

Desenvolvimento de protocolo para extração de polifenóis com atividade biológica de cultivares brasileiras de uvas de mesa

Mara Junqueira Carneiro⁽¹⁾, Alexandre Augusto Borghi⁽¹⁾, Roselaine Facanali⁽²⁾, Rafael Bonchristiano Reis⁽²⁾, Júlio César Rodrigues Lopes Silva⁽²⁾, Leandro Wang Hantao⁽³⁾, Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya⁽³⁾, João Dimas Garcia Maia⁽⁴⁾, Patricia Silva Ritschel⁽⁵⁾ e Marcia Ortiz Mayo Marques⁽⁶⁾

⁽¹⁾ Bolsistas, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. ⁽²⁾ Bolsistas, Instituto Agrônomo de Campinas, SP. ⁽³⁾ Professores, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. ⁽⁴⁾ Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho, Jales, SP. ⁽⁵⁾ Pesquisadora, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. ⁽⁶⁾ Pesquisadora, Instituto Agrônomo, Campinas, SP.

Resumo – As uvas (*Vitis* spp.) são fontes naturais de compostos fenólicos, que contribuem com a saúde humana por suas atividades antioxidante, cardioprotetora, anticâncer, anti-inflamatória, anti-idade e antimicrobiana. O Programa de Melhoramento Genético Uvas do Brasil lançou nove cultivares de uva de mesa e a determinação do seu conteúdo de compostos funcionais é demanda dos consumidores. A diversidade química dos polifenóis das plantas afeta sua polaridade, dificultando o desenvolvimento de uma metodologia padrão para a identificação e quantificação desses compostos. A preparação e o método de extração das amostras são críticos para o sucesso da caracterização e quantificação de compostos fenólicos de origem vegetal. O objetivo deste estudo foi desenvolver um processo eficiente para a extração de compostos fenólicos de uvas de cultivares brasileiras. O protocolo foi desenvolvido pela investigação da influência da massa de amostra desidratada e do solvente de extração sobre a quantidade e qualidade dos compostos fenólicos recuperados em análises espectrofotométricas e cromatográficas. Não houve interação entre a quantidade de amostra e o tipo de solvente, sendo a maior eficiência obtida com o uso de 60 mg de amostra e da mistura metanol 50% e ácido fórmico 1% como solvente. Foram identificados compostos fenólicos típicos de uva em amostras obtidas com o protocolo desenvolvido. Alterações na relação entre a massa e carga de compostos identificados também foram detectadas, confirmando a qualidade da extração para análises de fragmentação. Esse protocolo pode permitir a caracterização química de outras uvas híbridas e o desenvolvimento de metodologias menos poluentes de extração.

Termos para indexação: alimentos funcionais, antocianinas, cromatografia líquida e videira.

Embrapa Uva e Vinho

Rua Livramento, nº 515
Caixa Postal 130
95701-008 Bento Gonçalves, RS
www.embrapa.br/uva-e-vinho
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente

Henrique Pessoa dos Santos

Secretária-executiva

Renata Gava

Membros

Fernando José Hawerth,

Mauro Celso Zanus, Joelsio

José Lazzarotto, Jorge Tonietto,

Thor Vinicius Martins Fajardo,

Alessandra Russi, Edgardo

Aquiles Prado Perez, Fábio

Ribeiro dos Santos, Luciana

Elena Mendonça Prado, Michele

Belas Coutinho Pereira

e Rochelle Martins Alvorcem

Revisão de texto

Renata Gava

Normalização bibliográfica

Rochelle Martins Alvorcem

(CRB-10/1810)

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados à Embrapa.

Development of a protocol for the extraction of polyphenols with biological activity from brazilian table grape cultivars

Abstract – Grapes (*Vitis* spp.) are natural sources of phenolic compounds that contribute to human health due to their biological activity as antioxidant, cardio-protective, antitumor, anti-inflammatory, anti-aging, and anti-microbial. Grapevine Breeding Program Uvas do Brasil has released nine table grape cultivars and consumers demand information on their functional compound contents. The chemical diversity of plant polyphenols affects their polarity, impairing the development of a single standard extraction method to their identification and quantification. Sample preparation and extraction are critical steps to characterize and quantify plant phenolic metabolites. The current work aimed at developing an effective protocol to extract phenolic compounds from grapes of Brazilian cultivars. The protocol was established by investigating the influence of sample mass and extraction solvent on the quality and quantity of phenolic compounds detected by spectrophotometric and chromatographic methods. No interaction was observed between the tested variables and highest extraction performances were obtained using 60 mg of dehydrated sample and the mixture 50% methanol + 1% formic acid as solvent. Typical grape phenolics were detected in samples obtained using the developed protocol. Modifications in the metabolites mass/charge ratios were also detected, confirming the quality of the extraction in fragmentation analyses. The protocol may allow the chemical characterization of other hybrid grapes and provide bases for the development of environmentally safer methodologies.

Index terms: anthocyanins, functional foods, grapevine and liquid chromatography.

Introdução

As frutas estão entre os alimentos saudáveis que os consumidores mais demandaram no mundo desde o início da pandemia do coronavírus, em 2020. No Brasil, a uva está entre as seis frutas responsáveis por cerca de 70% do volume da produção e entre as três com maior valor bruto da produção (Beling, 2022). Em 2020, mais da metade da uva produzida no Brasil (53%, equivalendo a aproximadamente 754.578 t) foram destinadas ao consumo in natura, cultivadas praticamente em todas as regiões

vitícolas brasileiras, em especial na região do Vale do São Francisco (Maia et al., 2018).

Além de sua função na nutrição humana, os alimentos de origem vegetal também têm um papel importante na saúde, contribuindo para a prevenção de doenças, por meio de substâncias bioativas, dentre as quais se destacam os compostos fenólicos (Silva et al., 2022). Quimicamente, os polifenóis são caracterizados pela presença de duas ou mais hidroxilas ligadas a um ou mais anéis aromáticos, sendo classificados em grupos de acordo com sua estrutura, incluindo flavonoides, lignanas, estilbenos e ácidos fenólicos (Rana et al., 2022). Nas plantas, os compostos fenólicos podem estar na forma livre ou em complexos com açúcares e proteínas. Suas funções biológicas nas plantas estão associadas à proteção contra agentes abióticos, como radiação ultravioleta e bióticos, como microrganismos patogênicos, como bactérias, vírus e pragas (Ângelo; Jorge, 2007; Román et al., 2019). As antocianinas, responsáveis pela coloração vermelha, azul e violeta em flores, hortaliças e frutas, são compostos fenólicos e contribuem com as propriedades antioxidantes quando presentes nos alimentos (Jeong et al., 2015; Wijekoon et al., 2022).

As uvas (*Vitis* spp.) e seus derivados, como sucos e vinho tinto, são fontes naturais de compostos fenólicos (Strommer et al., 2003; Wijekoon et al., 2022). O perfil quantitativo e qualitativo de polifenóis varia de acordo com a cultivar considerada (Flutre et al., 2022). De maneira geral, a cor das uvas está concentrada na película, embora raramente possa ser observada a presença de pigmentos na polpa. As uvas apresentam um dos mais ricos perfis polifenólicos dentre as frutas, podendo as tintas conter uma combinação de mais de 20 tipos de compostos (Teixeira et al., 2013; Martín et al., 2017).

Diversas estratégias, como o melhoramento genético, o manejo de plantas e o processamento de alimentos podem ser utilizadas no desenvolvimento dos alimentos funcionais ou medicinais, incrementando e melhorando o conteúdo de compostos bioativos nos produtos agrícolas, promovendo a bio-disponibilidade nos produtos e derivados. Fatores climáticos também podem afetar o perfil de compostos fenólicos (Kobayashi et al., 2004; Luo; He, 2004; Ahn-Jarvis et al., 2019).

Em 45 anos, o Programa de Melhoramento Genético Uvas do Brasil desenvolveu e lançou nove cultivares de uva de mesa, com e sem sementes (Embrapa Uva e Vinho, 2023). O desenvolvimento de cultivares adaptadas ao clima tropical possibilitou o cultivo da fruta nestas áreas, tornando o Vale do São Francisco (VSF) responsável por 62% da

produção nacional de uva de mesa. Atualmente, a região é um polo de exportação de frutas, onde a viticultura é um exemplo de sucesso e inovação tecnológica (Fonseca, 2022). Além de atender as demandas agrônômicas, as cultivares de uva desenvolvidas pela Embrapa têm perfil químico rico em polifenóis (Lago-Vanzela et al., 2011; Rebello et al., 2013; Colombo et al., 2020, 2021). 'BRS Vitória' é uma cultivar de uva sem sementes, com adaptação ao cultivo em regiões tropicais e subtropicais, com bom desempenho agrônômico e tolerância a doenças (Maia et al., 2014; Rogovski-Czaja et al., 2019), tendo se tornado importante para o mercado nacional e internacional (Colombo et al., 2020, 2021).

A diversidade estrutural dos polifenóis dificulta o desenvolvimento de uma metodologia padrão para identificação e quantificação destes compostos (Silva et al., 2022). Durante a preparação da amostra, é necessário eliminar ou reduzir interferências de outros componentes da uva na detecção dos compostos de interesse. É essencial considerar as estruturas dos compostos fenólicos de interesse devido à variabilidade de polaridade dessas substâncias devido às diferenças no número de grupos hidroxila e à possibilidade de conjugação com açúcares, ácidos ou grupos alquil (Garcia-Salas, et al., 2010). Assim, a preparação da amostra, ou seja, o método de extração, é um fator determinante para a análise de compostos fenólicos (Ângelo; Jorge, 2007; Oliveira et al., 2016). Igualmente, é importante buscar a redução de custos, do tempo de análise e do uso de solventes orgânicos para a preparação de amostras para análise de polifenóis (Pinto et al., 2002). Aspectos relacionados à segurança, à insalubridade e aos danos ambientais potenciais dos solventes de extração também devem ser considerados (Tzia; Liadakis, 2003).

A primeira etapa do preparo consiste na desidratação da amostra, para a reduzir o alto teor de umidade, frequentemente encontrado em vegetais e que pode interferir na quantificação de compostos polifenólicos. Esse procedimento pode empregar diversos métodos, como uso de forno micro-ondas, secador de esteira, liofilização e outros (Canepelle et al., 2020). Em seguida, o material seco é pulverizado para aumentar a superfície de contato, facilitando a absorção e ação do solvente e, consequentemente, a extração. A última etapa da preparação é a extração, que é crítica para a determinação de compostos fenólicos, pois é responsável pela determinação da representatividade e rendimento dos compostos de interesse (Ângelo; Jorge, 2007). Portanto, o objetivo deste estudo foi desenvolver um processo de extração de compostos fenólicos

funcionais de uvas frescas para cultivares desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento Genético Uvas do Brasil.

Material e métodos

Material biológico

A cultivar BRS Vitória, que produz uvas apirênicas com película violeta escuro (*noir*) e sem coloração na polpa, desenvolvida pelo Programa de Melhoramento Genético Uvas do Brasil, foi selecionada. A cultivar foi escolhida como modelo para o desenvolvimento do protocolo por sua coloração, ausência de cor na polpa, base genética compartilhada com outros genótipos de interesse, existência de perfis químicos para comparação, e importância econômica. As uvas foram produzidas na área experimental da Embrapa Uva e Vinho, em Bento Gonçalves, RS, em fevereiro de 2021. Imediatamente após a colheita, foram enviadas para Campinas, SP, por via aérea, onde foram congeladas e mantidas na temperatura de -15°C até o preparo das amostras.

Preparo das amostras

As películas e a polpa das bagas das uvas foram separadas com auxílio de pinça e bisturi. Nesta etapa, as uvas foram mantidas congeladas e ao abrigo da luz, a fim de minimizar a degradação dos compostos bioativos. A seguir, as películas frescas foram armazenadas em frascos de vidro e congeladas a -15 °C. A etapa de secagem foi realizada por liofilização por período de 156 horas e temperatura de -45 °C. As películas secas foram trituradas em almofariz com nitrogênio líquido, armazenadas em frascos com tampa envoltos em papel alumínio e mantidas em freezer -80 °C.

Otimização do processo de extração

Para o desenvolvimento do protocolo de extração dos compostos fenólicos das películas de uva foram selecionados dois parâmetros: a massa das amostras e o solvente de extração. A eficiência de extração foi determinada a partir da avaliação da concentração de fenóis totais, antocianinas totais expressas em mg 100 g⁻¹ de películas, e compostos fenólicos detectados por área total dos picos obtida na análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Massa de amostra e solvente de extração

Foram testadas duas quantidades de amostra, em massa, 30 e 60 mg de película seca, e com base na literatura (Jeong et al.; 2015; Tarone et al. 2021;

Živković et al. 2021) foram selecionados três solventes para extração:

- Etanol 50% + 1% de ácido fórmico.
- Etanol 80% + 1% de ácido fórmico.
- Metanol 50% + 1% de ácido fórmico.

Processo de extração

As amostras foram colocadas em microtubo tipo *Eppendorf* com capacidade para 2 mL, com adição de 1 mL do solvente de extração e, a seguir, transferidas para banho ultrassônico a 30 °C por 30 minutos, à frequência de 42 kHz. Após a extração, as amostras foram centrifugadas em centrífuga a 11.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O resíduo foi reextraído mais duas vezes com 1 mL do solvente para cada ciclo de extração, totalizando três alíquotas por amostra. As extrações foram feitas em triplicata para cada tratamento.

Avaliação da concentração de fenóis totais e antocianinas totais

Determinação de fenóis totais

O conteúdo de fenóis totais foi determinado empregando-se o método Folin-Ciocalteu, descrito por Waterman e Mole (1994) e adaptado por Arnous et al. (2001). Em tubos de ensaio plástico de 4 mL, foram adicionadas alíquotas de 10, 40 e 100 µL do extrato (10 µL do sobrenadante 1; 40 µL do sobrenadante 2; 100 µL do sobrenadante 3), água destilada suficiente para levar o volume a 3.200 µL, seguida da adição de 200 µL do reagente Folin-Ciocalteu. As amostras foram homogeneizadas e deixadas em descanso por 7 min no escuro. Posteriormente, foram adicionados 600 µL de solução 20% (p/V) de Na_2CO_3 e a mistura foi homogeneizada e mantida por 50 min no escuro.

Após este período foi feita a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro a 760 nm e a concentração de fenóis totais foi estimada a partir da curva de calibração construída utilizando ácido gálico como padrão ($n = 5$; concentrações de 0,001 a 0,01 mg mL⁻¹; $R^2 = 0,9968$). Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por 100 g de amostra (mg EAG/100 g películas).

Determinação de antocianinas totais

O conteúdo de antocianinas totais foi determinado aplicando-se o método da diferença de pH (Giusti; Wroslad, 2001) usando dois sistemas tampão.

Em balão volumétrico de 5 mL, alíquotas de 250 e 500 µL do extrato (sobrenadante 1:250 µL; sobrenadante 2:500 µL; sobrenadante 3:500 µL) foram

diluídas de 10 a 20 vezes com tampão cloreto de potássio 0,025M pH 1,0 e tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5. A leitura da absorbância foi realizada a 510 nm, comprimento de onda considerado de absorbância máxima para cianidina-3-glicosídeo, e a 700 nm para descontar a turbidez da amostra.

A absorbância foi calculada a partir da seguinte equação:

$$A = (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH} = 1,0} - (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH} = 4,5}$$

em que A é a absorbância medida em nanômetros; e pH é o potencial hidrogeniônico.

O conteúdo de antocianinas foi calculado e representado em miligramas equivalentes de cianidina-3-glicosídeo por 100 g de película, de acordo com a fórmula:

$$C (\text{mg} / 100 \text{ g}) = (A \times MW \times FD \cdot 1.000) / (\epsilon \times 1)$$

em que C é a concentração de antocianinas, expressa em miligramas equivalentes de cianidina-3-glicosídeo por 100 g de película; A é a absorbância (diferença de absorbância nas duas faixas de pH); MW é o peso molecular da antocianina (449,2 mol); ϵ é a absorbância molar de cianidina-3-glicosídeo (26.900 mol L⁻¹); e FD é o fator de diluição.

As análises de fenóis totais e antocianinas foram feitas em triplicata e para a aceitabilidade dos resultados foi aplicado a equação de Horwitz (1982):

$$(CV = 2^{(1 - 0,5 \log C)})$$

em que CV é o coeficiente de variação; e $\log C$ é o logaritmo na base 10 da concentração de fenóis totais e antocianinas.

Os valores dos coeficientes de variação máximos aceitáveis entre as repetições analíticas foram iguais ou menores a 11,3 mg por 100 g de película.

Análise dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As análises foram realizadas em cromatógrafo com detector ultravioleta, coluna cromatográfica (4,6 x 100 mm, 3,5 µm).

As injeções e condições de análises foram monitoradas pelo *software*. No método cromatográfico foram usados: água ultrapura com ácido fórmico (0,1%) e metanol (grau HPLC), com vazão de 0,250 mL min⁻¹. O gradiente iniciou com 5% de metanol chegando a 100% aos 13 minutos de corrida e permanecendo em 100% até 15 min e a partir de 15,1 min retornou às condições iniciais de 5% de metanol até 18,5 minutos, para restabelecer o equilíbrio.

O volume de amostra injetado foi de 5 µL. As amostras foram injetadas em triplicata.

Análise estatística dos resultados

O estudo foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (2 x 3) com três repetições. O primeiro fator consistiu em duas massas de amostras (30 e 60 mg), e o segundo fator, em três tipos de solventes (etanol 50% + 1% de ácido fórmico; etanol 80% + 1% de ácido fórmico e metanol 50% + 1% de ácido fórmico). As variáveis analisadas foram fenóis totais, antocianinas totais e compostos fenólicos totais. Para as análises foram utilizados os dados médios das alíquotas para cada tratamento. Para verificar a normalidade e a homogeneidade da variância dos dados foram aplicados os testes de Shapiro-Wilk e de Levene (Zar, 2010). Os dados da variável “compostos fenólicos totais” foram transformados para logaritmo na base 10 ($\log_{10}$). As variáveis foram submetidas à análise de variância (Anova) e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, por meio de *software* estatístico (Zar, 2010).

Análise de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS)

A separação cromatográfica foi realizada em cromatógrafo acoplado a um espectrômetro de massa, com fonte de ionização eletrospray (ESI), usando uma coluna C18 HSS T3 (2,1 x 50,0 mm x 1,8 µm). A fase móvel foi composta por água ultrapura com ácido fórmico 1% (A) e acetonitrila 100% (B) grau HPLC. O método cromatográfico utilizado foi modo gradiente (Tabela 1) com total de 12 minutos de corrida e vazão de 0,2 mL min⁻¹. O volume da amostra injetada foi de 10 µL. O espectrômetro de massas operou em modo positivo e negativo nas seguintes condições: capilar (-) 3,00 kV, cone (-) 30 V, temperatura da fonte de 150 °C e temperatura de dessolvatação de 300 °C, em modo *full-scan* *m/z* 500–1000. Também foi realizada a fragmentação (MS/MS) dos íons de interesse com energia de colisão de 20 V.

Resultados e Discussão

Determinação do método de extração

A análise de variância indicou que as massas avaliadas e os solventes testados não apresentam interação entre si, tanto para a variável antocianinas totais quanto para a variável fenóis totais. Dessa forma, os resultados foram analisados individualmente. Não foram observadas diferenças significativas no

Tabela 1. Gradiente fase móvel da separação cromatográfica em cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS).

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	95	5
4	70	30
6	50	50
9	0	100
10	0	100
10,1	95	5
12	95	5

desempenho dos solventes testados para a extração de antocianinas totais. Os valores médios (mg) por 100 mg de películas variaram de 667,30 ± 41,89 (etanol 50% + 1% de ácido fórmico) até 734,90 ± 31,03 (metanol 50% + 1% de ácido fórmico). Ao contrário, para fenóis totais, o solvente constituído de 50% metanol + 1% ácido fórmico foi mais eficiente, gerando teor médio de 5956,21 ± 417,62 mg EAG por 100 mg de películas. O solvente menos eficiente para a extração de fenóis totais foi a mistura etanol 80% + ácido fórmico 1%, reduzindo mais de 20% a recuperação de fenóis totais das amostras de ‘BRS Vitória’ (Tabela 2).

O uso de metanol tem sido mais eficiente para a extração de compostos fenólicos de uva, folhas e galhos de videira e resíduos da indústria vitivinícola (Casazza et al., 2010; Lago-Vanzela et al., 2011; Rebello et al., 2013; Colombo et al., 2020, 2021), como observado neste trabalho. Recentemente, novos compostos atóxicos e de origem natural têm sido investigados para a extração de fenólicos de produtos naturais, incluindo de películas de uva (Bubalo et al., 2016; Ali Redha, 2021). Os solventes eutéticos profundos (do inglês, *deep eutectic solvents*) têm sido considerados alternativas viáveis para a extração de compostos fenólicos de uvas (Bubalo et al., 2016; Ali Redha, 2021).

A quantidade de amostra (massa) afetou significativamente a extração de fenóis totais e antocianinas (Tabela 3). Os valores extraídos empregando 60 mg foram superiores estatisticamente para o conteúdo de antocianinas e fenóis totais, representando um aumento de 12,72% para os fenóis totais e 7,03% para antocianinas, em mg por 100 gramas de película (Tabela 3).

Os efeitos da quantidade de amostra e da mistura de solventes na extração de compostos fenólicos

Tabela 2. Conteúdo de fenóis totais e antocianinas totais de amostras de uvas extraídas com diferentes solventes.

Solvente	Antocianina total* (mg 100 g ⁻¹ de película)	Fenol total*
Metanol 50% + 1% de ácido fórmico	734,90 ± 31,03 a	5956,21 ± 417,62 a
Etanol 50% + 1% de ácido fórmico	667,30 ± 41,89 a	5453,10 ± 428,48 b
Etanol 8% + 1% de ácido fórmico	701,72 ± 32,45 a	4676,05 ± 351,86 c
CV (%) ⁽¹⁾	6,14	4,69

⁽¹⁾ CV (%) corresponde ao coeficiente de variação dos experimentos indicando a alta reprodutibilidade dos resultados.

* Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si, de acordo com o teste Tukey a 5% de significância. Valores médios correspondem a 54 determinações analíticas.

Tabela 3. Conteúdo de fenóis totais e antocianinas totais de 'BRS Vitória' extraídos a partir de 30 e 60 mg de massa seca de películas.

Massa (mg)	Antocianina total* (mg 100 g ⁻¹ de película)	Fenol total*
30	675,73 ± 28,85 a	5730,62 ± 525,06 a
60	726,89 ± 39,53 b	4992,99 ± 469,67 b
CV (%) ⁽¹⁾	6,14	4,69

⁽¹⁾ CV (%): corresponde ao coeficiente de variação dos experimentos indicando a alta reprodutibilidade dos resultados.

* Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si, de acordo com a análise de variância e o teste Tukey a 5% de significância. Valores médios correspondem a 54 determinações analíticas.

de uvas 'BRS Vitória' também foram investigados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Figura 1). Não houve interação entre massa de amostra e tipo de solvente nos resultados da análise por HPLC, portanto, os fatores foram considerados independentes nas análises estatísticas. O uso de 60 mg de amostra promoveu um aumento de 52,42% na área do pico correspondente aos compostos fenólicos totais (Tabela 4).

O perfil químico de polifenóis de películas de uvas 'BRS' foi determinado por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência com ionização por

eletrospray e espectrometria de massas em tandem (UHPLC-ESI-MS/MS) empregando quantidades de amostra entre 2.000 e 200 mg em combinação com volumes de solvente que variaram de 50 a 20 mL (Lago-Vanzela et al., 2011; Rebello et al., 2013; Colombo et al., 2020, 2021), representando mais de 30 vezes a quantidade de amostra empregada no presente trabalho. Os relatos anteriores empregaram reextrações sucessivas por duas ou três vezes (Lago-Vanzela et al., 2011; Colombo et al., 2021), conforme realizado neste trabalho.

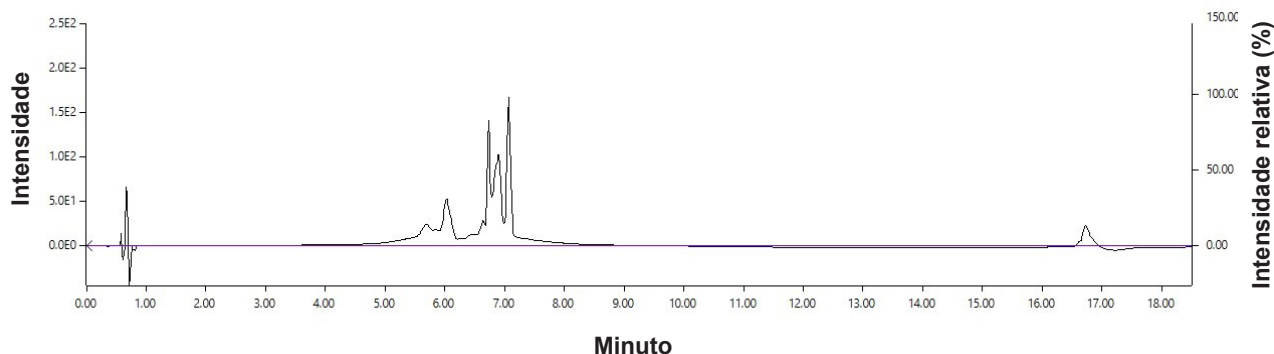
**Figura 1.** Cromatograma dos compostos fenólicos da cultivar de uva BRS Vitória. Massa de amostra, 30 mg; solvente de extração, etanol 50% + 1% de ácido fórmico.

Tabela 4. Conteúdo de fenóis totais e antocianinas totais (mg por 100 g de película) de 'BRS Vitória' extraídos a partir de 30 e 60 mg de massa seca de películas.

Massa (mg)	Composto fenólico* (Área total)
30	20,09 ± 3,23 b
60	38,32 ± 12,50 a
CV (%) ⁽¹⁾	10,8

⁽¹⁾ CV (%) corresponde ao coeficiente de variação dos experimentos indicando a alta reprodutibilidade dos resultados.

* Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si, de acordo com o teste Tukey a 5% de significância. Valores médios correspondem a 54 determinações analíticas.

Portanto, os resultados das análises espectrofotométricas e por HPLC indicam que o uso de 60 mg de amostra desidratada e da mistura metanol/ácido fórmico como solventes são eficientes para a

extração de polifenóis da película de uvas de 'BRS Vitória'. O processamento das uvas e a processo de extração e análise estão representados esquematicamente na Figura 2.

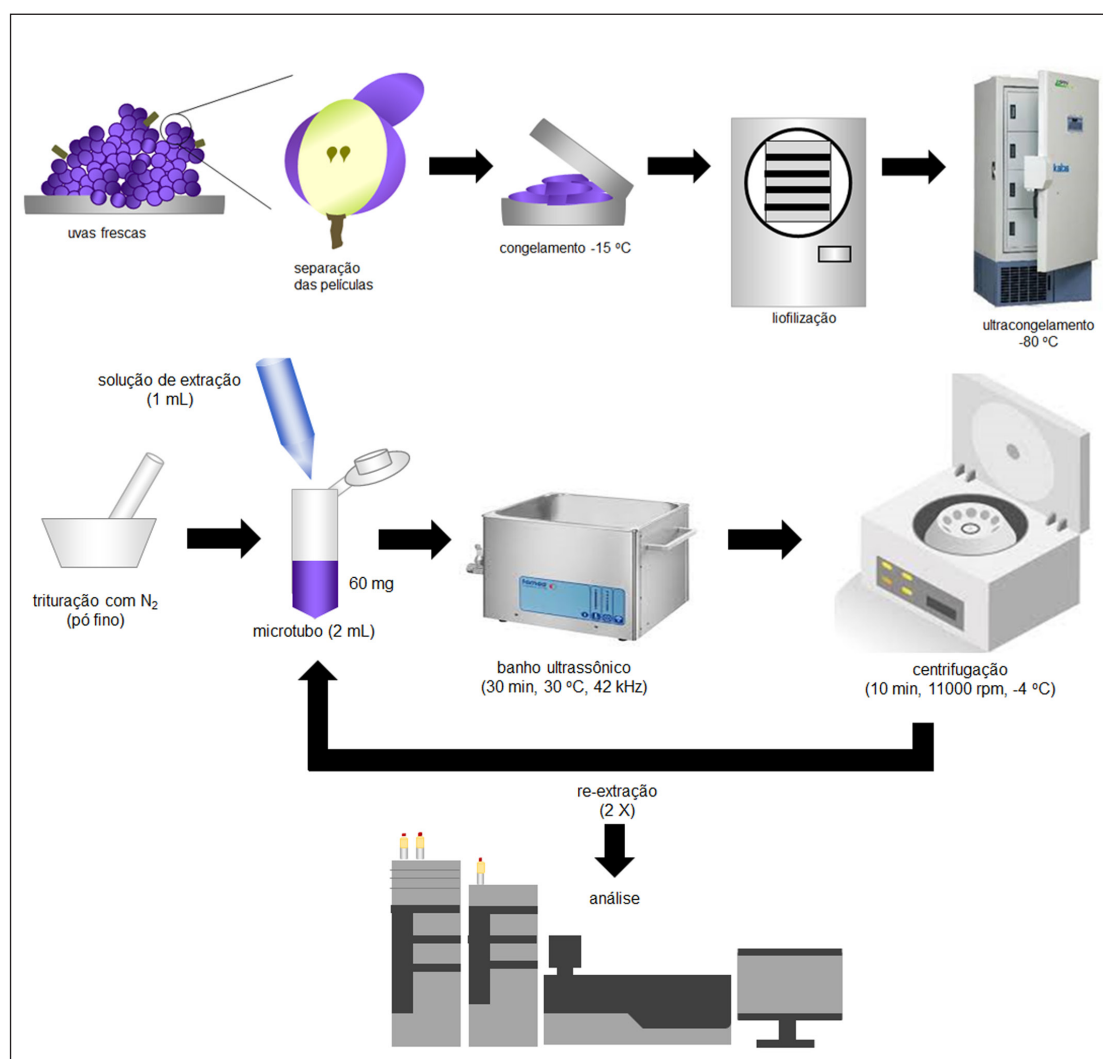


Figura 2. Fluxograma proposto para o processo otimizado de extração de antocianinas totais, fenóis totais e compostos fenólicos.

Ilustração: Vera Maria Quecini.

Validação do método de extração de fenóis totais por análise de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

O protocolo de extração desenvolvido a partir dos resultados das análises espectrofotométricas e por HPLC foi validado para a separação e detecção de compostos polifenólicos por UPLC-MS. A técnica UPLC apresenta a vantagem de aumento expressivo na eficiência de separação, mesmo com vazões elevadas da fase móvel, aumentando a eficiência e resolução da análise em menor tempo, além de promover melhor detectabilidade (Cavalcanti, 2013; Março et al., 2008; Queiroz et al., 2012). A espectrometria de massas (MS) é empregada para fornecer informação estrutural sobre os compostos, sendo frequentemente utilizada como um detector massa-específico com aplicações qualitativas e quantitativas em cromatografia de alta resolução (Ryan et al., 1999). A vantagem da MS está na capacidade de indicar a fórmula molecular exata da substância sem a necessidade de grandes quantidades de amostra, pois a técnica pode trabalhar com quantidades a nível traço (Ryan et al., 1999; Chiriac et al., 2021).

Os cromatogramas obtidos por ionização em modo negativo mostraram a presença de ácidos orgânicos, comumente encontrados em uva, como ácido tartárico (m/z 149) (Figura 3A). No cromatograma obtido com ionização em modo positivo, pode-se observar a presença de íons sugestivos de antocianinas, como m/z 493, m/z 449 e m/z 465 (Figura 3B). A análise do espectro de fragmentação permitiu confirmar a identificação de m/z 493, 449

e 465, por comparação com os padrões de antocianina, como malvidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-glicosídeo e delphinidina-3-O-glicosídeo (Figura 4). Os compostos detectados foram observados em relatos anteriores do perfil de polifenóis de 'BRS Vitória' (Colombo et al., 2020, 2021).

O protocolo de extração desenvolvido também permitiu a identificação de outros polifenóis nas películas de 'BRS Vitória', como observado nos espectros de fragmentação (Figura 5). A perda de m/z 162 no espectro de fragmentação demonstra a perda de um grupo monoglicosídeo, enquanto que a perda de m/z 308 e 204 correspondem à eliminação de um grupo cumaroil-glicosídeo e um acetil-glicosídeo, respectivamente (Willemse et al., 2013) (Figura 5).

As curvas de calibração foram empregadas para o cálculo das áreas dos picos nos cromatogramas para a quantificação das antocianinas delphinidina-3-O-glicosídeo (m/z 465), cianidina-3-O-glicosídeo (m/z 449) e malvidina-3-O-glicosídeo (m/z 493) nas amostras de película de 'BRS Vitória'. A quantificação das demais antocianinas foi realizada com base na curva de calibração de malvidina-3-O-glicosídeo (m/z 493). As curvas de calibração, regressão linear e o coeficiente de correlação (r^2) para delphinidina-3-O-glucosídeo, cianidina-3-O-glucosídeo, e malvidina-3-O-glucosídeo [(Figuras 7A, B e C), respectivamente]. A correlação entre as áreas dos picos e a massa desses compostos foi superior a 99% (Figura 6). Portanto, o protocolo de extração permitiu a separação e recuperação de compostos fenólicos de interesse de películas de 'BRS Vitória' sob uma técnica precisa e acurada.

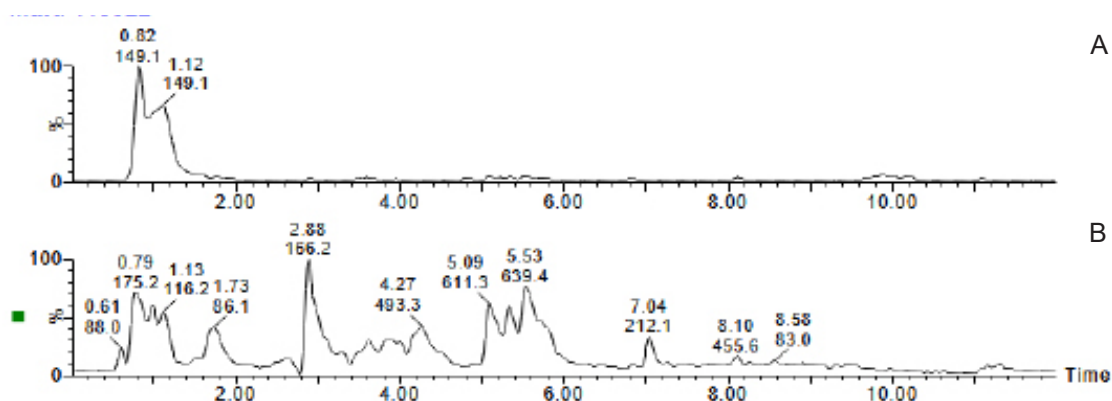


Figura 3: Exemplo de cromatograma da análise de películas de 'BRS Vitória' por análise de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS). Os modos de ionização negativo (A) e positivo (B) estão representados.

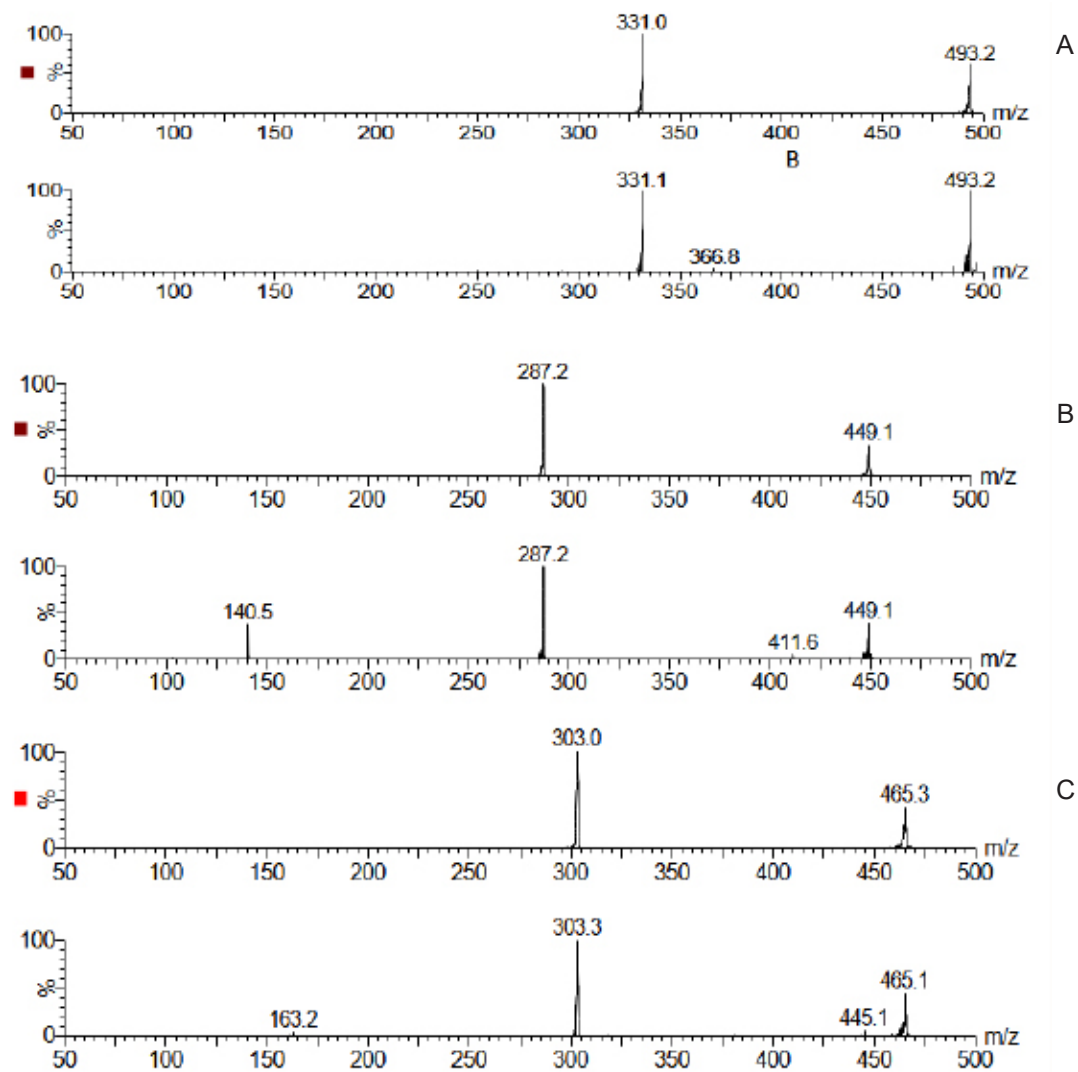
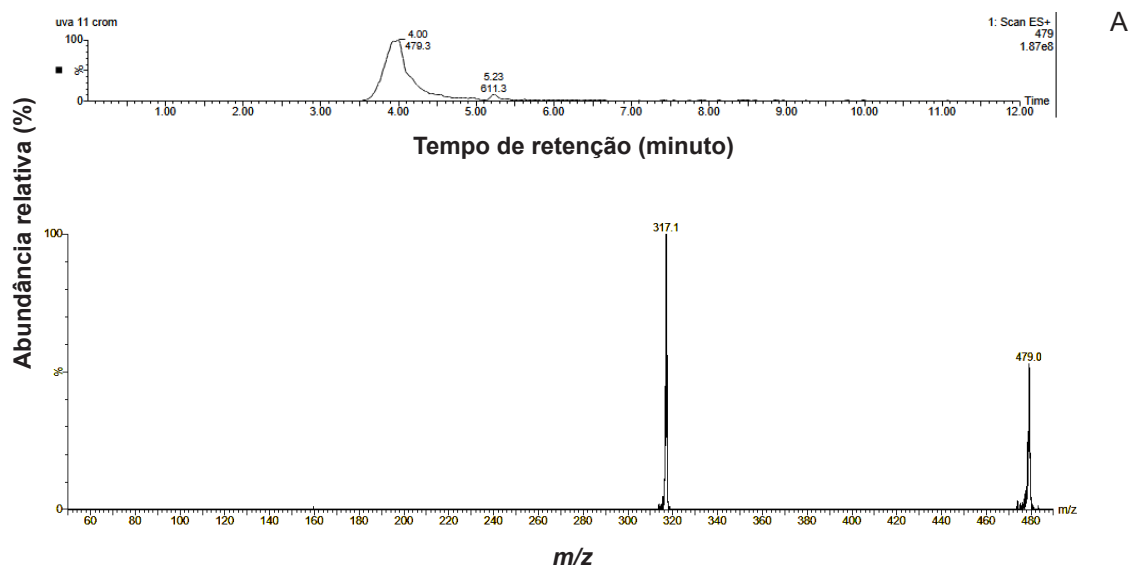


Figura 4. Espectro de fragmentação das antocianinas malvidina-3-O-glicosídeo (A), cianidina-3-O-glicosídeo (B) e delphinidina-3-O-glicosídeo (C) obtido por análise de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS) com energia de colisão de 20 V. O cromatograma superior representa o padrão e o inferior, a amostra, em cada subitem.



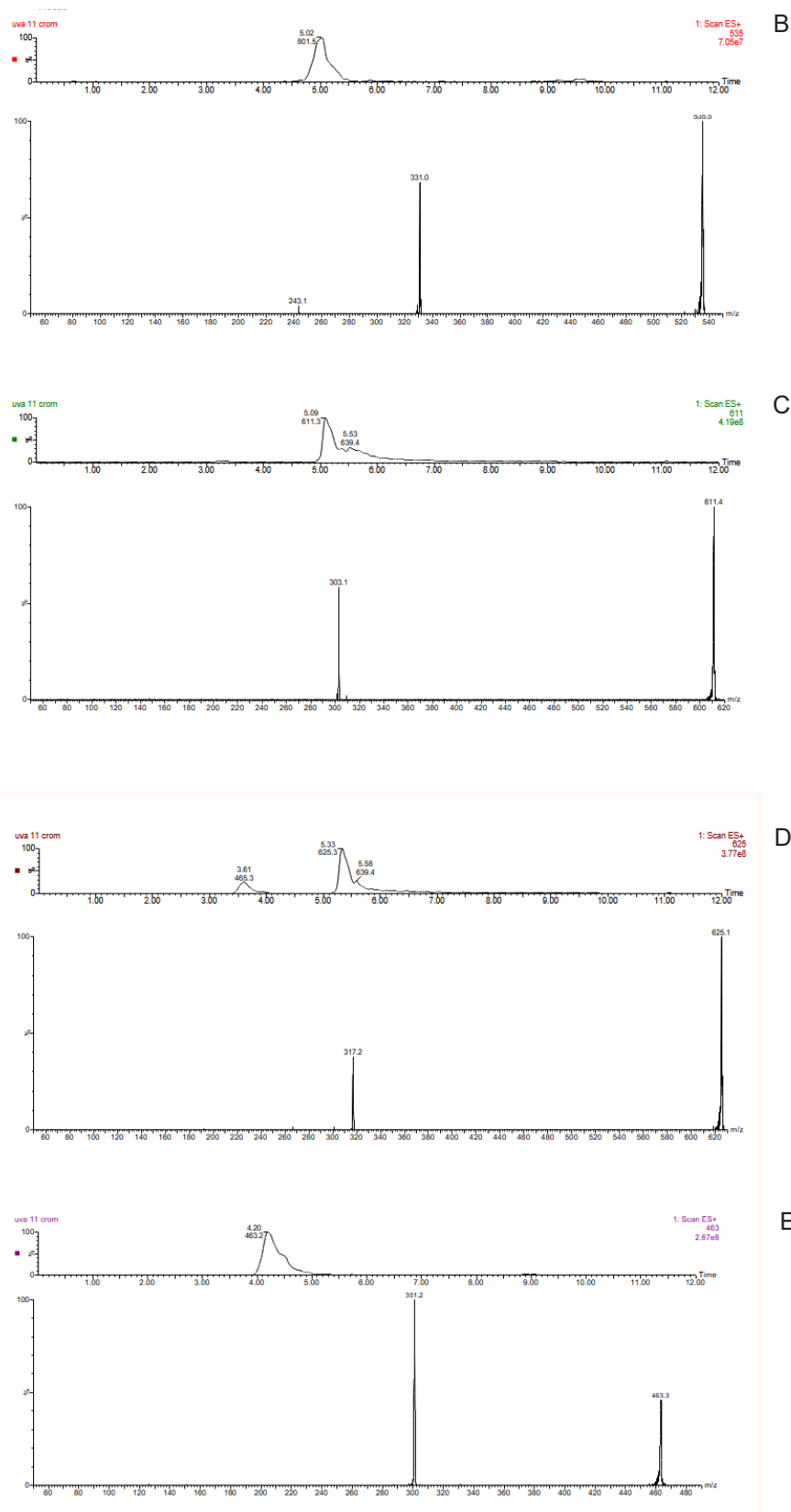


Figura 5. Espectros de fragmentação de polifenóis da película de 'BRS Vitória', obtidos por análise de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS) com energia de colisão de 20 V. (A) monoglicosídeo m/z 479 (gráficos 1 e 2); (B) acil-glucosídeo m/z 535 (204) (gráficos 3 e 4); (C) cumaril-glicosídeo m/z 611 (308) (gráficos 5 e 6); (D) m/z 625 (308) (gráficos 7 e 8); (E) m/z 463 (162) (gráficos 9 e 10).

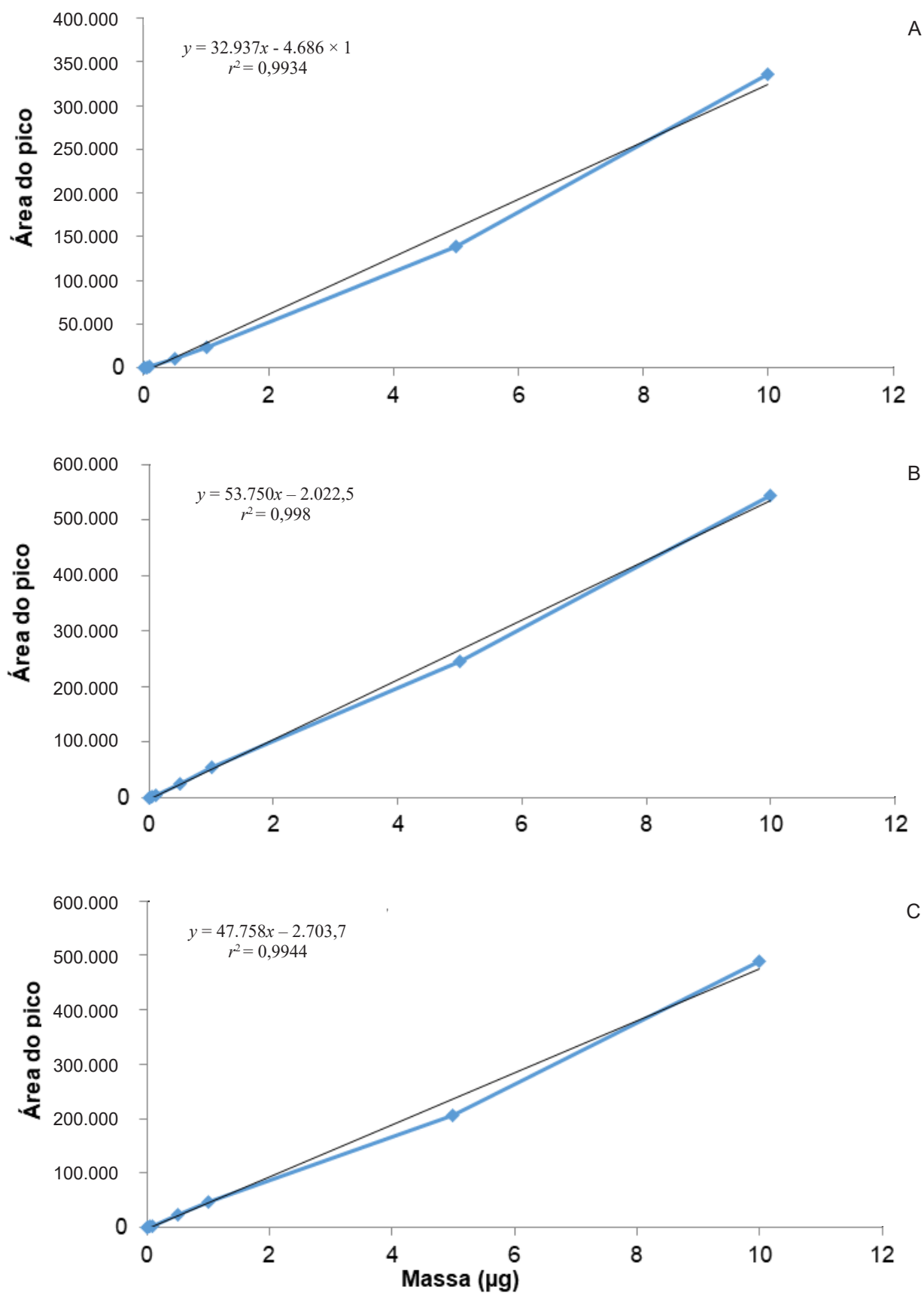


Figura 6. Curvas de calibração dos padrões de antocianinas empregadas para o cálculo das áreas dos picos para delphinidina-3-O-glicosídeo (m/z 465). (A); cianidina-3-O-glicosídeo (m/z 449) (B); malvidina-3-O-glicosídeo (m/z 493) (C) nas amostras de película de 'BRS Vitória'. As regressões lineares e seus respectivos r^2 estão representados.

Conclusões

- 1) Os fatores massa da amostra desidratada e solvente influenciaram a extração de compostos fenólicos de películas de uvas 'BRS Vitória', embora de forma independente. A massa de amostra de 60 mg e a mistura metanol 50% + 1% de ácido fórmico foram mais eficientes para a extração de compostos fenólicos das uvas. O uso da maior quantidade de amostra testada promoveu uma recuperação de fenóis e antocianinas totais superior a 12 e 7%, respectivamente, em comparação com o uso de 30 mg.
- 2) Da mesma forma, a área do pico correspondente aos compostos fenólicos na análise por HPLC foi aproximadamente 50% maior usando 60 mg de amostra. A quantidade de amostra empregada no presente protocolo é mais de 30 vezes inferior à massa usada em trabalhos de caracterização do perfil de fenólicos de uvas 'BRS' por HPLC-DAD-ESI-MS/MS.
- 3) A análise por UPLC-MS de compostos fenólicos de amostras de películas de 'BRS Vitória' extraídas pelo protocolo desenvolvido permitiu a caracterização de ácidos orgânicos e antocianinas na ionização em modo negativo e positivo, respectivamente. Também foi possível identificar alterações nas relações massa/carga (m/z) de compostos de interesse, confirmando a qualidade do protocolo de extração na fragmentação de compostos. A sensibilidade e precisão das análises por UPLC-MS foram confirmadas por curvas de calibração para três antocianinas de interesse para 'BRS Vitória'.
- 4) O protocolo desenvolvido pode servir de base para a caracterização do perfil químico de polifenóis de outras cultivares híbridas e para o desenvolvimento de estratégias de extração empregando solventes ambientalmente mais saudáveis.

Agradecimentos

À Embrapa Meio Ambiente, onde foi realizada a liofilização das amostras. Este trabalho foi executado no âmbito do contrato de Cooperação Técnica entre o Instituto Agrônomo de Campinas e a Embrapa Uva e Vinho e custeado pelo projeto Desenvolvimento de novas cultivares para a competitividade e sustentabilidade da vitivinicultura brasileira (Embrapa/SEG 20.22.01.007.00.00 e Embrapa/CNPq 404250/2020-3).

Referências

- AHN-JARVIS, J. H.; PARIHAR, A.; DOSEFF, A. I. Dietary flavonoids for immunoregulation and cancer: Food design for targeting disease. **Antioxidants**, v. 8, n. 7, 202-232, June 2019. DOI: 10.3390/antiox8070202.
- ALI REDHA, A. Review on extraction of phenolic compounds from natural sources using green deep eutectic solvents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 3, 878-912, Jan. 2021. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c06641.
- ÂNGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007. DOI: 10.53393/rial.2007.66.32841.
- ARNOUS, A.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 12, p. 5736-5742, Dec. 2001. DOI: 10.1021/jf010827s.
- BELING, R. R. (ed.). **Anuário Brasileiro de Horti & Fruti 2022**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2022.
- BUBALO, M. C.; ĆURKO, N.; TOMAŠEVIĆ, M.; GANIĆ, K. K.; REDOVNIKOVIĆ, I. R. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. **Food Chemistry**, v. 200, p. 159-166, June 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.040>.
- CANEPELLE, E.; WRITZL, T. C.; STEFFLER, A. D.; REDIN, M.; WEBER, F. H.; SCHERER, G. C. R. da S. Influência dos métodos de secagem e preparo das amostras no processo de desidratação e reidratação do Abacaxi Pérola Ananas comosus L. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 14, n. 2, p. 3267-3283, 2020. DOI: 10.3895/rbta.v14n2.10591.
- CASAZZA, A. A.; ALIAKBARIAN, B.; MANTEGNA, S.; CRAVOTTO, G.; PEREGO, P. Extraction of phenolics from Vitis vinifera wastes using non-conventional techniques. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 50-55, 2010. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2010.03.026.
- CAVALCANTI, R. N. **Extração de antocianinas de resíduo de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) utilizando líquido pressurizado e fluido supercrítico: caracterização química, avaliação econômica e modelagem matemática**. 2013. 197 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas.
- CHIRIAC, E. R.; CHIȚESCU, C. L.; GEANĂ, E.-I.; GIRD, C. E.; SOCOTEANU, R. P.; BOSCEANU, R. Advanced analytical approaches for the analysis of polyphenols in plants matrices – A review. **Separations**, v. 8, n. 5, 65, May 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/separations8050065>.

COLOMBO, R. C.; ROBERTO, S. R.; CRUZ, M. A. da; CARVALHO, D. U. de; YAMAMOTO, L. Y.; NIXDORF, S. L.; PEREZ-NAVARRO, J.; GÓMEZ-ALONSO, S.; SHAHAB, M.; AHMED, S.; GONÇALVES, L. S. A. Characterization of the phenolic ripening development of 'BRS Vitoria' seedless table grapes using HPLC–DAD–ESI-MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 95, 103693, Jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103693>.

COLOMBO, R. C.; ROBERTO, S. R.; NIXDORF, S. L.; PÉREZ-NAVARRO, J.; GÓMEZ-ALONSO, S.; MENA-MORALES, A.; GARCÍA-ROMERO, E.; GONÇALVES, L. S. A.; CRUZ, M. A. da; CARVALHO, D. U. de; MADEIRA, T. B.; WATANABE, L. S.; SOUZA, R. T. de; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Analysis of the phenolic composition and yield of 'BRS Vitoria' seedless table grape under different bunch densities using HPLC–DAD–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 130, 108955, April 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108955>.

EMBRAPA UVA E VINHO. **Programa Uvas do Brasil**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/programa-uvas-do-brasil>. Acesso em: 30 jan. 2023.

FLUTRE, T.; LE CUNFF, L.; FODOR, A.; LAUNAY, A.; ROMIEU, C.; BERGER, G.; BERTRAND, Y.; TERRIER, N.; BECCAVIN, I.; BOUCKENOOGHE, V.; ROQUES, M.; PINASSEAU, L.; VERBAERE, A.; SOMMERER, N.; CHEYNIER, V.; BACILIERI, R.; BOURSQUOT, J. M.; LACOMBE, T.; LAUCOU, V.; THIS, P.; PÉROS, J. P.; DOLIGEZ, A. A genome-wide association and prediction study in grapevine deciphers the genetic architecture of multiple traits and identifies genes under many new QTLs. **G3 Genes|Genomes|Genetics**, v. 12, n. 7, jkac103, April 2022. DOI: [10.1093/g3journal/jkac103](https://doi.org/10.1093/g3journal/jkac103).

FONSECA, L. A. B. V. **Fruticultura Brasileira: Diversidade e sustentabilidade para alimentar o Brasil e o Mundo**. 3 maio 2022. Disponível em: <https://cnabrazil.org.br/noticias/fruticultura-brasileira-diversidade-e-sustentabilidade-para-alimentar-o-brasil-e-o-mundo>. Acesso em: 21 jun. 2022.

GARCIA-SALAS, P.; MORALES-SOTO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8813-8826, Dec. 2010. DOI: [10.3390/molecules15128813](https://doi.org/10.3390/molecules15128813).

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 1, Special Issue, Aug. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>.

HORWITZ, W. Evaluation on analytical methods used for regulation of foods and drugs. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 67A-76A, Jan. 1982. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac00238a765>.

JEONG, K. M.; ZHAO, J.; JIN, Y.; HEO, S. R.; HAN, S. Y.; YOO, D. A. E.; LEE, J. Highly efficient extraction of anthocyanins from grape skin using deep eutectic solvents as green and tunable media. **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 38, n. 12, p. 2143-2152, Nov. 2015. DOI: [10.1007/s12272-015-0678-4](https://doi.org/10.1007/s12272-015-0678-4).

KOBAYASHI, S.; GOTO-YAMAMOTO, N.; HIROCHIKA, H. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. **Science**, v. 304, p. 982, 2004.

LAGO-VANZELA, E. S.; Da-SILVA, R.; GOMES, E.; GARCÍA-ROMERO, E.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Phenolic composition of the Brazilian seedless table grape varieties BRS Clara and BRS Morena. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 15, p. 8314-8323, June 2011. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf201753k>.

LUO, S.; HE, P. The inheritances of fruit skin and must colors in a series of interespecific crosses between *V. vinifera* and the wild grape species native to China. **Scientia Horticulturae**, v. 99, n. 1, p. 29-40, Jan. 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(03\)00085-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(03)00085-2).

MAIA, J. D. G.; RITSCHER, P.; LAZZAROTTO, J. J. A viticultura de mesa no Brasil. **Territoires du vin**, v. 9, Oct. 2018. Disponível em: <http://preo.u-bourgogne.fr/territoiresduvin/index.php?id=1546>. Acesso em: 1 jul. 2023.

MAIA, J. D. G.; RITSCHER, P.; CAMARGO, U. A.; SOUZA, R. T. de.; FAJARDO, T. V. M.; NAVES, R. de L.; GIRARDI, C. L. 'BRS Vitória' – a novel seedless table grape cultivar exhibiting special flavor and tolerance to downy mildew (*Plasmopara viticola*). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 204-206, Oct. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/1984-70332014v14n3a31>.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500051>.

MARTÍN, J.; NAVAS, M. J.; JIMÉNEZ-MORENO, A. M.; ASUERO, A. G. Anthocyanin pigments: importance, sample preparation and extraction. In: SOTO-HERNANDEZ, M.; PALMA-TENANGO, M.; GARCIA-MATEOS, M. del R. (ed.). **Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications**. London: IntechOpen, 2017. DOI: [10.5772/66892](https://doi.org/10.5772/66892).

OLIVEIRA, V. B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C. F.; PAULA, C. S.; DUARTE, A. F. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por CLAE-DAD de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 1suppl, p. 230-239, 2016. DOI: https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_106.

PINTO, Â. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. da S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. de A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n.1suppl, p. 45-61, maio 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000800009>.

QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. L.; ROSA, M. A. Validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando QuEChERS E UPLC-MS/MS. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 185-192, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000100032>.

RANA, A.; SAMTIYA, M.; DHEWA, T.; MISHRA, V.; ALUKO, R. E. Health benefits of polyphenols: a concise review. **Journal of Food Biochemistry**, n. 46, n.10, e14264, 2022. DOI: [10.1111/jfbc.14264](https://doi.org/10.1111/jfbc.14264).

REBELLO, L. P. G.; LAGO-VANZELA, E. S.; BARCIA, M. T.; RAMOS, A. M.; STRINGHETA, P. C.; DA-SILVA, R.; CASTILLO-MUÑOZ, N.; GÓMEZ-ALONSO, S.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Phenolic composition of the berry parts of hybrid grape cultivar BRS Violeta (BRS Rubea× IAC 1398-21) using HPLC–DAD–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 354-366, Nov. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.024>.

ROGOVSKI-CZAJA, E. A.; MOREIRA, R. R.; NESI, C. N.; DUARTE, H. da S. S.; MAY DE MIO, L. L. Understanding components of the grapevine leaf spot monocycle and comparing resistance of *Vitis labrusca* cultivars. **Journal of Plant Pathology**, v. 101, p. 897-906, April 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00281-y>.

ROMÁN, G. C.; JACKSON, R. E.; GADHIA, R.; ROMÁN, A. N.; REIS, J. Mediterranean diet: The role of long-chain v-3 fatty acids in fish; polyphenols in fruits, vegetables, cereals, coffee, tea, cacao and wine; probiotics and vitamins in prevention of stroke, age-related cognitive decline, and Alzheimer disease. **Review Neurologique (Paris)**, v. 175, n. 10, p. 724-741, Dec. 2019. DOI: [10.1016/j.neurol.2019.08.005](https://doi.org/10.1016/j.neurol.2019.08.005).

RYAN, D.; ROBARDS, K.; PRENZLER, P.; ANTOLOVICH, M. Applications of mass spectrometry to plant phenols. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 362-372, May 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(98\)00118-6](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(98)00118-6).

SILVA, A. S. L. da; SILVA, A. de J.; LATIF, A. L. O.; SANTOS JÚNIOR, A de F.; BENEVIDES, C. M. de J. Use of analytical methodologies for the determination

of phenolic compounds in food in Brazil: advances and weaknesses. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, e1311225193, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25193>.

STROMMER, J.; COVENTRY, J.; ALI, A.; METCALF, D.; FISCHER, H. Regulation of anthocyanin and stilbene production in *Vitis*. **Acta Horticulturae**, v. 603, n. 46, p. 361-370, 2003. DOI: [10.17660/ActaHortic.2003.603.46](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.603.46).

TARONE, A. G.; SILVA, E. K.; BARROS, H. D. de F. Q.; CAZARIN, C. B. B.; MAROSTICA JUNIOR, M. R. High-intensity ultrasound-assisted recovery of anthocyanins from jabuticaba by-products using green solvents: Effects of ultrasound intensity and solvent composition on the extraction of phenolic compounds. **Food Research International**, v. 140, 110048, Feb. 2021. DOI: [10.1016/j.foodres.2020.110048](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110048).

TEIXEIRA, A.; EIRAS-DIAS, J.; CASTELLARIN, S. D.; GERÓS, H. Berry phenolics of grapevine under challenging environments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 9, p. 18711-18739, Sept. 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms140918711>.

TZIA, C.; LIADAKIS, G. **Extraction optimization in food engineering**. New York: CRC Press, 2003.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Oxford: Blackwell Scientific, 1994.

WIJEKOON, C.; NETTICADAN, T.; SIOW, Y. L.; SABRA, A.; YU, L.; RAJ, P.; PRASHAR, S. Potential associations among bioactive molecules, antioxidant activity and resveratrol production in *Vitis vinifera* fruits of North America. **Molecules**, v. 27, n. 2, p. 336, Jan. 2022. DOI: [10.3390/molecules27020336](https://doi.org/10.3390/molecules27020336).

WILLEMSE, C. M.; STANDER M. A.; VILLIERS, A. de. Hydrophilic interaction chromatographic analysis of anthocyanins. **Journal of Chromatography A**, v. 1319, p.127-140, Dec. 2013. DOI: [10.1016/j.chroma.2013.10.045](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.045).

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 5. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2010.

ŽIVKOVIĆ, J.; JADRANIN, M.; PRŽIĆ, Z.; MARKOVIĆ, N.; SOKOLOVIĆ, D.; ŠAVIKIN, K.; MENKOVIĆ, N. Varietal differences of Prokupac, Evita and Čokot Zemun based on their anthocyanins content in grape skin extract. **Chemistry and Biodiversity**, v. 18, n. 4, e2000858, Feb. 2021. DOI: [10.1002/cbdv.202000858](https://doi.org/10.1002/cbdv.202000858).

