

Determinação de Açúcares em Mosto, Sucos de Uva e Vinho por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Clae)



ISSN 1808-9968

Dezembro, 2013

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Semiárido*

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 112

Determinação de Açúcares em Mosto, Sucos de Uva e Vinho por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Clae)

Luiz Cláudio Corrêa

Ana Cecília Poloni Rybka

Paula Tereza de Souza e Silva

Aline Camarão Telles Biasoto

Giuliano Elias Pereira

Embrapa Semiárido

Petrolina, PE

2013

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

Embrapa Semiárido

BR 428, km 152, Zona Rural

Caixa Postal 23

Fone: (87) 3866-3600

cpatsa.sac@embrapa.br

CEP 56302-970 Petrolina, PE

Fax: (87) 3866-3815

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Maria Auxiliadora Coêlho de Lima

Secretário-Executivo: Sidinei Anunciação Silva

Membros: Aline Camarão Telles Biasoto

Ana Cecília Poloni Rybka

Ana Valéria Vieira de Souza

Anderson Ramos de Oliveira

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: Aline Camarão Telles Biasoto

1ª edição (2013): 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

Determinação de açúcares em mosto, sucos de uva e vinho por cromatografia líquida de alta eficiência (Clae) / Luiz Claudio Corrêa... [et al.]. – Petrolina: Embrapa Semiárido, 2013.

15 p. (Embrapa Semiárido. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 112).

1. Uva. 2. Análise química. 3. Frutose. 4. Glicose. 5. Sacarose. I. Corrêa, Luiz Claudio. II. Rybka, Ana Cecília Poloni. III. Silva, Paula Tereza de Souza e. IV. Biasoto, Aline Camarão Telles. V. Pereira, Giuliano Elias. VI. Título. VII. Série.

CDD 663.63

Sumário

Resumo	4
Abstract	5
Introdução	6
Material e Métodos	8
Resultados e Discussão	9
Conclusões	14
Referências	15

Determinação de Açúcares em Mosto, Sucos de Uva e Vinho por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Clae)

Luiz Claudio Corrêa¹

Ana Cecília Poloni Rybka²

Paula Tereza de Souza e Silva³

Aline Camarão Telles Biasoto⁴

Giuliano Elias Pereira⁵

Resumo

Um método simples e rápido foi desenvolvido e validado para quantificar glicose, frutose e sacarose em mosto de uva, suco de uva e vinho por cromatografia líquida de alta eficiência. Para a validação do método proposto, foram avaliados os parâmetros seletividade, linearidade, exatidão, repetibilidade, precisão intermediária e os limites de detecção e quantificação. O método desenvolvido mostrou-se preciso e exato para determinar glicose, sacarose e frutose em todos os produtos avaliados, podendo ser útil para diversos propósitos, tais como: monitoramento da fermentação alcoólica, detecção de fraudes, predição do grau alcoólico de vinhos, dentre outros.

Termos para indexação: Clae, glicose, sacarose, frutose, validação de método.

¹Biólogo, D.Sc. em Botânica, analista da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, claudio.correia@embrapa.br.

²Engenheira de alimentos, D.Sc. em Ciência de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, ana.rybka@embrapa.br.

³Química, D.Sc. em Química, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, paula.silva@embrapa.br.

⁴Cientista de Alimentos, D.Sc. em Alimentos e Nutrição, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, aline.biasoto@embrapa.br.

⁵Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Viticultura e Enologia, pesquisador da Embrapa Uva e Vinho, giuliano.pereira@embrapa.br.

Sugar Determination in Grape Must, Juice and Wine by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Abstract

A simple and fast method was developed and validated to quantify glucose, fructose and sucrose in grape must, grape juice and wine by high performance liquid chromatography. Selectivity, linearity, accuracy, repeatability, intermediate precision and limits of detection and quantitation were evaluated. The method created was precise and accurate to determinate glucose, fructose and sucrose in all products evaluated and may be useful to various purposes, such as monitoring of the alcoholic fermentation, fraud detections, and alcoholic degree weather of wines, among others.

Index terms: HPLC, glucose, fructose, sucrose, method validation.

Introdução

A sacarose é o principal açúcar translocado das folhas para os frutos da videira, onde ocorre sua conversão pela ação da enzima invertase em glicose e frutose, que estão presentes na uva, suco e mosto de vinho em concentrações que variam de 15% a 30% do produto em função de fatores como clima, solo, sistema de condução, manejo do dossel vegetativo, porta-enxerto, variedade e estágio de maturação no momento da colheita (RIBÉREAU-GAYON et al., 2004a; SÁNCHEZ; DOKOOZLIAN, 2005).

O vinho e o suco de uva são produtos obtidos do processamento da uva, compostos por uma gama de substâncias, dentre as quais, açúcares, álcoois, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, substâncias nitrogenadas e outras. A presença de açúcares é fundamental para a elaboração do vinho, visto que é a partir de sua conversão, durante a fermentação alcoólica pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que o álcool etílico é obtido. Os açúcares presentes em maior concentração nas uvas (mosto), suco de uva e vinho, são a glicose e a frutose, enquanto a sacarose, quando presente, encontra-se em baixos níveis, mas podem aumentar em decorrência do uso de uvas com maior teor de sólidos solúveis. Em vinhos, maiores teores de sacarose também podem surgir por causa da realização da chaptalização, que consiste na adição de sacarose anteriormente à fermentação alcoólica para a elevação do teor alcoólico da bebida (RIBÉREAU-GAYON et al., 2004b).

Como em outras bebidas, no vinho e no suco de uva, os açúcares, além de conferirem gosto doce, intensificam a sensação de corpo da bebida e produzem efeito supressor sobre o gosto ácido. A quantificação dos açúcares na uva e no mosto de vinho é necessária para o acompanhamento da fermentação alcoólica, objetivando-se a obtenção da bebida com o teor alcoólico desejado, enquanto a determinação de açúcares no suco de uva e no vinho é útil para predizer características sensoriais e aceitação do produto, bem como para verificar se a bebida está de acordo com o limite estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2004, 2010).

O método oficial para a determinação dos açúcares na uva, mosto, suco e vinho é o método volumétrico de Lane-Eynon (BRASIL, 2005), que se baseia na redução completa de um volume conhecido do reagente de cobre alcalino (solução de *Fehling*) a óxido cuproso pelos açúcares redutores. Apesar de muito utilizado, o método pode apresentar alguns erros decorrentes de fatores como preparação antecipada da mistura dos reagentes *Fehling* A e B, tempo de ebulição incorreto e erro no momento da adição dos reagentes (RANKINE, 1989). Além disso, a preparação da amostra é complexa e a análise é realizada em diferentes etapas, aumentando o tempo de avaliação e os riscos de propagação de erros (CESCA, 2009). A adição da sacarose na chaptalização também pode gerar problemas analíticos, pois se trata de um açúcar não redutor, necessitando-se de pré-tratamento da amostra com hidrólise ácida (ZOECKLEIN et al., 2001).

Cesca (2009) realizou pesquisa comparativa entre laboratórios que utilizavam métodos titulométricos para avaliação de açúcares em vinhos e encontrou teor de açúcares totais variando entre os laboratórios de $1,65 \text{ g.L}^{-1}$ a $4,49 \text{ g.L}^{-1}$ para a mesma amostra, avaliada por licor de *Fehling*, evidenciando a inexatidão do método titulométrico.

Com o objetivo de verificar o teor de açúcares em alimentos e bebidas, também vem sendo utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (Clae), que além de apresentar maior sensibilidade e confiabilidade, reduz o tempo de análise em relação ao método tradicional e permite identificar os açúcares, redutores e não redutores, individualmente nas amostras em uma única análise. Embora métodos tenham sido descritos para análise de açúcares em uvas (MUÑOZ-ROBREDO et al., 2011; VARANDAS et al., 2004) e em vinhos (GUYON et al., 2011; SABIR et al., 2010) por Clae, a validação de um método rápido para análise desses compostos em vinhos, sucos e mosto pode agilizar e reduzir os custos das análises.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método para a quantificação de frutose, glicose e sacarose em mosto, suco de uva e vinho por Clae, utilizando-se detector por índice de refração.

Material e Métodos

Para o desenvolvimento do método, foram utilizados padrões de frutose, glicose e sacarose, com pureza superior a 99%. Para cada padrão, foi preparada uma solução estoque a 4.800 mg.L^{-1} em água ultrapura. Posteriormente, procedeu-se o preparo de soluções diluídas contendo os três padrões em sete níveis de concentração (25 mg.L^{-1} , 50 mg.L^{-1} , 100 mg.L^{-1} , 200 mg.L^{-1} , 400 mg.L^{-1} , 800 mg.L^{-1} e 1.600 mg.L^{-1}) em água ultrapura.

Foram avaliadas dez amostras, entre vinhos, sucos de uva e mosto, provenientes da região do Submédio do Vale do São Francisco.

Com a finalidade de se reduzir interferentes, alíquotas de 2 mL das amostras foram evaporadas utilizando-se um concentrador e, posteriormente, ressuspendidas em 10 mL com água ultrapura no caso dos vinhos secos e 40 mL nas demais amostras. Após a filtração em membrana de $0,45 \mu\text{m}$, procedeu-se a injeção em cromatógrafo líquido de alta eficiência, acoplado a um detector de índice de refração. Para a separação, foi empregada uma coluna Rezex RHM-monosaccharide H⁺ 300 x 7,8 mm e uma pré-coluna Carbo H, 4,0 x 3,0 mm. Como fase móvel, foi utilizada água ultrapura, com fluxo isocrático de $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$ e temperatura do forno de $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Foram injetados $10 \mu\text{L}$ de solução dos padrões e amostras.

Para a validação do método, foram avaliados os seguintes parâmetros:

- 1) Seletividade – Foi avaliada por meio dos tempos de retenção dos padrões, sendo confirmadas por comparação com amostras dos vinhos branco e tinto, do suco e do mosto, fortificadas com o padrão na concentração de 200 mg.L^{-1} .
- 2) Linearidade – Foi avaliada pela capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de uma faixa de aplicação. A linearidade foi verificada pelo coeficiente de determinação (R^2) das curvas de calibração com sete pontos, construídas de acordo com as concentrações esperadas dos açúcares nas amostras. Os resultados obtidos foram tratados

estatisticamente por meio de análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação foi de 0,999.

3) Limites de detecção e quantificação – Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados pelas equações $LD = 3s/m$ e $LQ = 10s/m$, respectivamente, onde s é o desvio padrão das áreas do padrão de concentração 25 mg.L^{-1} injetado sete vezes e o m é o coeficiente angular da curva de calibração (HARRIS, 2008).

4) Exatidão – A exatidão foi determinada com os valores obtidos no teste de adição do analito, realizado em triplicata para as amostras de suco, vinho e mosto, com os padrões nas concentrações 50 mg.L^{-1} , 200 mg.L^{-1} e 800 mg.L^{-1} .

5) Precisão – Para a determinação da precisão, foram realizados ensaios de repetibilidade e precisão intermediária.

6) Repetibilidade – A repetibilidade foi avaliada por meio da injeção de amostras de vinho tinto e branco, suco de uva e mosto, puras e fortificadas com os padrões nas concentrações 50 mg.L^{-1} , 200 mg.L^{-1} e 800 mg.L^{-1} em triplicata e expressa como coeficiente de variação (%).

7) Precisão intermediária – Para a verificação deste parâmetro, foram utilizadas as mesmas amostras já citadas na avaliação da repetibilidade, as quais foram injetadas em triplicata a cada 2 dias, perfazendo um total de nove injeções para cada amostra. A precisão intermediária foi expressa como coeficiente de variação (%).

Resultados e Discussão

O método foi capaz de separar os três compostos na mistura das soluções padrão e nas amostras analisadas (Figura 1). A injeção de amostras fortificadas confirmou a seletividade para os três compostos nas matrizes analisadas. Os limites de detecção ficaram entre $3,21 \text{ mg.L}^{-1}$ e $4,77 \text{ mg.L}^{-1}$ e os de quantificação entre $10,69 \text{ mg.L}^{-1}$ e $15,89 \text{ mg.L}^{-1}$. Os coeficientes de correlação (R^2) acima de 0,999 confirmaram a linearidade do método para os três compostos na faixa estudada (25 mg.L^{-1} a 1.600 mg.L^{-1}) (Tabela 1).

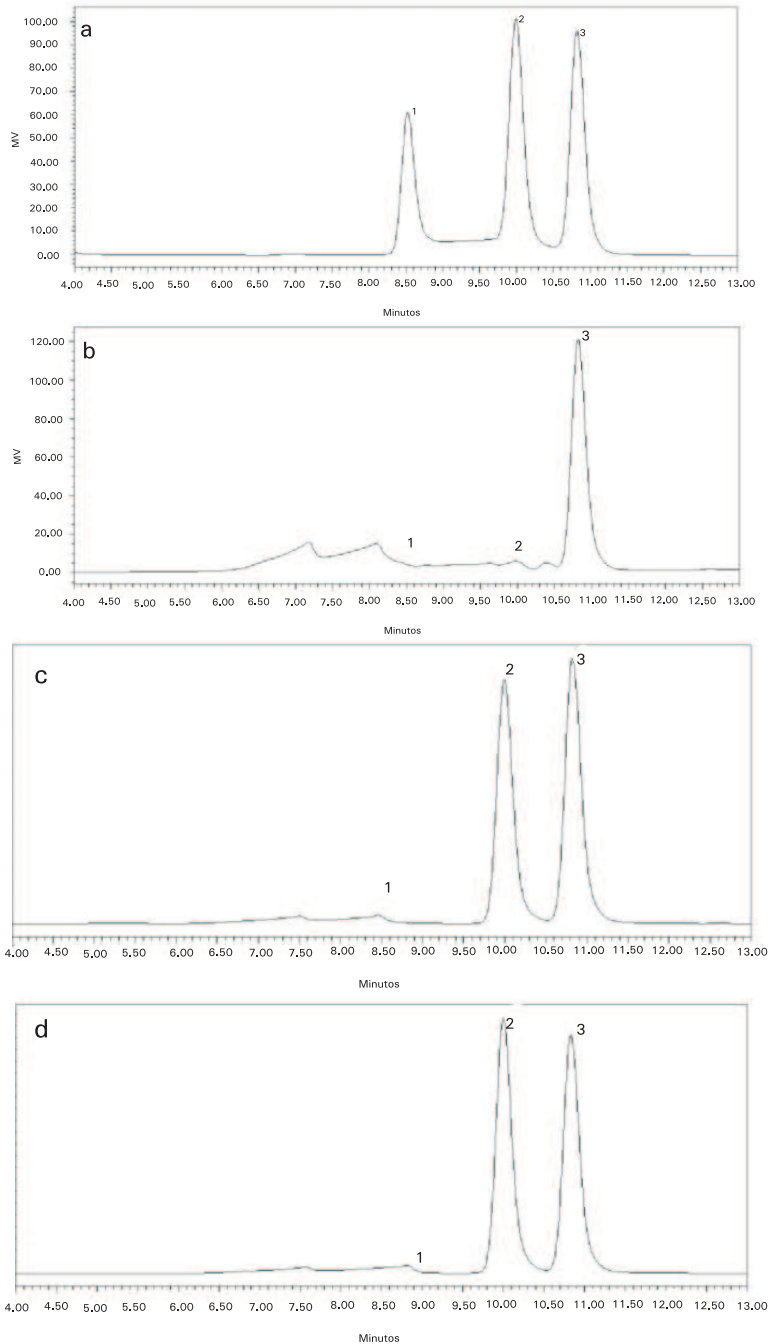


Figura 1. Cromatogramas obtidos a partir dos padrões de sacarose (1), glicose (2) e frutose (3) e para amostras de mosto, suco de uva e vinho. Onde: (a) Solução padrão a 1600 mg.L⁻¹; (b) vinho; (c) suco de uva e (d) mosto.

Tabela 1. Faixa linear, coeficiente de correlação e limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para o método.

Padrão	Concentração (mg.L ⁻¹)	R ²	LD (mg.L ⁻¹)	LQ (mg.L ⁻¹)
Frutose	25-1.600	0,9999	3,63	12,09
Glicose	25-1.600	0,9997	3,21	10,69
Sacarose	25-1.600	0,9997	4,77	15,89

A exatidão foi verificada por meio dos percentuais de recuperação das soluções dos padrões nas matrizes estudadas, que variou de 80% a 110% (Tabela 2). Esses valores estão de acordo com os observados na literatura, entre 80-120% (RIBANI et al., 2004).

Tabela 2. Exatidão do método de quantificação de frutose, glicose e sacarose em vinhos, sucos de uva e mosto por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Clae).

Compostos	Recuperação			
	Vinho tinto	Vinho branco	Suco de uva	Mosto
Frutose	90,87	95,53	102,51	98,76
Glicose	93,13	80,44	100,64	108,22
Sacarose	84,06	86,58	89,66	97,16

Os coeficientes de variação para os dados de precisão encontram-se na Tabela 3. A repetibilidade foi maior para a sacarose, com coeficiente de variação entre de 0,44% e 1,13% em todas as amostras.

Observou-se que para frutose e glicose, os valores foram semelhantes, variando entre 2,36% e 3,67%. A precisão intermediária apresentou coeficientes de variação entre 0,86-3,31%. Esses resultados mostram que o método foi preciso para a quantificação dos três compostos em todas as matrizes analisadas.

Tabela 3. Precisão do método para análise de açúcares em vinhos, sucos de uva e mosto por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Clae).

Composto	Re. 1	Re. 2	Re. 3	R2. 4	P.I. 1	P.I. 2	P.I. 3	P.I. 4
Frutose	3,67	3,56	3,36	2,84	2,67	2,33	1,96	1,18
Glicose	3,08	2,98	3,30	2,36	1,84	1,69	1,28	0,86
Sacarose	1,13	0,60	0,55	0,44	3,31	2,88	1,78	1,61

Re = repetibilidade (CV%); P.I. = precisão intermediária (CV%); 1. Vinho tinto; 2. Vinho branco; 3. Suco de uva; 4. Mosto.

Com relação às amostras analisadas (Tabela 4), verificou-se que a uva 'Cabernet Sauvignon' apresentou os maiores teores de frutose (86,27 g.L⁻¹) e glicose (92,46 g.L⁻¹); com destaque para o segundo. Esses dois açúcares representaram 96,6% do teor de sólidos solúveis dessa uva, que foi determinado em 18,5 °Brix. O teor de sacarose da uva 'Cabernet Sauvignon', bem como dos sucos de uva, não puderam ser quantificados por estarem abaixo do limite de quantificação do método, que é de 15,89 mg.L⁻¹ (Tabela 1). Os sucos de uva também apresentaram elevados teores de frutose (72,23 g.L⁻¹ e 72,52 g.L⁻¹) e glicose (65,76 g.L⁻¹ e 65,52 g.L⁻¹). Nota-se que as quantidades de glicose e frutose de ambos os sucos foram bem parecidas, mesmo tendo sido elaborados com variedades de uvas distintas, Isabel (gênero *Vitis labrusca*) e BRS Cora (híbrida).

Tabela 4. Resultados obtidos para o teor dos açúcares nas amostras avaliadas.

Amostras avaliadas	Frutose (g.L ⁻¹)	Glicose (g.L ⁻¹)	Sacarose (g.L ⁻¹)
Mosto de uva 'Cabernet Sauvignon' (18,5 °Brix)	86,27	92,46	<LD
Suco de uva integral experimental (cv. Isabel)	72,23	65,76	<LD
Suco de uva integral experimental (cv. BRS Cora)	72,52	65,52	<LD
Vinho branco licoroso de colheita tardia comercial (sem adição de açúcar)	33,94	29,38	0,26
Vinho tinto de mesa suave comercial (adição de 90 g/L de açúcar)	0,48	1,44	93,01
Vinho tinto de mesa seco experimental chaptalizado (adição de 54 g/L de açúcar)	1,45	<LD	0,12
Vinho tinto de mesa seco experimental (cv. Syrah safra março / 2010)	0,21	0,24	0,15
Vinho tinto de mesa seco experimental (cv. Syrah safra junho / 2010)	0,06	0,19	0,17
Vinho branco de mesa seco experimental (cv. Chenin Blanc safra março / 2010)	13,53	0,47	0,06
Vinho branco de mesa seco experimental (cv. Chenin Blanc safra junho / 2010)	10,13	0,29	0,16

LD: Limite de detecção.

Entre os vinhos, os menores teores de frutose e glicose foram observados nos tintos, na sua maioria, notadamente nos vinhos experimentais 'Syrah', elaborados sem a adição de açúcar, destacando aquele obtido a partir das uvas colhidas no mês de junho. Os vinhos brancos apresentaram teores significativamente maiores de frutose, principalmente o vinho licoroso (33,9 g.L⁻¹). Nos demais vinhos brancos, ambos elaborados experimentalmente a partir da variedade Chenin Blanc, foram observados teores entre 10,1 g.L⁻¹ e 13,5 g.L⁻¹, valores acima do limite máximo de açúcares permitido pela legislação brasileira para vinhos secos de mesa, que é de 5,0 g.L⁻¹, sendo, portanto, caracterizados como vinhos meio doces (BRASIL, 2004). No vinho chaptalizado, a despeito da adição de sacarose durante sua elaboração, os teores de açúcares encontram-se, também, no limite permitido pela legislação brasileira para vinhos secos.

Dentre os vinhos artificialmente adoçados, o produto comercial com a adição de 90 g.L^{-1} de açúcar apresentou teor de sacarose próximo ao descrito no rótulo do produto (93 g.L^{-1}). No vinho experimental, chaptalizado com 54 g.L^{-1} de açúcar para a obtenção de maior graduação alcoólica, foi observada baixa concentração de sacarose ($0,12 \text{ g.L}^{-1}$), constatando-se que a fermentação alcoólica ocorreu de modo eficiente. Neste caso, praticamente toda a sacarose adicionada foi metabolizada pelas leveduras, assim como a glicose e a frutose, visto que a concentração da glicose neste vinho mostrou-se abaixo do limite de quantificação do método, que é de $10,7 \text{ mg.L}^{-1}$ (Tabela 1).

No vinho licoroso, a sacarose também foi detectada em baixa concentração ($0,26 \text{ g.L}^{-1}$); no entanto, a mesma foi superior à dos demais vinhos elaborados sem a adição de açúcar, uma vez que este vinho foi elaborado com uvas colhidas em estágio de sobrematuração e, conseqüentemente, com maior teor de sólidos solúveis. Desta forma, os teores de frutose e glicose detectados nesta bebida também foram mais elevados.

Conclusões

O método de cromatografia líquida de alta eficiência apresentou boa separação dos compostos, com alta resolução.

Os parâmetros de validação avaliados demonstraram boa recuperação e coeficientes de variação, evidenciando que o método é preciso e exato, e as curvas de calibração obtidas apresentaram coeficiente de correlação indicando excelente ajuste dos dados para a curva analítica. Além disso, os limites de quantificação dos açúcares encontrados foram bastante baixos.

O método desenvolvido mostrou-se eficiente para a determinação de frutose, glicose e sacarose em mosto, suco de uva e vinho; podendo também ser utilizado para prever grau alcoólico do vinho, avaliar a conformidade de sucos e vinhos com a legislação vigente, detectar fraudes, como chaptalização excessiva de vinhos, e acompanhar a eficiência da etapa de fermentação alcoólica.

Referências

BRASIL. Lei nº 10.970, de 12 de novembro de 2004. Estabelece normas referentes à complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho e dos derivados da uva e do vinho. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 nov. 2004. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Instrução Normativa nº 24, de 8 de setembro de 2005. Aprova o Manual operacional de bebidas e vinagres. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 set. 2005. Seção 1, p. 11.

CESCA, M. **Comparação interlaboratorial de análises físico-químicas do vinho**. 2009. 38 p. Monografia (Tecnólogo em Viticultura e Enologia) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves.

GUYON, F.; GAILLARD, L.; SALAGOITY, M. H.; MÉDINA, B. Intrinsic ratios of glucose, fructose, glycerol and ethanol $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio determined by HPLC-*co*-IRMS: toward determining constants for wine authentication. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 401, p. 1.551-1.558, 2011.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

MUÑOZ-ROBREDO, P.; ROBLEDO, P.; MANRÍQUEZ, D.; MOLINA, R.; DEFILIPPI, B. G. Characterization of sugars and organic acids In commercial varieties of table grapes. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, v. 71, p. 452, 458, 2011.

RANKINE, B. **Manual pratico de Enologia**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1989.

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

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. **Traité d'Oenologie**: microbiologie du vin et vinifications. 5. éd. Paris: Dunod, 2004a. Tomme 1.

RIBÉREAU-GAYON, P.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU. **Traité d'oenologie**: chimie du vin, stabilization et traitements. 5. éd. Paris: Dunod, 2004b. Tomme 2.

SABIR, A.; KAFKAS, E.; TANGOLAR, S. Distribution of major sugars, acids and total phenols in juice of five grapevine (*Vitis* spp.) cultivars at different stages of berry development. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 8, p. 425-433, 2010.

SÁNCHEZ, L.; DOKOOZLIAN, N. Bud microclimate and fruitfulness in *Vitis vinifera*. **Latin American Journal of Enology and Viticulture**, v. 56, p. 319-329, 2005.

VARANDAS, S.; TEIXEIRA, M. J.; MARQUES, J. C.; AGUIAR, A.; ALVES, A.; BASTOS, M. M. S. M. Glucose and fructose levels on grape skin: interference in *Lobesia botrana* behaviour. **Analytica Chimica Acta**, [Kidlington], v. 513, p. 351-355, 2004.

ZOECKLEIN, B. W.; FULSEGANG, K. C.; GUMP, B. H. E.; NURY, F. S. **Análisis y producción de vino**. Zaragoza: Editorial Acribia, 2001.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



CGPE 11173