavan-3-ol resulta em carbocation, com uma carga positiva no carbono 4. O carbocation pode então reagir com a forma carbinol de uma antocianina, o pigmento gerado é chamado tipo F- A^+ . O processo de formação do carbocation é considerada relativamente lenta. A importância deste tipo de reação influenciando a cor do vinho é mais relevante em vinhos envelhecidos

(figura 12). O complexo então formado é colorido e torna-se vermelho alaranjado com desidratação. Essa reação ocorre na ausência de ar e não requer oxidação. É aumentada pela temperatura e depende da qualidade de antocianinas no meio. As mudanças de cor dependem do tipo de carbocation formado e do grau de polimerização.

O pH do vinho influencia essas reações, sendo que em valores menores que 3,8 a formação de pigmentos F-A⁺ é mais favorável que pigmentos A⁺-F. Os polímeros formados pelo mecanismo acima discutido, geralmente tem uma substituição na posição 4 da molécula de antocianina, protegendo estes do branqueamento com bissulfito. A exceção é o pigmento do tipo F-A⁺, onde a posição 4 não possui um substituto. Entretanto esse tipo de molécula parece ser altamente resistente ao branqueamento (CHEYNIER, 2006).

b) Reações de condensação indireta

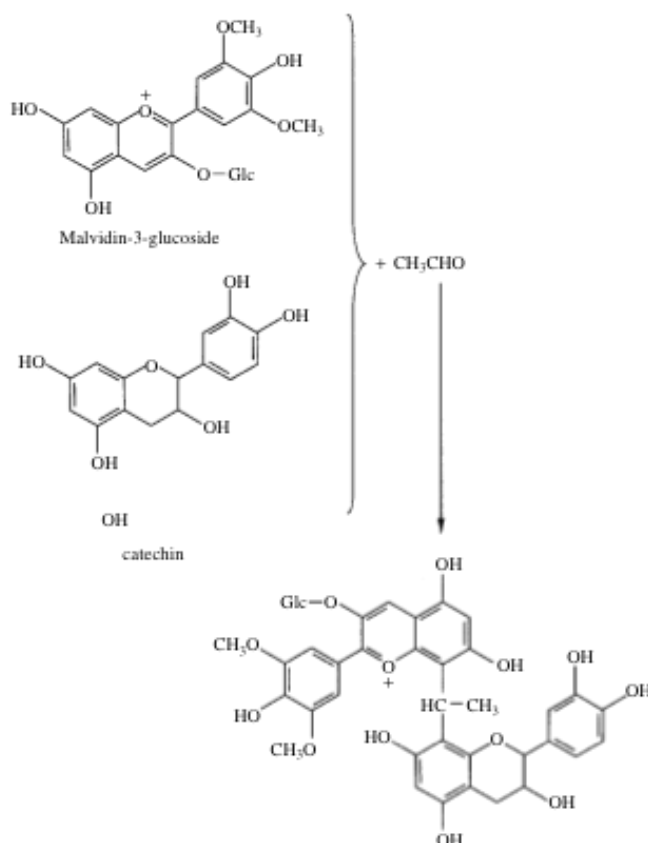


Figura 13 – Reação entre catequina e malvidina-3-glicosídeo em meio ácido, na presença de etanol. Fonte: Ribéreau-Gayon et al. (2006)

A presença de duas pontes carbon-etil entre um flavan-3-ol e uma antocianina é geralmente conseqüência de uma reação mediada por acetadeído. Sob as condições ácidas de

um vinho, o acetaldeído torna-se protonado e aumenta seu caráter eletrofílico e irá então reagir com um flavan-3-ol do tipo catequina na posição 8 (figura 13). Esta molécula acetaldeído-flavanol, pode reagir com a posição 8 de uma antocianina (na sua forma carbinol). Estudos realizados com malvidina 3-glicosídeo, mostraram que a cor deste pigmento é mais intensa (maior absorvidade molar) que a antocianina original e menos sensível a mudanças de pH. Uma ponte etil entre dois flavonols pode ocorrer pelo mesmo processo descrito acima.

De acordo com Guerra (1997), pode-se agrupar os produtos das reações acima descritas em quatro classes:

- produtos de condensação indireta antocianina-tanino, com cor violeta roxo (figura 14);
- produtos de condensação direta de antocianina-tanino, com cor laranja ou amarela;
- produtos de condensação indireta flavanol-flavanol, incolores;
- produtos de degradação de antocianinas, incolores ou amarelos.

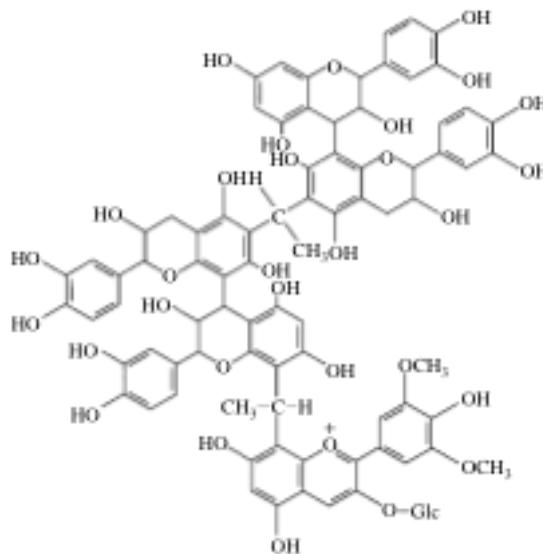


Figura 14 – Complexo vermelho violeta produzido pela condensação da malvidina-3-glicosídeo e procianidina B₃ na presença de etanol. Fonte: Guerra, 1997.

b) Reações de cicloadição

Alguns constituintes do vinho e metabólitos de leveduras podem reagir diretamente com o cátion flavilium das antocianinas e formar um novo pigmento. Um dos pigmentos formados é denominado vitisina-B, possui cor vermelho tijolo e é extremamente resistente ao

branqueamento com dióxido de enxofre, bem como a variações do pH (BAKKER; TIMBERLAKE, 1997). Este pigmento é classificado como piroantocianinas, uma vez que o novo anel formado entre a posição 4 e 5 é um anel pirano na nomenclatura de química orgânica.

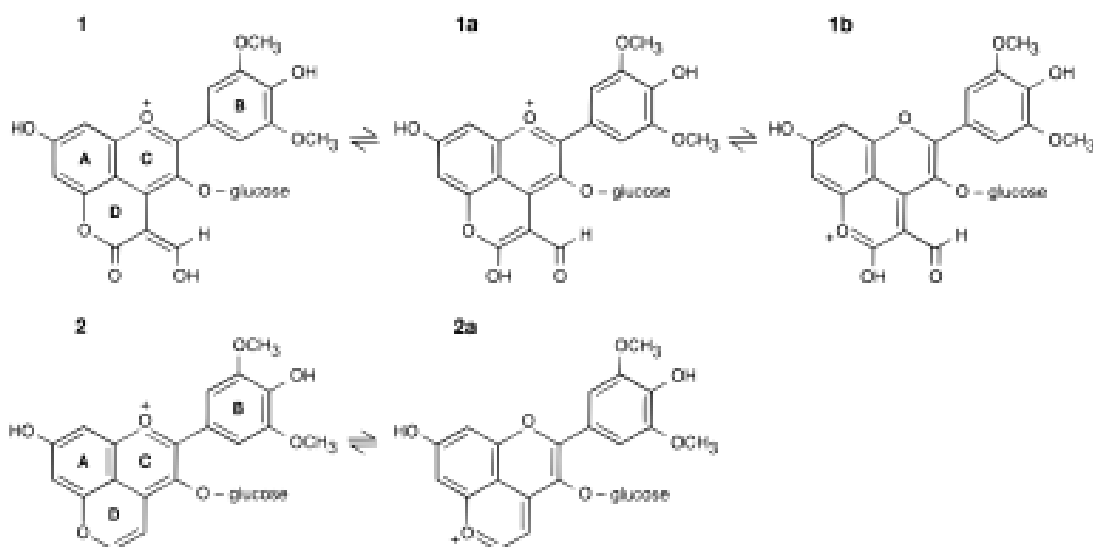


Figura 15 – Estruturas de vitisina A (1) e B (2), também mostrando as estruturas isômeras das formas flavilium. Fonte : Bakker e Timberlake (1997).

Piroantocianinas são pigmentos extremamente estáveis e de longa vida: foi encontrada Vitisina-A em vinhos Tempranillo com mais de 20 anos (RENTZSCH et al., 2010). A vitisina A é constituída de uma malvidina-3-glicosídeo, contendo uma ligação C₃H₂O₂ entre o carbono 4 e 5-hidroxi da molécula. Em relação a vitisina B, a qual é um vitisina A descarboxilada ou uma malvidina-3-glicosídeo com uma estrutura CH=CH ligada ao carbono 4 e ao grupo 5-hidroxi. A vitisina A é menos vermelha que a malvidina-3-glicosídeo, e a vitisina B é laranja. Tanto a vitisina A quanto a B são aciladas, tendo o posição 6 do açúcar acilado com uma ácido acético. Conforme esperado, essas novas estruturas possuem propriedades não usuais as antocianinas. A vitisina A é completamente protegida do branqueamento por dióxido de enxofre, enquanto que a vitisina B apresenta uma resistência maior que a malvidina-3-glicosídeo. Ambas as vitisinas possuem uma expressão de cor superior que as antocianinas em valores de pH mais elevados (BAKKER; TIMBERLAKE,1997)

2.5 Análise de Compostos Fenólicos

2.5.1 Metodologias

Vinhos tintos são soluções complexas e embora sua cor possa ser determinada por técnicas espectrais, a relação entre a cor do vinho e sua composição química é difícil de ser explicada (VERSARI et al., 2008). Várias metodologias tem sido propostas para quantificação de polifenóis em vinhos, incluindo métodos espectrofotométricos (BOULTON, 1996; DI STEFANO et al., 1989; HABERSTON et al., 2003; RIBÉREAU-GAYON; STONESTREET, 1965; SOMERS; EVANS, 1977) e métodos cromatográficos (KENNEDY; MATTHEWS; WATERHOUSE, 2000; VRSHOVSEK et al., 2001).

A pesquisa de compostos poliméricos via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando coluna C18 com fase reserva tem seu uso limitado porque esses compostos tipicamente são eluídos juntos, como uma banda larga (envelope), o que dificulta sua avaliação (VERSARI et al., 2008).

Versari et al. (2008), com o objetivo de comparar os métodos analíticos disponíveis para determinação dos componentes da cor de um vinho, analisaram os pigmentos monoméricos e poliméricos de 20 vinhos tintos jovens. Duas técnicas de CLAE foram testadas, a primeira utilizando coluna C18 de fase reserva e a segunda coluna PLRP (polímero). Os autores também introduziram uma modificação nessas metodologias, com a adição de dióxido de enxofre na fase móvel, o que permitiu que pigmentos poliméricos não sensíveis ao branqueamento fossem analisados por CLAE pela primeira vez. Em relação as técnicas espectrofotométricas foram testadas três metodologias : ensaio de taninos de Adam's, estudo da copigmentação desenvolvido por Boulton e ensaio de pigmentos coloridos estáveis de Somers. Os resultados mostram que a cor total de um vinho é formada por um conjunto de três componentes: copigmentação (8-30%), antocianinas livres totais (24-35%) e pigmentos poliméricos (35-63%). Segundo os autores os pigmentos poliméricos estimados por CLAE com coluna polimérica estão de acordo com os resultados obtidos com coluna C18 ($R^2 = 0,9703$) e a soma de taninos pequenos e grandes estimados pelo teste de Adam's ($R^2 = 0,9511$). O nível de copigmentação pode ser quase totalmente descrito pelo nível de pigmentos monoméricos ($R^2 = 0,9464$) e não pelo conteúdo de taninos como tem-se sugerido

na literatura (copigmentação x taninos: $R^2 = 0,4827$). Como conclusão os autores ressaltaram a importância do desenvolvimento de padrões certificados de pigmentos poliméricos.

2.6 Métodos por Espectrofotometria

A análise de compostos fenólicos em uvas e vinhos é essencial para o estudo da qualidade de um vinho, avaliar o potencial de uma determinada variedade de uva e determinar o melhor método de vinificação, entre outras utilidades. Atualmente existem várias metodologias descritas, cada uma com vantagens e desvantagens. Várias metodologias por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram desenvolvidas para análise específica de alguns compostos fenólicos; entretanto, segundo Vrhovsek et al. (2001) a quantificação de grupos de fenóis ainda tem sido realizada por meio de métodos espectrofotométricos. Dessa forma, serão descritas aqui as metodologias por espectrofotometria atualmente disponíveis para análise de compostos fenólicos em uvas e vinhos.

2.6.1 Compostos Fenólicos

Muitos dos métodos utilizados para análise de compostos fenólicos foram propostos há mais de cem anos, e foram inicialmente desenvolvidos por Folin e seus colegas da Harvard Medical School para estudar o metabolismo de proteínas em humanos (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006)

- Índice de Permanganato

De acordo com Barceló (1990), essa metodologia foi inicialmente descrita por Ribéreau-Gayon e Maurité em 1942 e posteriormente por Ribéreau-Gayon e Peynaud em 1958. A técnica utiliza a propriedade dos compostos fenólicos de reduzir a frio o permanganato de potássio. Como os compostos fenólicos do vinho não reagem de maneira semelhante com o permanganato, trata-se de uma medição global, por isso chamado de “Índice de Permanganato” (BARCELÓ, 1990). Estudos realizados por Ribéreau-Gayon

(1970) mostraram que este método não possui uma boa reprodutibilidade, por isso essa metodologia atualmente não é mais utilizada.

- Índice De Polifenóis Totais

Essa metodologia baseia-se no princípio de que todos os compostos fenólicos apresentam alguma absorvância a 280 nm. O problema dessa análise é que cada classe de fenóis possui uma absorvância (coeficiente de extinção) a 280 nm. Dessa forma, os resultados não podem ser relacionados com nenhum padrão específico, e são calculados diretamente em unidades de absorvância (WATERHOUSE, 2002).

A metodologia utiliza uma amostra de vinho tinto, diluída 1:100, para que a absorvância fique em torno de 0,5. A leitura é então realizada a 280 nm e multiplicada por 100. Uma atualização da técnica propõe subtrair 4 unidades de absorvância do resultado, devido a interferência de compostos não fenólicos, especialmente proteínas e nucleotídeos (WATERHOUSE, 2002).

Ribéreau-Gayon (1970) testou essa metodologia e concluiu que a mesma é válida para estimar a quantidade de compostos fenólicos presentes em um vinho, especialmente como forma de monitoramento dentro das vinícolas (WATERHOUSE, 2002).

Ribéreau- Gayon et al. (2006) citam que certas moléculas, tais como os ácidos cinâmicos e chalconas, não tem absorção máxima neste comprimento de onda. Entretanto, como estes compostos estão presentes em concentrações muito baixas no vinho, o erro será muito pequeno. Dessa forma, os autores recomendam essa técnica por ser rápida e fácil.

- Compostos Fenólicos Totais

Esta análise é mais específica que a oxidação do permanganato a frio (Índice de Permanganato) ou a absorção a 280 nm (Índice de Polifenóis Totais).

O reagente inicialmente utilizado nessa metodologia era o reagente de Folin Denis. Este reagente era uma mistura dos ácidos fosfotúngstico (WO_4^{2-}) e fosfomolibdico (MoO_4^{2-}), os quais eram reduzidos por grupos fenólicos da tirosina, resultando na formação de um composto azul. A intensidade de cor era então determinada por espectrofotometria. Essa metodologia foi desenvolvida em 1912 (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

Em 1927, Folin e Ciocalteu, acrescentaram sulfato de lítio e bromo ao reagente Folin Denis, evitando assim a formação de precipitados que interferiam na quantificação da intensidade de cor. O novo reagente foi então denominado Folin Ciocalteu e foi usado primeiramente para determinar o conteúdo de tirosina e triptofano em proteína hidrolisada,

mas atualmente pode ser utilizado para determinar a quantidade de fenóis em uma grande variedade de amostras (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

Um estudo realizado por Singleton e Rossi (1965) comprovaram que para análise de fenóis totais em uvas e vinhos o reagente de Folin Ciocalteu é o mais indicado por uma série de razões. A primeira é o fato do pigmento obtido por este reagente ser mais intenso, sendo analiticamente preferível. Outra razão é que, quando comparados com um padrão de fenol, tanto o reagente Folin Denis quanto o Folin Ciocalteu apresentaram valores próximos; entretanto, quando estão presentes fenóis menos reativos ou substâncias redutoras interferentes, o reagente Folin Ciocalteu apresenta melhores resultados. Toda a metodologia é descrita minuciosamente no estudo publicado por Singleton e Rossi (1965).

Di Stefano (1989) propõe algumas variações na metodologia proposta por Singleton e Rossi (1965), ainda utilizando o reagente de Folin Ciocalteu. Entretanto, essa técnica parece ser menos estudada e muito pouco utilizada. Segundo o Office International de la Vigne et du Vin - OIV - (2010) a metodologia oficial é a proposta por Singleton e Rossi (1965).

Em relação a faixa de leitura da absorbância, existe alguma variação de acordo com a metodologia utilizada. De maneira geral, os trabalhos baseados na metodologia de Ribéreau-Gayon (1970), usam o comprimento de onda 700 nm, por outro lado os trabalhos baseados na metodologia de Singleton e Rossi (1965) utilizam 765 nm como comprimento de onda.

O padrão utilizado é o ácido gálico. Alguns autores sugeriram o uso de ácido tânico, no entanto, o ácido gálico é preferível, uma vez que sua pureza é mais facilmente obtida e garantida. Além disso, possui satisfatória solubilidade, adequada estabilidade e baixo custo, entre outras vantagens (SINGLETON; ROSSI, 1965).

Scalbert et al. (1989), fizeram uma modificação no método proposto por Singleton e Rossi (1965). Nesse caso, após a adição dos reagentes, a amostra foi colocada em banho maria a 50°C por 5 minutos, em vez de 2 horas no escuro, com o objetivo de acelerar o desenvolvimento da cor. Entretanto, Vermerris e Nicholson (2006) alertam para o risco de ocorrer a quebra da molécula de glicose dos compostos fenólicos devido ao calor.

Um ponto crítico nessa análise é o tempo de desenvolvimento da cor, sendo que a temperatura também irá afetar a reação e sua degradação. Por essa razão, recomenda-se que a curva padrão seja refeita a cada corrida de amostras (WATERHOUSE, 2002).

O método de Folin-Ciocalteu baseia-se na reação cinética e não em uma conversão estequiométrica, por isso não é muito preciso, e variações em torno de 5% são normais para repetições, dependendo do controle de temperatura e precisão no tempo de adição dos reagentes e medida do espectro (WATERHOUSE, 2002).

2.6.2 Antocianinas

As antocianinas presentes em um vinho podem estar na forma livre ou combinada, por exemplo com taninos ou com o dióxido de enxofre. De acordo com Ribéreau-Gayon et al. (2006), não há nenhuma metodologia capaz de estimar a quantidade total de antocianinas. Segundo Amerine e Ough (1980), a maior dificuldade na quantificação de antocianinas por espectrofotometria é a separação destes compostos de acordo com seu grau de polimerização.

Duas técnicas de análise de antocianinas foram estabelecidas por Ribéreau-Gayon e Stonestreet (1965) e baseiam-se em duas propriedades específicas das antocianinas: variação de cor de acordo com o pH e branqueamento com SO₂.

- Método de dosagem pela diferença de pH

As antocianinas são heterosídeos, que liberam por hidrólise ácida uma aglicona, ou antocianidina, e uma ou mais moléculas de açúcar, portanto, são sensíveis a mudanças de pH do meio (RIBÉREAU-GAYON; STONESTREET, 1965).

A metodologia consiste no preparo de duas amostras, cada uma contendo 1 ml de vinho a 1 ml de etanol acidificado com 0,1% HCl. Então 10 ml de HCl a 2% (pH 0,7) é adicionado a primeira amostra e 10 ml de solução tampão a pH 3,45 é adicionado a outra amostra. Após 15 minutos, a diferença de absorvância (Δd_1) é lida a 520 nm, em cubeta de 10 mm de caminho ótico. Em comparação com uma solução padrão de antocianinas, a concentração (C) é dada pela equação 1:

$$C \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = \Delta d_1 \times 388 \quad (1)$$

Há outra metodologia proposta por Somers e Evans (1977), similar a descrita acima; a diferença está no tempo de espera, 4 horas em substituição aos 15 minutos da técnica descrita acima. Dessa forma o equilíbrio entre as diferentes formas de antocianinas é completamente desviada para a estrutura flavona – intensamente colorida – o que não ocorre no método de Ribéreau-Gayon e Stonestreet (1965) citado acima, devido ao menor tempo de reação utilizada por essa metodologia. As diferenças entre os métodos tornam-se maiores a medida que muda o grau de polimerização das moléculas.

- Método de dosagem utilizando o bissulfito de sódio

Metodologia também descrita por Ribéreau-Gayon e Stonestreet (1965). A descoloração com bissulfito de sódio é realizada em uma amostra de vinho acidificado a pH 0,8, posteriormente dividido em 2 tubos de ensaio. Então acrescenta-se água ao primeiro tubo e solução de bisulfito de sódio, densidade 1,24, no segundo tubo. A diferença de absorbância (Δd_1) é lida a 520 nm, em cubeta de 10 mm de caminho ótico, após 15 minutos.

Em comparação com uma solução padrão de antocianinas, a concentração (C) é dada pela equação 2:

$$C \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = \Delta d_1 \times 875 \quad (2)$$

No método de Ribéreau-Gayon e Stronstreet (1965), multiplica-se o valor da absorbância por 875. Os autores prepararam uma curva de calibração com diferentes concentrações de uma amostra padrão de antocianinas cristalizadas. No estudo realizado por Rivas-Gonzalo et al. (1992), o fator de multiplicação é outro, pois estes adaptaram a metodologia descrita acima para comparação com uma metodologia por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

O branqueamento de uma amostra de vinho com excesso de SO₂ e a leitura da absorção a 520 nm irá demonstrar o quanto da absorbância neste comprimento de onda é devido a pigmentos poliméricos (SOMERS; EVANS, 1977), uma vez que as antocianinas monoméricas sofrem descoloração após a adição do bissulfito. Versari et al. (2008) reforçam o fato dos pigmentos polimerizados serem mais estáveis à descoloração com SO₂ que os pigmentos monoméricos.

Rivas-Gonzalo et al. (1992), analisaram o conteúdo de antocianinas em vinhos tintos através de cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE - e comparam com os dois métodos clássicos de espectrofotometria, método por diferença de pH e método por descoloração com bissulfito citados acima. Os valores obtidos por CLAE foram sempre menores que os obtidos pelos métodos espectrofotométricos. A razão para esse resultado é que a análise de CLAE determina apenas antocianinas livres, enquanto que os outros dois métodos analisam também polímeros que são sensíveis aos efeitos do pH ou branqueamento pelo bisulfito. Dessa forma, os valores obtidos pelos métodos espectrofotométricos tendem a ser superestimados, especialmente para vinhos jovens.

- Análise de antocianinas livres

Para a determinação de antocianinas livres é necessário realizar um fracionamento. O vinho é absorvido em uma coluna PVPP (polivinilpirrolidona), também conhecida como

Policlar AT. Após a lavagem da coluna com água, é realizada uma eluição com solução de álcool diluída, o que libera as antocianinas livres, enquanto que as antocianinas combinadas e os taninos ficam absorvidos na coluna de PVPP (RIBÉREAU-GAYON et al. , 2006). Após realiza-se a determinação de antocianinas, conforme uma das metodologias citadas acima.

- Antocianinas monoméricas e poliméricas

Somers e Evans (1997) desenvolveram uma série de determinações espectrofotométricas para avaliar vinhos jovens e determinar a quantidade de antocianinas monoméricas, poliméricas, polifenóis totais e a “idade química” dos vinhos. Essa metodologia baseia-se no entendimento do equilíbrio do pH e dos diferentes efeitos do branqueamento do SO₂ sobre antocianinas monoméricas e poliméricas, bem como a ligação preferencial do SO₂ com acetaldeído em substituição a ligação com antocianinas. No caso do cálculo de antocianinas totais, os autores presumem que a cor dos pigmentos poliméricos aumenta de acordo com um fator de 5/3 devido a acidificação, por isso na fórmula substitui-se esse valor (VERSARI et al., 2008).

Recentemente, Ho et al. (2001) descrevem uma metodologia para fracionamento das antocianinas. O procedimento consiste em passar uma amostra de vinho em um cartucho de extração em fase sólida C18, após ativação do mesmo. A eluição das antocianinas monoméricas é realizada com acetonitrila a 16% e pH 2,0, seguida pela eluição das antocianinas poliméricas com metanol a pH 2,0. Cada fração é então lida a absorbância de 520 nm em cubetas de 1 cm de caminho ótico. Os dados são expressos em mg.L⁻¹ de malvidina-3-glicosídeo (peso molecular 529) e coeficiente de extinção molar (ϵ) de 28000 M⁻¹cm⁻¹ (BAUTISTA-ÓRTIN, 2005).

2.6.3 Análise de Copigmentação

Diferentes técnicas têm sido utilizadas por pesquisadores para estudar a reação de copigmentação de antocianinas. A técnica de espectroscopia UV-Visível é a ferramenta mais popular para investigação da reação de copigmentação, sendo utilizada principalmente na pesquisa de compostos já relatados estruturalmente, e em estudos cinéticos e termodinâmicos (FALCÃO et al., 2003).

Atualmente a técnica proposta por Boulton (1996) é a mais utilizada para estudar a copigmentação de um vinho, através da determinação de antocianinas copigmentadas, monoméricas, poliméricas e totais. Resumidamente, a metodologia consiste em ajustar o pH do vinho em 3,6 e então filtrar a amostra utilizando membrana de 0,45 μm de espessura. Em uma amostra de 2ml de vinho adiciona-se 20 μl de acetaldéido a 10%, e espera-se 45 minutos, a temperatura ambiente. Decorrido este tempo, lê-se a absorvância a 520 nm (Aacet). Em outra amostra de 2 ml adiciona-se 260 μl de solução de SO₂ a 5%, e lê-se a absorvância a 520 nm (ASO₂). A absorvância a 520 nm também é determinada em uma amostra de vinho, utilizando cubeta de 1mm de caminho ótico, sem diluição da amostra. Esta leitura é então multiplicada por 10 (Avinho). A partir dessas leituras, as diferentes formas de antocianinas são expressas em unidades de absorvância

2.6.4 Não Flavonóides

A análise de não flavonóides foi desenvolvida por Kramling e Singleton (1969) e baseia-se na determinação de fenóis totais via reagente de Folin Ciocalteau antes e após a precipitação e remoção dos flavonóides através da reação com formaldeído sob condições selecionadas (baixo pH, temperatura ambiente, etc.). Nessa situação fenóis que não possuem o grupo meta-hidroxi (nas plantas são os não flavonóides), não irão precipitar. De acordo com Amerine e Ough (1980), o formaldeído irá reagir com as posições 6 ou 8 dos 5,7-dihidroxi-flavonóis, formando um derivado do metanol que irá atacar outras posições 6 ou 8 em outro flavonóide e assim por diante.

2.6.5 Taninos

A principal dificuldade, para esse grupo de substâncias, é a definição correta deste tipo de fenóis. Segundo Sarkar e Howarth (1976) é difícil definir o termo “taninos” e esse tem sido motivo de confusões na literatura científica, um problema encontrado até os dias de hoje.

Segundo a definição clássica, taninos são compostos fenólicos hidrossolúveis, com peso molecular entre 500 e 3000, que possuem a habilidade de precipitar proteínas e,

atualmente, podem ser classificados em três grupos: taninos condensados (proantocianidinas, também chamados de fenóis poliméricos), taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitanos) e taninos complexos (KHANBABAEI; VAN REE, 2001).

Inúmeras metodologias foram desenvolvidas para análise de taninos em amostras vegetais. Scalbert et al. (1989) ressaltam que a maioria dos métodos de determinações de taninos baseiam-se na habilidade destes compostos em formarem complexos com proteínas. Entretanto, alguns métodos não levam em conta a estrutura heterogênea dos taninos. Ressalta-se que o estudo dos taninos envolve dois aspectos: a) quantificação do total de taninos e b) determinação do tipo de taninos presentes.

- Análise de Proantocianidinas

Esta metodologia é chamada de análise de proantocianidinas, na qual ocorre a conversão das antocianidinas por quebra com catálise ácida nas ligações interflavonoídes seguida por autooxidação (PORTER et al., 1986). De acordo com Di Stefano et al. (1989), as proantocianidinas são avaliadas pela transformação em cianidinas e a curva de calibração é feita em relação ao cloreto de cianidina. Vrhovsek et al. (2001) citam que esta metodologia possui correlação com as proantocianidinas de tamanhos maiores.

Esta metodologia inicialmente foi desenvolvida por Hills e Swain (1959), os quais utilizavam uma solução ácida com butanol. A metodologia foi então otimizada pela adição de quantidades adequadas de sais de ferro como catalisadores, para aumentar a reprodutibilidade da técnica e substituir o solvente n-butanol por etanol (RIGO et al., 2000).

- Taninos por Hidrólise Ácida

Ribéreau-Gayon et al. (2006) afirmam que os taninos nos vinhos tintos são formados por cadeias de flavonóis mais ou menos polimerizados (proantocianidinas), podendo ser homogêneos (com ligações regulares) ou heterogêneos (ligados por diferentes tipos de ligações). De qualquer maneira, certas ligações são quebradas quando essas moléculas são aquecidas em meio ácido, e os carbocations resultantes são parcialmente convertidos em cianidina, quando o meio é suficiente ácido para conduzir a oxidação. Esta propriedade tem sido usada na análise taninos por muitos anos.

O procedimento consiste em preparar duas amostras, através de diluições e acidificação do meio. Um dos tubos é aquecido a 100°C em banho maria por 30 minutos, e o segundo tubo é deixado a temperatura ambiente. A diferença de densidade ótica (D_1 e D_2) é então lida a 550 nm, e a quantidade é calculada pela equação 3:

$$\text{Taninos (g.L}^{-1}\text{)} = 19,33 \times (D_1 - D_2) \quad (3)$$

Embora esse método possua uma alta reprodutibilidade e seja fácil de ser implementado, seu resultado é apenas uma aproximação, uma vez que não leva em conta o efeito de várias estruturas presentes nos vinhos, nem o grau de polimerização, nem os componentes do vinho que interferem na análise. A concentração de taninos nos vinhos é subestimada. Não é incomum observar um aumento nos valores durante o envelhecimento em barricas ou nas garrafas, o que não corresponde a um aumento na quantidade de taninos (RIBÉREAU- GAYON et al., 2006).

Com base nestas observações, dois métodos foram desenvolvidos para calcular a concentração de taninos nos vinhos, através de equações que levam em consideração se o vinho é jovem ou envelhecido (RIBÉREAU- GAYON et al., 2006). Entretanto essa metodologia não parece ser muito utilizada atualmente.

- Índice de Vanilina

Esta metodologia baseia-se na reação da vanilina em meio fortemente ácido, formando um composto colorido com o máximo de absorção a 500 nm. Este teste é específico para flavan-3-ols, di-hidrochalconas e proantocianidinas que possuem uma ligação simples na posição 2-3 e uma hidroxila livre na posição meta do anel B. O objetivo dessa técnica é estimar o grau de polimerização dos taninos (SARKAR; HOWARTH, 1976; BROADHURST; JONES, 1978).

Entretanto, o reagente vanilina não é suficientemente específico, uma vez que, além de reagir com os derivados de catequina, também reage com dihidrochalconas, algumas flavonas e flavononóis (SARKAR; HOWARTH, 1976). Por muitos anos o teste de vanilina foi muito utilizado como método padrão para análise colorimétrica de flavonóis. Entretanto, esta metodologia apresenta alguns problemas de reprodutibilidade (SUN et al., 1998b).

O padrão utilizado é a catequina, um monômero de flavan-3-ol dos taninos condensados (BUTLER et al., 1982). Por isso, alguns autores, como Amerine e Ough (1980), classificam essa técnica como análise de catequinas. Outros autores, como Butler et al. (1982), classificam como análise de proantocianidinas. Por fim, trabalhos mais atuais denominam apenas como índice de vanilina, sendo que este refere-se a análise de catequinas e proantocianidinas (DI STEFANO, 1988; VRHOVSEK et al., 2001; RIGO et al., 2000). Vrhovsek et al. (2001) citam que esta metodologia possui melhor correlação com os monômeros (catequinas) e proantocianidinas menores.

Na tentativa de melhorar essa técnica, alguns estudos foram publicados com algumas recomendações sobre essa metodologia. Por exemplo, Butler et al. (1982) concluíram que o metanol é o melhor reagente, uma vez que a reação é muito menos sensível a unidades de monômeros, tais como a catequina, do que a polímeros. Atualmente o trabalho mais completo é o publicado por Sun et al. (1998a), onde os autores examinaram e otimizaram essa metodologia, determinando exatamente quais as melhores condições para realização dessa metodologia.

Atualmente vários autores concordam que para o índice de vanilina expressa o grau de polimerização dos taninos, a amostra (semente, casca ou vinho) necessita sofrer um tratamento prévio para fracionamento dos compostos. Essa separação poderá ser realizada por diferentes metodologias, tais como Fractogel TSK-HW (RICARDO DA SILVA et al., 1991) ou Sephadex LH-20 (KANTZ; SINGLETON, 1990). Sun et al. (1998b) desenvolveram e validaram uma metodologia para fracionamento de proantocianidinas com o uso de cartuchos de extração de fase sólida C₁₈. Dessa forma, são obtidas 3 frações (catequina, oligômeros e polímeros), então analisados pelo teste de vanilina.

- Índice de HCL

Este método reflete o estado de polimerização dos taninos no vinho, o que depende, por sua vez, das condições de envelhecimento. Por exemplo, a polimerização diminui após um período de frio ou clarificação, bem como durante o envelhecimento nas garrafas (RIBÉREAU- GAYON et al., 2006).

A metodologia baseia-se na instabilidade das proantocianidinas em um meio ácido, onde a velocidade de precipitação depende do grau de polimerização. O procedimento consiste em adicionar ácido clorídrico a uma amostra e ler a absorbância a 280 nm. Outra amostra, preparada da mesma forma, é deixada repousar por 7 horas e, após centrifugação, é lida a 280 nm. Os resultados são expressos na forma de relação entre as duas leituras, e deverão estar compreendidos entre 5 e 40 (RIBÉREAU- GAYON et al., 2006).

- Índice De Diálise

Este índice está relacionado com a estrutura e a carga dos taninos. Moléculas altamente carregadas passam por poros de uma membrana de diálise mais lentamente que moléculas menores com menos cargas. Os valores normalmente encontrados oscilam entre 5 e 30, e não há uma correlação direta com o índice de HCl (RIBÉREAU- GAYON et al., 2006).

- Índice De Gelatina

Esta metodologia é baseada na capacidade dos taninos de reagir com proteínas, formando combinações estáveis. Os taninos condensados presentes no vinho precipitam com gelatina de uma maneira homogênea e com reprodutibilidade.

A metodologia maximiza a capacidade dos taninos do vinho para reagir com as proteínas da gelatina. Esta reatividade é responsável pela sensação de adstringência experimentada quando degustamos um vinho tinto. A gelatina solúvel usada no ensaio possui um grande gama de proteínas, com diferentes pesos moleculares (5.000-30.000). Este índice reflete a reatividade dos taninos nos vinhos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

A metodologia consiste em adicionar a uma amostra de vinho uma solução de gelatina e deixar em repouso por 3 dias. Após a centrifugação, a quantidade de taninos é determinada pelo método LA (já citado acima), sendo que uma amostra controle (sem adição de gelatina) é utilizada conjuntamente. Os valores variam entre 25 a 80, de acordo com a origem do vinho e os métodos de vinificação.

Algumas metodologias citadas acima foram desenvolvidas há muitos anos atrás e com o aumento do conhecimento das estruturas das moléculas, ocorrem confusões nas nomenclaturas. A análise de compostos fenólicos é de fundamental importância e várias metodologias estão disponíveis. No entanto é necessário o conhecimento das frações analisadas pela técnica escolhida, bem como possíveis interferentes.

3 ARTIGOS

- **Artigo 1** : Potencial fenólico de uvas da variedade Merlot e sua correlação com a composição fenólica dos vinhos.

Artigo nas normas da revista Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA.

- **Artigo 2**: Copigmentation and color of Brazilian Merlot wines: I. Influence of skin contact time.

Artigo aceito para publicação na revista Journal International des Sciences de la Vigne et Du Vin

- **Artigo 3**: Evolução dos Compostos Fenólicos e da cor em vinhos tintos da variedade Merlot

Artigo nas normas da revista Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA.

- **Artigo 4** : Phenolic compounds of Merlot wines from two regions of Rio Grande do Sul, Brazil

Artigo nas normas da revista Vitis.

3.1 Artigo 1: Potencial Fenólico de uvas da variedade Merlot e sua correlação com a composição fenólica dos vinhos

Potencial fenólico de uvas da variedade Merlot e sua correlação com a composição fenólica dos vinhos

Phenolic potential of Merlot grapes and correlation with wine phenolic composition

Aline de Oliveira Fogaça* e Carlos Eugenio Daudt

Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais,
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, CEP 97105-910, Santa Maria - RS, Brasil, E-mail: alinefogaça@uol.com.br; ced.voy@uol.com.br

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a maturação fenólica e industrial de uvas da variedade Merlot produzidas na região da Campanha Gaúcha e Serra Gaúcha, RS, e avaliar a correlação entre o potencial fenólico estimado nessas uvas com a composição fenólica dos vinhos resultantes. Os resultados mostraram que a maturação industrial e fenólica apresentaram uma grande variabilidade entre os vinhedos estudados; sendo que algumas uvas apresentam baixo teor de antocianinas nas uvas, mas em compensação, o grau de maturação das células da casca permite que ocorra uma boa extração desses compostos. Os taninos presentes nas sementes foram responsáveis por 40% do total de fenóis presentes da uva, o que parece ser uma característica dessa variedade. A análise do potencial fenólico das uvas permitiu estimar algumas características dos vinhos resultantes, sendo assim uma ferramenta útil para a tomada de decisão do melhor momento da colheita. A intensidade de cor, o conteúdo de antocianinas e a porcentagem de cor devido a antocianinas poliméricas nos

vinhos, juntamente com o teor de polifenóis totais na uva foram os principais parâmetros que diferenciaram as uvas e os vinhos estudados.

Palavras – chaves : maturação fenólica, cor, antocianinas, taninos, maturação industrial

ABSTRACT

This work was carried out in order to evaluate the phenolic and industrial ripeness of Merlot grapes produced in the “Campanha Gaúcha” and “Serra Gaúcha” regions, RS, and evaluate the correlation, if any, between the phenolic potential estimated in Merlot grapes and the phenolic composition of the resulting wines. The results showed that the industrial and the phenolic maturity had a great variability among the vineyards studied; some grapes showed a low content of anthocyanins, however the skin maturity allowed a good extraction of this compounds. The seeds tannins represent 40% of total phenols, which seems to be a characteristic of this grape variety. The analysis of grape phenolic’s potential allowed to estimate the content of polyphenols, the percentage of color due to polymeric pigments and the procyanidins content in the future wines, making it a useful tool for the decision of the best time of harvest. The color intensity, the anthocyanin content and the percentage of color due polymeric anthocaynins in the wines and the grape total phenolic content were the main parameters that allowed to distinguish the wines and grapes studied.

Key words: phenolic ripennes, color, anthocyanins, procyanidins, industrial ripeness

Introdução

A produção de vinhos finos no Brasil aumentou nos últimos anos, chegando a 25 milhões de litros em 2010 (IBRAVIN, 2011), e novas regiões vitícolas surgiram. Os produtores brasileiros estão buscando produzir vinhos de qualidade, no entanto, a maioria ainda determina o momento da colheita somente de acordo com os parâmetros da maturação industrial (açúcar e acidez da polpa), uma alternativa seria o uso da análise da maturação

fenólica no momento da colheita. De acordo com Di Estefano et al. (2000), a maturação fenólica é definida como o momento em que se alcança um estado de combinação particular dos polifenóis das cascas e das sementes, o que determina uma queda na adstringência destes compostos e a extração máxima de antocianinas. A maturação fenólica pode ser definida em função da concentração destes compostos nas uvas, e também em função das estruturas moleculares implicadas na sua aptidão para serem extraídas durante a vinificação (Glories, 2001). O aumento da extratibilidade das antocianinas durante o amadurecimento das uvas é consequência da degradação celular por enzimas pectinolíticas (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

A análise do conteúdo de antocianinas e taninos nas uvas durante o processo de maturação é usado em algumas regiões vitícolas ao redor do mundo para monitorar o desenvolvimento de compostos e classificar vinhedos, ou até lotes, de acordo com o seu conteúdo fenólico (Ribéreau-Gayon et al., 2006). De acordo com Bautista-Órtin (2005), várias metodologias foram desenvolvidas na tentativa de estimar essa maturação. O método mais utilizado foi desenvolvido por Glories e Agustín em 1993, e é descrito por Saint-Cricq et al. (1998) e por Ribéreau-Gayon et al. (2006). O índice de maturação celular (IMC%), também conhecido como índice de extratibilidade, baseia-se no conceito de que a pH 1,0 há uma desorganização completa das membranas dos vacúolos, o que facilita a liberação dos compostos fenólicos. Por outro lado, a pH 3,6, a degradação natural das células é respeitada, situação similar ao que ocorre no mosto durante a vinificação (Saint-Cricq et al., 1998). González-Neves et al. (2003) trabalhando com uvas das variedades Merlot, Tannat e Cabernet Sauvignon no Uruguai, observaram que o conteúdo de antocianinas dos vinhos correlacionou-se muito significativamente com todos os índices determinados nas uvas. Dessa forma, os autores sugerem que a estimação do potencial fenólico das uvas pode ser muito útil para estimar a cor e a composição fenólica global de vinhos tintos, permitindo dirigir a vinificação da maneira mais adequada possível. O conhecimento das características fenólicas das uvas

auxilia na tomada de decisões durante a vinificação, tais como a intensidade das remontagens e a temperatura e a duração das macerações, as quais podem ser adaptadas de acordo com o ano (Bautista-Órtin, 2005).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a maturação fenólica e industrial de uvas da variedade tinta Merlot, produzidas em duas regiões vitícolas distintas do estado do Rio Grande do Sul e avaliar a correlação entre o potencial fenólico estimado nas uvas com a composição fenólica e a cor dos vinhos resultantes, utilizando metodologias muito utilizadas ainda hoje, e mais facilmente encontradas nas indústrias de produção de vinhos brasileiras, sendo que essas metodologias permitem uma análise global das características fenólicas de um vinho.

Material e Métodos

Amostras de uvas da variedade tinta *Vitis vinifera* Merlot, foram coletadas no momento da colheita comercial, em duas safras, 2010 e 2011. A amostragem, em triplicata, foi realizada extraindo 3 a 5 grãos por cacho, na zona média de altura das videiras e alternadamente das duas metades inferior e superior dos cachos, totalizando 250 grãos por amostra. Os vinhedos amostrados estão localizados em duas regiões distintas: Serra Gaúcha (município de Bento Gonçalves) e Campanha Gaúcha (município de Dom Pedrito). Os vinhedos 1 e 4 estão localizados na região da Campanha Gaúcha, já os vinhedos 2 e 3 estão localizados na região da Serra Gaúcha.

As análises espectrofotométricas foram realizadas utilizando cubetas de quartzo de 1 e/ou 10 mm de caminho ótico, de acordo com o comprimento de onda a ser lido, em um espectrofotômetro UV 11-000, marca Pró Análise (UV/Visível). A determinação do potencial polifenólico foi calculado através dos índices propostos por González-Neves et al. (2003), em triplicata. A partir dessas análises calculou-se o índice de maturidade celular (IMC%) e a proporção de taninos nas sementes e nas cascas. Análises de acidez titulável (g.L^{-1} de ácido

tartárico), pH e sólidos solúveis (°Brix) foram realizadas de acordo com OIV Methods (2010); o índice de maturação industrial foi calculado de acordo com Pszczólkowski & Lecco (2011): o valor do °Brix é dividido pelo valor da acidez (g.L^{-1} de ácido tartárico).

As uvas amostradas para análise da maturação industrial e fenólica foram utilizadas para realização de microvinificações. As microvinificações foram realizadas em triplicata, em recipientes com capacidade de 5 litros. Após o desengace e esmagamento, foi realizada a sulfitagem (50 mg.L^{-1} de SO_2) e inoculação de levedura *Saccharomyces cerevisiae* da marca Perdomini® (Blastocel Grand Cru), na dosagem de 20 g.hL^{-1} . O tempo de maceração foi de 8 dias, a temperatura de 28°C , e com duas remontagens diárias. Ao término da fermentação alcoólica, foi realizada nova sulfitagem (20 mg.L^{-1} de SO_2) e trasfega, com separação das borras. Após 2 meses, foi realizada nova trasfega e engarrafamento.

A quantificação de fenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu (mg.L^{-1} de ácido gálico); a de antocianinas pelo método de branqueamento por bisulfito (mg.L^{-1} de malvidina-3-glucosídeo) e a de procianidinas pelo método de hidrólise ácida (g.L^{-1} de cloreto de ciadinina). Os índices de cor (intensidade de cor e tonalidade) foram lidos diretamente, sem diluição da amostra, através da leitura da absorbância das amostras, em pH natural, nos comprimentos de onda 420, 520 e 620 nm. O Índice de polifenóis totais foi calculado a partir da absorbância de uma amostra diluída 1:100 a 280 nm; todas as metodologias acima são descritas por Ribéreau-Gayon et al. (2006). O estudo da copigmentação dos vinhos foi realizado através da determinação da porcentagem de cor devido a antocianinas copigmentadas, monoméricas e poliméricas, de acordo com a técnica proposta por Boulton (1996). Não foram utilizadas técnicas com uso de cromatografia líquida por não serem metodologias usadas normalmente pela indústria vinícola brasileira e não serem recomendadas para análise de grupos de fenóis (Vrhovsek et al., 2001).

A análise estatística foi realizada através do programa Statistica 7.0 (StatSoft), as médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e separadas pelo teste de Tukey a 5%. A partir do agrupamento dos dados de cada vinho, foi calculado o coeficiente de correlação linear entre os parâmetros. A análise de componente principal foi realizada através do software Pirouette 4.0 (Infometrix, Woodinville, EUA), sendo os dados autoescalados.

Resultados e Discussão

A maturação industrial determinada pelas características químicas das uvas é apresentada na tabela 1. De acordo com Rizzon et al. (1998), as características do solo e do clima das regiões vitícolas da Serra Gaúcha e da Campanha Gaúcha originaram uvas e vinhos que diferem significativamente quanto à acidez, o que confirma os dados obtidos nesse estudo. De acordo com Pszczólkowski & Lecco (2011), a maturação industrial é considerada adequada quando a relação entre o açúcar e a acidez ($^{\circ}\text{Brix/acidez}$) atinge valores entre 3 e 5. Os dados deste estudo mostram que na safra 2011 todas os vinhedos analisados estão nessa faixa, já na safra 2010 apenas 1 vinhedo atingiu a maturação industrial adequada.

De todos os parâmetros analisados para estimar o potencial fenólico das uvas, o teor de antocianinas potenciais (ApH1), tabela 1, destaca-se pela grande variação apresentada entre as amostras, inclusive na análise do mesmo vinhedo por dois anos consecutivos. Os teores de antocianinas potenciais e extraíveis (ApH3,2) parecem não ter correlação com os valores de acidez, ou seja, a quantidade de antocianinas não possui relação direta com o aumento da maturação industrial, uma vez que um adequado índice de maturação industrial não corresponde a um alto teor de antocianinas.

Um ponto importante parece ser a localização do vinhedo, uma vez que os vinhedos amostrados encontram-se em regiões com climas distintos; de acordo com Daudt et al. (1973) e Motta (2003), a região da Campanha Gaúcha (município de Dom Pedrito) apresenta maior insolação e menor quantidade de chuva no período em que vai de meados ao final da

maturação da uva e na época da vindima, quando comparada com a Serra Gaúcha (município de Bento Gonçalves). Cordon (2008) observou que em climas quentes, não somente a quantidade de antocianinas nas uvas é menor do que em climas frios, como a composição dessas também é diversa. Spayd et al. (2002), trabalhando com uvas da variedade Merlot, observaram que temperaturas excessivamente altas reduziram a acumulação de antocianinas nas cascas, embora o calor seja necessário para a síntese desses compostos. Assim, os menores teores de antocianinas encontrados nos vinhedos localizados em Dom Pedrito (vinhedos 1 e 4), quando comparados aos vinhedos de Bento Gonçalves, estão associados ao clima dessas regiões.

Em relação ao índice de maturidade celular (IMC%), quanto menor o valor desse índice, maior é a extratibilidade das antocianinas das cascas. O vinhedo 4, com menor quantidade de antocianinas, é o que apresenta o melhor IMC%, demonstrando que um alto teor de antocianinas nem sempre corresponde a uma extratibilidade adequada. Inúmeros fatores interferem na extração das antocianinas das cascas, Ortega-Regules & Bel (2008) propuseram que uma alta extratibilidade de antocianinas pode ser encontrada associada com baixas concentrações de galactose, celulose, ramanose e xilose e com a presença de pectinas de baixo teor de metoxilação.

O acúmulo de antocianinas parece não ter uma relação direta com o teor de fenóis totais (expresso pelo IPT), uma vez que vinhedos com os maiores teores de antocianinas não apresentaram os maiores valores de fenóis totais. Espera-se que durante o processo de maturação da uva, a proporção de taninos na semente (TS%), também conhecido como índice de maturação das sementes, apresente valores cada vez menores; entretanto essa queda não representa uma redução no teor de taninos e sim um decréscimo na extratibilidade dos mesmos (Kennedy, 2008), sendo que o aumento da qualidade dos taninos durante o processo de maturação da uva está ligado ao aumento na proporção de taninos nas cascas (TC%). As

amostras dos vinhedos 1 (safra 2010) e 4 (safra 2011) destacam-se por apresentarem os maiores valores de TS%, e conseqüentemente, os menores de TC%. Esses dois índices (TS% e TC%), são apenas uma estimativa, os quais levam em consideração o teor total de fenóis, medido pelo índice IPT; sabe-se que os taninos presentes nas cascas e nas sementes são de tipos diferentes (Kennedy, 2008). Todos os vinhedos analisados apresentaram um proporção de taninos nas sementes superior a 40%; de maneira geral, a alta proporção de taninos nas sementes é típico da variedade Merlot, como também foi observado por González-Neves et al. (2003).

A tabela 2 apresenta os dados obtidos na análise dos vinhos elaborados a partir das uvas analisadas na tabela 1, todos com 8 dias de maceração e após 6 meses de engarrafamento. A variação nos teores de antocianinas, do IPT e do índice de cor parecem estar mais associados as características do ano, uma vez que os maiores valores são encontrados nas amostras originárias do mesmo ano, no caso, da safra 2011. Já a quantidade de fenóis totais, procianidinas, porcentagem de antocianinas copigmentadas e porcentagem de antocianinas monoméricas apresentaram pouca ou nenhuma diferença entre os vinhos.

Analisando apenas os dados dos vinhos elaborados na safra 2011, o vinhedo 4, que apresentou o menor teor de antocianinas (A_{pH1} e $A_{pH3,2}$) na uva (Tabela 1), é o vinhedo com maior teor de antocianinas (ANT) no vinho (Tabela 2), o que pode ser explicado pelo alto índice de maturação celular (IMC%) que estas uvas apresentavam no momento da colheita, facilitando a extração desses compostos durante o processo fermentativo. Ressalta-se que essa técnica de antocianinas utilizada não determina o conteúdo total de antocianinas, mas sim a quantidade de pigmentos sensíveis ao branqueamento por bissulfito; a quantidade desses pigmentos depende do tipo de ligações que ocorreram nesse vinho. Outro ponto a ressaltar é que este vinho não apresenta o maior índice de cor. A influência da safra fica claro

quando analisamos o vinho proveniente do vinhedo 2, o qual apresenta o maior índice de cor na safra 2011, e bem menor na safra 2010.

A porcentagem de cor devido a antocianinas copigmentadas e poliméricas não diferiu entre os vinhos, ou seja, podemos dizer que esses parâmetros estão mais associados as características da variedade.

Com a finalidade de facilitar a correlação entre o potencial fenólico da uva e o teor de fenóis no vinho, foram calculados os coeficientes de correlação, apresentados na tabela 3. O índice de polifenóis (IPT) determinado na uva apresentou uma forte correlação positiva com o teor de polifenóis totais (0,77), com a quantidade de procianidinas (0,77) e com a porcentagem de antocianinas poliméricas (0,70), ambos determinados no vinho.

A quantidade de antocianinas extraíveis (ApH_{3,2}) apresentou uma forte correlação com a porcentagem de antocianinas poliméricas; essa correlação é explicada pela capacidade das antocianinas se ligarem a moléculas de taninos e formarem pigmentos poliméricos (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

O índice de maturidade celular (IMC%) apresentou uma forte correlação negativa com o teor de polifenóis totais (-0,91) e com a quantidade de taninos (-0,87) medidos no vinho. Pode-se dizer que quanto maior a maturação celular (menor valor de IMC%), maior é a extração de polifenóis totais e de taninos para o vinho. Esperava-se uma correlação forte com o teor de antocianinas, no entanto, esta é fraca para ambas as medidas de antocianinas utilizadas nesse estudo, uma vez que a cor de um vinho é resultado não apenas do teor de antocianinas, mas sim do tipo de pigmentos poliméricos presentes (Ribéreau-Gayon et al., 2006). A falta de correlações fortes entre a intensidade de cor do vinho e os parâmetros analisados na uvas confirmam a complexidade da cor de um vinho, a qual é influenciada por inúmeros fatores.

Os dados das tabelas 1 e 2 foram agrupados para análise multivariada, utilizando a análise de componente principal como ferramenta estatística e os resultados são apresentados na figura 1. O componente principal 1 (que explica 33,0% da variação), permitiu separar os vinhedos em dois grupos distintos (Figura 1b). As variáveis que mais pesaram para essa separação (Figura 1a) foram o teor de antocianinas, o índice de cor e a porcentagem de antocianinas poliméricas no vinho e o índice de polifenóis na uva, ou seja, esses quatro parâmetros são os principais responsáveis pelas diferenças encontradas nas amostras analisadas. Ressalta-se a nítida separação dos vinhedos 1 e 2 (ambos estudados nos dois anos do experimento) de acordo com a safra, comprovando que as condições climáticas tem uma grande influência nas características das uvas e vinhos.

O componente principal 2 (30,7% da variação), permitiu a separação de acordo com a região em que as uvas são produzidas. Nesse caso, os principais parâmetros são o teor de taninos no vinho (TAN), a proporção de taninos nas sementes (TS%), o teor de antocianinas potenciais (ApH1,0) e o índice de maturação celular (IMC%), ou seja, as características das uvas são os principais fatores que diferenciam as duas regiões estudadas.

Conclusões

1. A maturação industrial e fenólica apresentaram uma grande variabilidade entre os vinhedos estudados, especialmente em relação ao conteúdo de antocianinas.
2. Algumas uvas apresentam baixo teor de antocianinas nas uvas, mas em compensação, o grau de maturação das células da casca permite que ocorra uma boa extração desses compostos.
3. Os taninos presentes nas sementes são responsáveis por 40% do total de fenóis presentes da uva, o que parece ser uma característica dessa variedade.
4. A análise do potencial fenólico das uvas permitiu estimar o conteúdo de polifenóis, a porcentagem da cor devido a pigmentos poliméricos e a quantidade de procianidinas

presentes nos vinhos resultantes, sendo assim uma ferramenta útil para a tomada de decisão do melhor momento da colheita.

5. A intensidade de cor, o conteúdo de antocianinas e a porcentagem de cor devido a antocianinas poliméricas nos vinhos, juntamente com o teor de polifenóis totais na uva foram os principais parâmetros que diferenciaram as uvas e os vinhos estudados.

Referências Bibliográficas

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

BOULTON, R. B. A method for the assessment of copigmentation in red wines. In: ASEV 47th Annual Meeting, Reno, Nevada, June 1996. **Proceedings...ASEV 47th Annual Meeting**, USA, June 1996.

CORDON, N. **The influence of viticultural treatments on the accumulation of flavonoid compounds in grapes and their contribution to wine quality**. 2008. 327 f. Tese (doutorado) - University of Adelaide, Austrália.

DAUDT, C. E.; MUTTI, L. S. M.; KERSTEIN, É. Possibilidades de produção de *Vitis vinifera* em Uruguaiana e vizinhanças. **Ciência Rural**, v. 3, n. 1-4, p. 163-163, 1973.

DI STEFANO, R.; BORSA, D.; BOSSO, A.; GARCIA-MORUNO, E. Sul significato e sui metodi di determinazione dello stato di maturità dei polifenoli. **L'Enologo**, v.36, p.73-76, 2000.

GLORIES, Y. Caractérisation du potentiel phénolique: adaptation de la vinification. **Progress Agricole et Viticole**, v.118, n. 15-16, p. 347-350, 2001.

GONZÁLEZ-NEVES, G. N.; FRANCO, J.; MOUTOUNET, M.; CARBONNEAU, A. Differentiation between Tannat, Merlot and Cabernet-Sauvignon Uruguayan wines according

their global polyphenolic composition. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, v. 40, n. 2, p.81-89, 2003.

IBRAVIN. **Cadastro Víticola 2010**. Disponível em <http://www.ibravin.org.br/admin/UPLarquivos/220220111853082.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2011.

KENNEDY, J. A. Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. **Ciência e investigación agrária**, v. 35, n.2, p. 77-90, 2008.

MOTTA, F. S. Disponibilidade climática para maturação da uva destinada a produção de vinhos finos nas regiões da Serra do Nordeste e Campanha do Estado do Rio Grande do Sul. **Agrociência**, v. 9, n. 3, p. 297-299, 2003.

OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN. **Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins**. Paris: O.I.V., 464 p, 2010.

ORTEGA-REGULES, A.; BEL, A. Changes in skin cell wall composition during the maturation of four premium wine grape varieties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 420–428, 2008.

RIBÉREAU-GAYON, P. et al. Phenolic compounds. In: _____. **Handbook of Enology – Volume 2: The Chemistry of Wine**. 2 ed. John Wiley and Sons, 2006. Cap. 6, p. 141-203

RIZZON, L. A.; ZANUZ, M. C.; MIELE, A. Evolução da acidez durante a vinificação de uvas tintas de três regiões vitícolas do Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 2, p. 179-183, 1998.

PSZCZÓLKOWSKI, P.; LECCO, C. C. **Manual de vinificación: Guia práctica para la elaboración de vinos**. 1 ed. Ediciones UC, 2011. p. 31-32

SAINT-CRICQ, G. N.; VIVAS, N.; GLORIES, Y. Maturité phénolique: définition et controle. **Revue Francaise d'Oenologie**, v. 6, n. 173, p. 22–25, 1998.

SPAYD, S. E.; TARARA, J.M.; MEE, D. L.; FERGUSON, J. C. Separation of Sunlight and Temperature Effects on the Composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot Berries. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 3, n. 53, p.171-182., 2002.

VRHOVSEK, U.; MATTIVI, F.; WATERHOUSE, A. L. Analysis of red wine phenolics: comparison of HPLC and spectrophotometric methods. **Vitis**, v. 40, n. 2, p. 87-91, 2001.

Tabela 1 – Maturação industrial e fenólica de uvas da variedade tinta Merlot, cultivadas nos municípios de Bento Gonçalves (BG) e Dom Pedrito (DP), safras 2010 e 2011.

Safra	2010			2011		
Vinhedo	1	2	3	1	2	4
Localização	DP	BG	BG	DP	BG	DP
Maturação industrial						
Acidez	6,0 ^c	8,3 ^a	7,5 ^b	4,3 ^f	5,7 ^d	5,2 ^e
pH	3,36 ^b	3,27 ^b	3,18 ^d	3,65 ^a	3,11 ^c	3,67 ^a
°Brix	19,0 ^d	17,2 ^e	20,8 ^c	22,0 ^b	18,5 ^d	24,1 ^a
°Brix / acidez	3,2	2,1	2,8	5,1	3,2	4,6
Maturação Fenólica						
ApH1*	262,3 ^c	522,0 ^a	522,7 ^a	372,1 ^b	410,5 ^b	189,3 ^d
ApH3,2	176,1 ^b	327,6 ^a	369,0 ^a	220,5 ^b	197,9 ^b	147,7 ^b
IMC%	30,3 ^{bc}	37,3 ^b	29,4 ^{bc}	40,8 ^{ab}	51,8 ^a	22,1 ^c
IPT_{uva}	24,8 ^a	24,4 ^a	28,0 ^a	20,1 ^b	15,7 ^c	24,6 ^a
TC%	28,1 ^b	53,8 ^a	52,7 ^a	46,6 ^a	50,6 ^a	23,8 ^b
TS%	70,9 ^a	46,2 ^b	47,3 ^b	53,4 ^b	49,4 ^b	76,2 ^a

* acidez (g.L⁻¹ ácido tartárico).

* IPT - índice de polifenóis totais; ApH1 - antocianinas potenciais (mg.L⁻¹ malvidina glucosídeo); ApH3,2 - antocianinas extraíveis (mg.L⁻¹ malvidina glucosídeo); IMC% - índice de maturidade celular; TC% - proporção de taninos nas cascas; TS% - proporção de taninos nas sementes.

* Médias seguidas por mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p < 0,05).

Tabela 2 – Compostos fenólicos em vinhos da variedade Merlot, provenientes de vinhedos localizados nos municípios de Bento Gonçalves (BG) e Dom Pedrito (DP), safras 2010 e 2011.

Safr	2010			2011		
	Vinhedo	1	2	3	1	2
Localização	DP	BG	BG	DP	BG	DP
FT*	2.057,7 ^{ns}	1.918,3	2.040,2	1.639,0	1.551,9	2.319,0
ANT	228,1 ^d	289,2 ^{cd}	367,9 ^{cd}	413,5 ^{bc}	569,6 ^{ab}	578,4 ^a
PRO	1,30 ^a	1,11 ^a	1,09 ^{ab}	1,13 ^a	0,44 ^b	1,33 ^a
IC	3,94 ^d	5,55 ^{cd}	7,06 ^{bc}	7,22 ^{bc}	10,29 ^a	7,95 ^b
%C	28,9 ^{ns}	27,3	32,5	27,3	34,3	35,0
%M	43,9 ^{ns}	47,4	36,4	47,9	42,8	44,1
%P	27,2 ^{ab}	25,4 ^{ab}	31,1 ^a	24,8 ^{ab}	22,9 ^b	21,0 ^b
TA	3,53 ^b	4,73 ^{ab}	6,22 ^{ab}	6,41 ^a	6,00 ^{ab}	5,21 ^{ab}
IPT_{vinho}	29,2 ^d	37,0 ^c	46,5 ^{ab}	40,4 ^{bc}	39,6 ^{bc}	48,3 ^a

* FT – fenóis totais (mg.L^{-1} ácido gálico); ANT – antocianinas (mg.L^{-1} malvidina glicosídeo); PRO – procianidinas (g.L^{-1} cloreto de cianidina); IC – intensidade de cor; % C - antocianinas copigmentadas; % M – antocianinas monoméricas; %P – antocianinas poliméricas; TA – antocianinas totais (unidades de absorvância); IPT – Índice de Polifenóis totais.

* Médias seguidas por mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). ns – diferença não significativa.

Tabela 3 – Coeficientes de correlação determinados nos vinhos e nas uvas, safra 2010 e 2011.

VINHO	UVA					
	IPT	ApH1	ApH3,2	TS%	IMC%	TC%
FT	0,77	-0,41	-0,07	0,64	-0,91	0,37
ANT	-0,69	-0,44	-0,62	0,21	0,30	-0,17
TAN	0,77	-0,40	-0,05	0,58	-0,87	0,54
IC	-0,65	0,07	-0,15	-0,26	0,50	-0,18
% C	-0,24	-0,25	-0,29	0,20	0,01	-0,28
% M	-0,43	-0,24	-0,40	0,11	0,27	-0,02
% P	0,70	0,50	0,72	-0,31	-0,31	0,31
TA	-0,28	0,11	0,04	-0,21	0,17	0,13
IPT _{vinho}	0,01	-0,07	0,01	0,02	-0,21	0,45

* FT – fenóis totais (mg.L^{-1} ácido gálico); ANT – antocianinas (mg.L^{-1} malvidina glicosídeo); TAN – taninos (g.L^{-1} cloreto de cianidina); IC – intensidade de cor; %C - antocianinas copigmentadas; %M – antocianinas monoméricas; %P – antocianinas poliméricas; TA – antocianinas totais (unidades de absorvância); IPT_{vinho} – Índice de Polifenóis totais

* IPT – índice de polifenóis totais; ApH1 – antocianinas potenciais (mg.L^{-1} malvidina glucosídeo); ApH3,2 - antocianinas extraíveis (mg.L^{-1} malvidina glicosídeo); IMC% – índice de maturidade celular; TC% – proporção de taninos nas cascas; TS% – proporção de taninos nas sementes.

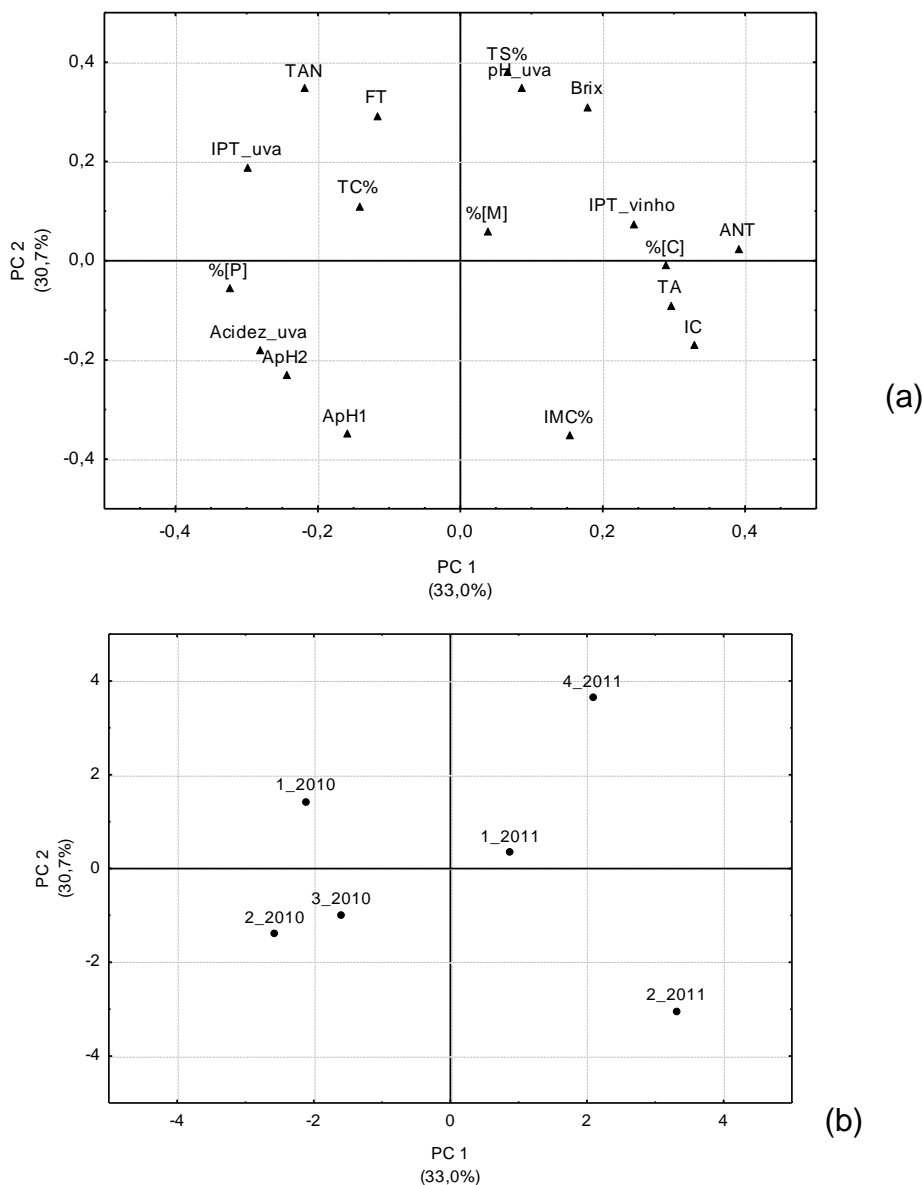


Figura 1 – Análise de Componente Principal dos parâmetros analisados nas uvas e vinhos da variedade Merlot, em quatro vinhedos e duas safras. (a) pesos das variáveis. (b) distribuição das amostras. Vinhedos 1 e 4 – localizados em Dom Pedrito; vinhedos 2 e 3 – localizados em Bento Gonçalves. * FT – fenóis totais (mg.L^{-1} ácido gálico); ANT – antocianinas (mg.L^{-1} malvidina glicosídeo); TAN – procianidinas (g.L^{-1} cloreto de cianidina); IC – intensidade de cor; %C - antocianinas copigmentadas; %M – antocininas monoméricas; %P – antocianinas poliméricas; TA – antocianinas totais (unidades de absorvância); IPT – Índice de Polifenóis totais; ApH1 – antocianinas potenciais (mg.L^{-1} malvidina glicosídeo); ApH3,2 - antocianinas extraíveis (mg.L^{-1} malvidina glicosídeo); IMC% – índice de maturidade celular; TC% – proporção de taninos nas cascas; TS% – proporção de taninos nas sementes.

3.2 Artigo 2: Copigmentation and color of Brazilian Merlot wines: I. Influence of skin contact time

COPIGMENTATION AND COLOR OF BRAZILIAN MERLOT WINES:

I. INFLUENCE OF SKIN CONTACT TIME

Aline de Oliveira FOGAÇA* and Carlos Eugenio DAUDT

Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Federal University of Santa Maria, 97105-910 Santa Maria, RS, Brazil.

***Corresponding author:** alinefogaca@uol.com.br

Abstract

Aim: To evaluate the impact of maceration time on color, polyphenols and copigmentation of Merlot wines in order to better understand the differences between two important Brazilian viticultural regions, Campanha Gaúcha and Serra Gaúcha, which have not been extensively studied.

Methods and results: Merlot grapes (red *Vitis vinifera* variety) from four vineyards located in the Campanha Gaúcha (n=2) and Serra Gaúcha (n=2) regions were harvested, crushed and fermented at the same temperature, with three different maceration times (4, 8 and 15 days). Wines from the 2009 and 2010 harvest were analyzed by spectrometry for phenolic composition and color. The results showed that the origin of the grapes had a higher influence on phenolic composition and color than the winemaking process treatments (i.e., maceration time). Maceration time did not affect copigmentation phenomena, and polymeric anthocyanins had the greatest correlation with color intensity.

Conclusion: The maceration time had different effects according to the wines studied. However, more studies will be necessary to identify the characteristics of the grapes and to understand the differences between these two viticultural regions.

Significance and impact of the study: One of the regions studied, Campanha Gaúcha, is a new Brazilian viticultural region. There are only few studies on this wine region. So, the results presented here will provide some guidance for the selection of the most appropriate oenological practices for this region.

Key words: merlot, maceration time, copigmentation, polyphenols

Résumé

Objectif : Vérifier l'impact du temps de macération sur la couleur, les polyphénols et la copigmentation de vins issus de cépages Merlot afin de mieux comprendre les différences qui existent entre deux grandes régions viticoles brésiliennes, Campanha Gaúcha et Serra Gaúcha, pour lesquelles il existe peu d'études.

Méthodes et résultats : Des raisins de la variété rouge *Vitis vinifera* Merlot cultivés dans quatre vignobles de la région de Campanha Gaúcha (n=2) et Serra Gaúcha (n=2) ont été récoltés, broyés et fermentés à la même température, avec trois temps de macération différents : 4, 8 et 15 jours. La composition phénolique et la couleur des vins des récoltes 2009 et 2010 ont été analysées par spectrométrie. Les résultats montrent que les caractéristiques des raisins sont plus importantes pour la couleur et la composition phénolique des vins que les techniques de vinification utilisées (temps de macération). Le temps de macération n'a eu aucun effet sur la copigmentation et les anthocyanes combinées étaient les plus fortement corrélées à la couleur.

Conclusion : Le temps de macération a des effets différents suivant les vins étudiés. Par conséquent, d'autres études seront nécessaires afin d'identifier les caractéristiques des raisins et de mieux comprendre les différences entre ces deux régions viticoles.

Signification et impact de l'étude : Une des régions étudiées, Campanha Gaúcha, est une nouvelle région viticole brésilienne. Il existe, à ce jour, peu d'études sur les vins de cette

région. Les résultats obtenus aideront au conseil de pratiques œnologiques plus adaptées à la région.

Mots clés : merlot, temps de macération, copigmentation, polyphénols

INTRODUCTION

Nowadays, the wine industry efforts are focused on the production of deeply colored, full bodied red wines, as this type of wine has become highly preferred by consumers. Color is one of the most important sensory attributes of red wines and is related to anthocyanin extraction from grape skins during the winemaking process. For this reason, many winemaking techniques have been developed to increase color extraction, allowing the production of wines meeting the market demands (Puertas *et al.*, 2008).

The concentration and composition of anthocyanins are affected by skin contact time, fermentation and aging conditions, and they affect the color of wine (Mazza *et al.*, 1999).

The evolution of grape anthocyanin content is highly influenced by the climatic conditions during the growing season and thus the differences between seasons for a single variety are greater than the differences between varieties within a season (Cacho *et al.*, 1992).

Gao *et al.* (1997), who worked with Pinot noir wines produced by different vinification processes, concluded that the presence of total or individual polymeric anthocyanins is directly related to wine color intensity, and that all the polymeric anthocyanins are important to wine color. Fermentation conditions has a deep influence on monomeric and polymeric anthocyanins, however, fermentation temperature was found to be the critical factor in the generation of polymeric anthocyanins. A fermentation temperature of 30°C favors both the formation of polymeric anthocyanins and a dark-colored wine. After fermentation, the content of individual monomeric anthocyanins declines gradually while that of polymeric anthocyanins increases. At the time of bottling, residual monomeric anthocyanins are only a

fraction of the initial concentration, and the total polymeric anthocyanin content reaches the highest levels (Gao *et al.*, 1997).

The color of red wines is positively influenced by the copigmentation phenomenon, which is due to molecular associations between pigments and other (usually non-colored) organic molecules in solutions (Levengood and Boulton, 2004; Boulton, 2001). These associations cause the pigments to exhibit a greater color than would be expected from those of the fermentation (Boulton, 2001). Moreover, it is suggested that copigmentation may have an important role in the subsequent evolution of color during red wine aging, affecting the speed of polymerization reactions and protecting the anthocyanin pigments from oxidative processes (Boulton, 2001). Copigmentation may also have implications in the sensory perception of tactile sensation (bitterness) attributed to polyphenols (Boulton, 2001). Finally, copigmentation depends on many factors: type and concentration of anthocyanins, type and concentration of copigments, pH, temperature and, in particular, the type of solvents (Ribererau-Gayon *et al.*, 2006).

Campanha Gaúcha is a new viticultural area in the southwest of the state of Rio Grande do Sul, Brazil, latitude 31° south, along the border with Uruguay. The moderate climate, with warm and dry summers, makes it a good viticultural area. However, it has been observed that grapes reach “technological maturity” (analysis of sugars, acidity and pH based mainly on optimum total solid content) before “phenolic maturity”. Daudt and Polenta (1999), working with *Vitis vinifera* grapes from Campanha Gaúcha and Serra Gaúcha (the traditional Brazilian wine region), showed that these two areas differ with respect to the amount of phenols, anthocyanins and tannins and color intensity of their wines. However, the same authors emphasize that the reasons for these differences need more complex studies.

Today, consumers are increasingly demanding highly colored red wines, with a good structure. To achieve this, it is necessary that polyphenol extraction from grapes be as

complete as possible to ensure color intensity and stability during aging. The main aim of this work was to evaluate the impact of skin contact time on color, other phenols and copigmentation of Merlot wines in order to understand the differences between these two Brazilian regions.

MATERIALS AND METHODS

Studied area and winemaking process

Merlot grapes from four commercial vineyards located in two different regions of Rio Grande do Sul (Brazil) were harvested in two seasons, 2009 and 2010, and used for the production of five wines (table 1).

Table 1 – Location of vineyards for wine production

Wine	Vineyard
1 and 3	Vineyard 1, Campanha Gaúcha
2	Vineyard 2, Campanha Gaúcha
4	Vineyard 3, Serra Gaúcha
5	Vineyard 4, Serra Gaúcha

The grapes were harvested at technological maturity, according to °Brix, acidity and pH parameters, and vinified. For each wine, three vinifications were made using different maceration times (4, 8 and 15 days), with three replications each. For all vinifications, dry active yeast (*Saccharomyces cerevisiae*, Blastocel Grand cru, Perdomini) was added (20 mg.L⁻¹) after the addition of 30 mg.L⁻¹ of sulfur dioxide. Fermentation was performed at 28°C, and at the end, sulfur dioxide was added again (20 mg.L⁻¹). The wines were bottled after two months of vatting.

Spectrometric analysis

All the measurements were carried out on a UV 11-000 (Pro-Analise, Brazil) spectrophotometer using 10 mm or 1 mm pathlength quartz and glass cells.

Color characteristics, i.e., intensity ($A_{420} + A_{520} + A_{620}$) and hue (A_{420}/A_{520}), were measured directly on the basis of absorption at 420 and 520 nm in a 1 mm optical path cell. The results were then multiplied by 10 in order to normalize the data to the conventional 10 mm optical path (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

Monomeric anthocyanins (%M), copigmented anthocyanins (%C) and polymeric anthocyanins (%P) were determined according to the method proposed by Boulton (1996). Briefly, the wines were adjusted to pH 3.6 (for standardization) and membrane filtered (0.45 mm pore size). For the monitoring of anthocyanins, 20 mL of 10% acetaldehyde solution was added to 2 mL of wine sample. After resting for 45 minutes, the absorbance was measured at 520 nm. Another 100 μ L of wine sample was mixed with 1900 μ L of buffer solution pH 3.6. After a few minutes, the absorbance was read at 520 nm. For the monitoring of the total amount of phenols, a diluted wine sample (1/100) was read directly at 280 nm.

Statistical analysis

The Statistica program for Windows release 5.1 (StatSoft Inc., 1998) was used for data processing. Analysis of variance (ANOVA) was used to compare the results among wines; and the means were statistically separated by a Tukey's test at 5%.

The data corresponding to the five wines and the two years were calculated and the linear correlations between those were analyzed. The correlations between color and phenolic composition of the wines were also calculated.

RESULTS AND DISCUSSION

According to the physico-chemical analysis of wines (table 2), it is possible to observe that the grapes had different degrees of technological maturity. pH was an important factor for this

study as it directly affects the balance between the colored and colorless forms of anthocyanins. Indeed, at high pH values ($>4,5$), the flavylum cation (color) is converted to colorless species (Brouillard *et al.*, 1989).

Table 2 - Alcohol (%vol.), acidity (g% tartaric acid) and pH in Merlot wines, harvest 2009 and 2010.

	2009		2010		
	Wine 1	Wine 2	Wine 3	Wine 4	Wine 5
Alcohol	14,0	12,5	11,7	12,5	12,8
Acidity	0,63	0,56	0,62	0,69	0,71
pH	3,40	3,80	3,65	3,53	3,66

Average of all treatments.

Table 3 shows the percentage of color due to copigmented anthocyanins, free anthocyanins (monomeric) and polymeric anthocyanins. Copigmentation has been shown to account for 30 to 50% of the color in young wines (Boulton, 2001); however, in this study copigmentation accounted for 15.8 to 41.5% of color, which is less than expected. Copigmentation is primarily influenced by the levels of several specific, non-colored phenolic components or cofactors (Boulton, 2001). Maceration time did not influence the percentage of copigmented anthocyanins found in wines 2, 4 and 5. However, in wines 1 and 3 (both from the same vineyard but from different years), the percentage of copigmented anthocyanins decreased with 15 days of skin contact. The different levels of cofactor and anthocyanin content in grapes and the winemaking procedures could explain these differences (Darias-Martin *et al.*, 2007).

Table 3 - Total (ANT), copigmented [C], monomeric [M] and polymeric [P] anthocyanins and total phenolic index (TPI) of Merlot wines, harvest 2009 and 2010, with different times of skin contact.

Wine		Skin contact time		
		4 days	8 days	15 days
Harvest 2009				
1	% [C]	22.1 ^{ab}	27.5 ^a	16.1 ^b
	% [M]	35.4 ^a	22.4 ^b	39.3 ^a
	% [P]	42.4 ^b	50.1 ^a	44.5 ^b
	ANT	3.36 ^b	3.70 ^{ab}	3.93 ^b
	TPI*	31.7 ^b	39.1 ^a	40.4 ^a
2	% [C]	20.4 ^{ns}	22.0	33.3
	% [M]	29.5 ^{ns}	24.9	27.4
	% [P]	50.1 ^{ab}	53.1 ^a	39.3 ^b
	ANT	4.76 ^{ns}	5.15	4.9
	TPI	39.6 ^b	43.3 ^b	50.1 ^a
Harvest 2010				
3	% [C]	36.0 ^a	28.9 ^a	15.8 ^b
	% [M]	31.2 ^b	43.9 ^{ab}	53.6 ^a
	% [P]	32.7 ^{ns}	27.2	31.6
	ANT	3.62 ^{ns}	3.53	3.62
	TPI	35.5 ^b	29.2 ^c	39.6 ^a
4	% [C]	31.9 ^{ns}	27.3	20.1
	% [M]	39.2 ^{ns}	47.4	48.5
	% [P]	28.8 ^{ab}	25.4 ^b	31.2 ^a
	ANT	4.21 ^b	4.73 ^a	4.95 ^a
	TPI	30.0 ^b	37.0 ^a	35.2 ^a
5	% [C]	40.4 ^{ns}	32.5	41.5
	% [M]	24.6 ^{ns}	36.4	12.8
	% [P]	35.7 ^{ns}	31.1	45.8
	ANT	4.66 ^b	6.22 ^{ab}	6.84 ^a
	TPI	33.8 ^b	44.5 ^{ab}	46.5 ^b

Means within each row followed by different letters are significantly different ($p < 0,05$). ns = not significant.

* TPI : OD 28 0nm, adjusted to pH 3.6.

The percentage of monomeric anthocyanins (%M), which represents the free forms of anthocyanins, increased with 15 days of maceration for wines 1 and 3, whereas the other wines did not show any difference. With some exceptions, the percentage of color due to monomeric forms was greater than that due to copigmented anthocyanins.

Polymeric anthocyanins (%P) rarely showed any significant difference among the three maceration times. However, in wines 1 and 2, the percentage of color due polymeric anthocyanins was greater than 50% with 8 days of skin contact. This could explain why wine 2, although showing a high pH value (table 2), had a high color intensity (figure 1).

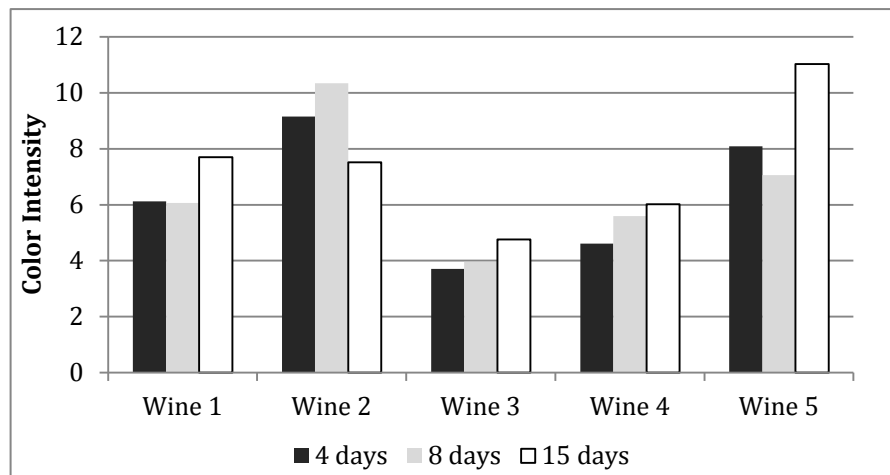


Figure 1 – Color intensity of Merlot wines, harvest 2009 and 2010, with different skin contact times.

As expected, the longer the maceration time, the greater the amount of total phenols (TPI) extracted in wines, especially with 15 days of skin contact. It is assumed that these phenols are originated from seed tannins.

According to several authors, an increase in tannin content, but not in anthocyanin content, is expected with the increase in maceration time (Sacchi *et al.*, 2005). From the analysis of the content of total anthocyanins (units of absorbance) obtained by the addition of acetaldehyde to the sample, it is possible to observe that for Campanha Gaúcha wines (1, 2 and 3), the

increase in total anthocyanin content with the increasing maceration time was less than that found in Serra Gaúcha wines (4 and 5), which increased with skin contact time. It should be noted that since pH has a strong influence on the color of anthocyanins, this determination was performed with wine samples adjusted to pH 3.6. This difference in the extraction of anthocyanins is most likely linked to the maturation degree of the grapes, which should be investigated in future work. The work by González-Neves (2008) reinforces the idea that the characteristics of the grapes have a strong influence on the effect of the winemaking techniques.

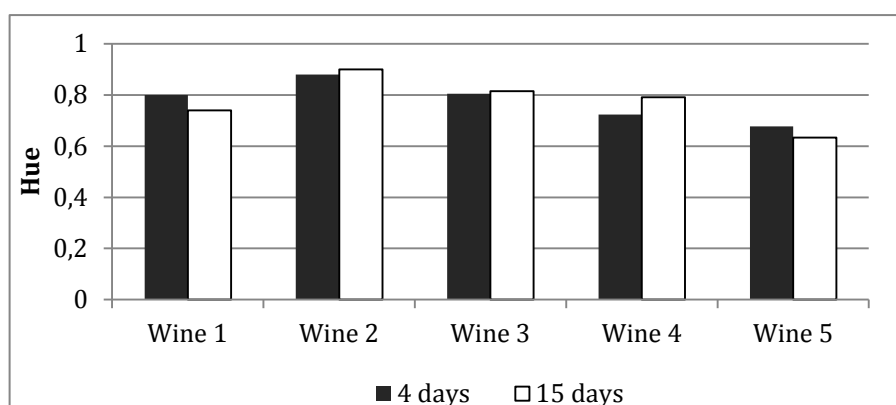


Figure 2 – Color Hue of Merlot wines, harvest 2009 and 2010, with different skin contact times.

Table 4 - *F* value and *p* value of two-way ANOVA of analyzed parameters, considering all the means of the studied wines, harvest 2009 and 2010.

	Origin		Skin contact time	
	<i>F</i> value	<i>P</i> value*	<i>F</i> value	<i>P</i> value*
% [C]	3.382	0.019	1.320	0.279
% [M]	6.79	0	0.76	0.471
% [P]	16.25	0	0	0.998
ANT	19.14	0	1.29	0.285
TPI	2.73	0.043	1.13	0.339
CI	17.41	0	0.65	0.528
Hue	9.07	0	0.50	0.610

* Bold values indicate significance at $p < 0,05$.

% C – copigmented anthocyanins; % M – monomeric anthocyanins; % P – polymeric anthocyanins; CI – color intensity; ANT – total anthocyanins; TPI – total phenolic index

Figure 1 shows the color intensity of the wines studied. In general, all wines except wine 2 showed an increase of color intensity with increasing skin contact time, with wine 5 showing the biggest increase in the color intensity parameter. Regarding hue (figure 2), skin contact time did not have any influence.

Table 5 – Total (ANT), copigmented [C], monomeric [M] and polymeric [P] anthocyanins, total phenolic index (TPI), color intensity (CI) and hue of Merlot wines, harvest 2009 and 2010, with different times of skin contact, considering all the means of the studied wines

	2009		2010		
	wine 1	wine 2	wine 3	wine 4	wine 5
% [C]	21.7 ^a	25.2 ^{ab}	27.2 ^{ab}	26.4 ^{ab}	38.1 ^c
% [M]	32.4 ^{ab}	27.3 ^a	42.2 ^b	45.1 ^b	24.5 ^a
% [P]	45.7 ^{bc}	47.52 ^c	30.4 ^a	28.5 ^a	37.4 ^{ab}
ANT	3.67 ^a	4.90 ^b	3.46 ^a	4.63 ^b	5.91 ^c
TPI	37.1 ^{ab}	31.0 ^a	34.7 ^{ab}	34.1 ^{ab}	41.62 ^b
CI	6.62 ^{bc}	8.39 ^{cd}	4.16 ^a	5.25 ^{ab}	8.52 ^d
Hue	0.79 ^a	0.87 ^c	0.82 ^{bc}	0.77 ^{ab}	0.70 ^a

Means within each row followed by different letters are significantly different ($p < 0,05$).

* % C – copigmented anthocyanins; % M – monomeric anthocyanins ; % P – polymeric anhtocyanin; IPT – total phenol index; ANT – total anthocyanin

The p values of two-way ANOVA (table 4) was performed considering all data obtained and shows the effect of grapes' origin (vineyards) and skin contact time for each parameter studied. In general, the origin of the grapes but not skin contact time had a major influence on the parameters. Based on these results, all means were grouped for each wine, with the aim of grouping wines by harvest and by region, regardless of treatments (i.e., skin contact time) (table 5). All wines showed significant differences among them. Wine 5 had the greatest intensity of color, the highest amount of total anthocyanins, the highest percentage of copigmented anthocyanins and the lowest percentage of monomeric anthocyanins.

Table 6 – Correlation coefficients between chemical and color parameters in Merlot wines, harvest 2009 and 2010.

	wine 1		wine 2		wine 3		wine 4		wine 5	
	CI*	H	CI	H	CI	H	CI	H	CI	H
% C	-0.68	0.48	-0.29	0.08	-0.87	0.4	-0.05	-0.26	0.39	-0.64
% M	0.56	-0.5	-0.35	0.47	0.77	-0.28	0.01	0.27	-0.86	0.79
% P	-0.18	0.36	0.72	-0.58	0.07	-0.21	0.07	-0.01	0.81	-0.56
TPI	0.45	-0.53	0.55	-0.22	0.62	0.01	0.71	0.25	-0.01	0.44
ANT	0.8	-0.53	0.62	-0.18	-0.44	-0.35	0.59	-0.1	0.51	-0.04

Bold values correspond to strong correlations.

CI – color intensity; H – Hue; % C – copigmented anthocyanins; % M – monomeric anthocyanins ; % P – polymeric anhtocyanins; TPI – total phenolic index; ANT – total anthocyanins

The use of the correlation coefficient (table 6) was conducted with the purpose of determining the main parameter influencing the color intensity and hue of the wines. For wine 5, there was a negative correlation between color intensity and the percentage of monomeric anthocyanins (-0.86) and a positive correlation with the percentage of polymeric anthocyanins (0.81); wine 2 also showed a positive correlation with the percentage of polymeric anthocyanins (0.72). These data emphasized the importance of polymeric pigments in the color of these wines and that copigmentation did not have a positive correlation with color intensity in this case; in fact, a negative correlation was observed for wine 3.

Wine 2 had the second highest color intensity and the highest polymeric anthocyanins (table 5), and these two parameters were positively correlated (0.72).

CONCLUSION

The maceration time influenced the phenolic characteristics and color of the wines studied; however, major differences were found when the wines were grouped according to vineyard. Thus, the origin of the grapes seems to have a higher influence on phenolics than the treatments used during the winemaking process. Maceration time did not affect copigmentation phenomena, and polymeric anthocyanins had the greatest correlation with

color intensity. However, more studies are necessary to identify the characteristics of the grapes and to understand the differences between these two Brazilian viticultural regions.

REFERENCES

- Boulton R., 1996. A method for the assessment of copigmentation in red wines. *Presented at ASEV 47th Annual Meeting*, Reno, Nevada, USA.
- Boulton R., 2001. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 52, 67–87.
- Brouillard R., Mazza G., Saad Z., Albrecht-Gary A.M., Cheminat A., 1989. The copigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe for the structural study of aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 2604–2610.
- Cacho J., Fernandez P., Ferreira V., Castells J.E., 1992. Evolution of five anthocyanidin- 3-glucosides in the skin of the Tempranillo, Moristel, and Garnacha grape varieties and influence of climatological variables. *Am. J. Enol. Vitic.*, 43, 244–248.
- Darias-Martín J., Carrillo-López M., Echavarri-Granado J.F., Díaz-Romero C., 2007. The magnitude of copigmentation in the colour of aged red wines made in the Canary Islands. *Eur. Food Res. Technol.*, 224, 643–648.
- Daudt C.E. and Polenta G.J., 1999. Les phénols dans les moûts de Cabernet Sauvignon et d'Isabel soumis à divers traitements. *J. Sci. Tech. Tonellerie*, Bordeaux, France, 5, 57–64.
- Gao L., Girard B., Mazza G., Reynolds A.G., 1997. Changes in anthocyanins and color characteristics of Pinot noir wines during different vinification processes. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2003–2008.
- González-Neves G., 2008. Estudio comparativo de la extracción de polifenoles en la elaboración de vinos Tannat por técnicas alternativas. *Revista Enología*, 1, 1–5.
- Levengood J. and Boulton R., 2004. The variation in the color due to copigmentation in young Cabernet Sauvignon wines. In: *Red wine color. Revealing the mysteries*. Waterhouse A. and Kennedy J. (Eds), American Chemical Society, Washington DC, 882, pp. 35–52.

Mazza G., Fukumoto L., Delaquis P., Girard B., Ewert B., 1999. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet franc, Merlot, and Pinot noir wines from British Columbia. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4009–4017.

Puertas B., Guerrero R., Jurado M., Jimenez M., Cantos-Villar E., 2008. Evaluation of alternative winemaking processes for red wine color enhancement. *Food Sci. Tech. Int.*, 14, 21–27.

Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D., 2006. Phenolic compounds. In: *Handbook of Enology - Volume 2. The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments*. 2 ed. John Wiley and Sons Ltd, pp. 141–203.

Sacchi K., Bisson L., Adams D., 2005. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 56, 197–206.

3.3 Artigo 3: Evolução dos Compostos Fenólicos e da cor em vinhos tintos da variedade Merlot

EVOLUÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E DA COR DE VINHOS TINTOS DA VARIEDADE MERLOT

Aline Fogaça^{1*}, Carlos Eugenio Daudt¹

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi acompanhar as mudanças nos teores de compostos fenólicos e na cor de vinhos da variedade Merlot, produzidos em duas regiões, nas safras 2009 e 2010, analisados em tempos diferentes de envelhecimento. Em todos os vinhos analisados ocorreu um aumento na quantidade de pigmentos poliméricos durante o envelhecimento dos vinhos, fato comprovado pela redução na quantidade de antocianinas sensíveis ao bissulfito, redução na porcentagem de cor devido a antocianinas monoméricas, aumento na porcentagem de cor devido a antocianinas poliméricas e aumento da cor a 420 nm. Os vinhos elaborados com uvas da região da Campanha diferenciaram-se dos elaborados com uvas da Serra por alguns fatores. Durante o envelhecimento dos vinhos da Campanha, há um aumento na cor devido a copigmentação e as antocianinas poliméricas; comparando os dados, a velocidade de polimerização parece ser maior nos vinhos da Campanha. A intensidade de cor e antocianinas totais é maior nos vinhos da Serra. De maneira geral, o tempo de maceração de 15 dias parece ser o mais recomendado, por resultar em maior intensidade de cor, no entanto, a influência do tempo de maceração parece diminuir com o envelhecimento do vinho.

¹ Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, CEP 97105-910, Santa Maria - RS, Brasil, E-mail: alinefogaca@uol.com.br. * Autor para correspondência

Palavras- Chaves: antocianinas, taninos, copigmentação, uvas

ABSTRACT

The aim this work was to follow changes in the levels of phenolic compounds and color of Merlot wines, produced in two regions, harvest in 2009 and 2010, analyzed at different times of aging. In all wines analyzed there was an increased in the amount of polymeric pigments during aging of wines, a fact evidenced by the reduction in the amount of anthocyanin sensitivity to bisulfite bleaching, decrease in the percentage of color due monomeric anthocyanins, increase in the percentage of color due polymeric anthocyanins and increase in color at 420 nm. Wines made with grapes of ‘Campanha Gaúcha’ region differed from the wines made with grapes of ‘Serra Gaúcha’ region by some factors. During aging of Campanha wines, there is an increase in color due copigmentation and due polymeric anthocyanins; comparing the data, the polymerization rate seems to be higher in the ‘Campanha’ wines, however, the color intensity and total anthocyanins is higher in ‘Serra’ wines. In general, the maceration time of 15 days seems to be recommended, because it results in greater color depth, however, the influence of maceration time appears to decrease with aging wine.

Keywords: anthocyanins, tannins, copigmentation, grapes

INTRODUÇÃO

As reações químicas de polifenóis são particularmente importante em vinhos tintos, uma vez que estes são responsáveis pelas mudanças de cor e de sabor que ocorrem durante o envelhecimento (Cheynier, 2005). A cor de um vinho é resultado de uma mistura interessante e desafiadora, composta por vários componentes (Versari et al., 2007), incluindo a presença de antocianinas monoméricas livres (Mazza, 1995), a influência do fenômeno de

copigmentação com outros compostos fenólicos não coloridos (Boulton, 2001) e os pigmentos poliméricos (Somers, 1971).

Inúmeras reações de flavonóides ocorrem durante o processo de vinificação e envelhecimento de vinhos, produzindo uma grande variedade de produtos incolores e pigmentos (Fulcrand et al., 2006). Durante o envelhecimento, um vinho tinto sofrerá mudanças em algumas de suas características: alguns vinhos irão envelhecer rapidamente alcançando uma qualidade superior já no primeiro ano, enquanto que outros irão requerer muitos anos de estocagem antes de atingir sua qualidade máxima (Somers & Evans, 1977).

Durante o processo de envelhecimento, a cor do vinho tinto muda de vermelho brilhante para uma tonalidade vermelho amarronado, devido a formação de pigmentos poliméricos, com participação das antocianinas extraídas das cascas das uvas (Bakker et al., 1993). Esta mudança é atribuída a formação de pigmentos poliméricos novos e mais estáveis, através de reações entre antocianinas originárias das uvas com outros compostos fenólicos, em particular, flavan-3-ols (Jurd, 1969; Scollary, 2010), sendo que o primeiro estudo confirmando a reação direta entre antocianinas e taninos em vinhos tintos foi realizado por Remy et al. (2000). Esses pigmentos poliméricos são mais resistentes ao branqueamento com dióxido de enxofre e menos sensíveis a variações de pH, quando comparados as antocianinas (Scollary, 2010). Vários fatores podem influenciar a polimerização de um vinho. Na ausência de acetaldeído, o dióxido de enxofre reduz a taxa de perda de antocianinas e reduz levemente a polimerização. Quando o acetaldeído está presente, os efeitos do dióxido de enxofre não são mais observados (Picinelli et al., 1994). Monagas et al. (2005) trabalhando com vinhos das variedades tintas Tempranillo, Graciano e Cabernet Sauvignon, observaram que durante o envelhecimento na garrafa, ocorreu uma redução progressiva do conteúdo de antocianinas, sendo esta mais pronunciada entre 3 e 9 meses após o engarrafamento.

A variedade Merlot é cultivada em várias regiões vitícolas do Rio Grande do Sul, Brasil, e seu vinho tem grande comercialização. O objetivo deste trabalho foi acompanhar as mudanças nos teores de compostos fenólicos e da cor de vinhos da variedade Merlot, produzidos em duas regiões, nas safras 2009 e 2010, analisados em diferentes tempos de envelhecimento.

MATERIAL E MÉTODOS

As uvas, da variedade tinta *Vitis vinifera* Merlot, foram obtidas em vinhedos comerciais, em plena produção, localizados em duas regiões diferentes do Rio Grande do Sul: Campanha Gaúcha e Serra Gaúcha. Na safra 2009 foram elaborados os vinhos 1 e 2, de vinhedos localizados no município de Dom Pedrito (região da Campanha Gaúcha); na safra 2010 foram elaborados os vinhos 3, 4 e 5, de vinhedos localizados no município de Dom Pedrito (vinho 3) e no município de Bento Gonçalves (vinhos 4 e 5).

A colheita foi realizada no momento da maturação tecnológica, ou seja, de acordo com os parâmetros de °Brix, acidez e pH. De cada vinhedo foram realizadas 3 microvinificações, com tempos de maceração diferentes (4, 8 e 15 dias), em triplicata. Os experimentos foram realizados em recipientes com capacidade de 5 litros. Após o desengace e esmagamento, foi realizada a sulfitação (50 mg.L^{-1} de SO_2) e a inoculação de levedura (*Saccharomyces cerevisiae bayanus* da marca Perdomini®, tipo Blastocel Grand Cru), na dosagem de 20 g.100L^{-1} . A temperatura de fermentação foi mantida em 28°C , sendo realizadas duas remontagens diárias. Após o término da fermentação, foi realizada nova sulfitação (20 mg.L^{-1} de SO_2) e trasfega, com separação das borras. Após 2 meses, foi realizada nova trasfega e engarrafamento. Os vinhos foram analisados em dois tempos de envelhecimento; na safra 2009 aos 18 e 28 meses; na safra 2010 aos 6 e 12 meses.

As análises foram realizadas utilizando cubetas de quartzo de 1 ou 10 mm de caminho ótico, de acordo com o comprimento a ser lido, em um espectrofotômetro UV 11-000, marca Pró Análise (UV/Visível).

A intensidade de cor e a tonalidade dos vinhos foram determinadas conforme (Ribéreau-Gayon et al., 2006), através da leitura da absorbância das amostras, em pH natural, nos comprimentos de onda 420, 520 e 620 nm. A copigmentação foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Boulton (1996), através da determinação de antocianinas copigmentadas, monoméricas, poliméricas e totais. As seguintes metodologias também foram utilizadas: polifenóis totais, expresso em mg.L^{-1} de ácido gálico (Singleton & Rossi, 1965); antocianinas por descoloração por bissulfito, expressos em mg.L^{-1} de malvidina-3-glicosídeo (Ribéreau-Gayon & Stonestreet, 1965) e taninos por hidrólise ácida, expressos em mg.L^{-1} de cloreto de cianidina (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

A análise estatística foi realizada através do programa StatSoft (Statistica) e do Microsoft Office Excel©. As médias obtidas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias foram separadas pelo teste de Tukey a 5%. A partir do agrupamento de todos dados de cada vinho, foi calculado o coeficiente de correlação linear entre os parâmetros. A análise de componente principal foi realizada através do software Pirouette 4.0 (Infometrix, Woodinville, EUA), sendo os dados autoescalados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os vinhos analisados foi observada uma redução na quantidade de antocianinas presentes entre os dois tempos de envelhecimento. Para os vinhos da safra 2009 (tabela 1), com 12 meses de envelhecimento, há uma diferença significativa na quantidade de antocianinas entre os diferentes tempos de maceração, o que não foi observado após 28 meses. Já para os vinhos analisados com 6 e 18 meses (safra 2010 – tabela 2), ainda observa-se diferença entre os diferentes tempos de maceração. Ressalta-se que essa análise não refere-

se a quantidade total de antocianinas presentes na amostra, e sim a quantidade de pigmentos sensíveis ao bissulfito (Somers & Evans, 1977). O branqueamento por bissulfito é consequência da adição de hidrogênio do sulfito no anel do cátion flavilium, nas posições 2 ou 4 (Scollary, 2010). Durante o processo de envelhecimento de um vinho, os novos pigmentos formados podem ser completamente (visitina A) ou parcialmente resistentes (visitina B) ao branqueamento por dióxido de enxofre (Bakker & Timberlake, 1997), já os pigmentos oligoméricos podem ser branqueados pelo bissulfito. Dessa forma, a redução no teor de antocianinas deve-se a formação de pigmentos poliméricos resistentes ao branqueamento com bissulfito, os quais iniciam o processo de formação logo após o esmagamento da uva (Bakker et al., 1986).

Os teores de taninos apresentados nas tabelas 1 e 2 representam, na verdade, uma estimativa do teor de procianidinas da amostra. Essa metodologia baseia-se no fato de que, quando aquecidos em meio ácido, algumas ligações desses compostos são quebradas, resultando em carbocátions, que são posteriormente convertidos em cianidinas, desde que o meio permita essa oxidação (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Na safra 2009 (Tabela 1), conforme esperado, com 15 dias de maceração foram encontrados os maiores valores de taninos, para todos os vinhos estudados. Por outro lado, na safra 2010 (Tabela 2), as diferenças entre os tempos de maceração foram pouco significativas. Em relação ao processo de envelhecimento, em ambas as safras, observa-se uma tendência de redução no teor de taninos. Essa redução pode ser explicada pela instabilidade das moléculas de procianidinas, que podem sofrer reações de oxidação e polimerização (Ribéreau-Gayon et al., 2006), da mesma forma que para antocianinas, a redução no teor de taninos está ligada a formação de pigmentos mais estáveis. Algumas amostras apresentam um aumento do teor de taninos com o passar do tempo, entretanto, de acordo com Ribéreau-Gayon et al. (2006), não é incomum observar um aumento nos valores de taninos durante o envelhecimento dos vinhos, o que não

corresponde a um aumento na quantidade de taninos, essa variação pode ser explicada pela contínua quebra de ligações e rearranjos dos taninos em um vinho (Fulcrand et al., 2006).

A medida que o vinho envelhece espera-se um aumento no teor de pigmentos poliméricos e uma redução no teor de monômeros, devido as reações de polimerização. De maneira geral, a copigmentação é importante em vinhos tintos jovens, podendo explicar até 50% da cor de um vinho (Boulton, 2001). De acordo com a tabela 3, os resultados mostram que, entre 12 e 28 meses, aumentou a influência da copigmentação e dos polímeros na cor dos vinhos, ocorrendo uma expressiva redução em relação a monômeros, em quase todos os vinhos estudados da safra 2009. Na média, com 28 meses, 50% da cor desses vinhos é devido a antocianinas polimerizadas. Para os vinhos elaborados na safra 2010 (tabela 4), observa-se que o vinho 3 apresenta um comportamento similar aos vinhos da safra 2009, ressaltando que esses três vinhos provêm de vinhedos localizados na mesma região. Entretanto, para os vinhos 4 e 5, a influência da copigmentação diminui, e os monômeros, apesar de sofrerem redução, ainda contribuem com 30% da cor. Sugere-se que os vinhos 4 e 5 apresentam uma velocidade de polimerização menor em relação ao vinho 3.

O teor de antocianinas totais apresenta uma redução durante o envelhecimento. Entretanto, as diferenças são mais acentuadas na safra 2010, onde o tempo de envelhecimento foi menor.

A variação na intensidade de cor durante o envelhecimento está ligado ao tipo de pigmentos formados, por exemplo, considera-se que alguns pigmentos derivados de antocianinas apresentam uma tonalidade amarelo-vermelho ou laranja-vermelho, com máximo de absorbância a 420 nm (Birse, 2007). Nos vinhos da safra 2009 (tabela 5), observa-se que após 28 meses de envelhecimento na garrafa, ocorreu uma redução na intensidade da cor em relação a análise realizada com 12 meses; por outro lado, para a tonalidade de cor, apesar de pouca expressiva, observa-se um aumento. É interessante

observar que para o vinho 1, o tempo de maceração de 15 dias apresentou uma maior intensidade de cor; já para o vinho 2, a maior intensidade de cor foi observado no tempo de maceração de 8 dias. Entretanto, para os vinhos da safra 2010 (tabela 6), observa-se um aumento na intensidade de cor e tonalidade durante o envelhecimento, o que pode ser explicado pela análise ter sido realizada com 12 meses, e não com 28 meses, como na safra 2009. Nesse ano, o tempo de maceração com 15 dias apresentou a maior intensidade de cor, para os três vinhos analisados. Gómez-Plaza (1999), trabalhando com a variedade Monastrell, na Espanha, encontrou resultados semelhantes a este estudo, ou seja, decréscimo na quantidade de antocianinas totais, aumento no teor de antocianinas poliméricas e tonalidade ao longo de 12 meses de envelhecimento. De acordo com o autor, o aumento na tonalidade está associado a formação de polímeros entre antocianinas-acetaldeído-catequina, resultando na formação de intermediários altamente coloridos com um aumento na absorbância, sendo que a temperatura influencia a velocidade de polimerização.

A análise de componente principal, figura 1, permitiu observar a variação nos compostos fenólicos nos vinhos estudados durante o processo de envelhecimento, além das diferenças entre safras. O PC1 (que explica 34,73% da variação) permitiu separar os dois vinhos da safra 2009 de acordo com o tempo envelhecimento, sendo os principais parâmetros (figura 2): porcentagem de monômeros (%M), antocianinas totais (TA), tonalidade (TON) e porcentagem de amarelo (%A). Uma das principais diferenças entre os vinhos analisados com 12 meses e 28 meses é o aumento no teor de pigmentos mais amarronados (o que resulta em aumento da tonalidade do vinho) e o aumento no teor da cor devido a pigmentos poliméricos (%P). Um aspecto interessante é que com 28 meses, a diferença entre os tempos de maceração parece ser menor, uma vez que há uma aproximação das amostras dos vinhos no espaço do gráfico. O PC 2 (que explica 19,57% da variação) permitiu separar os vinhos de acordo com a safra, a exceção do vinho 5. Um dos principais fatores de separação foi a intensidade de cor

e o teor de taninos (figura 2). Dessa forma, os vinhos da safra 2010 apresentaram menor intensidade de cor em ambas as regiões. Os parâmetros que distinguiram o vinho 5 foram a intensidade de cor (IC) e a quantidade de antocianinas totais (AT).

Analisando somente os vinhos elaborados na safra 2010, observa-se que no vinho 3, entre 6 e 12 meses, ocorre um aumento da importância dos pigmentos amarronados (%A) e uma diminuição no efeito da maceração sobre as características do vinho. A nítida separação do vinho 3, com 12 meses, dos demais vinhos elaborados nessa safra, ocorre devido a queda na porcentagem de antocianinas monoméricas (%M), comprovando a diferença na velocidade de polimerização dos vinhos.

CONCLUSÕES

Em todos os vinhos analisados ocorreu um aumento na quantidade de pigmentos poliméricos durante o envelhecimento dos vinhos, fato comprovado pela redução na quantidade de antocianinas sensíveis ao bissulfito, redução na porcentagem de cor devido a antocianinas monoméricas, aumento na porcentagem de cor devido a antocianinas poliméricas e aumento da cor a 420 nm.

Nos vinhos elaborados com uvas produzidas em Dom Pedrito, durante o passar do tempo, há um aumento na cor devido as antocianinas poliméricas e a copigmentação, nas duas safras analisadas. No entanto, nos dois vinhos elaborados com uvas produzidas em Bento Gonçalves, esse fato não é observado; sugere-se essa diferença seja decorrente da velocidade de polimerização dos compostos fenólicos.

De maneira geral, o tempo de maceração de 15 dias resultou em maior intensidade de cor, no entanto, a influência do tempo de maceração parece diminuir com o envelhecimento do vinho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bakker, J. et al. The determination of anthocyanins in aging red wines: Comparison of HPLC and spectral methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 37, p. 121-126, 1986.

Bakker, J. et al. Model wine solutions: colour and composition changes during ageing. **Vitis**, v. 32, p. 111-118, 1993.

Bakker, J.; Timberlake, C. F. Isolation, Identification, and Characterization of New Color-Stable Anthocyanins Occurring in Some Red Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 35-43, 1997.

Birse, M. J. **The colour of red wine**. 2007. 300p. Tese (Doutorado) - University of Adelaide, Austrália.

Boulton, R. B. A method for the assessment of copigmentation in red wines. In: ASEV 47th Annual Meeting, Reno, Nevada, June 1996. **Proceedings...ASEV 47th Annual Meeting**, USA, 1996.

Boulton, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the colour of red wine: a critical review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 52, p. 67-87, 2001.

Cheyrier, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, (1 Suppl), 223S-229S, 2005

Fulcrand, H. et al. Phenolic Reactions during Winemaking and Aging. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, n. 3, p. 289-297, 2006.

Jurd, L. Review of polyphenol condensation reactions and their possible occurrence in the aging of wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 20, p. 197-195, 1969.

Gómez-Plaza, E. Color and phenolic compounds of a young red wine as discriminant variables of its ageing status. **Food Research International**, v. 32, n. 7, p. 503-507, 1999.

Mazza, G. Anthocyanins in grapes and grape products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 341-371, 1995.

Monagas, M. et al. Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle. **European Food Research And Technology**, v. 220, p. 607-614, 2005.

Picinelli, A. et al. Model wine solutions : Effect of sulphur dioxide on colour and composition during ageing. **Vitis**, v. 33, p. 31-35, 1994.

Remy, S. et al. First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin-tannin reactions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 6, p. 745-751, 2000.

Ribéreau-Gayon, P.; Stonestreet, E. Le dosage des antocyanes dans le vin rouge. **Bulletin de la Société Chimique de France**, v. 9, n. 419, p. 2649-52, 1965.

Ribéreau-Gayon, P. et al. **Handbook of Enology - Vol. 2: The chemistry of wine stabilization and treatments**. John Wiley & Sons, Ltd.2006, 2nd ed., p. 441.

Singleton, V.; Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144 -158, 1965.

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: 01 jun. 2011.

Somers, T.C. The polymeric nature of wine pigments. **Phytochemistry**, v. 10, p. 2175-2186, 1971.

Somers, T. C.; Evans, M. E. Spectral evaluation of young wines: anthocyanin equilibrium, total phenolics, free and molecular sulfur dioxide “chemical age”. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 28, n. 3, 2p. 79-281, 1977.

Versari, A. et al. Characterisation of Colour Components and Polymeric Pigments of Commercial Red Wines by Using Selected UV-Vis Spectrophotometric Methods. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 28, n.1, p. 6-10, 2007.

Tabela 1 - Fenóis Totais - FT- (mg.L^{-1} ácido gálico), antocianinas - ANT - (mg.L^{-1} malvidina-3-glucosídeo) e taninos - TAN - (g.L^{-1} cloreto de cianidina) em vinhos da variedade Merlot, safra 2009, com diferentes tempos de maceração, vinhedos localizados no município de Dom Pedrito.

	vinho	12 meses			28 meses		
		4 dias	8 dias	15 dias	4 dias	8 dias	15 dias
FT	1	3.057,4 ^a	3.174,1 ^a	3.137,0 ^a	1.158,2 ^b	1.109,0 ^b	1.383,6 ^b
	2	3.042,6 ^a	3.040,7 ^a	3.353,7 ^a	889,1 ^c	1.286,6 ^b	1.392,7 ^b
ANT	1	461,7 ^b	551,3 ^a	531,4 ^a	102,2 ^c	102,1 ^c	103,0 ^c
	2	582,2 ^b	589,4 ^b	747,8 ^a	166,8 ^c	178,6 ^c	148,5 ^c
TAN	1	1,39 ^{bc}	1,65 ^b	1,97 ^a	1,24 ^c	1,50 ^{bc}	1,49 ^{bc}
	2	0,94 ^{cd}	0,82 ^d	1,90 ^a	1,20 ^{cd}	1,33 ^{bc}	1,70 ^{ab}

*Médias seguidas por letras iguais, na mesma linha, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tabela 2 - Fenóis Totais (mg.L^{-1} ácido gálico), antocianinas -ANT- (mg.L^{-1} malvidina-3-glucosídeo) e taninos (g.L^{-1} cloreto de cianidina) em vinhos da variedade Merlot, safra 2010, com diferentes tempos de maceração, vinhedos localizados no município de Dom Pedrito (3) e Bento Gonçalves (4 e 5).

		6 meses			18 meses		
		4 dias	8 dias	15 dias	4 dias	8 dias	15 dias
Fenóis Totais	3	1.820,5 ^b	2.057,7 ^{ab}	2.245,2 ^a	675,8 ^c	631,8 ^c	896,7 ^c
	4	1.490,5 ^b	1.918,3 ^a	2.027,2 ^a	1.140,2 ^c	1.425,3 ^{bc}	1.355,7 ^{bc}
	5	1.754,1 ^{ab}	2.040,2 ^a	2.106,3 ^a	528,4 ^c	1.389,9 ^b	1.224,5 ^b
ANT	3	242,7 ^a	228,1 ^a	177,6 ^b	138,5 ^c	123,5 ^{cd}	96,2 ^d
	4	263,5 ^{ab}	289,2 ^a	278,8 ^{ab}	105,6 ^c	186,2 ^{bc}	142,8 ^c
	5	213,3 ^{bc}	367,9 ^a	228,4 ^{bc}	164,5 ^c	231,4 ^b	178,7 ^{bc}
Taninos	3	1,13 ^{ab}	1,30 ^a	0,81 ^{ab}	0,73 ^b	0,87 ^{ab}	0,96 ^{ab}
	4	0,92 ^{ab}	1,11 ^a	1,18 ^a	0,74 ^b	1,02 ^a	1,00 ^{ab}
	5	1,68 ^a	1,09 ^{ab}	1,80 ^a	0,43 ^c	1,26 ^{ab}	0,50 ^{bc}

*Médias seguidas por letras iguais, na mesma linha, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tabela 3 - Antocianinas copigmentadas (%), monoméricas(%), poliméricas (%) e antocianinas totais (AT) em vinhos Merlot, na safra 2009, com diferentes tempos de maceração, em duas épocas de estocagem, vinhedos localizados no município de Dom Pedrito.

Vinho		12 meses			28 meses		
		4 dias	8 dias	15 dias	4 dias	8 dias	15 dias
1	% copigmentação	22,1 ^a	27,5 ^b	16,1 ^{bc}	35,7 ^a	39,0 ^a	41,3 ^a
	% monomeros	35,4 ^a	22,4 ^b	39,3 ^a	9,8 ^c	8,2 ^c	7,8 ^c
	% polímeros	42,4 ^c	50,0 ^{ab}	44,5 ^{bc}	54,5 ^a	52,8 ^a	50,9 ^{ab}
	AT	3,4 ^{ab}	3,7 ^{ab}	3,9 ^a	2,8 ^b	2,9 ^{ab}	3,8 ^{ab}
2	% copigmentação	20,4 ^{ns}	22,0	33,3	33,6	38,1	18,5
	% monomeros	29,5 ^a	24,9 ^{ab}	27,4 ^a	10,9 ^{bc}	9,1 ^c	34,1 ^a
	% polímeros	50,1 ^{ab}	53,1 ^{ab}	39,3 ^b	55,6 ^a	52,8 ^{ab}	48,6 ^{ab}
	AT	4,6 ^{ns}	5,1	4,9	4,3	4,7	3,9

AT – antocianinas totais, medidas após adição de acetaldeído a amostra, em unidades de absorvância.

*Médias seguidas por letras iguais, na mesma linha, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tabela 4 - Antocianinas copigmentadas (%), monoméricas(%), poliméricas (%) e antocianinas totais (AT) em vinhos Merlot, na safra 2010, com diferentes tempos de maceração, em duas épocas de estocagem, vinhedos localizados no município de Dom Pedrito (3) e Bento Gonçalves (4 e 5).

Vinho		6 meses			18 meses		
		4 dias	8 dias	15 dias	4 dias	8 dias	15 dias
3	% copigmentação	37,8 ^a	28,9 ^{ab}	15,0 ^b	44,9 ^a	33,5 ^{ab}	34,3 ^{ab}
	% monomeros	29,7 ^{bc}	43,9 ^{ab}	53,4 ^a	11,9 ^c	21,9 ^{bc}	15,1 ^c
	% polímeros	32,5 ^{cd}	27,2 ^d	31,5 ^{cd}	43,3 ^{ab}	44,6 ^{ab}	50,3 ^a
	AT	3,5 ^a	3,5 ^a	3,2 ^a	2,4 ^b	2,4 ^b	2,4 ^b
4	% copigmentação	31,9 ^a	27,3 ^a	20,1 ^{ab}	12,0 ^b	21,7 ^{ab}	20,9 ^{ab}
	% monomeros	39,3 ^{bc}	47,4 ^{ab}	48,5 ^a	39,3 ^{bc}	34,3 ^{bc}	32,5 ^c
	% polímeros	28,8 ^b	25,4 ^b	31,2 ^b	49,0 ^a	44,1 ^a	44,7 ^a
	AT	4,2 ^a	4,7 ^a	5,0 ^b	3,1 ^d	3,4 ^{cd}	3,6 ^c
5	% copigmentação	40,5 ^a	32,5 ^{ab}	41,3 ^a	14,2 ^{bc}	34,1 ^{ab}	11,3 ^c
	% monomeros	24,6 ^{ns}	36,4	23,7	36,4	22,1	35,7
	% polímeros	35,7 ^{ns}	31,1	45,8	47,5	41,8	53,5
	AT	4,7 ^b	6,2 ^a	6,8 ^a	3,6 ^b	4,2 ^b	4,8 ^b

AT – antocianinas totais, medidas após adição de acetaldeído a amostra, em unidades de absorvância.

*Médias seguidas por letras iguais, na mesma linha, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Tabela 5 – Intensidade de cor e tonalidade em vinho Merlot, safra 2009, com diferentes tempos de maceração, vinhedos localizados no município de Dom Pedrito.

Vinho		12 meses			28 meses		
		4 dias	8 dias	15 dias	4 dias	8 dias	15 dias
1	Intensidade	6,12 ^{bc}	6,06 ^{bc}	7,70 ^a	5,81 ^c	6,01 ^{bc}	7,11 ^{ab}
	Tonalidade	0,80 ^{ab}	0,80 ^{ab}	0,74 ^c	0,92 ^a	0,94 ^a	0,85 ^{ab}
2	Intensidade	8,0 ^{ab}	10,3 ^a	6,8 ^b	7,8 ^{ab}	7,8 ^{ab}	6,3 ^b
	Tonalidade	0,88 ^{ns}	0,84	0,90	0,91	0,91	0,96

*Médias seguidas por letras iguais, na mesma linha, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Tabela 6 – Intensidade de cor e tonalidade em vinhos Merlot, safra 2010, com diferentes tempos de maceração, vinhedos localizados no município de Dom Pedrito (3) e Bento Gonçalves (4 e 5).

Vinho		6 meses			12 meses		
		4 dias	8 dias	15 dias	4 dias	8 dias	15 dias
3	Intensidade	3,79 ^b	3,94 ^{ab}	4,75 ^{ab}	4,24 ^{ab}	4,44 ^{ab}	4,81 ^a
	Tonalidade	0,83 ^{ns}	0,82	0,81	0,88	0,87	0,85
4	Intensidade	4,57 ^b	5,55 ^{ab}	5,65 ^{ab}	5,98 ^a	5,71 ^{ab}	5,90 ^a
	Tonalidade	0,76 ^{ns}	0,78	0,77	0,79	0,81	0,77
5	Intensidade	7,05 ^b	8,09 ^b	11,03 ^a	6,68 ^b	7,93 ^b	9,49 ^{ab}
	Tonalidade	0,68 ^b	0,81 ^a	0,63 ^b	0,82 ^a	0,87 ^a	0,80 ^a

*Médias seguidas por letras iguais, na mesma linha, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

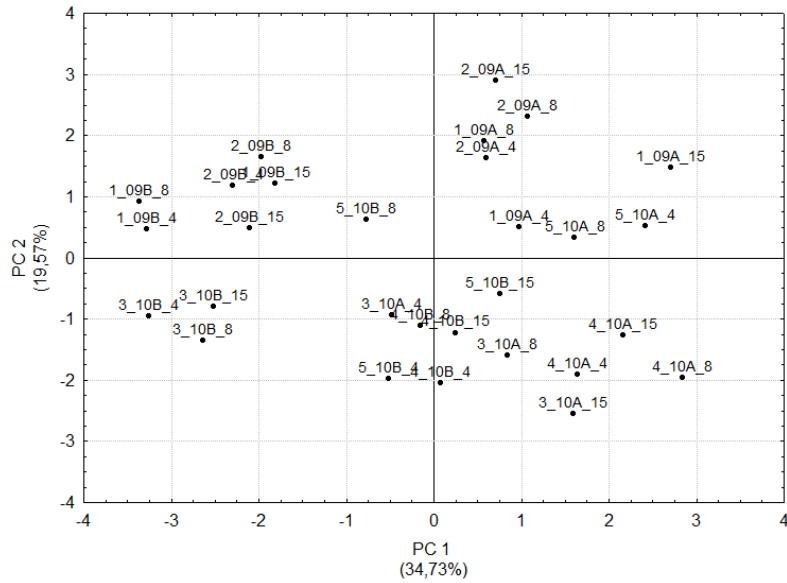


Figura 1 – Distribuição das amostras na análise de Componente Principal em vinhos da variedade Merlot, duas safras (2009 e 2010), dois tempos de estocagem (A e B) e três tempos de maceração (4, 8 e 15 dias). Vinhos 1, 2 e 3 – Dom Pedrito; vinhos 4 e 5 – Bento Gonçalves.

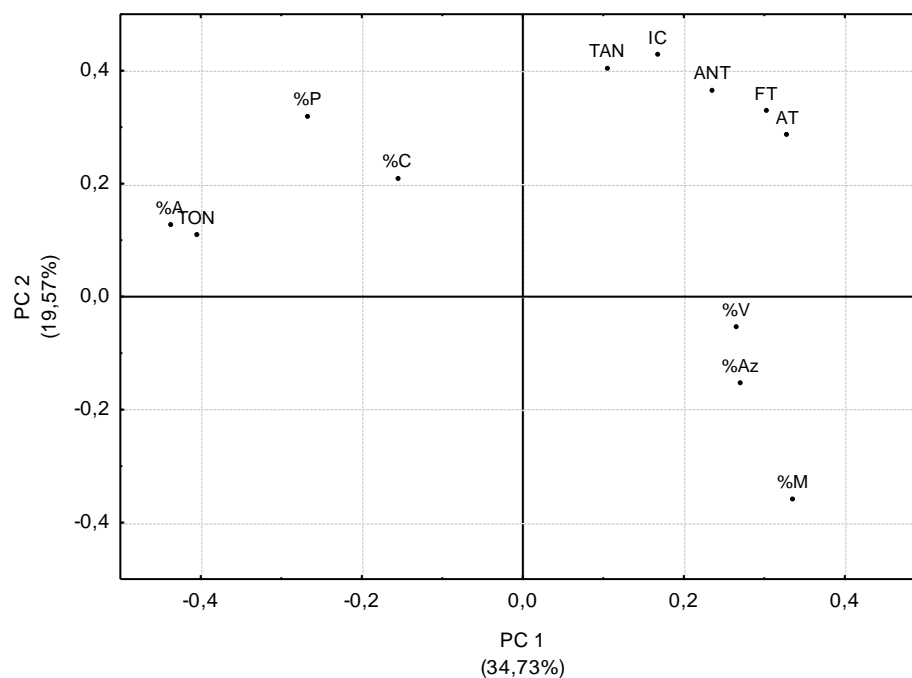


Figura 2 – Pesos das variáveis na análise de Componente Principal em vinhos da variedade Merlot. * FT – fenóis totais (mg.L^{-1} ácido gálico); ANT – antocianinas (mg.L^{-1} malvidina glicosídeo); TAN – taninos (g.L^{-1} cloreto de cianidina); IC – intensidade de cor; %C - antocianinas copigmentadas; %M – antocianinas monoméricas; %P – antocianinas poliméricas; TA – antocianinas totais (unidades de absorvância); IPT – Índice de Polifenóis totais; ApH1 – antocianinas potenciais (mg.L^{-1} malvidina glicosídeo); ApH3,2 - antocianinas extraíveis (mg.L^{-1} malvidina glicosídeo); IMC% – índice de maturidade celular; TC% – proporção de taninos nas cascas; TS% – proporção de taninos nas sementes.

3.4 Artigo 4: Phenolic compounds of Merlot wines from two wine regions of Rio Grande do Sul, Brazil

Phenolic compounds in Merlot wines from two wine regions of Rio Grande do Sul, Brazil

Phenolics compounds in Merlot wines

Abstract

In Brazil, the grape and wine production are concentrated in the state of Rio Grande do Sul, and “Serra” is the tradicional wine region. In the last years, new areas have emerged, with emphasis for the “Campanha” region; the red wines in this region have low acidity, little color intensity and are wines for drinking young, even when produced from varieties such Merlot and Cabernet Sauvignon. The purposes of this study was to evaluate the influence of different maceration types on the phenolic compounds of Merlot wines, made with grapes produced in two regions of Rio Grande do Sul, Serra and Campanha, as well as to identify the key differences between the wines produced. The localization of the vineyard seems to be more important for the characteristics of the wine than the type of maceration. The color due copigmentation was important in wines made with short maceration. The effect of extended maceration was different than expected for the Campanha region wines; a larger maceration increased the extraction of tannins, resulting in greater color intensity and a greater amount of anthocyanins. The pH control of the Campanha region wines seems to be a key factor.

Keywords: wine, copigmentation, anthocyanin, tannin, Merlot, color

Introduction

Nowadays, deeply colored and full-bodied red wines are highly valued by brazilian consumers. For this reason, many winemaking techniques have been developed to improve color extraction allowing obtaining products with market demanding characteristic [1]. Winemaking practices also help to change the extraction of phenolic compounds and their subsequent reactions in wine. Maceration conditions greatly affect the relative proportion of anthocyanins and flavanols diffusing into the wine [2].

The extent of red color in wines is due to a number of factors including the type and concentration of anthocyanins, pH, free SO₂ level, and the extent of polymerization and copigmentation. The color displayed by a red wine continues to change during its life and can be affected by a number of winemaking practices and environmental conditions [3,4]. Darias-Martín et al. [5] noted that wines made with grapes from warm zones presented higher values of polymeric pigments (%P), and lower values of free anthocyanins (%M).

There are two major characteristics of the wine medium that affect the color of wine pigments and consequently influence red wine color; these factors are the pH value of the medium and the susceptibility to color bleaching in the presence of the sulfite ion [6].

In Brazil, the grape and wine production are concentrated in the state of Rio Grande do Sul, and “Serra” is the tradicional wine region. In the last years, new areas have emerged, with emphasis for the “Campanha” region; the climate of this region has adequate rainfall and sunshine to produce wines of quality, as confirmed by numerous researches [7,8] and even the Brazilian wine industry. The red wines in this region have low acidity, little color intensity and are wines for drinking young, even when produced from varieties such Merlot and Cabernet Sauvignon. The purposes of this study was to evaluate the influence of different maceration techniques on the phenolic compounds of Merlot wines, made with grapes produced in two regions of Rio Grande do Sul, as well as identify the key differences between the wines produced.

Material and Methods

Red grapes from *Vitis vinifera* Merlot variety were harvested in 2011 from commercial vineyards, located in two cities: Dom Pedrito (vineyards 1 and 2) and Bento Gonçalves (vineyard 3).

The grapes were harvested at the technological maturity, accordingly to the °Brix, acidity and pH parameters and vinified with three replications each. In the musts, dry active yeast (*Saccharomyces cerevisiae bayanus*, Blastocel Grand cru, Perdomini) was added (0,2 g.L⁻¹), after the addition of 30 mg.L⁻¹ of sulfur dioxide. The fermentation temperature was done at 28°C. At the end of fermentation, sulfur dioxide was added again (20 mg.L⁻¹). After two months, the wines were cleaned and bottled. Four maceration types were tested: short (4 days of skin contact time), control (8 days of skin contact time), extended (15 days of skin contact time) and WBF (whole berry fermentation: destemming, light crushed and fermented with whole berries for 4 days, then completely crushed, staying on the skins for 8 days). After 4 months of bottling, the analyses were carried over.

Alcohol (°GL), pH and total acidity (g.100ml⁻¹ tartaric acid) were determined by OIV [9]. Total phenolics were determined by Folin Ciocalteu method (mg.L⁻¹ galic acid equivalent); anthocyanins by the bleaching method (mg.L⁻¹ de malvidin-3-glucoside); tannins by acid hydrolysis (g.L⁻¹ cianidin chloride) [4].

The color characteristics, intensity (A420 + A520 + A620) and nuance (A420/A520), have been measured directly on the basis of absorption at 620, 420 and 520 nm, registering the measurement in a 1 mm optical path cell and multiplying the results by 10, since the measure is conventionally referred to the optical path of 10 mm [4].

The contribution of monomeric anthocyanin (% M), copigmentation anthocyanin (%C), degree of anthocyanin polymerization (% P) and total anthocyanin (TA) were determined from the method proposed by Boulton [10].

Monomeric anthocyanins (mg.L⁻¹ de malvidin-3-glucoside) and polymeric anthocyanins (mg.L⁻¹ de malvidin-3-glucoside) were calculated by fractionation using C18 Sep-pak cartridges [11].

The methodology described by Mazza et al. [12] was used to estimate the phenolic content of wine samples. Samples were diluted 1:10 with 10% ethanol solution. The method consisted of placing 0.25mL of sample or standard in a test tube and adding 0.25mL of 0.1% HCl in 95% ethanol and 4.55mL of 2% HCl. The solution was mixed and allowed to sit for approximately 15min before reading the absorbance at 280 and 320nm with a spectrophotometer. The absorbance at 280 nm was used to estimate total phenolic content (F280) and at 320 nm was used to estimate tartaric esters (F320). Standards used were gallic acid in 10% ethanol for total phenolics and caffeic acid in 10% ethanol for tartaric esters. All standards were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

All the measurements were carried out by UV 11-000 (Pro Analise) spectrophotometer using quartz and glass cells with 10 mm or 1 mm pathlength.

The Statistica program for Windows release 5.1 (StatSoft Inc., 1998) was used for data processing. Analyses of Variance (ANOVA) was applied to the results among wines; the means were statistically separated by Tukey at 5%. Principal component analysis was used from standardized (autoescalate) variables to study the relationship between the 20 analyzed parameters, using software Pirouette 4.0 (Infometrix, USA).

Results and Discussion

The physical-chemical parameters are shown in table 1. As expected, the type of maceration influenced the pH of resulting wines; the highest values being found in wines

produced with extended maceration. This aspect is important, since the pH values affect directly the equilibrium between red and colorless forms of anthocyanins; at high pH the flavilium cation (reddish color) is converted into uncolored species [13].

Anthocyanins are extracted at the beginning of the process, mainly in the aqueous phase, during maceration at the beginning of alcoholic fermentation [4]. Some studies show that different maceration times did not significantly influence the intensity and hue of color [14]. This is in agreement with the results for wine 3, from Serra (Table 2). However, for the Dom Pedrito wines (1 e 2) there is a different profile extraction (Table 2 e 3). The increase in maceration time (extended maceration) resulted in higher amounts of anthocyanins (ANT e TA) and color intensity for both wines.

Tannins from the skins are extracted with the anthocyanins at the beginning of the process of fermentation; however its extraction continues for a longer period due to the location of these tannins in the skin cells. Tannins from seeds are solubilized when the cuticle is dissolved by ethanol [4]. In this study the amount of procyanidins is estimated by the tannins analysis (TAN). All wines showed the highest amount of procyanidins (TAN), table 2, in the wines produced with extended maceration, as well the highest amount of total phenol compounds (Table 2) and total phenol index (TPI- Table 3). These results are in agreement with Cerpa-Calderón and Kennedy [15]; which evaluated the influence of the degree of crushing in the content of procyanidin in Merlot wines. They found that total procyanidin extraction increased with the time of fermentation in all treatments; in addition, crushing increased the rate at which procyanidins were extracted.

As expected, the short maceration had significantly lower total phenolics (Table 2), as well TPI (Table 3) for all wines studied. This type of maceration had the highest values of color due to copigmentation (Table 3). Some facts suggest that the copigmentation level in red wine is independent of the free anthocyanins and total phenol content, having to look for some other relationship with copigment precursors, such as the non-flavonoid compounds. It explains the highest effect of copigmentation in short maceration, which has less phenolics compounds. Darias Martin et al. [5] noted the copigmented anthocyanins (%C) do not appear to be correlated with the location of vineyard.

The WBF maceration is used by some wineries, but there are not enough studies on the effects of this type of maceration. It showed very similar results to the control treatment (both have 8 days of skin contact time); it was noted that only the anthocyanin content and the color intensity are a little smaller in WBF.

Gao et al. [16] working with Pinot noir grapes, reported that the total or individual polymeric anthocyanins were directly related to the color intensity of the wines, and all polymeric anthocyanins were important contributors to wine color; however, in our study the color intensity did not show a direct correlation with any specific parameters. In general, it is known that the polymerization process starts already during the winemaking process, and wine 2 shows the highest amounts of polymeric anthocyanins (AP) (Table 3), but this has not resulted in higher color intensity (Table 2). Besides that, the wine 2 does not have high value of color due polymerization (%P); this difference between the two parameters is explained by the fact that color due polymerization (%P) determines the amount of pigment resistant to sulfite bleaching, while the amount of polymeric anthocyanins (AP) is linked to the size of the molecule. Birse [6] suggests that there are no difference between wine regions in terms of the percentage of pigments that did not lose their color upon SO₂ bleaching; this observation suggests that it is not the quantity of SO₂-stable pigments that contributed the most to the overall red wine color.

The principal component analysis (Figure 1) allowed the separation of wines according to origin and type of maceration and principal component 1 and 2 explains 70,9% of the variation of the samples. However the location of vineyard seems to be the most important factor; the effect of each maceration type is different according to the wine.

The multivariate analysis (Figure 1) allowed to observe that the differences in wines produced in different regions could not be explained by just one parameter. Wine 3, from Serra grapes, presented the highest total acidity, the highest percentage of red (%R) and color intensity (CI). On the other hand, wines 1 and 2, from Dom Pedrito, showed the highest pH, procyanidins, total phenol index (TPI) and total phenols (TF). The pH value seems to be negatively correlated with wine color intensity and percentage of red (abs 520 nm). Thus, management of wine pH in this region seems to be critical.

These results are in agreement with Zimman et al. [17], that worked with four vineyards located in different Californian viticultural areas and had observed that fruit composition at one site had an overwhelming effect on phenolic composition compared to the maceration treatments. The same conclusion was achieved by Puertas et al. [1] with Tempranillo variety, where grape variety, climate conditions and stage of ripeness have been proposed as important determinants on effects of winemaking process.

The data of the wines from Dom Pedrito were grouped and the results are shown in figure 2. The principal factor 1 and 2 explains 73,6% of the variation. Even within the same region there is a clear wine separation by vineyard's location; the maceration type also

allowed some separation, but the effect of each type is dependent of the wine analyzed (Figure 2a). The most important parameters in principal component 1 were the amount of phenols, percentage of red, the amount of tartaric esters and color due copigmentation.

Principal component 2 allowed to separate especially wines made with short and extended maceration; the most important parameters were percentage of red, color intensity, percentage of yellow and color hue. However, wines 1 and 2 had different behaviors.

Procyanidins are the primarily responsible substances for the astringency properties in red wines, and this astringency varies with the degree of procyanidins polymerization and galloylation [4]. This aspect (adstringency) needs more studies, as the Campanha region wines do not show highest adstringency despite the greater amount of procyanidin (TAN) found in these wines.

The localization of the vineyard seems to be more important for the characteristics of the wine than the type of maceration. The color due copigmentation was important in wines made with short maceration. The effect of extended maceration was different than expected for the Campanha region wines; a larger maceration increased the extraction of tannins, resulting in greater color intensity and a greater amount of anthocyanins. The pH control of the Campanha region wines seems to be a key factor.

References

1. Puertas B., Guerrero R. F., Jurado M. S., Jimenez M. J. and Cantos-Villar E. (2008). Evaluation of Alternative Winemaking Processes for Red Wine Color Enhancement. *Food Science and Technology International*, 14: 21-27. doi:10.1177/1082013208095686
2. Fulcrand H., Salas E. and Cheynier V. (2006). Phenolic Reactions during Winemaking and Aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3): 289-297.
3. Boulton R. B., Singleton V. L., Bisson L. F. and Kunkee R. E. (1998) *Principles and Practices of Winemaking*. Kluwer, New York, 1st. ed, p. 613.
4. Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A. and Dubourdiou D. (2006). *Handbook of Enology - Vol. 2: The chemistry of wine stabilization and treatments*. L. John Wiley & Sons, Ed. 2nd ed., p. 441
5. Darias-Martín J., Carrillo-López M., Echavarri-Granado J. F. and Díaz-Romero C. (2006). The magnitude of copigmentation in the colour of aged red wines made in the Canary Islands. *European Food Research and Technology*, 224 (5): 643-648. doi:10.1007/s00217-006-0352-7

6. Birse, M. J. (2007). *The Colour of Red Wine*. . University of Adelaide.
7. Daudt C. E., Mutti L. S. M. and Kerstein E. (1973). Possibilidades de produção de *Vitis vinifera* em Uruguaiana e vizinhanças. *Ciência Rural*, 3:163-163.
8. Motta F. S. (2003). Disponibilidade climática para maturação da uva destinada a produção de vinhos finos nas regiões da Serra do Nordeste e Campanha do Estado do Rio Grande do Sul. *Agrociência*, 9(3): 297-299
9. OIV - Office International de la Vigne et Du Vin (2010). *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins*. Paris: O.I.V.
10. Boulton R. B. (1996). A method for the assessment of copigmentation in red wines. In: ASEV 47th Annual Meeting, Reno, Nevada, June 1996. *Proceedings...ASEV 47th Annual Meeting, USA*.
11. Ho P., Silva M. D. C. M. and Hogg T. A. (2001). Changes in colour and phenolic composition during the early stages of maturation of port in wood, stainless steel and glass. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(13): 1269-1280. doi:10.1002/jsfa.938
12. Mazza G., Fukumoto L., Delaquis P., Girard B. and Ewert B. (1999). Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10): 4009-17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10552758>
13. Brouillard R., Mazza G., Saad Z., Albrecht-Gary A. M. and Cheminat A. (1989). The copigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe for the structural study of aqueous solutions. *Journal of the American Chemical Society*, 111 (7): 2604-2610. doi:10.1021/ja00189a039
14. Vrhovsek U., Vanzo A. and Nemanic J. (2002). Effect of red wine maceration techniques on oligomeric and polymeric proanthocyanidins in wine , cv . Blaufränkisch. *Vitis*, 41(1): 47-51.
15. Cerpa-Calderón F. K. and Kennedy J. A. (2008). Berry integrity and extraction of skin and seed proanthocyanidins during red wine fermentation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56 (19): 9006-14. doi:10.1021/jf801384v
16. Gao L., Girard B., Mazza G. and Reynolds A. G. (1997). Changes in Anthocyanins and Color Characteristics of Pinot Noir Wines during Different Vinification Processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(6): 2003-2008. doi:10.1021/jf960836e

17. Zimman A., Joslin W. S., Lyon M. L., Meier J. and Waterhouse A. L. (2002). Maceration Variables Affecting Phenolic Composition in Commercial-scale Cabernet Sauvignon Winemaking Trials. *American Journal of Enology and Viticulture*, 2(52): 93-98.

Table 1 – pH, total acidity (g% tartaric acid) e alcohol (°GL) in Merlot wines with different maceration types, harvest 2011.

Wine	Maceration	pH	acidity	alcohol
1	Short	3,42 ^a	0,60 ^{ns}	13,6 ^b
	Control	3,46 ^b	0,64	13,6 ^b
	WBF	3,57 ^{ab}	0,62	13,7 ^b
	Extended	3,67 ^b	0,61	13,9 ^a
2	Short	3,74 ^b	0,65 ^{ns}	13,5 ^{ns}
	Control	3,81 ^b	0,63	13,4
	WBF	4,21 ^a	0,62	13,8
	Extended	4,08 ^a	0,60	13,8
3	Short	3,13 ^{ns}	0,74 ^{ns}	10,7 ^{ns}
	Control	3,21	0,75	10,8
	Extended	3,23	0,78	11,1

* Means followed by different letters, in the same column, for each wine, are significantly different ($p < 0,05$). ns = not significant. Short: 4 days of maceration; control: 8 days of maceration; extended: 15 days of maceration; WBF: whole berry fermentation - destemming, light crushed and fermented with whole berries for 4 days, then completely crushed, staying on the skins for 8 days.

Table 2 – Phenolic compounds in Merlot wines, different maceration types, harvest 2011.

Wine	Maceration	ANT	TAN	TF	CI	Hue	% R	% Y	% B
1	Short	222,5 ^b	1,15 ^{ab}	1.176,1 ^c	5,6 ^b	0,76 ^a	50,9 ^b	38,8 ^a	10,3 ^{ns}
	Control	413,5 ^a	1,13 ^b	1.639,0 ^b	7,2 ^b	0,63 ^b	54,9 ^{ab}	34,3 ^b	10,8
	WFB	406,0 ^a	1,03 ^b	1.594,8 ^b	7,1 ^b	0,65 ^{ab}	54,3 ^{ab}	35,2 ^{ab}	10,5
	Extended	493,7 ^a	1,52 ^a	2.112,2 ^a	10,2 ^a	0,59 ^b	56,4 ^a	33,5 ^b	10,2
2	Short	518,9 ^c	1,28 ^b	1.752,0 ^b	7,9 ^{ab}	0,69 ^b	52,4 ^a	36,0 ^{ns}	11,6 ^b
	Control	578,4 ^a	1,33 ^b	2.319,0 ^{ab}	7,9 ^{ab}	0,77 ^{ab}	49,5 ^b	38,1	12,4 ^{ab}
	WFB	550,4 ^b	2,42 ^a	2.323,7 ^{ab}	6,9 ^b	0,81 ^a	47,8 ^b	38,7	13,5 ^a
	Extended	580,6 ^a	2,84 ^a	2.791,7 ^a	8,4 ^a	0,75 ^{ab}	49,9 ^{ab}	37,4	12,7 ^{ab}
3	Short	523,7 ^{ns}	0,47 ^{ns}	1.262,1 ^{ns}	8,2 ^{ns}	0,43 ^{ns}	64,5 ^{ns}	27,7 ^{ns}	7,7 ^{ns}
	Control	569,6	0,44	1.551,9	10,3	0,51	59,9	30,3	9,7
	Extended	499,2	1,01	1.615,0	8,5	0,53	58,9	31,0	10,2

ANT – anthocyanin, mg.L⁻¹ malvidin-3-glucosídeo; TAN – tannins, g.L⁻¹ cianidin chloride; TF – total phenols, mg.L⁻¹ galic acid; CI – color intensity; %R – absorbance at 520 nm; %Y – absorbance at 420 nm; % B – absorbance at 620 nm. Short: 4 days of maceration; control: 8 days of maceration; extended: 15 days of maceration; WFB: whole berry fermentation - destemming, light crushed and fermented with whole berries for 4 days, then completely crushed, staying on the skins for 8 days.

* Means followed by different letters, in the same column, for each wine, are significantly different (p<0,05). ns = not significant.

Table 3 – Percentage of color due to Copigmented Anthocyanins (%C), to Monomeric Anthocyanins (%M) and to Polymeric Pigments (%P), Total Anthocyanin (TA – absorbance units), Total Phenol Index (TPI – OD 280 nm) and Monomeric (AM) and Polymeric Anthocyanins (AP), in Merlot wines, with different types of maceration, harvest 2011.

Wine	Maceration	%C	%M	%P	TA	TPI	AM	AP
1	Short	48,3 ^a	24,6 ^b	27,1 ^{ns}	3,91 ^c	31,8 ^c	94,5 ^b	279,4 ^{ns}
	Control	27,3 ^b	47,9 ^a	24,8	5,21 ^b	40,4 ^b	239,3 ^a	255,7
	WBF	45,3 ^a	27,1 ^b	27,6	4,71 ^{bc}	35,1 ^{bc}	199,8 ^a	218,9
	Extended	46,7 ^a	26,2 ^b	27,1	6,43 ^a	46,9 ^a	219,9 ^a	266,5
2	Short	37,9 ^a	42,6 ^{ns}	19,5 ^b	5,85 ^{ab}	45,5 ^b	247,9 ^b	958,4 ^a
	Control	35,0 ^{ab}	44,1	21,0 ^{ab}	6,41 ^a	48,3 ^b	344,4 ^a	960,1 ^a
	WBF	27,5 ^b	47,5	25,0 ^{ab}	5,42 ^b	48,5 ^b	382,9 ^a	908,4 ^a
	Extended	32,7 ^{ab}	39,7	27,5 ^a	6,44 ^a	55,5 ^a	342,3 ^a	1.512,5 ^b
3	Short	37,7 ^{ns}	48,4 ^{ns}	13,9 ^{ns}	4,92 ^{ns}	30,2 ^{ns}	342,7 ^{ns}	318,2 ^{ns}
	Control	34,3	42,8	22,9	6,00	39,6	349,1	283,4
	Extended	34,2	46,2	19,6	5,45	39,8	291,0	306,4

* Means followed by different letters, in the same column, for each wine, are significantly different ($p < 0,05$). ns = not significant. AM e AP = mg.L^{-1} malvidin-3-glucoside. Short: 4 days of maceration; control: 8 days of maceration; extended: 15 days of maceration; WBF: whole berry fermentation - destemming, light crushed and fermented with whole berries for 4 days, then completely crushed, staying on the skins for 8 days.

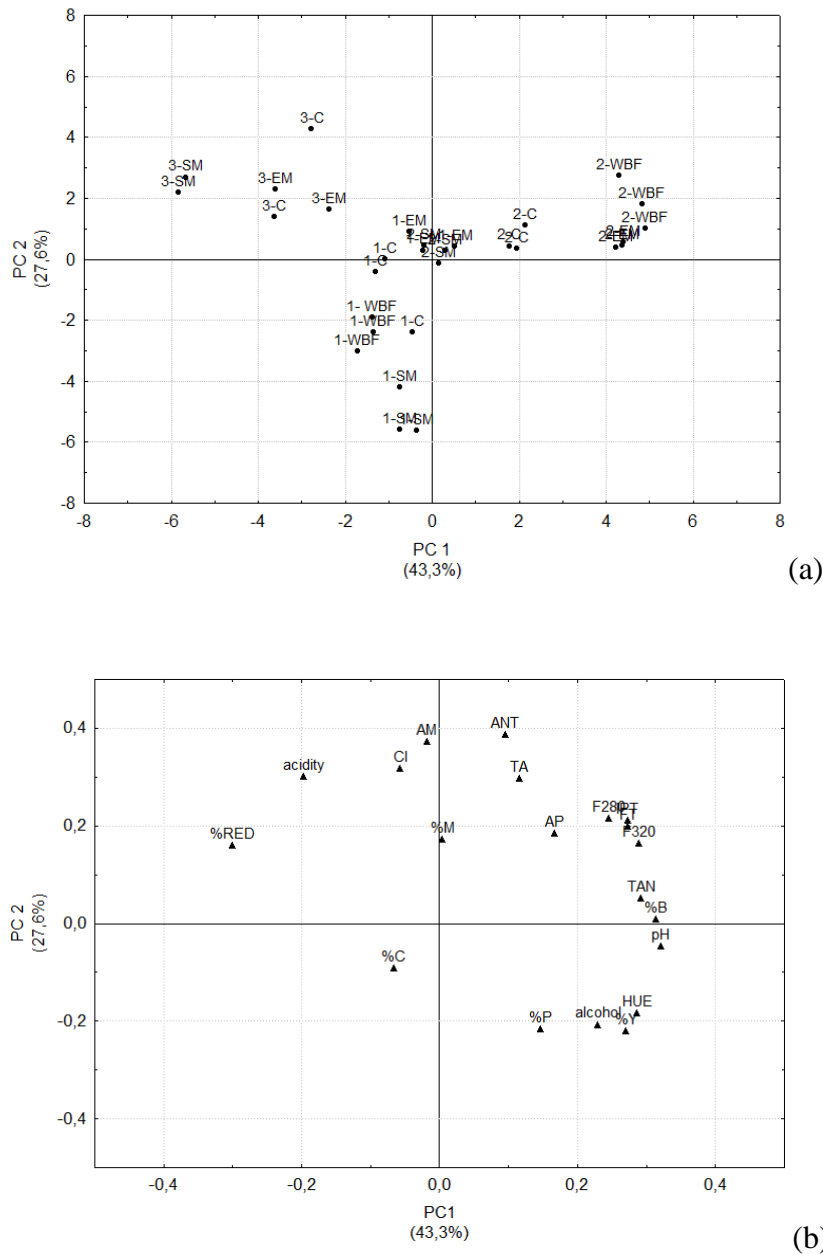


Fig. 1 - Principal component analysis of Merlot wines, harvest 2011. (a) loadings; (b) scores. 1 – wine 1; 2 – wine 2; 3 – wine 3; SM – short maceration; C – control maceration; WBF – whole berry fermentation; EM – extended maceration. ANT – anthocyanin, mg.L^{-1} malvidin-3-glucosídeo; TAN – tannins, g.L^{-1} cianidin chloride; TF – total phenols, mg.L^{-1} gallic acid; CI – color intensity; %R – absorbance at 520 nm; %Y – absorbance at 420 nm; %B – absorbance at 620 nm; %C - copigmented anthocyanins; %M - monomeric anthocyanins; %P - polymeric pigments (%P); TA - total anthocyanin (absorbance units), TPI - Total phenol index (OD 280 nm); AM e AP - monomeric and polymeric anthocyanins, em mg.L^{-1} malvidin-3-glucoside; F320 – tartaric esters, mg.L^{-1} caffeic acid; F280 - total phenolics, mg.L^{-1} gallic acid.

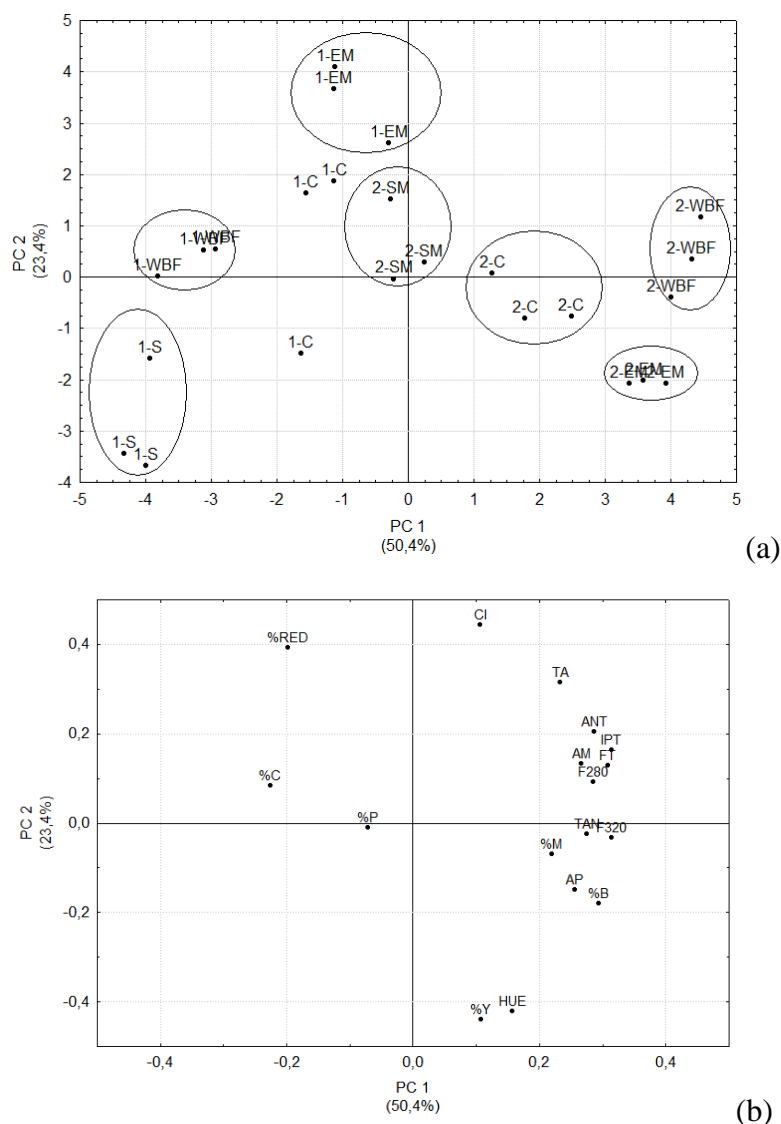


Fig. 2 - Principal component analysis of Merlot wines of Dom Pedrito, harvest 2011. (a) loadings; (b) scores. 1 – wine 1; 2 – wine 2; SM – short maceration; C – control maceration; WBF – whole berry fermentation; EM – extended maceration. ANT – anthocyanin, mg.L^{-1} malvidin-3-glucosídeo; TAN – tannins, g.L^{-1} cianidin chloride; TF – total phenols, mg.L^{-1} gallic acid; CI – color intensity; %R – absorbance at 520 nm; %Y – absorbance at 420 nm; %B – absorbance at 620 nm; %C - copigmented anthocyanins; %M - monomeric anthocyanins; %P - polymeric pigments (%P); TA - total anthocyanin (absorbance units), TPI - Total phenol index (OD 280 nm); AM e AP - monomeric and polymeric anthocyanins, mg.L^{-1} malvidin-3-glucoside; F320 – tartaric esters, mg.L^{-1} caffeic acid; F280 - total phenolics, mg.L^{-1} gallic acid.

4 DISCUSSÃO

Duas regiões do Rio Grande do Sul se destacam na produção de uvas finas no Brasil: Serra e Campanha. Seus vinhos tintos apresentam características diferentes em relação ao conteúdo e ao comportamento dos compostos fenólicos. Uma das principais diferenças é a menor intensidade de cor nos vinhos produzidos com uvas da região da Campanha. Uma das hipóteses que poderia explicar essa diferença seria o fato de que as uvas cultivadas na região da Campanha atingem a maturação industrial antes de atingirem a maturação fenólica. Outro aspecto é que atualmente há dúvidas sobre quais os métodos mais adequados para a vinificação de uvas tintas, especialmente das uvas produzidas na Campanha. Com o objetivo de melhorar o entendimento dessas questões acima mencionadas, durante três safras, foram analisadas a composição fenólica das uvas e dos vinhos da variedade tinta Merlot, provenientes de dois vinhedos do município de Bento Gonçalves (Serra Gaúcha) e dois do município de Dom Pedrito (Campanha Gaúcha).

A maturação fenólica (ou análise do potencial fenólico) deve ser analisada em três aspectos: conteúdo de antocianinas, maturação celular e porcentagem de taninos nas cascas e sementes. Analisando primeiramente o conteúdo de antocianinas, observa-se que o teor de antocianinas em uvas de Dom Pedrito, quando comparados com os teores encontrados em uvas de Bento Gonçalves, é menor, no entanto a extratibilidade dessas antocianinas, ou maturação celular, é maior (menor Índice de Maturação Celular, IMC%), o que irá facilitar a extração desses compostos durante o processo de maceração. Esse menor teor de antocianinas nas uvas parece ser o responsável pela menor intensidade de cor apresentada por esses vinhos. Alguns autores observaram que o excesso de calor pode prejudicar a síntese de antocianinas (CORDON, 2008; SPAYD et al., 2002); sendo a região da Campanha Gaúcha mais quente que a Serra Gaúcha, é provável que a diferença climática seja responsável pela diferença no teor de antocianinas.

Analisando a maturação das sementes, ou seja, a estimativa do teor de taninos presentes nas sementes, observa-se que as uvas da região da Campanha apresentam entre 50 a 70% dos taninos nas sementes, enquanto que na Serra os valores ficaram entre 40 a 50%; ressalta-se que esses taninos presentes nas sementes são considerados de qualidade sensorial inferior. Um aumento no tempo de maturação dessas uvas poderia reduzir esse valor,

contribuindo para melhorar a qualidade dos taninos presentes, especialmente na região da Campanha.

Uma parte das uvas amostradas nesse estudo, foram vinificadas de acordo com a técnica usual de vinificação, ou seja, esmagamento da uva, maceração por 8 dias, temperatura controlada a 28°C e duas remontagens diárias e neste os resultados obtidos na análise de maturação fenólica foram correlacionados com o conteúdo fenólico dos vinhos elaborados. Os resultados mostram que a análise do potencial fenólico das uvas permitiu estimar os seguintes parâmetros nos vinhos: conteúdo de polifenóis, porcentagem da cor devido a antocianinas poliméricas e quantidade de procianidinas. A análise de maturação fenólica mostrou-se uma ferramenta muito útil na decisão do melhor momento de colheita da uva Merlot, cultivada nessas duas regiões, permitindo predizer algumas características do vinho resultante. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; GONZÁLEZ-NEVES et al., 2004). De maneira geral, uma maior maturação celular (IMC%) das uvas parece resultar em apenas um aumento no teor de fenóis totais e procianidinas no vinho, não tendo influência direta na intensidade de cor dos mesmos.

Há uma lacuna sobre qual o método mais adequado para a vinificação de uvas na região da Campanha, especialmente em relação ao tempo de maceração, esmagamento ou não da uva e influência da copigmentação.

Ao longo das safras 2009, 2010 e 2011, foram testados 4 tipos de maceração, todos com esmagamento total da uva. Nos vinhos com maceração curta (4 dias de contato das cascas com o líquido) ocorreu um aumento da intensidade de cor devido a copigmentação na maioria dos vinhos. O efeito da maceração estendida foi diferente, para os vinhos de Dom Pedrito do que o esperado, uma vez que, além do aumento da extração de procianidinas, também houve um aumento na intensidade de cor e quantidade de antocianinas; assim, para as uvas dessa nova região vitícola, a maceração estendida é recomendada quando o objetivo é aumentar a intensidade de cor de seus vinhos. Um ponto a ressaltar aqui é o aumento no pH nos vinhos elaborados com maceração estendida.

O fenômeno da copigmentação ainda é pouco estudado e não há dados disponíveis sobre a influência da copigmentação em vinhos brasileiros da variedade Merlot. A cor devido a copigmentação foi menor do que o esperado, uma vez que de acordo com Boulton (2001), esta pode ser responsável por até 50% da cor; o tempo de maceração influenciou muito pouco esse parâmetro.

Outro ponto que gera muitas dúvidas é sobre o esmagamento ou não das uvas após o desengace; os resultados da fermentação com uvas esmagadas e inteiras, mostram que as

diferenças nos parâmetros avaliados nesse estudo são muito pequenas em relação ao tratamento controle.

Os resultados da safra 2009 e 2010 mostram que a influência do tipo de maceração é menor do que a influência da origem da uva, uma vez que as maiores diferenças são encontradas quando os vinhos são agrupados de acordo com o vinhedo de origem. Da mesma forma, o uso da análise de componente principal nos vinhos elaborados na safra 2011, permitiu separar os vinhos de acordo com a origem das uvas; esses dados confirmam o conceito de que a região de cultivo e as condições climáticas são fatores-chaves nas características dos vinhos da variedade Merlot.

É importante ressaltar que as diferenças entre os vinhos produzidos nas duas regiões não podem ser explicadas por um parâmetro apenas; de acordo com os dados da safra 2011, os principais parâmetros são a intensidade de cor, o conteúdo de antocianinas, a porcentagem de cor devido a antocianinas poliméricas e o teor de polifenóis totais no vinho, sendo o pH um ponto crítico a ser observado.

A região da Campanha apresenta características diferenciadas, os vinhos resultantes são de consumo jovem, e por isso, de certa forma, já “nascem prontos” (DAUDT, 2002, Informe verbal). Os resultados desse estudo não permitiram esclarecer totalmente essa questão, no entanto, as análises das uvas e dos vinhos durante esses três anos mostram que, na Campanha, as uvas da variedade Merlot apresentam maior proporção de taninos nas sementes e maiores quantidades de fenóis totais no vinho. Sabe-se que a percepção de taninos é complexa e depende não somente da composição de taninos, mas sim da composição do vinho no qual os taninos estão presentes, especialmente o conteúdo de álcool, polissacarídeos e açúcares (KENNEDY et al., 2008); dessa forma, sugere-se que esses vinhos apresentem uma alta polimerização de taninos.

As duas regiões também apresentam diferenças em relação às mudanças que ocorrem com o envelhecimento do vinho, uma vez que durante o envelhecimento dos vinhos de Dom Pedrito, observou-se um aumento na cor devido às antocianinas poliméricas e à copigmentação; da mesma maneira, a velocidade de polimerização parece ser maior nos vinhos dessa região quando comparados com os vinhos de Bento Gonçalves. No entanto, nessa última região, a intensidade de cor e antocianinas totais é maior.

Estes fatos permitem afirmar que os vinhos Merlot provenientes da Serra Gaúcha podem ser envelhecidos devido, principalmente, à menor velocidade de pigmentos poliméricos (responsáveis pela fixação da cor nos vinhos).

5 CONCLUSÕES

As uvas e os vinhos da variedade tinta Merlot apresentaram diferenças de acordo com a localização do vinhedos, sendo que as características das uvas foram mais importantes para o vinho resultante do que as técnicas de vinificação empregadas. Foram encontradas diferenças importantes no conteúdo e no comportamento dos compostos fenólicos entre as duas regiões representadas nesse estudo, tanto em relação a uva quanto ao vinho.

As uvas cultivadas nos vinhedos do município de Dom Pedrito atingem uma maturação celular adequada, no entanto, o teor de antocianinas é menor e o teor de taninos nas sementes é superior a 50%, comportamento oposto as uvas cultivadas no município de Bento Gonçalves.

A análise do potencial fenólico das uvas permite estimar o conteúdo de polifenóis totais, a porcentagem da cor devido a antocianinas poliméricas e a quantidade de procianidinas presentes no vinho a ser elaborado com uvas dessa variedade.

Em relação a técnica de vinificação para a região de Dom Pedrito, recomenda-se o uso de maceração estendida (15 dias no mínimo), porém há uma tendência de elevação do valor de pH do vinho resultante; o esmagamento total ou não da uva não irá influenciar esse aspecto.

Durante o envelhecimento, os vinhos apresentaram resultados de acordo com a região de origem da uva, sendo que os vinhos de Dom Pedrito apresentam uma maior velocidade de polimerização; as diferenças entre os tempos de maceração diminuem com o envelhecimento do vinho para todos dos vinhos analisados nesse estudo.

As principais diferenças entre os vinhos dos dois municípios estudados deve-se a intensidade de cor, ao conteúdo de antocianinas, a porcentagem de cor devido a antocianinas poliméricas e ao teor de polifenóis totais nos vinhos. Estes fatos permitem afirmar, em parte, que os vinhos Merlot da Serra Gaúcha podem ser envelhecidos por mais tempo e que os vinhos Merlot oriundos da Campanha Gaúcha podem e devem ser consumidos mais jovens.

RECOMENDAÇÕES

Sugere-se que os seguintes pontos poderiam ser mais estudados: acompanhamento da evolução da maturação fenólica; análise do tipo de taninos presentes nas sementes, polimerização dos fenóis e relação entre temperatura e formação de compostos fenólicos.

6 REFERENCIAS

AMERINE, M.A.; OUGH, C.S. **Wine and must analysis**. New York: J. Wiley & Sons, 1980, 121p.

AMRANI, J. K. et al. Localisation des tanins dans la pellicule de baie de raisin. **Vitis**, v. 33, p. 133-138, 1994.

ARON, P. M.; KENNEDY, J. A. Compositional investigation of phenolic polymers isolated from *Vitis vinifera* L. Cv. Pinot Noir during fermentation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 14, p. 5670-80, 2007.

ASEN, S. et al. Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1139–1144, 1972.

BAKKER, J.; TIMBERLAKE, C. F. Isolation, Identification, and Characterization of New Color-Stable Anthocyanins Occurring in Some Red Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 35-43, 1997.

BARCELÓ, J. G. **Técnicas analíticas para vinos**. Barcelona: GAB. Moja- Olérdola, 1990, 525p.

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. et al. 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, n. 1, p. 3-9, 2001.

BISSON, L. In search of optimal grape maturity. **Practical Winery and Vineyard**, Jul-Aug, p. 32- 43, 2001

BOULTON, R. B. A method for the assessment of copigmentation in red wines. In: ASEV 47th Annual Meeting, Reno, Nevada, June 1996. **Proceedings...ASEV 47th Annual Meeting, USA, June 1996**.

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

BROADHURST, R.B.; JONES W.T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 29, p.788-90, 1978. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi:10.1002/jsfa.2740290908>: abstract>. Acesso em: 01.dez. 2009. doi: 10.1002/jsfa.2740290908.

BROUILLARD, R. B. et al. Relaxation Amplitudes in pH-Jump Experiments. **Journal of the American Chemical Society**, v. 100, p. 6202-6205, 1978.

BROUILLARD, R. B. et al. Chimie des pigments anthocyaniques. 4. Spectre d'absorption UV-visible de la forme chalcone de la glucoside-3 malvidine. **Journal of Chimie Physique**, v. 76, p. 273, 1979.

BUTLER, L. G. et al. Vanillin assay for proanthocyanidins (condensed tannins): modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.30, n.6, p. 1087-1089, 1982.

CATANIA, C.; AVAGNINA, S. La maduración de la uva - **Curso Superior de Degustacion de Vinos. EEA Mendoza, INTA**, 2007. Disponível em: http://www.inta.gov.ar/mendoza/invest/Doc_Cursos/18.%20La%20maduración%20de%20la%20uva.pdf. Acesso em: 22 fev. 2010.

CHEYNIER, V. et al. Structure and Properties of Wine Pigments and Tannins. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, n. 3, p. 298-305, 2006.

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

DAUDT, C. E. et al. Possibilidades de produção de *Vitis vinifera* em Uruguaiana e vizinhanças. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 3, n. 1-4, p. 163-163, 1973.

DAUDT, C. E.; POLENTA, G. J. Les phénols das les moûts de Cabernet Sauvignon et d'Isabel soumis à divers traitements. **Des Sciences Et Techniques de La Tonnellerie**, Bordeaux, França, v. 5, p. 57-64, 1999.

DAUDT, C. E. [comunicação Pessoal] . Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, CEP 97105-910, Santa Maria – RS, Brasil, E-mail: ced.voy@gmail.com. 2002

DE SANTIS, D.; FRANGIPANE, M. T. Effect of Prefermentative cold maceration on the aroma and Phenolic Profiles of a merlot red Wine. **Italian Journal of Food Science**, v. 22, n. 1, p. 47-5, 2010.

Di STEFANO, R. et al. Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. **L'enotecnico**, v. 5, p. 83-89, 1989.

DOWNEY, M. O. et al. 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. 53, n. 3, p. 257-268, 2006.

FALCÃO, L. D. et al. Copigmentação intra e intermolecular de antocianinas: uma revisão. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 21, n. 2, jul./dez. 2003

FRAGOSO-GARCÍA, S. et al. Estudio y optimizacion de un metodo analitico para la estimacion de los parametros de madurez fenolica. **Revista Enologos**, v. 58, p.38–43, 2009.

FULCRAND, H. et al. Phenolic Reactions during Winemaking and Aging. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, n. 3, p. 289-297, 2006.

GENY, L. et al. Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 27, p. 8051-4, 2003.

GIL-MUÑOZ, R. et al. Determination of anthocyanin content in c.v. Monastrell grapes during ripening period using several procedures. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 9, p.1986-1992, 2011.

GIRARDELLO, R. C. **Evolução dos compostos fenólicos durante a maceração do mosto de uvas Malbec e Syrah submetidas a diferentes processos**. 2012, 115p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2012.

GLORIES, Y. Caractérisation du potentiel phénolique: adaptation de la vinification. **Progress Agricole et Viticole**, Montpellier, v.118, n. 15-16, p. 347-350, 2001.

GÓMEZ-PLAZA E, et al. Phenolic compounds and color stability of red wines. Effect of skin maceration time. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 52, p. 271-275, 2001.

GONZÁLEZ-NEVES, G. et al. Adaptacion de la vinificación en tinto en función del potencial polifenólico de las uvas. Experiencias realizadas en la vendimia. **Agrociencia**, v. VII, n.1, p. 59-67, 2003.

GONZÁLEZ-NEVES, G. et al. Phenolic potential of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, n. 1, p. 191-196, 2004.

GONZÁLEZ-NEVES, G. et al. Influence of grape variety on the extraction of anthocyanins during the fermentation on skins. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 6, p. 1349-1355, 2007.

GONZÁLEZ-NEVES, G. et al. Estudio comparativo de la extracción de polifenoles en la elaboración de vinos Tannat por técnicas alternativas. **Revista Enologia**, Año V, Marzo – Abril, p. 1-5, 2008.

GONZÁLEZ-NEVES, G. et al. Estudio plurianual del potencial polifenólico de uvas Tannat. Multiannual study of the polyphenolic potential of Tannat grapes in southern Uruguay. **Agrociencia**, v. 14, n. 2, p. 10-21. 2010a

GONZÁLEZ-NEVES, G. et al. Evolucion de los pigmentos en el primer año de vinos tintos Tannat elaborados por técnicas alternativas. **Revista Enologia**, Año VII, Mayo – Junio, p. 1-14, 2010b

GONZÁLEZ-NEVES, G. et al. Pigment profile of red wines cv. Tannat made with alternative winemaking techniques. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 447-454, 2010c.

GONZÁLEZ-NEVES, G. et al. Prediction of the colour and polyphenolic composition of the young red wines from the phenolic potential of the grapes. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1843-1851, 2010d.

GUERRA, C. C. **Recherches sur les interactions anthocyanes-flavanols: application à l'interprétation chimique de la couleur des vins rouges**. 1997. Tese (Doutorado), University Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, França, 1997.

HARBERTSON, J. F. et al. Measurement of polymeric pigments in grape berry extracts and wines using a protein precipitation assay combined with bisulfate bleaching. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 54, n. 4, p. 301-306, 2003.

HANLIN, R. L. et al. Review: Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. **Australian Journal of grape and Wine Research**, v. 16, p. 173-188. 2009.

HILLS, W. T.; SWAIN, T. The phenolic constituents of *Prunus domestica* – II. The analysis of tissues of the Victoria plum tree. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, n. 2, p. 135-144, 1959.

HO, P. et al. Changes in the colour and phenolic composition during the early stages of maturation of port in wood, stainless steel and glass. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 13, p. 1269-1280, 2001.

IDE, G. M. **Evolução dos compostos fenólicos na maturação da uva e no tempo de maceração do vinho**. 1992. 87p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Maria, RS, 1992.

KANTZ, K.; SINGLETON, V. L. Isolation and determination of polymeric polyphenols using Sephadex LH-20 and analysis of grape tissue extracts. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 41, p. 223-8, 1990.

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

KENNEDY, J. A. et al. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. **Phytochemistry**, v. 55, n. 1, p. 77-85, 2000.

KENNEDY, J. A. et al. Effect of Maturity and Vine Water Status on Grape Skin and Wine Flavonoids. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 53, n. 4, p. 268-274, 2002.

KENNEDY, J. A. et al. Grape and Wine Tannins Production, Perfection , Perception. **Practical Winery & Vineyard**, p. 1-6, May/June, 2007.

KENNEDY, J. A.; MATTHEWS, M. A.; WATERHOUSE, A. L. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. **Phytochemistry**, v. 55, n. 1, p. 77-85, 2002.

KHANBABAEE, K.; VAN REE, T. Tannins: Classification and definition. **Nature Products Report**, v. 18, p. 641-649, 2001.

KLIEWER, W. M.; TORRES R. E. Effect of controlled day and night temperatures on grape coloration. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 23, p. 71-76, 1972

KRAMLING, T. E.; SINGLETON, V. L. An estimate of the nonflavonoid phenols in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 20, p. 86 – 92, 1969.

KOUNTOUDAKIS, N. et al. Influência da maturação fenólica das uvas na adstringência do vinho. **Revista Internet de Viticultura e Enologia**, v. 10, p. 1-5, 2008.

KOUNTOUDAKIS, N. et al. Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 767-774, 2011.

LAMADON, F. Protocole pour l'évaluation de la richesse polyphenolique des raisins. **Revue des Oenologues**, v. 76, p. 37–38, 1995.

LIAO, H. et al. Polyphenol interactions. Anthocyanins: Co-pigmentation and colour changes in red wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 59, p. 299–305, 1992.
doi: 10.1002/jsfa.2740590305

MAZZA, G.; BROUILLARD, R. The mechanism of copigmentation of anthocyanins in aqueous solution. **Phytochemistry**, v. 29, p. 1097–1102, 1990.

MAZZA, G. Anthocyanins in grapes and grape products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 341-371, 1995.

MELLO, L. M. Viticultura brasileira: Panorama 2011. **Comunicado Técnico 115**. EMBRAPA Uva e Vinho, 1ª Ed., 4 p., 2012.

MIRABEL M. et al. Copigmentation in model wine solutions: occurrence and relation to wine aging. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, p. 211–218, 1999.

MONAGAS, M. et al. Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle. **European Food Research and Technology**, p. 607-614, 2005.

MOTTA, F. S. Disponibilidade climática para maturação da uva destinada a produção de vinhos finos nas regiões da Serra do Nordeste e Campanha do Estado do Rio Grande do Sul. **Agrociência**, v. 9, n. 3, p. 297-299, jul-set, 2003

OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN. **Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins**. Paris: O.I.V., 2010. 464 p.

ORTEGA-REGULES, A. et al. A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 26-32, 2006.

PASTOR DEL RIO, J. L.; KENNEDY, J. A. Development of procyanidins in *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir grapes and extraction into wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, n. 2, p. 125-132, 2006.

PORTER, L. J. et al. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, v. 25, p. 223-230, 1986. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94533-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94533-3)> Acesso em: 15 out.2009. doi: 10.1016/S0031-9422(00)94533-3.

POTTER, G. H. et al. Desfolha parcial em videiras e seus efeitos em uvas e vinhos Cabernet Sauvignon da região da Campanha do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 2011-2016, 2010.

RENTZSCH, M. et al. Survey on the content of vitisin A and hydroxyphenyl-pyranoanthocyanins in Tempranillo wines. **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1426-1434, 2010. doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.023.

RIBÉREAU-GAYON, P. Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. **Chimie Analytique**, v.52, n. 6, p. 627-31, 1970.

RIBÉREAU-GAYON, P.; STONESTREET, E. Le dosage des antocyanes dans le vin rouge. **Bulletin de la Société Chimique de France**, v.9, n. 419, p. 2649-52, 1965.

RIBÉREAU-GAYON, P. et al. Phenolic compounds. In: _____. **Handbook of Enology - Volume 2: The Chemistry of Wine**. 2 ed. John Wiley and Sons, 2006. Cap. 6, p. 141-203

RICARDO DA SILVA, J. M. et al. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, n.9, p. 1549-1552, 1991.

RICARDO DA SILVA, J. M. et al. Effect of Pomace Contact, Carbonic Maceration, and Hyperoxidation on the Procyanidin Composition of Grenache blanc Wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 44, n. 2, p. 168 - 172, 1993.

RICARDO-DA-SILVA, J. M. et al. Fatores condicionantes dos processos de vinificação e conservação na cor de vinhos portugueses. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 10. 2003, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2003. p.69-86.

RIGO, A. et al. Contribution of the proanthocyanidins to the peroxy-radical scavenging capacity of some Italian red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 1996-2002, 2000.

RIVAS-GONZALO, J. C. et al. Comparisons of Methods for the Determination of Anthocyanins in Red Wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 43, n. 2, p. 210-214, 1992.

SACCHI, K. et al. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 56, n. 3, p. 197–206, 2005.

SAINT CRICQ, N. et al. Maturité phénolique: définition et contrôle. **Revue Française d'oenologie**, v. 173, p. 22–25, 1998.

SANTOS, M. **Análise cromática de vinhos tintos da variedade Cabernet Sauvignon do Rio Grande do Sul**. 2011, 78p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2011.

SARKAR, S. K.; HOWARTH, R. E. Specificity of the Vanillin Test for Flavanols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 317-320, 1976.

SARTORI, G. V. **Maturação fenólica de uvas tintas cultivadas no Rio Grande do Sul**. 2011. 72p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2011.

SAUCIER, C. et al. Tannin—Anthocyanin Interactions: Influence on Wine Color. IN: WATERHOUSE, A. L.; KENNEDY, J. A. **Red wine color: Exploring the mysteries (ACS Symposium Series, 886)**. Washington, D.C., American Chemical Society, pp 265-273, 2004.

SCALBERT, A. et al. Tannins in wood: comparison of different estimation methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n.5, p. 1324-1329, 1989.

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: 01 jun. 2011.

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

SMART, R. E. Principles of grapevine canopy microclimate manipulation with implications for yield and quality. A review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 36, p. 230-239, 1985.

SOMERS, T. C. The polymeric nature of wine pigments, **Phytochemistry**, v. 10, n. 9, p. 2175-2186, September, 1971.

SOMERS, T. C.; EVANS, M. E. Spectral evaluation of young wines: anthocyanin equilibrium, total phenolics, free and molecular sulfur dioxide "chemical age". **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 28, n. 3, p. 279-281, 1977.

SOMERS, C. T.; EVANS, M. E. Grape pigment phenomena: Interpretation of major colour losses during vinification. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 30, p. 623-633, 1979.

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

SPAYD, S. et al. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 53, n. 3, p. 171-182, 2002.

SUN, B.S. et al. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4267-4274, 1998a.

SUN, B.S. et al. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 1390-1396, 1998b.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic Compound Biochemistry**. Nicholson (Eds.). Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2006. 276 pp.

VERSARI, A. et al. A comparison of analytical methods for measuring the color components of red wines. **Food Chemistry**, v. 106, n. 1, p. 397-402, Jan. 2008. .

VRHOVSEK, U. et al. Analysis of red wine phenolics: comparison of HPLC and spectrophotometric methods. **Vitis**, v. 40, n. 2, p. 87-91, 2001.

ZIMMAN, A. et al. Chapter 1: Short history of red wine colour. IN: WATERHOUSE, A. L.; KENNEDY, J. A. **Red wine color: Exploring the mysteries (ACS Symposium Series, 886)**. Washington, D.C., American Chemical Society, pp 217-231, 2004.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. In: Wrolstad, R. E. **Current protocols in food analytical chemistry**. New York: John Wiley and Sons. 2002. II.1.1 – II.1.8.

WINKLER, A.J. et al. **General viticulture**. Berkeley: University of California, 1974. 710p.

YAMANE, T. et al. Effects of Temperature on Anthocyanin Biosynthesis in Grape Berry Skins. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, n. 1, p. 54-59. 2006.