Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 119
on line
ISSN 1808-9968
Dezembro, 2014

Desenvolvimento de Metodologia para Detecção e Quantificação de Compostos Fenólicos em Vinhos

Embrapa

ISSN 1808-9968

Dezembro, 2014

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Semiárido
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 119

Desenvolvimento de Metodologia para Detecção e Quantificação de Compostos Fenólicos em Vinhos

Luiz Claudio Corrêa
Ana Cecília Poloni Rybka
Aline Camarão Telles Biasoto
Paula Tereza de Souza e Silva
Giuliano Elias Pereira

Embrapa Semiárido
Petrolina, PE
2014

Esta publicação está disponibilizada no endereço: www.cpatsa.embrapa.br

Embrapa Semiárido
BR 428, km 152, Zona Rural
Caixa Postal 23 CEP 56302-970 Petrolina, PE
Fone: (87) 3866-3600 Fax: (87) 3866-3815
cpatsa.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade
Presidente: Maria Auxiliadora Coêlho de Lima
Secretário-Executivo: Sidinei Anunciação Silva
Membros: Aline Camarão Telles Biasoto
Anderson Ramos de Oliveira
Ana Cecília Poloni Rybka
Ana Valéria Vieira de Souza
Fernanda Muniz Bez Birolo
Flávio de França Souza
Gislene Feitosa Brito Gama
José Mauro da Cunha e Castro
Juliana Martins Ribeiro
Welson Lima Simões

Supervisão editorial: Sidinei Anunciação Silva
Revisão de texto: Sidinei Anunciação Silva
Normalização bibliográfica: Sidinei Anunciação Silva
Tratamento de ilustrações: Nivaldo Torres dos Santos
Editoração eletrônica: Nivaldo Torres dos Santos
Foto(s) da capa: Sidinei Anunciação Silva

1ª edição (2014): formato digital

Todos os direitos reservados
A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

É permitida a reprodução parcial do conteúdo desta publicação desde que citada a fonte.

CIP. Brasil. Catalogação na Publicação
Embrapa Semiárido

Desenvolvimento de metodologia para detecção e quantificação de compostos fenólicos em vinhos / Luiz Claudio Corrêa [et al.]... Petrolina: Embrapa Semiárido, 2014.

20 p. (Embrapa Semiárido. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 119).

1. Enologia. 2. Cromatografia. 3. Química analítica. 4. Vinho branco. 5. Vinho tinto. I. *Vitis vinífera* L. II. Corrêa, Luiz Claudio. III. Rybka, Ana Cecília Poloni. IV. Biasoto, Aline Camarão Telles. V. Silva, Paula Tereza de Souza. VI. Pereira, Giuliano Elias. VII. Título. VIII. Série.

CDD 634.8

© Embrapa 2014

Sumário

Resumo 4
Abstract 6
Introdução 7
Material e Métodos 9
Resultados e Discussão 11
Conclusões 18
Referências 19

Desenvolvimento de Metodologia para Detecção e Quantificação de Compostos Fenólicos em Vinhos

Luiz Claudio Corrêa[1], Ana Cecília Poloni Rybka[2], Aline Camarão Telles Biasoto[3], Paula Tereza de Souza e Silva[4], Giuliano Elias Pereira[5]

Resumo

Com este trabalho, objetivou-se desenvolver um método cromatográfico para a quantificação de compostos fenólicos em vinhos brancos e tintos por cromatografia líquida de alta eficiência. Para a validação em amostras, foram selecionados dez vinhos. Foram utilizados 25 padrões de compostos fenólicos. A separação dos compostos foi realizada utilizando-se simultaneamente os detectores de arranjos de fotodiodos e fluorescência. As fases móveis utilizadas foram: solução de dihidrogenofosfato fosfato de potássio em água ultrapura com pH ajustado para 2,05; metanol e acetonitrila e como fase estacionária foi utilizada coluna C18 (150x4,60 mm, 3μm). A seletividade foi confirmada através dos tempos de retenção e dos espectros de absorção dos padrões analíticos, das amostras puras e fortificadas com a mistura dos padrões.

[1]Biólogo, D.Sc. em Ciências Biológicas, analista da Embrapa semiárido, Petrolina, PE, claudio.correa@embrapa.br.
[2]Engenheira de Alimentos, D.Sc. em Ciência de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, ana.rybka@embrapa.br.
[3]Bacharel em Ciência dos Alimentos, D.Sc. em Alimentos e Nutrição, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, aline.biasoto@embrapa.br.
[4]Química, D.Sc. em Química Ambiental, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, paula.silva@embrapa.br.
[5]Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Enologia, pesquisador da Embrapa Semiárido/Uva e Vinho, Petrolina, PE, giuliano.pereira@embrapa.br.

A linearidade das curvas analíticas para cada composto foi confirmada através do R2 das curvas, que variaram entre 0,997 e 0,999, com os limites de detecção e quantificação variando de 0,02 mg L-1 a 0,30 mg L-1 e 0,05 mg L-1 a 1,00 mg L-1. A repetibilidade variou de 1,05 a 3,39 (CV%), enquanto a precisão intermediária ficou entre 1,27 e 3,19 (CV%). A exatidão apresentou variação de 90,86% a 99,64% e de 92,20% a 99,89% nos vinhos tinto e branco, respectivamente.

Termos para indexação: vinho, validação, cromatografia, compostos fenólicos.

Development of Methodology for Detection and Quantification of Phenolic Compounds in Wines

Abstract

The aim of this study was to develop a chromatographic method for quantification of phenolic compounds in red and white wines. Ten wines were used as samples for validation. Twenty five analytical standards of phenolic compounds were used. Separation of compounds was performed in a liquid chromatographic system coupled to a photodiodes array detector and fluorescence detector. The mobile phases used dihydrogen potassium phosphate solution with pH = 2,05; methanol and acetonitrile. The column C18 (150 x 4,60 mm, 3μm) was used as estacionary phase. The selectivity was confirmed by retention times and absorption spectra of analytical standards and the injection of pure wines and spiked wines with a mixture of standards. The linearity for each compound was confirmed by R2 coefficient, ranging from 0.997 to 0.999. Limits of detection and quantification ranged from 0.02 to 0.30 mg L -1 and 0.05 to 1.00 mg L-1, respectively. The repeatability ranged from 1.05 to 3.39 (CV%), while the intermediate precision was between 1.27 and 3.19 (CV%). The accuracy showed variation from 90.86 to 99.64 for red wines and 92.20% and 99.89% for white wines.

Index terms: wine, validation, chromatography, phenolic compounds.

Introdução

Uvas contêm grande quantidade de compostos fenólicos em suas cascas, polpa e sementes. Esses compostos são parcialmente extraídos durante o processo de elaboração de vinhos (JACKSON, 2008). A composição desses compostos nas uvas depende, primeiramente, da cultivar, podendo variar em função do tipo de irrigação, intensidade da luz, temperatura, composição do solo e do grau de maturação da uva na colheita. No processo de elaboração do vinho, a composição da fração fenólica pode ser afetada pela presença de engaço no mosto durante a maceração, em decorrência da duração da maceração e nas etapas de filtração, clarificação, estabilização e envelhecimento (AMERINE; JOSLYN, 1987; CANTOS et al., 2002; SINGLETON; TROUSDALE, 1983; TOMÁS-BARBERÁN; ESPÍN, 2001;).

Diferenças entre tipos de vinhos se devem, em grande parte, à concentração e composição da fração fenólica, uma vez que estes compostos, notadamente os taninos e as antocianinas, são muito importantes para a estabilidade do vinho e os principais responsáveis pela sua estrutura, cor, adstringência e amargor, podendo também ser precursores de voláteis de poder odorífero e influenciar no gosto ácido da bebida (JACKSON, 2008; RIBÉREAU-GAYON et al., 2004; ZOECKLEIN et al., 2001).

Os compostos fenólicos do vinho dividem-se em duas classes principais: derivados flavonoídicos e não flavonoídicos. Os flavonoides possuem dois anéis aromáticos ligados pelo oxigênio de um anel pirano (heterocíclico), sendo representados como $C_6C_3C_6$. Diferenças entre a estrutura destes compostos decorrem do grau de oxidação do anel heterocíclico, originando uma gama de substâncias com propriedades físico-químicas e estabilidades distintas. Os principais flavonoides do vinho são os flavan-3-ols ou flavanóis (taninos, catequina, epicatequina), flavonóis (miricitina, quercetina, rutina e caempferol) e antocianinas (cianidina-3-*O*-glucosídeo, malvidina-3-

O-glucosídeo, peonidina-3-*O*-glucosídeo, petunidina-3-*O*-glucosídeo e delfinidina-3-*O*-glucosídeo). Por sua vez, os fenólicos classificados como não flavonoides, no vinho, são principalmente derivados do ácido benzoico (ácidos vanílico, siríngico, gálico e *p*-hidroxibenzoico) e do ácido cinâmico (ácidos *p*-cumárico, ferrúlico, cafeico e sinapico). Fazem parte, também, do grupo dos não-flavonoides: os estilbenos (*cis* e *trans*-resveratrol), os fenólicos voláteis (eugenol e guaiacol) e os taninos hidrolisáveis, que correspondem aos ésteres de ácido gálico e ácido elágico, extraídos da madeira durante o envelhecimento do vinho (OLIVEIRA et al., 2011; RIBÉREAU-GAYON et al., 2004).

Para a determinação de compostos fenólicos em vinhos, os principais procedimentos utilizados são os métodos espectrofotométricos (FOLIN; CIOCALTEU, 1927; TARANTILIS et al., 2008) e o uso de biossensores (RODRÍGUEZ; RIVAS, 2002), mas estas técnicas não permitem a separação e quantificação de cada composto individualmente, além de, muitas vezes, não fornecerem valores corretos do conteúdo desses compostos, superestimando-os por quantificar interferentes que absorvem luz no mesmo comprimento de onda. Assim, para identificar e quantificar os compostos fenólicos em vinhos, atualmente recomenda-se a utilização de eletroforese capilar de zona (VOLIKAKIS; EFSTATHIOU, 2005) e cromatográficas (FERRER-GALLEGO et al., 2010; ORGANISATION INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN, 1990; ZOECKLEIN et al., 2001), principalmente a cromatografia líquida de alta eficiência (Clae), com coluna de fase reversa (C18) e detectores de arranjo de fotodiodos (DAD), fluorescência (FLD) e/ou espectrometria de massas (EM). Estudos de comparação entre os métodos apontam que a cromatografia líquida é superior em termos de precisão, exatidão e sensibilidade em comparação à eletroforese capilar de zona (GARCIA-VIGUERA; BRIDLE, 1995).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia analítica, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, que permita a quantificação de vários compostos fenólicos em vinhos brancos e tintos, em uma única análise cromatográfica, incluindo o simples preparo de amostra.

Material e Métodos

Para a determinação dos parâmetros foram utilizados 25 padrões comerciais de compostos fenólicos: delfinidina-3-*O*-glucosídeo, peonidina-3-*O*-glicosídeo, pelargonidina-3-*O*-glicosídeo, cianidina-3-*O*-glicosídeo, malvidina-3-*O*-glicosídeo, procianidina B2, procianidina B1, procianidina A2, trans-resveratrol, isorhamnetina-3-*O*-glicosídeo, (-)-galato epigalocatequina, (-)-galato epicatequina, (-)-epicatequina, (+)-catequina, caempferol-3-*O*-glicosídeo, miricetina e rutina; ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido *p*-cumárico; ácido gálico, ácido ferrúlico, ácido vanílico, ácido siríngico, e quercetina. Soluções estoque dos padrões foram preparadas em metanol grau HPLC, variando de 1.000 mg L^{-1} para peonidina-3-*O*-glicosídeo e procianidina B1 a 5.000 mg L^{-1} para catequina. Estas soluções estoque foram armazenadas em ultra-freezer, a -80 ºC.

Fase móvel A: dihidrogenofosfato fosfato de potássio em água ultrapura 0,025 M e pH = 2,05, ajustado com ácido ortofosfórico. Fase móvel B: 100% metanol grau HPLC. Fase móvel C: 100% acetonitrila grau HPLC (Fase C).

Utilizou-se cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado aos detectores DAD e FLD. Para o DAD, foram utilizados os comprimentos de onda de 220 nm, 320 nm, 360 nm e 520 nm. Para a detecção em FLD, a excitação se deu a 280 nm e a emissão a 360 nm. Os dois detectores foram utilizados simultaneamente. Foram utilizadas a coluna C18 (150x4,60 mm, 3μm) e a pré-coluna C18 (4,0x3,0mm).

A temperatura do forno foi de 40 ºC e o volume de injeção de 10 μL, com fluxo de 0,6 mL min^{-1}. O gradiente utilizado para a separação dos compostos foi: 0 min: 100% A; 18 min: 87,5% A, 2,5% B e 10% C; 30 min: 83,5% A, 3,2 % B e 13,3 % C; 36 min: 75% A, 5% B e 20% C; 48,5 min: 65% A, 8,3% B e 26,7% C; 50 min: 65% A, 8,3% B e 26,7% C; 65 min: 100% A; 70 min: 100% A.

Foram utilizadas dez amostras entre vinhos tintos (n = 7) e brancos (n = 3), elaborados pelo método tradicional descrito por Peynaud (1997), no Laboratório de Enologia da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, a partir de variedades *Vitis vinífera* cultivadas no Submédio do Vale do São Francisco, sendo: Syrah (colheitas: 29/08/11 – SY1_S1, 25/11/10 – SY2_S2 e 13/05/10- SY3_S1), Petit Verdot (colheita: 03/09/10, elaborados com 10 dias de maceração - PV1_S1 e 30 dias de maceração – PV2_S1), Tempranillo (colheitas: 25/11/10 – TE1_S2 e 16/06/11 – TE2_S1), Chennin Blanc (colheitas: 31/08/10 – CB1_S1 e 21/07/11 – CB2_S1) e Sauvignon Blanc (colheita: 03/02/10 – SB_S2). Os vinhos da mesma variedade foram elaborados com uvas colhidas no mesmo local de procedência, utilizando-se clone da cultivar, porta-enxerto e sistema de condução similares.

Ressalta-se que, na região do Submédio do Vale do São Francisco, por causa das condições climáticas peculiares e ao clima tropical semiárido, é possível colher uva em duas safras ao longo do ano. Assim, os vinhos das uvas colhidas entre os meses de maio a setembro são chamados de vinhos da primeira safra do ano (S1), enquanto os vinhos originados de uvas colhidas entre os meses de novembro e março são denominados vinhos da segunda safra do ano (S2).

As amostras foram filtradas em membranas com poro de 0,45 μm e injetadas diretamente no cromatógrafo em volume de 10 μL.

A seletividade foi avaliada pela identificação dos tempos de retenção e espectros de absorção dos padrões isolados, da mistura de padrões e de amostras puras e fortificadas com a mistura dos padrões no mesmo nível.

Para a determinação da faixa linear, foram avaliadas curvas de calibração de sete pontos, pelo método do padrão externo, com concentrações variando de 0,625 mg L^{-1} a 160 mg L^{-1} (Tabela 1).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados conforme proposto por Harris (2008).

A precisão do método foi avaliada por meio de testes de repetibilidade e de precisão intermediária. A repetibilidade foi determinada com injeção, em triplicata, de amostras de vinho tinto e branco, puras e fortificadas com mistura de padrões em três níveis de concentração (BRASIL, 2003; ESTADOS UNIDOS, 1996).

Para a precisão intermediária, foram utilizadas as mesmas amostras, injetadas em triplicata e em três dias diferentes. Os resultados foram expressos por meio do coeficiente de variação (CV%) das respostas obtidas. O mesmo procedimento foi utilizado para a avaliação da estabilidade dos padrões, que foram mantidos em freezer a -20 ^{0}C e injetados em triplicata a cada 2 dias.

O grau de exatidão foi determinado em duas amostras (vinho tinto e vinho branco) fortificadas com a mistura de padrões em três níveis de concentração (BRASIL, 2003; ESTADOS UNIDOS, 1996) por meio da recuperação percentual dos padrões, em comparação com os valores teóricos.

Resultados e Discussão

O método se mostrou seletivo para a separação dos 25 compostos fenólicos avaliados, conforme apresentado nos cromatogramas (Figuras 1 e 2). Os resultados obtidos para os parâmetros de validação do método desenvolvido estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

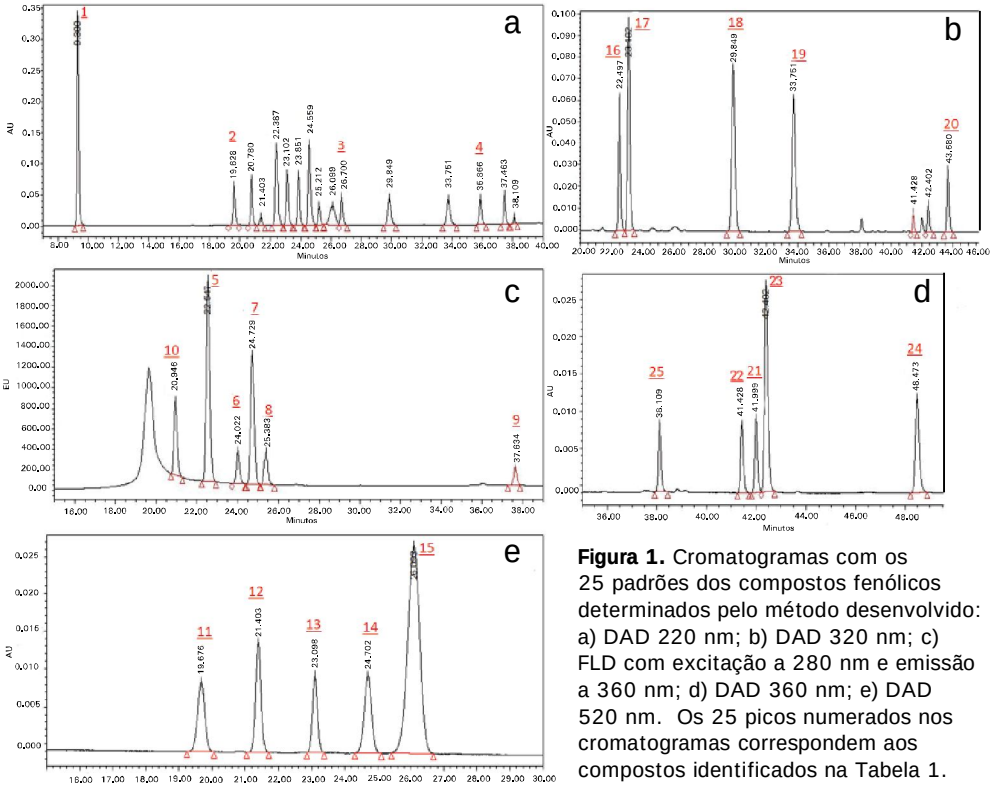

Figura 1. Cromatogramas com os 25 padrões dos compostos fenólicos determinados pelo método desenvolvido: a) DAD 220 nm; b) DAD 320 nm; c) FLD com excitação a 280 nm e emissão a 360 nm; d) DAD 360 nm; e) DAD 520 nm. Os 25 picos numerados nos cromatogramas correspondem aos compostos identificados na Tabela 1.

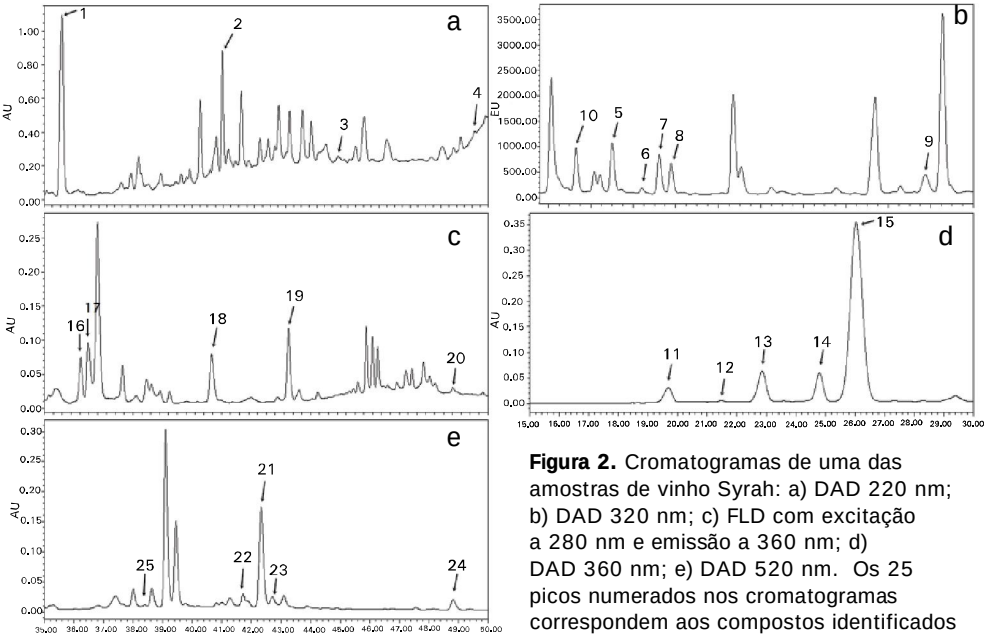

Figura 2. Cromatogramas de uma das amostras de vinho Syrah: a) DAD 220 nm; b) DAD 320 nm; c) FLD com excitação a 280 nm e emissão a 360 nm; d) DAD 360 nm; e) DAD 520 nm. Os 25 picos numerados nos cromatogramas correspondem aos compostos identificados na Tabela 2.

Tabela 1. Faixa linear, equação da reta, coeficiente de correlação (R^2), limites de detecção (L. D.) e quantificação (L.Q.) para os 25 compostos fenólicos[1].

Composto	Faixa Linear (mg L^{-1})	Equação da reta	R^2	L.D. (mg L^{-1})	L.Q. (mg L^{-1})
1. Ácido gálico	5 - 160	Y = 1,34e+005 X + 5,31e+004	0,9996	0,12	0,41
2. Procianidina B1	1,25 - 40	Y = 1,17e+005 X + 8,54e+003	0,9996	0,09	0,31
3. (-)-Galato epigalatocatequina	1,25 - 40	Y = 9,64e+004 X + 3,22e+003	0,9999	0,09	0,31
4. (-)-Galato epicatequina	1,25 - 40	Y = 8,93e+004 X + 8,55e+003	0,9997	0,13	0,42
5. Ácido vanílico	2,5 - 80	Y = 1,23e+007 X + 3,99e+006	0,9990	0,30	1,00
6. Procianidina B2	2,5 80	Y = 1,87e+006 X + 4,44e+004	0,9977	0,27	0,89
7. (-)-Epicatequina	1,25 - 40	Y = 1,61e+007 X + 2,94e+006	0,9991	0,26	0,86
8. Ácido siríngico	2,5 - 80	Y = 1,91e+006 X - 7,75e+004	0,9998	0,28	0,93
9. Procianidina A2	1,25 - 40	Y = 1,66e+006 X + 5,87e+005	0,9972	0,23	0,76
10. (+)-catequina	2,5 - 80	Y = 4,01e+006 X - 4,07e+005	0,9983	0,05	0,18
11. Delfinidina-3-*O*-glucosídeo	0,625 - 20	Y = 5,56e+004 X + 6,28e+003	0,9995	0,09	0,30
12. Cianidina-3-*O*-glucosídeo	0,625 - 20	Y = 6,42e+004 X + 4,84e+003	0,9997	0,04	0,12
13. Pelargonidina-3-*O*-glucosídeo	0,625 - 20	Y = 4,26e+004 X + 2,71e+003	0,9996	0,02	0,05
14. Peonidina-3-*O*-glucosídeo	0 625 - 20	Y = 6,35e+004 X + 4,12e+003	0,9995	0,04	0,13
15. Malvidina-3-*O*-glucosídeo	5,00 - 160	Y = 3,47e+004 X + 1,46e+004	0,9997	0,27	0,89
16. Ácido clorogênico	2,5 - 80	Y = 5,42e+004 X + 8,96e+003	0,9996	0,09	0,30
17. Ácido cafeico	2,5 - 80	Y = 9,99e+004 X + 1,94e+004	0,99959	0,08	0,26
18. Ácido p-cumárico	2,5 - 80	Y = 1,09e+005 X + 1,79e+004	0,99967	0,08	0,27
19. Ácido ferúlico	2,5 - 80	Y = 9,30e+004 X + 1,80e+004	0,99956	0,09	0,30
20. Trans-resveratrol	0,625 - 20	Y = 1,16e+005 X + 4,02e+003	0,99974	0,03	0,09
21. Isorhamnetina-3-*O*-glicosídeo	0,625 - 20	Y = 3,06e+004 X + 2,48e+003	0,99952	0,03	0,09
22. Caempferol-3-*O*-glicosídeo	0,625 - 20	Y = 2,80e+004 X + 1,90e+003	0,99959	0,03	0,10
23. Miricetina	1,25 - 40	Y = 5,42e+004 X - 4,14e+003	0,99996	0,03	0,11
24. Quercetina	0,625 - 20	Y = 5,62e+004 X + 1,70e+002	0,99994	0,06	0,18
25. Rutina	0,625 - 20	Y = 2,77e+004 X + 1,84e+003	0,99943	0,06	0,20

[1]DAD: 220 nm (compostos 1 a 4); 320 nm (compostos 16 a 20); 360 nm (compostos 21 a 25); 520 nm (compostos 11 a 15) e Fluorescência com excitação a 280 nm e emissão a 360 nm (compostos 5 a 10).

Tabela 2. Parâmetros de validação para a determinação dos 25 compostos fenólicos[1]: repetibilidade (Rep) precisão intermediária (P.I.), exatidão para vinho tinto (V. T.) e vinho branco (V. B.).

Composto	Rep. C. V. (%)	P. I. C. V. (%)	Exatidão V. T. (%)	Exatidão V. B. (%)
1. Ácido gálico	1,11	1,53	99,64	99,81
2. Procianidina B1	1,45	1,42	98,89	96,69
3. (-)-Galato epigalatocatequina	2,32	1,89	99,31	92,83
4. (-)-Galato epicatequina	1,97	2,20	95,36	99,50
5. Ácido vanílico	1,95	2,35	96,86	97,69
6. Procianidina B2	1,88	1,67	93,11	92,20
7. (-)-Epicatequina	2,95	3,19	92,31	93,06
8. Ácido siríngico	2,30	2,01	96,01	97,10
9. Procianidina A2	2,83	3,11	94,38	95,11
10. (+)-catequina	1,79	1,42	95,65	99,89
11. Delfinidina-3-*O*-glucosídeo	3,39	2,40	90,86	96,43
12. Cianidina-3-*O*-glucosídeo	2,88	1,90	97,00	94,62
13. Pelargonidina-3-*O*-glucosídeo	1,21	1,60	99,33	96,56
14. Peonidina-3-*O*-glucosídeo	0,62	1,79	98,85	99,13
15. Malvidina-3-*O*-glucosídeo	1,26	1,25	97,44	98,56
16. Ácido clorogênico	1,43	1,27	99,64	98,96
17. Ácido cafeico	2,79	1,64	99,17	98,47
18. Ácido p-cumárico	1,73	1,53	97,67	99,28
19. Ácido ferúlico	2,19	1,56	98,92	98,64
20. Trans-resveratrol	2,70	1,74	96,00	97,81
21. Isorhamnetina-3-*O*-glicosídeo	1,05	1,56	98,44	97,28
22. Caempferol-3-*O*-glicosídeo	2,75	1,79	94,11	96,39
23. Miricetina	1,22	1,62	98,83	100,14
24. Quercetina	1,26	1,68	97,56	98,01
25. Rutina	2,93	1,72	92,33	96,78

[1]DAD: 220 nm (compostos 1 a 4); 320 nm (compostos 16 a 20); 360 nm (compostos 21 a 25); 520 nm (compostos 11 a 15) e Fluorescência com excitação a 280nm e emissão a 360 nm (compostos 5 a 10).

Coeficiente de correlação (R^2) maior do que 0,9990 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003). Os coeficientes para o estudo de linearidade do método desenvolvido variaram entre 0,9972 e 0,9999 para os compostos fenólicos avaliados (Tabela 1); valores similares aos observados por Dutra et al. (2010), que obtiveram coeficientes de determinação entre 0,9980 e 0,9998 para os compostos fenólicos avaliados também por Clae.

A porcentagem de recuperação do método desenvolvido está entre 90,86% e 99,64% para os vinhos tintos e entre 92,20% e 100,14% para os vinhos brancos (Tabela 2). Os intervalos aceitáveis de recuperação, geralmente ficam no intervalo entre 70% e 120% (RIBANI et al., 2004). Assim, os resultados alcançados para a recuperação dos 25 compostos fenólicos avaliados são aceitáveis tanto para vinhos tintos como para brancos.

A repetibilidade (CV%) variou de 0,62 a 3,39, enquanto a precisão intermediária ficou entre 1,25 e 3,19. Para a análise da precisão, nos métodos para a análise de traços ou impurezas, são aceitos CV's de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (HUBER, 1998). Desta forma, os valores de precisão intermediária do método desenvolvido são satisfatórios. Dutra et al. (2010), observaram valores de repetibilidade próximos aos da Tabela 2 para compostos fenólicos, iguais a 2,96; 1,79 e 2,07 em CV%, para rutina, ácido cafeico e ácido 5-cafeoilquínico, respectivamente; demostrando que o método se mostrou eficaz, também, quanto à repetibilidade.

Os resultados de quantificação dos 25 compostos fenólicos nas amostras de vinhos tintos e brancos analisadas estão apresentados na Tabela 3.

As amostras apresentaram grande variação nos teores dos compostos fenólicos analisados. O ácido gálico, a procianidina B1, a catequina e a malvidina-3-*O*-glucosídeo, o ácido siringico e o ácido cafeico foram os compostos fenólicos que se destacaram nos vinhos. Por sua vez, os compostos fenólicos encontrados em menor concentração foram a rutina, o ácido ferrúlico, a cianidina-3-*O*-glucosídeo e o trans-resveratrol.

Tabela 3. Compostos fenólicos determinados nas amostras de vinhos tinto e branco avaliadas.

Compostos fenólicos (mg L-1)	Amostras1									
	CB1_S									
	TE1_S2	TE2_S1	PV1_S1	SB_S2	CB1_S1	CB2_S1	SY2_S2	SY1_S1	SY3_S1	PV2_S1
Ácido gálico	24,00	38,10	29,90	0,70	0,75	0,45	24,90	22,20	75,40	71,50
Procianidina B1	38,50	60,50	25,20	1,80	38,75	14,35	20,55	30,85	52,90	43,40
(-)-Galato epigalatocatequina	1,40	4,10	3,90	0,55	0,50	0,30	1,50	1,85	2,15	1,55
(-)-Galato epicatequina	1,65	1,85	1,50	ND	2,00	0,45	2,55	2,50	1,05	1,80
Ácido vanílico	1,35	3,90	3,25	0,05	0,15	0,55	1,90	1,85	7,45	3,60
Procianidina B2	4,00	10,20	5,85	1,80	ND	ND	8,65	10,75	19,50	37,80
(-)-Epicatequina	1,85	1,80	7,05	0,10	ND	ND	2,10	1,30	4,70	7,10
Ácido siríngico	11,90	24,30	24,55	1,65	ND	ND	39,40	32,05	45,15	105,00
Procianidina A2	3,70	10,60	2,40	1,05	4,30	1,60	4,60	2,20	4,30	5,55
(+)-Catequina	10,50	27,40	16,00	6,15	0,55	0,70	21,75	17,00	27,80	75,00
Delfinidina-3-*O*-glucosídeo	1,15	18,25	2,75	ND1	ND	ND	0,50	32,50	0,60	3,30
Cianidina-3-*O*-glucosídeo	o	2,10	0,50	ND	ND	ND	<LQ	0,43	0,05	0,55
Pelargonidina-3-*O*-glucosídeo	2,35	26,40	5,80	ND	ND	ND	3,70	12,10	1,30	7,30
Peonidina-3-*O*-glucosídeo	0,40	7,25	1,40	ND	ND	ND	1,48	4,33	1,25	1,05
Malvidina-3-*O*-glucosídeo	25,55	123,25	41,95	ND	ND	ND	66,50	116,75	17,25	60,00
Ácido clorogênico	9,70	12,85	3,70	2,95	1,95	2,55	0,60	6,75	4,25	0,00
Ácido cafeico	3,80	13,50	10,65	1,00	1,10	0,55	25,30	8,00	10,05	37,00
Ácido □-cumarico	1,60	13,15	7,30	0,10	0,40	0,10	8,40	5,65	8,80	12,80
Ácido ferrúlico	0,25	0,80	0,85	ND	0,20	0,15	1,05	0,25	0,60	2,30
Trans-resveratrol	0,05	1,20	0,15	ND	ND	ND	0,35	0,35	0,90	0,35
Isorhamnetina-3-*O*-glicosídeo	2,70	4,80	10,00	ND	ND	ND	16,80	17,05	16,10	12,45
Caempferol-3-*O*-glicosídeo	1,55	1,90	0,75	0,70	1,20	0,00	1,15	2,05	1,00	1,30
Miricetina	0,50	4,85	1,10	ND	ND	ND	0,70	1,20	1,25	2,55
Quercetina	0,25	2,95	0,20	ND	ND	ND	0,38	1,65	1,70	0,95
Rutina	0,90	1,05	0,80	ND	ND	0,30	0,33	0,80	0,63	0,53
Total	149,6	417,1	207,5	18,6	51,9	22,1	255,1	332,4	306,1	494,7

ND =não detectado. <LQ = abaixo do limite de quantificação. 1Legenda das amostras: SY = Syrah, TE = Tempranillo, PV = Petit Verdot, CB = Chenin Blanc, SB = Sauvignon Blanc.

Para os vinhos brancos, não foram encontradas nenhuma das cinco antocianinas, conforme esperado, e baixo teor de fenólicos em geral, notadamente de trans-resveratrol e dos cinco flavonoides avaliados. A procianidina B1 foi o composto predominante nestes vinhos, principalmente nos vinhos da variedade Chenin Blanc.

Para os vinhos, nota-se a prevalência da malvidina-3-*O*-glucosídeo, dentre as cinco antocianinas avaliadas; dos ácidos gálico e siríngico, entre os ácidos fenólicos; maiores teores de isorhamnetina-3-*O*-glucosídeo e menores de rutina, entre os flavonoides, e maiores teores de (+)-catequina e procianidina B1, entre os flavan-3-ols. O estilbeno trans-resveratrol foi encontrado em maiores quantidades no vinho cv. Tempranillo elaborado com as uvas colhidas na primeira safra do ano (TE2_S1).

De modo geral, para os vinhos das cultivares Tempranillo e Syrah, maiores teores de compostos fenólicos foram encontrados nos vinhos elaborados com uvas colhidas na primeira safra do ano (SY1_S1, SY3_S1, TE2_S1). Para o vinho da cultivar Petit Verdot, o aumento de 20 dias de duração da maceração durante a vinificação, originou um vinho com maior conteúdo de compostos fenólicos quantificados. A quantidade de compostos do vinho Petit Verdot com 30 dias de maceração (PV2_S1), além de ser a maior, foi mais de duas vezes superior à do vinho Petit Verdot com 10 dias de maceração (PV1_S1).

Conclusões

O método desenvolvido mostrou-se eficiente para a determinação dos 25 compostos fenólicos testados em vinhos brancos e tintos, tendo como vantagem a possibilidade da análise simultânea de todos os compostos em 60 minutos de corrida e o fato de necessitar apenas de uma etapa de filtração simples da amostra.

Os vinhos brancos apresentaram menores concentrações de todos os compostos fenólicos avaliados.

O perfil de compostos fenólicos nos vinhos tintos avaliados variou principalmente em função da época de colheita e das técnicas de vinificação (maceração).

Referências

AMERINE, A.; JOSLYN, M. A. **Composition of grapes and distribution of phenolics from table wines, the technology of their production**. Berkeley: University of California Press, 1987. p 234-238.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de2003. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2 jun. 2003.

CANTOS, E.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERAN, F. A. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivares studies by LC-DAD-MSMS. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, D.C., v. 50, p. 5691-5696, 2002.

DUTRA, F. L. G.; HOFFMANN-RIBANI R.; RIBANI M. Determination of phenolic compounds by isocratic high performance liquid chromatografic method during storage of yerba-mate. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, 2010.

ESTADOS UNIDOS. Department of Health and Human Services. **Guidance for industry**: Q2B validation of analytical procedures: methodology. [Washington, D. C.], 1996. Disponível em: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm265700.htm>. Acesso em: 15 ago. 2014.

FERRER-GALLEGO, R.; GARCÍA-MARINO, M.; HERNÁNDEZ-HIERRO, J. M.; RIVAS-GONZALO, J. C.; ESCRIBANO-BAILÓN, M. T. Statistical correlation between flavanolic composition, colour and sensorial parameters in grape seed during ripening **Analytica Chimica Acta**, Bethesda, v. 660, n. 1, p. 22-28, 2010.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 73, p. 627-650, 1927.

GARCÍA-VIGUERA, C.; BRIDLE, P. Analysis of non-coloured phenolic compounds in red wines. A comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis. **Food Chemistry**, [Amsterdam 54, p.349– 352, 1995.

HARRIS, D. C.; **Análise Química Quantitativa**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC-GC International**, [New York], v. 11, p. 96-105, 1998.

JACKSON, R. S. **Wine science**: principles, practice and perception. 3rd ed. San Diego: Elsevier. 2008.

OLIVEIRA, C. M.; FERREIRA, A. C. S.; DE FREITAS, V.; SILVA, A. M. S. Oxidation mechanisms occurring in wines. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 44, p. 1.115-1.126, 2011.

ORGANISATION INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN. **Recueil des méthodes internationales d analyse des vins et des mouts**. Paris, 1990.

PEYNAUD, E. **Connaissance et travail du vin**. 2 éd. Paris: Dunod, 1997. 341p.

RIBANI, M., BOTTOLI C. B. G., COLLINS C. H., JARDIM I. C. S. F., MELO L. F. C., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBORDIEU, D. **Traité d oenologie - Chimie du vin:** stabilisation et traitements. 5 éd. Paris: Dunod, 2004. 566 p.

RODRÍGUEZ, M. C.; RIVAS, G. A. Glassy carbon paste electrodes modified with polyphenol oxidase: analytical applications. **Analytica Chimica Acta**, [Amsterdam], v. 459, p. 43-51, 2002.

SHABIR, G. A.; Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. understanding the differences and similarities between validation requeriments of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, [Amsterdam], v. 987, p. 57-66, 2003.

SINGLETON, V. L.; TROUSDALE, E. White wine phenolics. Varietal and processing differences as shown by HPLC. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 34, n. 1,p. 27-34, 1983.

TARANTILIS, P. A.; TROIANOU, V. E.; PAPPAS, C. S.; KOTSERIDIS, Y. S.; POLISSIOU, M. G. Differentiation of Greek red wines on the basis of grape variety using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, [Amsterdam], v. 111, p. 192-196, 2008.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits end vegetables. **Journal of the Science of Food and** Agriculture, [Hoboken], v. 35, p. 853-876, 2001.

VOLIKAKIS, G. J.; EFSTATHIOU, C. E. Fast screening of total flavonols in wines, tea-infusions and tomato juice by flow injection/adsorptive stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, [Amasterdam], v. 551, p. 124-131, 2005.

ZOECKLEIN, B. W.; FUGELSANG, K. C.; GUMP, B. H.; NURY, F. S. **Analisis y produccion de vino**. Zaragoza: Editorial Acribia, 2001. 613 p.

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA

CGPE 11941