

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BACHARELADO**

**CARACTERIZAÇÃO DE VINHOS PELO SEU TEOR  
DE POLIFENÓIS**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**Roberta Fabricio Loose**

**Santa Maria, 2015**

# **CARACTERIZAÇÃO DE VINHOS PELO SEU TEOR DE POLIFENÓIS**

**por**

**Roberta Fabricio Loose**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação de Química Bacharelado, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Bacharel em Química**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Barcellos da Rosa  
Co-orientador: Prof. Dr. Lalitesh Nitin Seetohul

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Departamento de Química  
Curso de Graduação em Química Bacharelado**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova o Trabalho de Conclusão de Curso

## **CARACTERIZAÇÃO DE VINHOS PELO SEU TEOR DE POLIFENÓIS**

elaborado por  
**Roberta Fabricio Loose**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Bacharel em Química**

### **COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Prof. Dr. Marcelo Barcellos da Rosa**  
(Orientador – UFSM)

**Dr. Luis Manoel do Rosário Ferraz**  
(UFSM)

Santa Maria, 10 de dezembro de 2015

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, aos meus pais Sueli Teresinha Fabricio e Ernani Loose, pelo amor, carinho e suporte imensuráveis em todos os momentos de minha vida. Os quais sempre me incentivaram e me ensinaram a sonhar alto, e acima de tudo a buscar realizar esses sonhos e anseios.

À minha irmã Rafaela, meus avós e todos os demais familiares pelo carinho e apoio de sempre, mesmo em tantos momentos especiais nos quais não pude estar presente devido às tarefas da graduação.

Ao Henrique, por todo amor, paciência, dedicação, apoio e incentivo para sempre seguir em frente e não desistir dos meus sonhos. E também à família Faccin pelo acolhimento e carinho.

À Bárbara e Daniela pela amizade, apoio e suporte, bem como as alegrias e também tristezas compartilhadas ao longo desses anos de graduação. Além, é claro, aos demais amigos e colegas, pois com certeza não teríamos ido tão longe sem nossa parceria.

Ao professor Marcelo Barcellos da Rosa, pelo conhecimento transmitido, acolhimento no grupo de pesquisa do Lachem e apoio nas minhas decisões em relação à graduação e intercâmbio.

Ao Luis Ferraz, primeiramente por ter me acolhido no Lachem, e também por ter compartilhado seus conhecimentos e aceito enriquecer e fazer parte da banca de avaliação do presente trabalho.

Aos amigos e colegas do Lachem, pela parceria, companheirismo, alegrias, dúvidas e conhecimento compartilhados.

Aos amigos Alisha, Bruno, Expedito, Gabriela, Jefferson, Joimar, Juliana, Karla, Luiz, Marian, Mariana, Marina, Neelam, Paulina, Tainah, Tatenda e Tayyaba da Universidade Nottingham Trent, por todo apoio e suporte ao longo do ano de intercâmbio, o que o tornou mais leve, divertido e alegre, além de terem proporcionado um grande enriquecimento cultural à minha jornada.

Aos professores Michael Coffey e Lalitesh Nitin Seetohul, pelo suporte e conhecimento transmitidos para a realização deste trabalho. Assim como os demais professores e técnicos da Universidade Nottingham Trent pelo acolhimento e suporte ao longo do intercâmbio.

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro conferido para realização deste trabalho e da graduação-sanduíche no Reino Unido.

*“Todo lo que puedes imaginar es real.”*

Pablo Picasso

## **RESUMO**

Trabalho de Conclusão de Curso  
Curso de Química Bacharelado  
Universidade Federal de Santa Maria

### **CARACTERIZAÇÃO DE VINHOS PELO SEU TEOR DE POLIFENÓIS**

AUTOR: Roberta Fabricio Loose

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Barcellos da Rosa

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Lalitesh Nitin Seetohul

Santa Maria, 10 de dezembro de 2015

O vinho é uma das bebidas mais consumidas no mundo e associado a ele estão diversos benefícios. Tais benefícios estão fortemente ligados à presença de polifenóis, os quais são conhecidos por atuarem na prevenção de doenças cardíacas, diabetes e tantas outras. Baseado em tais fatores, buscou-se uma caracterização e classificação de vinhos de diversas regiões de acordo com o seu conteúdo polifenólico. Fez-se uso da espectroscopia de luminescência total (TLS) e da cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC<sup>®</sup>-MS) para analisar e quantificar os compostos fenólicos (+)-catequina, resveratrol, (-)-catequina galato, quercetina, miricetina e daidzeína. Ademais, a análise de componentes principais (PCA) foi aplicada a fim de se obter a classificação de doze amostras de vinho de diferentes regiões geográficas. Assim, utilizando os dados de TLS e PCA, fez-se uma classificação dos vinhos de acordo com suas cores; e levantou-se a possibilidade de os vinhos tintos analisados terem mais polifenóis que os brancos. Com os dados obtidos no UPLC<sup>®</sup>-MS, confirmou-se a maior quantidade dos analitos quantificados nas amostras de vinhos tintos. Além de que os vinhos tintos franceses, dentre os analisados, tiveram os maiores valores de polifenóis quantificados. Apesar de a TLS ter apenas resultado em uma suposição da presença de tais polifenóis, a presença destes foi confirmada nos vinhos por UPLC<sup>®</sup>-MS. Além disso, não se fez necessário técnicas laboriosas de preparação de amostras; e os dados de PCA permitiram a classificação dos vinhos de acordo com suas cores.

**Palavras-Chave:** polifenóis, vinho, TLS, UPLC<sup>®</sup>-MS, PCA

## **ABSTRACT**

Work of Course Conclusion  
Bachelor's Degree in Chemistry  
Federal University of Santa Maria

### **CHARACTERISATION OF WINES BY THEIR POLYPHENOL CONTENT**

**AUTHOR:** Roberta Fabricio Loose

**ADVISER:** Prof. Dr. Marcelo Barcellos da Rosa

**CO-ADVISER:** Prof. Dr. Lalitesh Nitin Seetohul

Santa Maria, 10<sup>th</sup> December 2015

Wine is one of the most consumed beverages in the world and associated to it are several benefits. Such benefits are strongly connected to the polyphenol content found in wines, which are known by acting in the prevention of heart diseases, diabetes and others. Based on these factors, it was sought for a characterisation and classification of wines from different regions accordingly to their polyphenol content. Total luminescence spectroscopy (TLS) and ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC<sup>®</sup>-MS) were employed to analyse and quantify phenolic compounds as (+)-catechin, resveratrol, (-)-catechin gallate, quercetin, myricetin and daidzein. Additionally, principal component analysis (PCA) was applied in a way to obtain the classification of twelve wine samples from different geographic regions. Then, using the data from TLS and PCA, it was made a classification of the wines accordingly to the wines' colours. Based on that, it was raised a possibility that the analysed red wines may have more polyphenols than the white ones. With the UPLC<sup>®</sup>-MS data, it was confirmed the highest amount of the quantified analytes in the red wine samples. Moreover, French wines had the highest amounts of polyphenols among the analysed ones. Although the TLS data just has given a supposition about the presence of such polyphenols, such presence was confirmed by UPLC<sup>®</sup>-MS. In addition, it was not necessary any laborious sample preparation method in the present work; and the PCA data allowed the classification of wines accordingly to their colours.

**Keywords:** polyphenols, wine, TLS, UPLC<sup>®</sup>-MS, PCA

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados da quantificação dos polifenóis (+)-catequina, resveratrol, (-)-catequina galato, daidzeína, quercetina e miricetina (em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para as 12 amostras de vinho, utilizando UPLC<sup>®</sup>-MS. O desvio padrão (n=3), (%), encontra-se entre parênteses.....21



## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1. Descrição das doze amostras de vinho utilizadas nas análises por TLS e UPLC <sup>®</sup> -MS.....	16
---	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico de superfície da amostra de vinho australiano tinto (SASC), utilizando dados de TLS.....	19
Figura 2. Gráfico de superfície da amostra de vinho australiano branco (SC), utilizando dados de TLS.....	20
Figura 3. Gráfico 3D de dispersão do PCA de todos os 12 vinhos analisados através de TLS.....	22
Figura 4. Gráfico 3D de contorno do PCA de todos os 12 vinhos analisados através de TLS.....	23
Figura 5. Gráfico de dispersão do PCA de todos os 12 vinhos analisados através de TLS.....	23

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ESI** – Ionização por *electrospray* (do inglês *Electrospray Ionisation*)

**GC** – Cromatografia gasosa (do inglês *Gas Chromatography*)

**HPLC** – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

**MS** – Espectrometria de massas (do inglês *Mass Spectrometry*)

**PCA** – Análise de componentes principais (do inglês *Principal Component Analysis*)

**QWPSR** – Vinho de Qualidade Produzido em Região Determinada (do inglês *Quality Wines Produced in Specified Regions*)

**SIR** – Monitoramento de íons selecionados (do inglês *Single Ion Recording*)

**TIC** – Cromatograma de íons totais (do inglês *Total Ion Chromatogram*)

**TLS** – Espectroscopia de luminescência total (do inglês *Total Luminescence Spectroscopy*)

**TPC** – Teor de fenólicos totais (do inglês *Total Phenolic Content*)

**UPLC<sup>®</sup>-MS** – Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*)

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Objetivos Gerais .....	15
1.1.1 Objetivos Específicos .....	15
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
2.1 Reagentes e amostras.....	16
2.2 Análise por fluorescência .....	17
2.3 Análise por UPLC <sup>®</sup> -MS .....	17
2.4 Análise quimiométrica.....	18
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	18
3.1 Espectrometria de luminescência total .....	18
3.2 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC <sup>®</sup> -MS).....	20
3.3 Análise de componentes principais (PCA).....	21
4 CONCLUSÃO.....	25
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar de o consumo e produção de vinho ter consideravelmente decaído nos últimos anos, especialmente com a crise econômica em 2008, ele permanece no topo das bebidas mais consumidas no mundo. Além disso, de acordo com a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (2012), França e Itália ainda são os maiores consumidores de vinho na União Europeia.

O vinho possui propriedades que previnem doenças coronárias (RENAUD *et al.*, 1992). Um argumento prático que reforça essa afirmação é que na França, país onde as pessoas costumam consumir mais vinho que em outros locais, é relatada a existência de um paradoxo na saúde pública. Nomeado de paradoxo francês, ele é conhecido devido aos franceses consumirem grandes quantidades de gordura saturada e, ao mesmo tempo, o país apresentar uma baixa mortalidade por doença cardíaca coronária. Uma vez que este fato pode se originar de um alto consumo de vinhos por parte da população, deve-se destacar uma possível influência dos polifenóis que compõem esta bebida. Entretanto, também há estudos que indicam que consumidores moderados de vinho tendem a se exercitar mais, bem como ter mais consciência em relação à saúde e serem de classe socioeconômica e educacional mais alta (LINDBERG *et al.*, 2008).

O importante teor de polifenóis do vinho é um dos fatos mais relatados como causa dos benefícios à saúde humana proporcionados pelo consumo de vinho. Os polifenóis são conhecidos por diminuírem consideravelmente as ocorrências de diferentes tipos de câncer, doenças do coração, inflamações, diabetes tipo 2, além de atuarem como agentes protetores dos sistemas cardiovascular e nervoso e também como agentes quimiopreventivos (GUERRERO *et al.*, 2009, HANSEN, 2005). É sabido, contudo, que todos os vinhos diferem na sua composição e o mesmo é válido para os benefícios percebidos pelas pessoas. Essas diferenças nos vinhos, especialmente no seu conteúdo de polifenóis, dependem de diferentes variações, tais como clima, região geográfica, variações sazonais, tipo de solo, inseticidas utilizados, localização do vinhedo, tempo de colheita do grão, processo de produção do vinho, variedade da uva e envelhecimento (GUILFORD *et al.*, 2011, RODRÍGUEZ-DELGADO *et al.*, 2002).

Tais polifenóis são separados em dois principais grupos, que são os flavonoides e os não-flavonoides. Os não-flavonoides, que são principalmente encontrados na polpa da uva, são separados em outros dois grupos. O primeiro deles é composto por ácidos fenólicos, que

compreendem ácidos hidroxibenzóicos (ácidos gálico, siríngico, vanílico, gentísico, protocatecuico e p-hidroxibenzóico) e os ácidos hidroxicinâmicos (ácidos cafeico, cumárico, caftárico, cutárico, etc.). O segundo subgrupo são os estilbenos, sendo estes compostos majoritariamente por *cis* e *trans*-resveratrol, glucose e derivados de ambos. Nas sementes, casca e engaço das uvas os flavonoides são facilmente encontrados, e são divididos entre flavan-3-óis, flavonóis, antocianinas, flavonas e flavanonóis. Os flavan-3-óis basicamente compreendem (+)-catequina, (+)-galocatequina, (-)-epicatequina e (-)-epigalocatequina; canferol, quercetina, isoramnetina, miricetina e todos os derivados são flavonóis; as antocianinas são a petunidina, cianidina, delfinidina, malvidina e peonidina; luteolina e apigenina fazem parte das flavonas; e os flavanonóis são todos derivados da diidroquercetina, diidromiricetina e diidrocanferol (MINUSSI *et al.*, 2003).

Nas uvas há também alguns açúcares, compostos nitrogenados e aromáticos, ácidos orgânicos e minerais. Porém, os polifenóis presentes no vinho ainda são os principais responsáveis pelas mais importantes percepções sensoriais no vinho, como amargor, adstringência, cor e conseqüentemente, sabor (MINUSSI *et al.*, 2003, MALOVANÁ *et al.*, 2001). As propriedades mais importantes são amargor e adstringência, que são bem conhecidas por serem responsáveis por reações não-positivas dos consumidores. Adicionalmente, de acordo com Lesschaeve e Noble (2005), há diferentes fatores que afetam essas propriedades sensoriais ou suas percepções. Um deles é o método sensorial utilizado para avaliar o amargor e a adstringência, o qual não pode ser uma comparação direta, pois tais propriedades tornam-se mais intensas quando muitas amostras são provadas, uma após a outra. Em relação à química envolvida, a configuração dos flavonoides é conhecida por afetar essas propriedades sensoriais, assim como o grau de polimerização. Estudos também reportam que o nível de etanol, a mudança de pH, a adição de ácido e a viscosidade causam alterações nas propriedades sensoriais de vinhos e sucos. Tais condições afetam especialmente a qualidade dos vinhos, os quais são classificados em duas categorias na União Europeia: vinho de mesa e Vinho de Qualidade Produzido em Região Determinada (QWPSR). Como o nome sugere, este último deve ser de uma região produtora específica e seu rótulo deve conter o nome dessa região e designações de qualidade, que são as técnicas de produção do vinho, variedades de uva e nível de maturação, por exemplo. A satisfação relacionada à expectativa dos consumidores é um importante fator associado à qualidade do vinho. Um exemplo é a grande possibilidade de o consumidor não adquirir o mesmo vinho mais de uma vez se as expectativas visuais não são atingidas quando o vinho é provado. Já a qualidade do vinho avaliada por especialistas é

principalmente focada em fatores intrínsecos da bebida. Portanto, para ser tal analista de qualidade de vinhos, é necessário vasta experiência e treinamento. Por exemplo, para atestar bons resultados desse especialista, faz-se necessário observar-se uma notável repetitividade dos resultados de qualidade nas mesmas amostras de vinho (LANGSTAFF, 2010).

Apesar do fato de que classificar um vinho como sendo o mais saudável é uma difícil tarefa, é possível classificar tipos de vinho de acordo com suas composições e outras variações já citadas. Uma maneira de fazer essa classificação é utilizando a análise sensorial, que é uma das mais conhecidas técnicas usadas na avaliação da qualidade dos vinhos. Ela se caracteriza por usar os sentidos humanos para analisar, medir e interpretar as reações à comida e outros materiais característicos (STONE *et al.*, 2012). Entretanto, há desvantagens em usar esta técnica na classificação de vinhos. Uma delas é que o paladar pessoal e outros aspectos como densidade e cor da amostra podem influenciar essa análise. Portanto, para atingir resultados reproduzíveis e precisos, esta técnica deveria normalmente ser combinada a alguma análise instrumental, como feito por Granato *et al.* (2012), que combinaram a análise sensorial com a espectroscopia UV-Visível para fazer uma caracterização de vinhos da América do Sul. Outro método possível de ser usado é a espectroscopia de fluorescência, que além de ser mais rápida e simples que a análise sensorial, é uma técnica não destrutiva. Esta última característica permite que a amostra seja analisada continuamente, preservando a amostra original e então provendo resultados de acordo com o estágio de maturação ou oxidação do vinho, por exemplo. A seletividade deste método pode ser melhorada com a técnica de espectroscopia de luminescência total, a qual combina comprimentos de onda de excitação e emissão em uma aquisição simultânea (SEETOHUL *et al.*, 2013). Sádecká *et al.* (2009), por exemplo, utilizaram este método para classificar whiskies e destilados de vinho, combinado com análise multivariada, e obtiveram resultados satisfatórios na diferenciação das amostras. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa (GC), acopladas ou não à espectrometria de massas (MS) (WELKE *et al.*, 2013) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio ( $^1\text{H NMR}$ ) (SON *et al.*, 2009), são geralmente empregadas na classificação de vinhos, contudo, é comum que métodos de preparação de amostras que consomem demasiado tempo sejam utilizados em conjunto a tais análises (WANG *et al.*, 2016). Aliado a métodos instrumentais, a quimiometria é normalmente empregada na análise de dados (BURIN *et al.*, 2011, SERRANO-LOURIDO *et al.*, 2012).

A Análise de Componentes Principais (PCA) é uma das maneiras de processar tais dados, sendo utilizada com a proposta de reduzir volume de dados quando as variáveis estão

correlacionadas (MILLER *et al.*, 2010). Uma dada matriz, X, por exemplo, é reduzida a duas matrizes menores (PC1 e PC2), as quais compreendem os principais padrões da matriz maior, X. Quando plotados esses dois PCs, o primeiro dá os padrões dominantes e o segundo os padrões complementares da matriz X (WOLD *et al.*, 1987). Baseado nessas combinações de PCs é possível então avaliar características similares ou diferenças entre os dados de interesse, e assim, fazer uma classificação quando desejado.

## 1.1 Objetivos Gerais

A proposta principal do presente trabalho, realizado em parceria com a Universidade Nottingham Trent, é, portanto:

- Fazer uma caracterização e classificação de vinhos baseado no seu teor de polifenóis.

### 1.1.1 Objetivos Específicos

- Obter espectros das amostras de vinhos analisadas utilizando espectroscopia de luminescência total;
- Quantificar os analitos (+)-Catequina, Resveratrol, (-)-Catequina Galato, Daidzeína, Quercetina e Miricetina utilizando ULPC<sup>®</sup>-MS;
- Realizar uma análise de dados utilizando PCA, com a finalidade de reduzir as variáveis e obter-se a classificação dos vinhos.



## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes e amostras

Doze amostras de vinhos tintos, rosé e brancos foram adquiridas em mercados locais, e estão descritos no Quadro 1. Neste quadro estão listados todos os vinhos utilizados, incluindo uma descrição das variedades de uva, ano, país de origem e identificadores utilizados para cada amostra, os quais são usados nos gráficos de PCA. Oriundos originalmente da França, Estados Unidos da América, Austrália, Romênia e Itália, todos os vinhos apresentavam teor alcóolico entre 11,0 e 13,5% Vol. Seis padrões foram utilizados em ambas as técnicas: (+)-catequina, resveratrol, (-)-catequina galato, quercetina, daidzeína e miricetina, todos adquiridos de Sigma Aldrich (St. Louis, EUA), com grau de pureza acima de 95%. Ácido fórmico com 98% de pureza e metanol grau HPLC foram adquiridos da Acros Organics (Geel, Bélgica) e ácido nítrico 2% adquirido da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA) foram usados como solventes. Nitrogênio com 99,9% de pureza foi utilizado como gás de secagem no UPLC<sup>®</sup>-MS.

**Quadro 1.** Descrição das doze amostras de vinho utilizadas nas análises por TLS e UPLC<sup>®</sup>-MS.

Identificador	Vinho	Vinícola	Variedade de uva	Cor do Vinho	Ano	Origem
SC	Chardonnay	Sunnycliff Estates	Chardonnay	Branco	2014	Austrália
SA	Winemakers Choice	South Eastern Australia	Shiraz	Tinto	2014	Austrália
SASC	Stamp of Australia	Hardys	Shiraz, Cabernet Sauvignon	Tinto	2014	Austrália
B	Beaujolais	Tesco	Gamay	Tinto	2014	França
LC	Côtes du Rhône Prestige	La Châsse	Shiraz, Grenache, Mourvèdre, Cinsault	Tinto	2013	França
FC	Grande Reservé Merlot	French Connection	Merlot	Tinto	2014	França
PG	Pinot Grigio	Lucotto	Sauvignon Blank	Branco	2014	Itália
BPN	The Illustration Series	Bradshaw	Pinot noir	Tinto	2013	Romênia
CA	Castillo de Albai Rioja Reserva	Bodegas Pagos del Rey	Tempranillo	Tinto	2014	Espanha
SR	Spanish Red Wine	Tesco Everyday Value	Assemblage de uvas vermelhas	Tinto	2015	Espanha
EF	Chardonnay White Californian Wine	Echo Falls	Chardonnay	Branco	2013	EUA
G	Grenache Rosé	Blossom Hill	Grenache, Colombard	Rosé	2014	EUA

## 2.2 Análise por fluorescência

As medidas de luminescência total foram realizadas em um espectrofotômetro de fluorescência Varian Cary Eclipse (Palo Alto, Califórnia, EUA) com uma célula de quartzo da Hellma Analytics (Müllheim, Alemanha) com 10 mm de comprimento de caminho óptico, usando uma lâmpada de xenônio como fonte de luz. O equipamento foi remotamente operado com um software Cary Eclipse WinFLR (versão 1.2). A taxa de varredura utilizada foi de 3000 nm min<sup>-1</sup> e o intervalo foi de 10 nm; o comprimento de onda de excitação variou de 210 nm a 380 nm, e os comprimentos de onda de emissão variaram de 260 nm a 750 nm, com aquisição de dados a cada 5 nm.

As amostras de vinho foram diluídas 180 vezes com água ultrapura e o contato com o ar foi evitado ao vedar os recipientes das amostras, a fim de prevenir breve oxidação destas. Elas foram estocadas em geladeira a 4°C antes e após serem analisadas as 10 replicatas no espectrofotômetro de fluorescência. As diluições apropriadas dos padrões foram feitas a partir de soluções estoque de 1 mg mL<sup>-1</sup> em metanol, para posterior análise no espectrômetro de fluorescência.

## 2.3 Análise por UPLC<sup>®</sup>-MS

As medidas no UPLC<sup>®</sup>-MS foram realizadas em um Waters Acquity UPLC<sup>®</sup> SQ Detector (Milford, Massachusetts, USA) utilizando uma coluna Waters Acquity UPLC<sup>®</sup> C18 Amide 1.7µm 2.1x100 mm (Milford, Massachusetts, USA). A fonte de ionização utilizada foi ESI no modo positivo, com uma temperatura de fonte de 150°C, capilar 2,92 kV, cone 8 V, extrator 10 V e lentes RF 0 V, e o gás de secagem utilizado foi nitrogênio. A aquisição de dados foi realizada em modo MS Scan (*m/z* 70-450), no intervalo de 2 a 8 minutos da análise cromatográfica. Os compostos de interesse foram analisados no modo de monitoramento de íons selecionados (SIR) em *m/z* 291.0 ((+)-catequina), *m/z* 443.0 ((-)-catequina galato), *m/z* 229.0 (resveratrol), *m/z* 319.0 (miricetina), *m/z* 255.0 (daidzeína), e *m/z* 303.0 (quercetina). O volume de injeção utilizado foi 10 µL para todas as análises, e o programa de gradiente de

eluição foi realizado utilizando solvente A (0,1% ácido fórmico em água) e solvente B (0,1% ácido fórmico em metanol) com uma vazão de  $0,300 \text{ mL min}^{-1}$ , mantendo a coluna cromatográfica a uma temperatura de  $30^\circ\text{C}$ . As condições no tempo zero foram 95% A e 5% B; durante 10 minutos elas foram 5% A e 95% B; e a partir de 10,01 a 15 minutos, as condições foram 95% A e 5% B. As amostras foram mantidas a  $4^\circ\text{C}$ . O equipamento foi remotamente operado utilizando o software Waters MassLynx (versão 4.1, SCN 805).

Para as análises por UPLC<sup>®</sup>-MS, as amostras foram somente filtradas através de um filtro minisart  $0,20 \mu\text{m}$  (Sartorius Stedim Biotech, Gottingen, Alemanha) com o auxílio de uma seringa plástica (BD Plastipak, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA), diluindo quando necessário e armazenadas em refrigerador a  $4^\circ\text{C}$  antes e depois de serem analisadas em triplicatas. A partir de padrões de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  em metanol, diluições (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  para (+)-catequina e 0,25, 0,5, 1, 2, 4 e  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  para os outros compostos) foram feitas na fase móvel B (0,1% ácido fórmico em metanol) para construir as curvas de calibração.

## 2.4 Análise quimiométrica

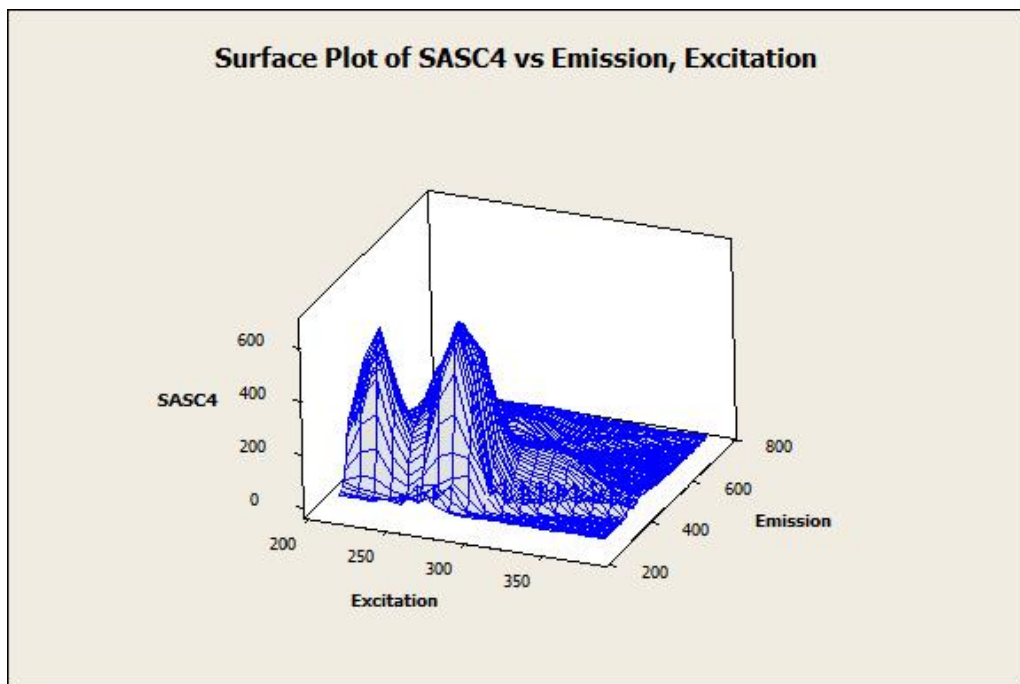
PCA foi realizado nos dados coletados utilizando o software Minitab<sup>®</sup> versões 16 e 17 (Minitab Inc., State College, Pensilvânia, EUA). Microsoft Office Excel<sup>®</sup> 2013 (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA) foi utilizado para plotar os resultados.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

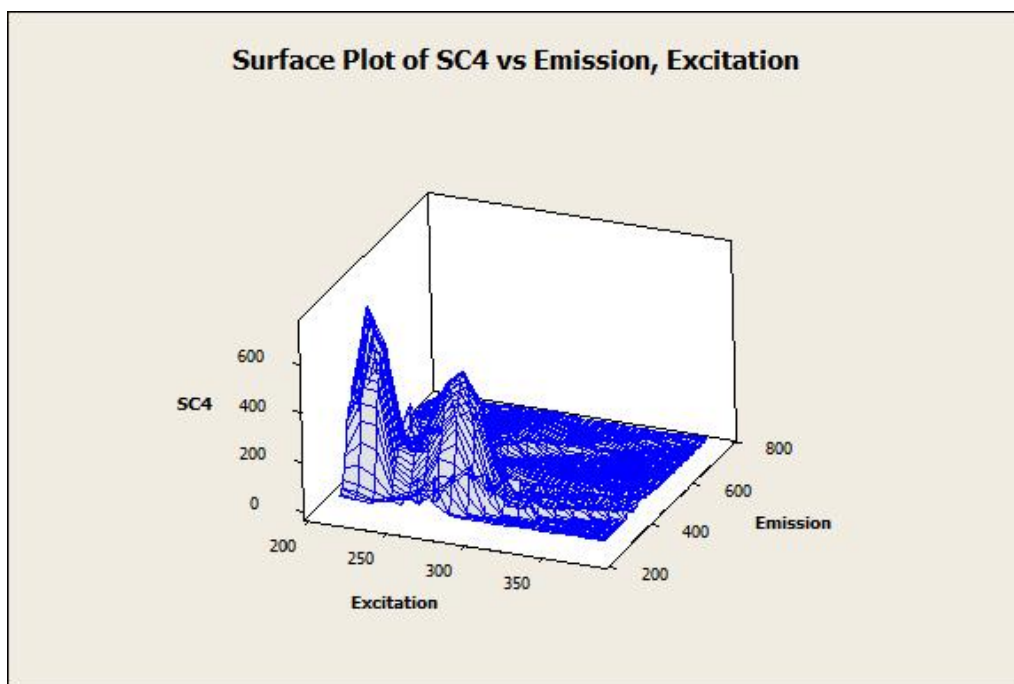
### 3.1 Espectrometria de luminescência total

A partir da espectrometria de luminescência total, foi possível identificar a presença de flavonoides nas amostras de vinho comparando a forma do espectro de cada padrão, assim como a região de comprimentos de onda na qual os flavonoides analisados deveriam emitir

fluorescência. Fazendo-se uma comparação entre dois vinhos australianos, um tinto (SASC) (Figura 1) e um branco (SC) (Figura 2), pode-se observar uma distinção dos vinhos em relação ao conteúdo de polifenóis. Foi observado o quão diferente são as formas dos picos de emissão, especialmente em termos de intensidade de sinal. Baseado em tal observação, acreditou-se que a quantidade de polifenóis nos vinhos tintos analisados fosse maior do que em vinhos brancos, como já confirmado por Vinson e Hontz (1995). Estes autores fizeram uso de diferentes metodologias para a quantificação de polifenóis em vinhos tintos e brancos, e mencionaram que a diferença no conteúdo de polifenóis entre as duas cores de vinho pode ser um efeito da temperatura usada na fermentação. Ademais, eles também reportaram que a discrepância no conteúdo polifenólico pode estar ligado ao maior contato dos vinhos tintos com as cascas da uva, onde são encontradas as maiores quantidades de polifenóis.



**Figura 1.** Gráfico de superfície da amostra de vinho australiano tinto (SASC), utilizando dados de TLS.



**Figura 2.** Gráfico de superfície da amostra de vinho australiano branco (SC), utilizando dados de TLS.

### 3.2 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC<sup>®</sup>-MS)

A presença dos polifenóis investigados nas amostras escolhidas para análise foi confirmada por meio de UPLC<sup>®</sup>-MS, utilizando um analisador de massas quadrupolar simples. Primeiramente, o modo de aquisição de dados por *full scan* foi testado, porém, os cromatogramas de íons totais (TIC) apresentaram grande quantidade de ruídos. Dessa forma, o monitoramento de íons selecionados (SIR) foi aplicado e os polifenóis foram identificados nas amostras de vinho através da relação  $m/z$  e da comparação de seus tempos de retenção com os dados obtidos dos padrões. Foi possível fazer uma quantificação de alguns dos polifenóis (Tabela 1), sendo identificados (+)-catequina e resveratrol em todas as amostras de vinho estudadas, e daidzeína em apenas uma amostra de vinho (CA). Os outros compostos não foram detectados ou estavam abaixo do limite de quantificação, o que também está evidenciado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resultados da quantificação dos polifenóis (+)-catequina, resveratrol, (-)-catequina galato, daidzeína, quercetina e miricetina (em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para as 12 amostras de vinho, utilizando UPLC<sup>®</sup>-MS. O desvio padrão (n=3), (%), encontra-se entre parênteses.

Amostras de Vinho	Analito ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	(+)-Catequina	Resveratrol	(-)-Catequina Galato	Daidzeína	Quercetina	Miricetina
<i>BPN</i>	10,75 (1,69)	1,48 (1,41)	< LOQ*	< LOQ*	n.d.	n.d.
<i>CA</i>	4,48 (2,88)	1,26 (3,54)	n.d.	0,24 (4,23)	n.d.	n.d.
<i>SA</i>	5,31 (4,14)	< LOQ*	< LOQ*	< LOQ*	n.d.	n.d.
<i>LC</i>	11,58 (4,01)	1,32 (0,69)	< LOQ*	< LOQ*	n.d.	n.d.
<i>FC</i>	13,23 (1,06)	5,24 (1,88)	< LOQ*	n.d.	n.d.	n.d.
<i>SASC</i>	6,09 (4,58)	< LOQ*	< LOQ*	< LOQ*	n.d.	n.d.
<i>B</i>	13,53 (3,79)	1,79 (1,62)	< LOQ*	n.d.	n.d.	n.d.
<i>SC</i>	1,02 (5,55)	< LOQ*	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>SR</i>	4,01 (2,09)	0,74 (2,28)	n.d.	< LOQ*	n.d.	n.d.
<i>G</i>	7,27 (1,19)	< LOQ*	n.d.	< LOQ*	n.d.	n.d.
<i>PG</i>	0,43 (5,72)	< LOQ*	n.d.	< LOQ*	n.d.	n.d.
<i>EF</i>	0,63 (4,72)	0,81 (1,44)	n.d.	< LOQ*	n.d.	n.d.

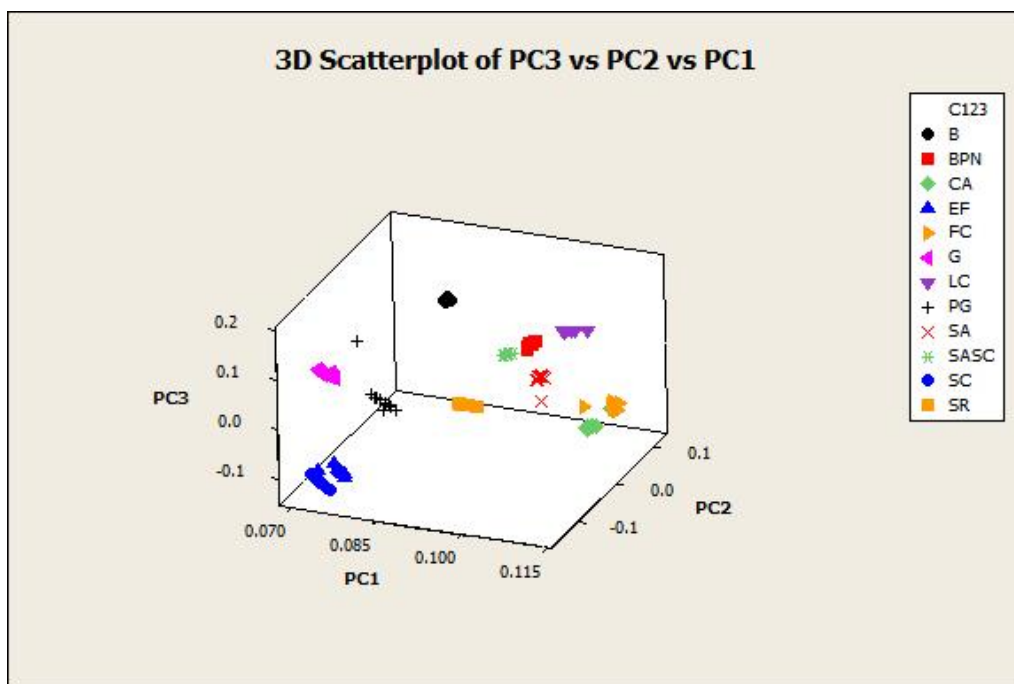
\*Os valores de LOQ calculados para cada analito são: (+)-Catequina 0,37  $\mu\text{g/mL}$ ; Resveratrol 0,47  $\mu\text{g/mL}$ ; (-)-Catequina Galato 1,65  $\mu\text{g/mL}$ ; Daidzeína 0,20  $\mu\text{g/mL}$ ; Quercetina 1,28  $\mu\text{g/mL}$ ; Miricetina 1,99  $\mu\text{g/mL}$ .  
n.d.: não detectado.

Na análise por fluorescência levantou-se a possibilidade de que os vinhos tintos analisados teriam uma maior quantidade de polifenóis dos que os brancos. Tal hipótese foi confirmada através da quantificação dos polifenóis por UPLC<sup>®</sup>-MS. Assim, se observado na Tabela 1, a amostra denominada SASC (vinho tinto) tem aproximadamente 5 vezes mais (+)-catequina que o vinho branco denominado SC, embora ambos possuam a mesma origem geográfica (Austrália). Quando o conteúdo de polifenóis nos vinhos analisados foi comparado pelo seu país de origem, França teve os seus vinhos com a maior quantidade de polifenóis, dentre os quantificados. Vale salientar que os três vinhos franceses avaliados (B, LC e FC) eram de cor tinta. A Itália teve o vinho (PG) com a menor quantidade de (+)-catequina, por exemplo, sendo este de cor branca e o único vinho italiano analisado.

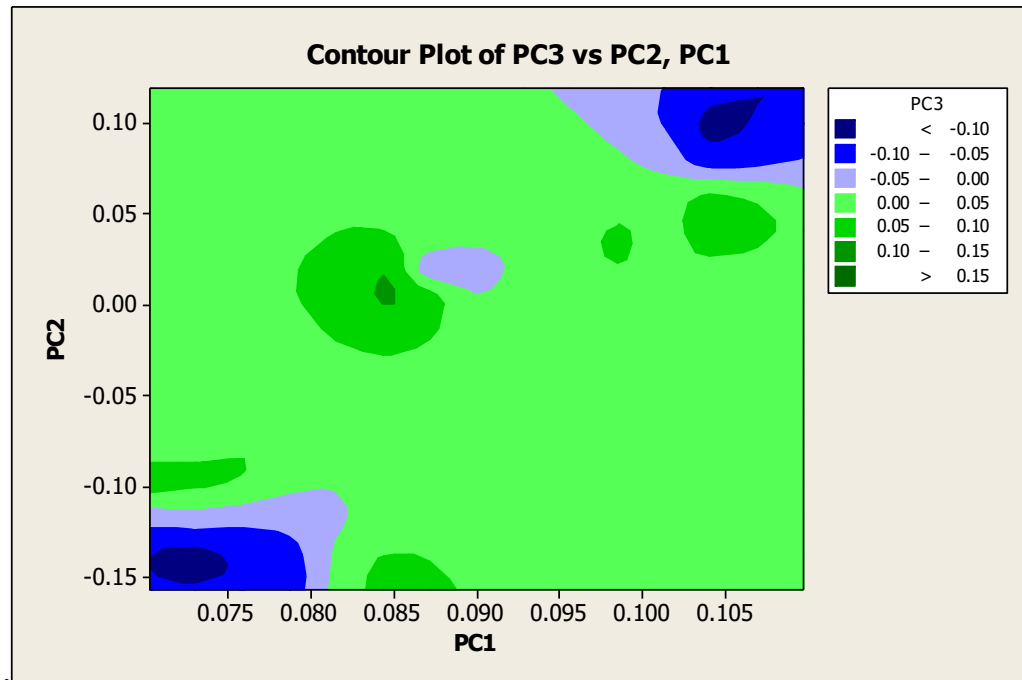
### 3.3 Análise de componentes principais (PCA)

A partir da redução e análise de dados feita utilizando-se PCA, obteve-se três gráficos para a luminescência total de todos os doze vinhos analisados. Estes gráficos são: um gráfico

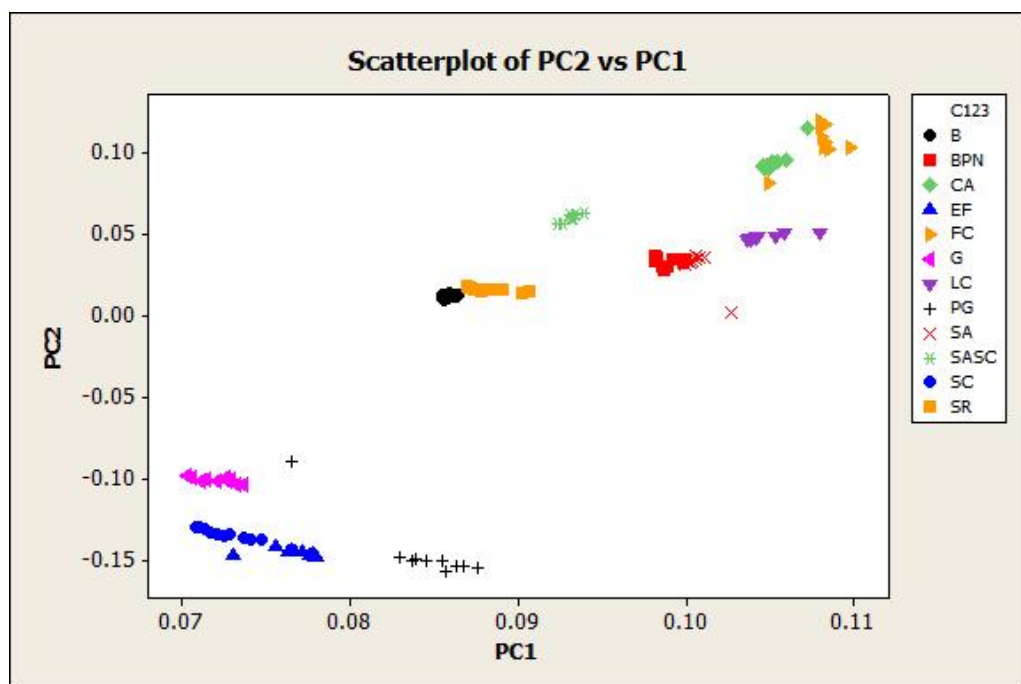
3D de dispersão e um de contorno do PC3 *versus* PC2 *versus* PC1, figuras 3 e 4 respectivamente; e um gráfico de dispersão do PC2 *versus* PC1 (Figura 5). Nesta análise por PCA, 95,6% da variância total são explicadas pelo PC1 e 2,6% pelo PC2, o que proporciona uma boa explicação da variância total do conjunto de dados apenas utilizando os dois primeiros PCs. Observando-se estes gráficos, então, é possível reafirmar a diferença no conteúdo e quantidade de polifenóis de acordo com a cor dos vinhos, sejam eles tintos, rosé ou brancos. Além disso, no gráfico de dispersão em 3D também foi possível observar o quão isolado o vinho branco italiano (PG) está dos demais, até mesmo dos outros dois vinhos de mesma cor avaliados (SC e EF). Esta diferenciação do vinho PG foi reafirmada através dos dados obtidos por UPLC<sup>®</sup>-MS (Tabela 1), visto que este possui a menor quantidade de (+)-catequina dentre os vinhos analisados. Estes resultados levam a mais uma indicação da possibilidade de os franceses sofrerem menos com doenças cardíacas coronárias do que pessoas de outros países. Como já relatado na literatura, isto se deve ao fato de que os vinhos franceses analisados terem as maiores quantidades de (+)-catequina e resveratrol, por exemplo. Contudo, é também válido destacar que o processo de prensagem e outros métodos de produção de vinho podem alterar as quantidades de polifenóis, como mencionado por Gürbüz *et al.* (2007).



**Figura 3.** Gráfico 3D de dispersão do PCA de todos os 12 vinhos analisados através de TLS.



**Figura 4.** Gráfico 3D de contorno do PCA de todos os 12 vinhos analisados através de TLS.



**Figura 5.** Gráfico de dispersão do PCA de todos os 12 vinhos analisados através de TLS.

Já Paixão *et al.* (2007) fizeram uma quantificação de fenólicos totais (TPC) em vinhos tintos, rosé e brancos disponíveis comercialmente na ilha da Madeira. Estes autores usaram o



método de Folin-Ciocalteu com um padrão de ácido gálico. Contudo, eles puderam apenas observar uma grande diferença nos fenólicos totais quando feita uma comparação entre grupos de cores dos vinhos. Quando avaliado o TPC apenas nos vinhos tintos, ou apenas nos brancos, não foi possível observar uma diferença significativa a fim de fazer uma classificação de tais vinhos. Ao contrário de Paixão *et al.* (2007), no presente estudo foi possível fazer tal classificação de vinhos a partir da quantificação de alguns marcadores analíticos por UPLC<sup>®</sup>-MS. Adicionalmente, Son *et al.* (2009) fez uma boa classificação de vinhos da Coreia do Sul baseado nas variedades de uva, entretanto, foi utilizada uma custosa e muito mais complexa técnica para analisar e quantificar metabólitos, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

A análise sensorial é um outro método usado para classificar e analisar a qualidade do vinho, mas quando comparado a qualquer outro método de análise instrumental, o método sensorial é expressivamente mais caro, consome mais tempo e requer mais treinamento e habilidade dos analistas. Além disso, é mais suscetível a erros. Como um exemplo, Hodgson (2008) fez uma pesquisa com um painel de júri durante três anos, e menos da metade do júri obteve resultados parecidos, o que foi julgado como inconsistência, falta de concordância nos resultados ou até mesmo ambos. Outro resultado desta pesquisa foi que o painel de júris teve a tendência em ter mais certeza dos vinhos que não apreciavam do que os que gostavam de fato. Isto significa que tal análise de vinho não foi baseada apenas na qualidade do vinho, mas também no gosto pessoal do júri. Gawel *et al.* (2008) fizeram uma pesquisa com índices de qualidade do vinho, os quais foram coletados durante um período de quinze anos, com aproximadamente 600 experientes degustadores. Apesar de terem sido obtidos resultados satisfatórios, a reprodutibilidade dos índices foi maior para vinhos tintos do que brancos. Tal resultado pode ser atribuído à densidade da cor do vinho tinto, o que é uma medida *de facto* da qualidade do vinho, mas que também pode afetar a percepção do aroma e a interpretação final da qualidade do produto. Baseado nesses resultados, é possível afirmar que a análise sensorial de vinhos além de ser mais cara, pode não provir resultados consistentes. Portanto, a classificação de vinhos com este tipo de análise seria mais trabalhosa e possivelmente afetada pelo paladar pessoal dos analistas, ao invés de derivar em resultados reais e reprodutíveis como um método instrumental é capaz de fazer.

## 4 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos por PCA com os dados de TLS, conclui-se que os vinhos tintos, rosé e brancos analisados possuem conteúdo e quantidades diferentes de polifenóis, visto que eles estão localizados em regiões bem distintas nos gráficos de PCA. Entretanto, estes dados obtidos através da espectrometria de luminescência total não foram capazes de separar os vinhos em diferentes regiões de origem, apenas de acordo com a cor dos vinhos. Contudo, ao realizar a análise no UPLC<sup>®</sup>-MS obtiveram-se dados que confirmaram a diferenciação entre as cores dos vinhos. Relacionando, então, ambas as técnicas de análise instrumental, pode-se entender que os vinhos tintos franceses analisados possuem as maiores quantidades de polifenóis dentre os quantificados.

Contudo, na tentativa de correlacionar análises sensoriais com análises feitas a partir de técnicas instrumentais, estudos mais específicos devem ser feitos para avaliar se há relação clara entre o teor de polifenóis nos vinhos e seus sabores e aceitabilidade pelos consumidores.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BURIN, Vívian Maria et al. Determination of some phenolic compounds in red wine by RP-HPLC: method development and validation. **Journal of chromatographic science**, v. 49, n. 8, p. 647-651, 2011.

GAWEL, Richard; GODDEN, Peter W. Evaluation of the consistency of wine quality assessments from expert wine tasters. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2008.

GRANATO, Daniel; UCHIDA KATAYAMA, Flavia Chizuko; DE CASTRO, Inar Alves. Characterization of red wines from South America based on sensory properties and antioxidant activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 3, p. 526-533, 2012.

GUERRERO, Raúl F. et al. Wine, resveratrol and health: a review. **Natural product communications**, v. 4, n. 5, p. 635-658, 2009.

GUILFORD, Jacquelyn M.; PEZZUTO, John M. Wine and health: a review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 62, n. 4, p. 471-486, 2011.

GÜRBÜZ, Ozan et al. Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 518-525, 2007.

HANSEN, Alice Schmidt et al. Effect of red wine and red grape extract on blood lipids, haemostatic factors, and other risk factors for cardiovascular disease. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 449-455, 2005.

HODGSON, Robert T. An examination of judge reliability at a major US wine competition. **Journal of Wine Economics**, v. 3, n. 02, p. 105-113, 2008.

ORGANISATION INTERNATIONALE DE LA VIGNE ET DU VIN, Global Economic Survey, 2012. Disponível em: < [http://www.oiv.int/oiv/files/4%20-%20Statistiques/4%20-%201%20Publications%20statistiques/4-1-2/EN/Note%20de%20conjuncture/OIV\\_Note\\_Conjuncture\\_mars2012\\_EN\\_DEF.pdf](http://www.oiv.int/oiv/files/4%20-%20Statistiques/4%20-%201%20Publications%20statistiques/4-1-2/EN/Note%20de%20conjuncture/OIV_Note_Conjuncture_mars2012_EN_DEF.pdf) >. Acesso em: 23 Nov. 2015.

LANGSTAFF, S. A. et al. Sensory quality control in the wine industry. **Sensory analysis for food and beverage quality control: a practical guide**, p. 236-261, 2010.

LESSCHAEVE, Isabelle; NOBLE, Ann C. Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 1, p. 330S-335S, 2005.

LINDBERG, Matthew L.; AMSTERDAM, Ezra A. Alcohol, wine, and cardiovascular health. **Clinical Cardiology**. v. 31, n. 8, p. 347-351, 2008.

MALOVANÁ, Sabina et al. Optimisation of sample preparation for the determination of trans-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 428, n. 2, p. 245-253, 2001.

MILLER, James N.; MILLER, Jane Charlotte. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. Pearson Education, 2010.

MINUSSI, Rosana C. et al. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. **Food Chemistry**, v. 82, n. 3, p. 409-416, 2003.

MONAGAS, María; BARTOLOMÉ, Begoña; GÓMEZ-CORDOVÉS, Carmen. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 45, n. 2, p. 85-118, 2005.

PAIXÃO, Neuza et al. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 204-214, 2007.

RENAUD, S. de; DE LORGERIL, Michel. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **The Lancet**, v. 339, n. 8808, p. 1523-1526, 1992.

RODRÍGUEZ-DELGADO, Miguel-Ángel et al. Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines. **Food Chemistry**, v. 78, n. 4, p. 523-532, 2002.

SÁDECKÁ, Jana; TÓTHOVÁ, Jana; MÁJEK, Pavel. Classification of brandies and wine distillates using front face fluorescence spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 117, n. 3, p. 491-498, 2009.

SEETOHUL, L. Nitin et al. Discrimination of Sri Lankan black teas using fluorescence spectroscopy and linear discriminant analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 9, p. 2308-2314, 2013.

SERRANO-LOURIDO, Daniel et al. Classification and characterisation of Spanish red wines according to their appellation of origin based on chromatographic profiles and chemometric data analysis. **Food chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1425-1431, 2012.

SON, Hong-Seok et al. Characterization of wines from grape varieties through multivariate statistical analysis of <sup>1</sup>H NMR spectroscopic data. **Food Research International**, v. 42, n. 10, p. 1483-1491, 2009.

STONE, Herbert; BLEIBAUM, Rebecca; THOMAS, Heather A. **Sensory evaluation practices**. Academic press, 2012.

VINSON, Joe A.; HONTZ, Barbara A. Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 2, p. 401-403, 1995.

WANG, Jiaming et al. Chemical and sensory profiles of rosé wines from Australia. **Food Chemistry**, v. 196, p. 682-693, 2016.

WELKE, Juliane Elisa et al. Differentiation of wines according to grape variety using multivariate analysis of comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection data. **Food chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3897-3905, 2013.

WOLD, Svante; ESBENSEN, Kim; GELADI, Paul. Principal component analysis. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 2, n. 1, p. 37-52, 1987.