UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA



Caracterização Química e Funcional de Vinhos Moscatel Portugueses

Maria Nubélia Silvestre Bravo

DOUTORAMENTO EM FARMÁCIA
Bromatologia

2008

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA



Caracterização Química e Funcional de Vinhos Moscatel Portugueses

Maria Nubélia Silvestre Bravo

DOUTORAMENTO EM FARMÁCIA
Bromatologia

DISSERTAÇÃO ORIENTADA POR:

Professora Doutora Maria do Rosário Bronze

Professor Doutor Luís Filipe Vilas Boas

RESUMO

Neste trabalho, foram estudadas amostras de vinho Moscatel de Setúbal e do Douro.

Dada a complexidade das amostras procedeu-se a um pré-tratamento por extracção líquido-líquido ou por extracção em fase sólida obtendo-se extractos de características mais adequadas para as análises a efectuar. Os vinhos de ensaios de vinificação e vinhos comerciais de diferentes produtores bem como extractos de vinho e de peles de uvas foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (LC) com detectores de díodos (DAD), de fluorescência (FD), electroquímico (ED) e espectrómetro de massa (MS) para identificar e quantificar os compostos. Relativamente à espectrometria de massa utilizaram-se fontes de "electrospray" e de ionização química à pressão atmosférica e procedeu-se à optimização das condições de análise. Os resultados obtidos por LC-MS foram complementados com os obtidos por LC-DAD-FD-ED. Os resultados de espectrometria de massa permitiram ainda apresentar estruturas possíveis para alguns compostos não identificados.

As áreas dos picos detectados a 280 nm foram utilizadas para comparar as amostras comerciais no sentido de tentar determinar se era possível agrupá-las e quais as variáveis responsáveis pela formação desses grupos.

No estudo da actividade biológica das amostras foram efectuados ensaios para avaliação da capacidade antioxidante (FRAP, ORAC, DPPH e EPR), oxidação de LDL e citotoxicidade para células HT-29. Os resultados obtidos foram comparados com os teores em fenóis totais e com as áreas dos picos detectados pelo modo electroquímico. Pretendia-se deste modo concluir acerca dos compostos que poderiam ser responsáveis pelas propriedades antioxidantes detectadas. Para avaliar a absorção destes compostos utilizou-se um modelo *in vitro* da linha celular Caco-2 e estudaram-se alguns extractos das amostras.

Foram ainda efectuados ensaios *in vivo* com ratos wistar, para avaliar o efeito de extractos de peles de uvas Moscatel no colesterol, triglicéridos e HDL e a acção deste extracto num processo de inflamação aguda.

Palavras-chave
Vinho Moscatel, LC-MS, actividade antioxidante, ensaios *in vitro* e *in vivo*

ABSTRACT

Muscatel wines from Setúbal and Douro regions were studied.

The chemical compositions of samples are very complex: therefore pre-treatment by liquid-liquid or solid phase extraction (SPE) methods were sometimes necessary before the chemical analysis.

The samples of wines from a large number of producers were analysed by liquid chromatography (LC) with diode array detector (DAD) coupled with other detectors: mass spectrometer (MS) or a tandem of fluorescence (FD) and electrochemical (ED) detectors in order to identify and/or quantify compounds. For MS analysis, ionization sources of "electrospray" (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) were used after optimization of the analytical conditions. The results obtained with LC-MS were complemented with the results from LC-DAD-FD-ED. Hypothetical structures were proposed for some non identified compounds using data from mass spectra.

Peak areas measured at 280 nm were used for comparison of commercial samples in order to find out if there were deviant samples or clusters of samples and which parameters could be responsible for such situations.

As part of the study of biological activities of samples, tests for evaluation of antioxidant capacity (FRAP, ORAC, DPPH and EPR), oxidation of LDL e citotoxicity for HT-29 cells were used. These results were compared with total phenolic contents and areas of peaks of chromatograms obtained with electrochemical detection in search of compounds responsible for the observed antioxidant capacities. The absorption of these compounds contained in sample extracts was studied using an *in vitro* model with Caco-2 cells.

In vivo assays were performed with wistar mice in order to evaluate the effect of Muscatel grape skin extracts on cholesterol, triglycerides and HDL, as well as the effect of one of these extracts in an acute anti-inflammatory process.

Keywords

Muscatel wine, LC-MS, antioxidant proprieties, *in vitro*, *in vivo*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus orientadores Prof.ª Doutora Maria do Rosário Bronze e ao Prof. Doutor Luís Vilas Boas, pelo apoio e orientação do trabalho desenvolvido.

Ao ITQB e IBET agradeço terem proporcionado as condições para que o trabalho apresentado fosse executado.

Às Empresa José Maria da Fonseca Succ.ˢ, Adega Cooperativa de Palmela e Horácio Simões pela oferta das amostras de Moscatel de Setúbal em fase de processamento.

À Comissão Vitivinícola Regional da Península de Setúbal (CVRPS) pela oferta de amostras de vinho comercial de vários produtores da região de Setúbal.

À Prof.ª Doutora Ana Coelho, do ITQB, pela utilização do HPLC/MS.

À Profª Doutora Ana Luísa Simplício, do IBET, pelo apoio e acompanhamento nos ensaios da actividade biológica.

À Prof.ª Doutora Catarina Duarte, do IBET, pelo apoio na realização dos ensaios da actividade antioxidante.

À Prof.ª Doutora Maria Eduardo Figueira da Faculdade de Farmácia de Lisboa pelo apoio nos ensaios *in vivo*.

Ao Dr. Hugo Serra pelo apoio, conhecimentos e amizade na realização dos ensaios da actividade biológica.

À Dr.ª Teresa Serra pelo apoio e conhecimentos na realização dos ensaios da actividade antioxidante

Ao grupo de Química Orgânica do ITQB, coordenado pelo Professor Doutor Christopher Maycock pelo apoio cientifico, disponibilidade de equipamento e amizade.

Gostaria de expressar o apreço pela amizade e apoio demonstrado pelos Eng. António Ferreira, Eng. António Pires, Dr. Mário Patrício, Drª. Sandra Silva, Dr. Rodrigo Feliciano, Drª. Rita Ventura, Dr. Antero Ramos e Drª. Claúdia Antunes.

Aos meus amigos, pelo suporte emocional nos momentos menos bons.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AAPH	Hidrocloreto de 2,2'azobis(2-metilamidinopropano)
AP-BL	Apical – basolateral
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
BL-AP	Basolateral–apical
c	cis
Caco-2	Células de carcinoma do colorectal humano
Cat	Catequina
CoA	Coenzima A
CVRPS	Comissão Vitivinícola Regional da Península de Setúbal
CZE	Electroforese capilar por zona
DAD	Detector de fotodíodos (*Diode Array Detector)*
DMPO	N-óxido de 5,5-dimetilpirrolina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Denominação de origem
DOC	Denominação de origem controlada
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazila
DS	Daughter Scan
EC	Energia de colisão
Ec	Epicatequina
ED	Detector electroquímico
EG	Epigalhocatequina
EPR	Ressonância paramagnética electrónica
ESI	Espectometria de massa com ionização por *electrospray* (*Electrospray Ionization Mass Spectrometry)*
FD	Detector de fluorescência
FRAP	Ferric Reducing/Antioxidant Power

GRP	Grape Reaction Product
GRP2	Ácido S-glutationil-2-caftárico
HDSA	N-(2-hidroxi-3sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HSC	hepatic stellate cells
HT-29	células de carcinoma do colorectal humano
i.d.	Diâmetro interno
LD	Limite de detecção
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein)*
LQ	Limite de quantificação
m/z	Relação massa/carga de um ião
MM	Massa molecular
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Espectrometria de massa (*Mass Spectrometry)*
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonatofenil)-2H-tetrazolio
NI	Não identificado
NMS	Escalonamento multidimensional não-métrico
$OH^{\cdot}$	Radical hidroxilo
ORAC	Capacidade Antioxidante do Radical Oxigénio (Oxygen Radical Absorbance Capacity)
p	para
PACs	Proanticianidinas
PAL	Fenil amónia liase
PAMPA	Parallel Artificial Membrane Permeation Assay
$\boldsymbol{P_{appab}}$	Permeabilidade aparente no sentido apical basolateral
$\boldsymbol{P_{appba}}$	Permeabilidade aparente no sentido basolateral apical
PBS	Solução tampão de fosfato

PCA	Análise multivariável dos componentes principais
PG's	Prostaglandinas
PGE1	Prostaglandina E1
PGI2	Prostaglandina I2
PMS	Metilsulfato de fenazónio
PPO	Polifenoloxidase
PtP	Pico a pico
RDA	R*etro* Diels-Alder
RMS	Root mean square
ROS	Reactive oxygen species
Rpm	Rotações por minuto
RSD	Desvio padrão relativo
S/N	Sinal/ruido
SD	Modo Daughter Scan
SGLT1	Transportador da glicose dependente do sódio
SIR	Single Ion Recording
SIR	Selected ion recording
SP	Modo Parent Scan
SPE	Extracção em fase sólida (*Solid phase extraction)*
t	trans
TAS	Actividade antioxidante total
TEER	Resistência eléctrica das células transepitelial
TIC	Cromatograma de corrente iónica total
t_r	Tempo de retenção
UV-Vis	Espectroscopia de ultravioleta-visível
VLQPRD	Vinhos licorosos de qualidade produzidos em região determinada
λ_{ex} /λ_{em}	Comprimentos de onda de excitação e emissão
λ_{max}	Comprimento de onda máximo de absorção

ÍNDICE

Resumo i

Abstract iii

Agradecimentos v

Lista de Símbolos e abreviaturas vii

Índice xi

Índice de figuras xv

Índice de tabelas xxiii

1. Introdução 1

1.1. Compostos fenólicos em uvas e vinhos 1

1.2. Os compostos fenólicos e os efeitos benéficos na saúde 15

1.3. Metodologias de identificação, quantificação e estudo da importância biológica dos compostos fenólicos 27

1.3.1. Metodologias de identificação e quantificação 27

1.3.2. Avaliação da actividade biológica 30

1.4. O vinho Moscatel 33

1.4.1. DOC Setúbal 35

1.4.2. DOC Douro 40

1.5. Objectivos do trabalho e delineamento experimental 41

2. Material e Métodos 43

2.1. Reagentes 43

2.2. Padrões 45

2.3. Amostras e sua preparação 46

2.4. Preparação de extractos de vinhos 47

2.5. Análise por Cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de díodos e de espectrometria de massa 50

2.5.1. Equipamento e condições de análise 50

2.5.2. Condições de análise 50

2.6. Análise por Cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de díodos, de fluorescência e electroquímico 53

2.6.1. Equipamento 53

2.6.2. Condições de análise 54

2.7. Traçado dos espectros de absorção e de emissão 55

2.8. Análise do teor em fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu 55

2.9. Ensaios de hidrólise enzimática de amostras de vinho 55

2.10. Ensaios de avaliação da Actividade Antioxidante pelos métodos: DPPH, ORAC e FRAP 56

2.11. Teste de Oxidação da LDL 57

2.12. Análise por ressonância paramagnética electrónica (**EPR)** 57
2.13. Testes *in vitro* para avaliação da actividade anti-proliferativa 58
2.13.1. Condições de cultura das células 58
2.13.2. Ensaios anti-proliferativos 58
2.14. Modelo de transporte i*n vitro*: ensaio com células de Caco-2 58
2.14.1. Preparação de soluções 58
2.14.2. Condições de cultura das células 59
2.14.3. Testes de citotoxicidade 59
2.14.4. Estudos de transporte 59
2.15. Ensaios *in vivo* para avaliação da actividade biológica 61
2.15.1. Parâmetros bioquímicos avaliados no soro do rato 62
2.15.2. Estudo do efeito anti-inflamatório agudo 63
3. Resultados e Discussão 65
3.1. Pré –tratamento da amostra 68
3.2. Identificação dos compostos fenólicos no vinho Moscatel por LC-DAD-MS 72
3.2.1. Ácidos benzóicos e derivados 79
3.2.2. Ácidos cinâmicos e derivados 84
3.2.3. Flavonóides 98
3.2.4. Estilbenos 114
3.2.5. Outros compostos 115
3.3. Estudo de vinhos Moscatel Portugueses 138
3.3.1. Estudo dos vinhos Moscatel comerciais 145
3.3.2. Estudo da evolução química dos vinhos: ensaios de vinificação 167
3.3.3. Estudo de amostras de vinho Moscatel de Setúbal: ensaios de vinificação 177
3.3.4. Quantificação de ésteres etílicos em amostras de vinho Moscatel de Setúbal 187
3.3.4.1. Optimização das condições de análise por LC-MS 187
3.3.4.2. Análise de amostras de vinho Moscatel por LC-MS 194
3.3.4.3. Optimização das condições para a análise por LC-DAD-FD 201
3.3.4.4. Quantificação dos ésteres etílicos nas amostras de vinho Moscatel comercial de diferentes produtores 203
3.3.5. Identificação e quantificação de estilbenos em amostras de vinho Moscatel de Setúbal 207
3.3.5.1. Identificação do t-resveratrol em amostras por LC-DAD-MS 207
3.3.5.2. Optimização das condições para análise do t-resveratrol por LC-FD 210
3.3.5.3. Quantificação do *t*-resveratrol em amostras de vinho Moscatel 211
3.4. Actividade Biológica de Extractos de vinho e de uva Moscatel 219
3.4.1. Alguns testes para avaliação da actividade biológica de extracto de vinho Moscatel 219

3.4.2. Modelos in vitro para avaliação da actividade associada a extractos 224

3.4.2.1. Avaliação da actividade antiproliferativa (HT-29) de extractos de vinho Moscatel 224

3.4.2.2. Avaliação da permeabilidade das células Caco-2 225

3.4.3. Extracto de peles de uva: ensaios in vivo 237

3.4.3.1 Caracterização do extracto de peles de uva 237

3.4.3.2 Ensaios in vivo 243

4. Conclusões e Considerações finais 247

5. Referências Bibliográficas 253

Apêndice A 277

Apêndice B 281

Apêndice C 295

Apêndice D 303

Apêndice E 307

Anexo A 317

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Biossíntese de compostos fenólicos solúveis pela via metabólica do chiquimato	5
Figura 1.2	Biossíntese de flavonóides detectados nas uvas	6
Figura 1.3	Estrutura química das coumarinas	10
Figura 1.4	Estrutura dos flavonóides	19
Figura 1.5	Organização anatómica do tracto gastrointestinal	20
Figura 1.6	Diferentes mecanismos de absorção (**a**) difusão passiva; (**b**) difusão facilitada; (**c**) transporte activo; (**d**) endocitose	21
Figura 1.7	Compartimentos envolvidos na metabolização da quercetina-3-glucósido	25
Figura 1.8	Mapa das regiões de Denominação de Origem em Portugal Continental e arquipélagos dos Açores e Madeira	34
Figura 1.9	O processo de vinificação do vinho Moscatel de Setúbal	36
Figura 2.1	Preparação de extractos: extracção líquido-líquido com acetato de etilo	47
Figura 2.2	Preparação de extractos: extracção em fase sólida	48
Figura 2.3	Preparação de extractos de pele de uva Moscatel para análise por LC	49
Figura 2.4	Equipamento LC Surveyor- Termo Finnigan e Espectrómetro de Massa *LCQ ion trap* (Thermo Finnigan, San José C.A., EUA). **Legenda: 1**- Sistema de eluentes; **2**- Detector de Díodos; **3**-Amostrador; **4**- Forno e Coluna; **5**- Bomba; **6**- Espectrómetro de Massa	50
Figura 2.5	Lavagem das células com o meio de transporte HBSS	60
Figura 2.6	Medição da resistência das células TEER	61
Figura 3.1	Cromatogramas do vinho Moscatel C_4 aos c.d.o. 254, 280, 320 e 360 nm	66
Figura 3.2	Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) detecção electroquímica,, (**B**) detecção espectrofotométrica ao c.d.o. 280 nm e (**C**) detecção fluorimétrica (280/320 nm)	67
Figura 3.3	Cromatograma da amostra de vinho Moscatel de Setúbal após detecção fluorimétrica a diferentes c.d.o. $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: (A) 280/320 nm; (B) 260/400 nm, (C) 300/390 nm; (D) 330/374 nm	69
Figura 3.4	Cromatogramas (c.d.o. 280 nm): (**A**) injecção directa do vinho Moscatel de Setúbal; (**B**) extracto de vinho obtido por extracção líquido-líquido; (**C**)extracto de vinho obtido por SPE	71
Figura 3.5	Cromatogramas de máximos de absorção molecular ($\lambda_{máx}$) no intervalo de c.d.o. 200 a 400 nm obtidos na análise de uma amostra de vinificação C_3: (**A**) fracção A; (**B**) fracção B	72
Figura 3.6	Cromatogramas TIC obtidos na análise por LC-MS de uma amostra de vinho Moscatel de Setúbal: (**A)** fonte ESI em modo positivo e negativo; (**B)** fonte APCI em modo positivo e negativo	74
Figura 3.7	Cromatogramas de um extracto de vinho Moscatel C_4: (**A**) Mapa de absorção (c.d.o. 200-350 nm); (**B**) Mapa de intensidades de massa (*m/z* 100-800); (**C**) c.d.o. 280 nm; (**D**) TIC	75
Figura 3.8	Representações da % de áreas acumuladas em função do tempo para os cromatogramas (**A**) a 280 nm; (**B**) TIC; (**C**) % de áreas acumuladas em função do número de picos (previamente ordenados por ordem decrescente de áreas)	77
Figura 3.9	Cromatograma do extracto do vinho Moscatel de Setúbal C_4 para *m/z*= 169	80
Figura 3.10	Pico (**14**) t_r= 10.18 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectro de UV (200-400 nm); (**B**) Espectro de massa (*m/z* 90-2000)	81
Figura 3.11	Espectro MS/MS do ião *m/z* 169 e esquema de fragmentação do pico (**14**) t_r= 10.18 min	81
Figura 3.12	Padrão de ácido gálhico (100 mgL^{-1}): (A) Espectro de massa (*m/z* 80-200); (B) Espectro MS/MS do ião m/z 169; (C) Espectro de absorção (240-400 nm)	82

Figura 3.13	Pico (**59**) t_r= 39.53 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectro de massa (*m/z* 40-500); (**B**) espectro MS/MS do ião *m/z* 197; (**C**) espectro de absorção (200-400 nm)	83
Figura 3.14	Cromatograma do extracto do vinho Moscatel de Setúbal C_4 para *m/z* 153	83
Figura 3. 15	Pico (**25**) t_r= 15.73 min: (**A**) Espectro de massa (*m/z* 80-500), (**B**) espectro MS/MS do ião *m/z* 153; (**C**) Esquema de fragmentação do ácido protocatechuico	84
Figura 3.16	Cromatogramas do extracto de vinho Moscatel de Setúbal: (A) c.d.o. 280 nm; (B) c.d.o. 320 nm; (C) m/z (163+209)	86
Figura 3.17	Picos (**41**) e (**43**) no extracto de vinho Moscatel: **(A)** Espectros de massa (m/z 80-600); (**B**) espectros de absorção (c.d.o. 240-400 nm)	87
Figura 3.18	Espectros MS/MS do ião *m/z* 295: (**A**) *c*-cutárico tr= 24.53 min; (**B**) *t*-cutárico tr=26.86 min(**C**) esquema de fragmentação do ácido cutárico	87
Figura 3.19	Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (A) c.d.o. 280 nm; (B) c.d.o. 320 nm; (C) m/z (295+341)	88
Figura 3.20	Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (A) c.d.o. 280 nm; (B) c.d.o. 320 nm; (C) m/z (179+225)	89
Figura 3.21	Pico (**47**) t_r=31.10 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) espectro de massa (m/z 80 a 400); (**B**) espectro MS/MS do ião *m/z* 179; (**C**) espectro de absorção (240-400 nm) e (**D**) esquema de fragmentação	89
Figura 3.22	Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (B) c.d.o. 320 nm; (**C**) *m/z* (311+357)	90
Figura 3.23	Pico (**30**) t_r= 17.75 min e (**34**) t_r= 19.85 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectros de massa (*m/z* 80-800); (**B**) espectros de absorção (c.d.o. 240-400 nm)	90
Figura 3.24	Pico (**30**) t_r= 17.77 min e (**34**) t_r= 19.71 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectro MS/MS do ião m/z 311; (**B**) esquema de fragmentação	91
Figura 3.25	Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (**B**) c.d.o. 320 nm; (**C**) *m/z* (179+225)	92
Figura 3.26	Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (**B**) c.d.o. 320 nm; (**C**) m/z (193+239)	94
Figura 3.27	Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (B) c.d.o. 320 nm; (**C**) *m/z* (325+371)	94
Figura 3.28	Pico **IX** t_r= 31.57 min e (**49**) t_r= 32.95 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectro de massa (m/z 100-2000); (**B**) espectros de absorção (c.d.o. 250-450 nm)	94
Figura 3.29	Espectro MS/MS do ião m/z 325 (**A**) pico **IX** t_r= 31.57 min), (**B**) pico (**49**) t_r= 32.95 min; (**C**) esquema de fragmentação	95
Figura 3.30	Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (**B**) c.d.o. 320 nm; (C) m/z (223+269)	95
Figura 3.31	Cromatograma do extracto do vinho Moscatel de Setúbal para *m/z* (207+ 253)	96
Figura 3.32	Pico **109** tr= 69.53 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectro de massa (m/z 80 - 500); (**B**) Espectro MS/MS do ião *m/z* 207; (**C**) Espectro de absorção (250-450 nm); (**D**) esquema de fragmentação do cafeato de etilo	97
Figura 3.33	Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (**B**) c.d.o. 320 nm; (**C**) m/z (191+237)	98
Figura 3.34	Esquema de fragmentação do cumarato de etilo	98
Figura 3.35	Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (B) c.d.o. 360 nm; (**C**) m/z (301+347)	101
Figura 3.36	Esquema de fragmentação da quercetina	102

Figura 3.37	Pico **82** tr= 53.2 min espectro de absorção (240-400 nm): (**A**) no extracto de vinho Moscatel (**B**) no padrão de quercetina-3-*O*-glucósido. Espectros de massa (**C**) no extracto da amostra de vinho Moscatel; (**D**) no padrão de quercetina-3-*O*-glucósido	103
Figura 3.38	Pico (**79**) t_r= 52.47 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectro de massa (90-2000); (**B**) Espectro Ms/MS do ião *m/z* 463; (**C**) espectro de absorção (200-500 nm)	103
Figura 3.39	Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (B) c.d.o. 360 nm; (**C**) *m/z* (317+363)	104
Figura 3.40	Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (B) c.d.o. 360 nm; (**C**) *m/z* (315+361)	105
Figura 3.41	Pico **93** tr= 59.48 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectro de massa (m/z 80 - 500); (**B**) fragmentação do ião com *m/z* 477; (**C**) espectro de absorção (240-450 nm)	106
Figura 3.42	Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (B) c.d.o. 360 nm; (**C**) *m/z* (285+331)	106
Figura 3.43	Pico **91** tr= 58.4 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectro de absorção (240-450 nm) (**B**) esquema de fragmentação do campferol-3-*O*-glucósido; (**C**) Espectro de massa (80-500); (**D**) Espectro MS/MS do ião *m/z* 447	106
Figura 3.44	Cromatograma do extracto do vinho Moscatel de Setúbal para *m/z* 461 e 507	108
Figura 3.45	Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm (B) *m/z* (289+335); (C) *m/z* (577+625) **Identificação**: **39**. Procianidina B1; **42.** catequina+NI; **44.** procianidina; **47.** ácido cafeico+ procianidina**; 51.** Procianidina B2; **56.** epicatequina; **60.** glucósido do ácido indol-láctico	109
Figura 3.46	Pico (**42**) t_r= 25.98 min: Espectro MS/MS do ião *m/z* 289 (**A**) no extracto de vinho Moscatel; (**B**) do padrão de catequina. Espectro de absorção (250-400 nm); (**C**) no extracto de vinho Moscatel; (**D**) do padrão de catequina	110
Figura 3.47	Esquema de fragmentação da catequina	110
Figura 3.48	Pico **39** t_r= 22.88 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectro de MS/MS do ião *m/z* 577; (**B**) espectro de absorção (250-350 nm). Pico **51** t_r= 34.42 min no extracto de vinho Moscatel: (**C**) espectro de MS/ MS do ião *m/z* 577; (**D**) espectro de absorção (240-440 nm)	111
Figura 3.49	Cromatogramas do extracto de vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (**B**) *m/z* (305+351); (**C**) *m/z* (441+487); (D) *m/z* (457+504)	112
Figura 3.50	Pico **26** t_r= 16.44 min (**A**) Espectro de massa (80-400); (**B**) espectro MS/MS do ião *m/z* 305	113
Figura 3.51	Esquema de fragmentação da galhocatequina	113
Figura 3.52	Pico **41** t_r= 24.41 min (**A**) Espectro de massa (80-500); (**B**) Espectro de absorção (250-420 nm)	114
Figura 3.53	Cromatogramas do extracto de vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (B) c.d.o. 320 nm; (**C**) *m/z* (389+435)	115
Figura 3.54	Pico (**75**) t_r= 49.72 min e (**91**) t_r= 58.05 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectros de massa (m/z 90-2000); (**B**) espectros de absorção (c.d.o. 250-400 nm)	116
Figura 3.55	Cromatograma do extracto do vinho Moscatel de Setúbal *m/z* (161+177+179+180+223+224+225+226)	117
Figura 3.56	Amostra de vinho Moscatel (B_2): (**A**) cromatograma *m/z* (616+662); (**B**) espectro de absorção (260-450 nm) do pico com t_r20.80 min	119
Figura 3.57	Cromatogramas *m/z* (616+662) dos extractos de vinho Moscatel dos diferentes produtores (**A**) amostra B_2 (fracção A) (**B**) amostra A_2 (fracção A) e (**C**) amostra A_2 (fracção B)	119

Figura. 3.58	Espectros MS/MS do ião *m/z* 616 com diferentes valores de CE: (**A**) 30V; (**B**) 20V; (**C**) 10V	120
Figura 3.59	Fragmentação do ácido S-glutationil-2-trans cafeoiltartárico	121
Figura 3.60	Cromatogramas do extracto de vinho Moscatel: (**A**) c.d.o. 280 nm; (**B**) c.d.o. 320 nm; (**C**) *m/z* (366+412). (**D**) espectro de massa (80-600) do pico t_r= 40.59 min; (**E**) espectro MS/MS do ião *m/z* 366	122
Figura 3.61	Espectros MS/MS do pico t_r= 7 min com diferentes valores de CE: (**A**) 10 V; (**B**) 20 V; (**C**) 30 V; (**D**) 40 V, (**E**) e (**F**) 50 V	123
Figura 3.62	Cromatogramas do extracto de vinho Moscatel obtidos em modo Parent Scan para *m/z* (**A**) 158 e (**B**) 142	124
Figura 3.63	Fragmentação do ião *m/z* 366: glucósido do ácido indol-láctico	125
Figura 3.64	Cromatogramas do extracto de vinho Moscatel: (**A**) TIC; (**B**) *m/z* 366	126
Figura 3.65	Cromatogramas obtidos em modo SIR para *m/z* 366+412 obtidos na análise de extractos concentrados (fracção B) das amostras de JMF2001, A_2, ACP2004 e B	127
Figura 3.66	Cromatogramas obtidos em modo SIR para *m/z* 366+412 obtidos na análise de extractos concentrados (fracção B) das amostras (**A**) A_2 (fracção B), (**B**) A_2 (fracção A) e (**C**) B_2 (fracção A)	128
Figura 3.67	Cromatogramas de uma amostra de extracto de vinho Moscatel (**A**) c.d.o. 280nm; (**B**) TIC	129
Figura 3.68	Espectros de massa para diferentes tempos de retenção (**A**) 20.185min; (**B**) 29.965 min; (**C**) 32.800 min	130
Figura 3.69	Hipotética estrutura I do composto correspondente ao ião *m/z* 447	131
Figura 3.70	Estrutura hipotética II para composto correspondente ao ião *m/z* 447	132
Figura 3.71	Estrutura hipotética III para composto correspondente ao ião *m/z* 447	134
Figura 3.72	Estrutura hipotética para o composto correspondente ao ião *m/z* 461	136
Figura 3.73	Estrutura hipotética para o composto correspondente ao ião *m/z* 475	137
Figura 3.74	Cromatogramas a c.d.o. 280 nm de: (**A**) extracto da amostra C_4; (**B**) amostra C_4, (**C**) amostra comercial (HS_{353})	140
Figura 3.75	Cromatogramas do extracto da amostra de Moscatel de Setúbal, B_4, (DAD) c.d.o. 280 nm; FD; ED	142
Figura 3.76	Cromatogramas dos extractos em acetato de etilo de vinho Moscatel de Setúbal (A_4, B_4 e C_4) obtidos com ED	143
Figura 3.77	Projecção das amostras (n= 70) no espaço a tri-dimensional definido pelas três primeiras componentes principais	146
Figura 3.78	Projecção das amostras (n= 70) e variáveis (v= 42) no plano bi-dimensional definido pelas duas primeiras componentes principais	149
Figura 3.79	Projecção das amostras (n= 70) no espaço tri-dimensional após tratamento dos resultados por NMS	148
Figura 3.80	Projecção das amostras (n= 70) no espaço bi-dimensional após tratamento dos resultados por NMS	149
Figura 3.81	Cromatogramas a c.d.o. 280 nm das amostras MR1989, JMF225, JMF20, JPV238, JPV346, JPV347 e XSS313 Identificação: consultar tabela CII apêndice C	150
Figura 3.82	Projecção das amostras (n= 62) no espaço tri-dimensional definido pelas três primeiras componentes principais	152
Figura 3.83	Projecção das amostras (n= 62) no espaço tri-dimensional após tratamento dos resultados por NMS	153
Figura 3.84	Projecção das amostras (n= 62) no espaço bi-dimensional após tratamento dos resultados por NMS	154
Figura 3.85	Projecção das amostras (n= 62) e variáveis (v= 40) no espaço bi-dimensional definido pelas duas primeiras componentes principais	155
Figura 3.86	Cromatogramas a c.d.o. 280 nm das amostras HS209, XSS244, CASI322, PMD, CA e XSS205. **Identificação:** consultar tabela CI, CII apêndice C	156

Figura 3.87	Projecção das amostras (n= 58) no espaço a tri-dimensional definido pelas três primeiras componentes principais	157
Figura 3.88	Projecção das amostras (n= 58) no espaço tri-dimensional após tratamento dos resultados por NMS	158
Figura 3.89	Teor em 5-HMF nas amostras de vinho Moscatel analisadas (n=70)	160
Figura 3.90	Teor em furfural nas amostras de vinho Moscatel analisadas (n=70)	161
Figura 3.91	Comparação dos teores em 5-HMF e furfural para amostras de vinho Moscatel de diferentes anos de colheita	162
Figura 3.92	Teor em catequina e NI (pico 42) nas amostras de vinho Moscatel analisadas (n=70)	163
Figura 3.93	Comparação das médias das áreas dos picos 41 (ácido *c*-coutárico) e 43 (ácido *t*-coutárico) para os vinhos analisados dos diferentes produtores (n=70)	164
Figura 3.94	Teor de ácido gálhico nas amostras de vinho Moscatel analisadas (n=70)	165
Figura 3.95	Teor de ácido protocatechuíco nas amostras de vinho Moscatel analisadas (n=70)	165
Figura 3.96	Teor de tirosol nas amostras de vinho Moscatel analisadas (n=70)	165
Figura 3.97	Comparação das áreas dos picos (c.d.o. 280 nm) 59 (galhato de etilo) e 109 (cafeato de etilo+NI) nas amostras de vinho Moscatel	167
Figura 3.98	Projecção das amostras (n= 21) no espaço tri-dimensional definido pelas 3 primeiras componentes principais	170
Figura 3.99	Projecção das amostras (n=21) e variáveis (v=20) no espaço bi-dimensional definido pelas duas primeiras componentes principais	172
Figura 3.100	Cromatogramas obtidos por ED das amostras JMF225, JMF206, HS237 e ACP213**. Identificação:** 14E**.** ácido gálhico e 15E não identificado	172
Figura 3.101	Projecção das amostras (n=21) e variáveis (v=18) no plano bi-dimensional definido pelas duas primeiras componentes principais	173
Figura 3.102	Projecção das amostras (n= 70) e variáveis (v= 19) no plano bi-dimensional definido pelas duas primeiras componentes principais	177
Figura 3.103	Projecção das amostras (n= 70) no espaço tri-dimensional após tratamento dos resultados por NMS	178
Figura 3.104	Cromatogramas a c.d.o. 280 nm do vinho Moscatel de Setúbal após 5 meses de maceração. **Identificação:** consultar tabela CI e CII apêndice C	179
Figura 3.105	Projecção das amostras do ensaio de vinificação (n= 22) no espaço tri-dimensional definido pelas 3 primeiras componentes principais	181
Figura 3.106	Projecção das amostras (n=22) e variáveis (n= 37) no espaço bi-dimensional definido pelas duas primeiras componentes principais	182
Figura 3.107	Projecção das amostras (n= 22) no espaço tri-dimensional após tratamento dos resultados por NMS	183
Figura 3.108	Comparação das áreas dos picos (**A**) ácido gálhico e galhato de etilo (**B**) ácido cafeico e cafeato de etilo em amostras do ensaio de vinificação	184
Figura 3.109	Variação da área do pico do coumarato de etilo em amostras do ensaio de vinificação	185
Figura 3.110	Relação entre o teor em fenóis totais e a área total no cromatograma dos vinhos Moscatel dos produtores A, B e C durante a vinificação	186
Figura 3.111	Esquema de fragmentação do ião $[M-H]^-$ *m/z* 197	188
Figura 3.112	Análise de uma solução padrão de galhato de etilo: (**A**) cromatograma a c.d.o. 280 nm; (**B**) cromatograma TIC (m/z 100-400); (**C**) espectro de absorção (c.d.o. 240-400 nm); (**D**) espectro de MS (m/z 100-400)	189
Figura 3.113	Cromatogramas de uma solução padrão de galhato de etilo: (**A**) modo SIR para *m/z* 197; (**B**) *m/z* 197	190
Figura 3.114	Cromatogramas de uma solução padrão de galhato de etilo: (**A**) TIC; (**B**) m/z=197; (**C**) MRM (197>169)	191
Figura 3.115	Análise de uma solução padrão de galhato de etilo: (**A**) cromatograma TIC; (**B**) modo PS do *m/z* 169; (**C**) espectro do ião "pai" do ião *m/z* 169	192

Figura 3.116	Cromatogramas TIC de uma solução de cafeato de etilo (**A**) tratamento pelo método de "moving mean"; (**B**) tratamento pelo método de "Savitzky Golay"; (**C**) sem tratamento	193
Figura 3.117	Análise de solução padrão de cafeato de etilo: cromatogramas (**A**) TIC (m/z 100-600) (**B**) c.d.o. 323 nm. Espectros de massa: (**C**) pico t_r 10.138 min; (**D**) pico t_r 9.254; (**E**) pico t_r 8.045 min. Espectros de absorção (**F**) pico t_r 10.075 min e (**G**) pico t_r 9.192 min	194
Figura 3.118	Cromatogramas de vinho Moscatel: (**A**) modo SIR para *m/z* 197; (**B**) modo SIR para *m/z* 207; (**C**) TIC	195
Figura 3.119	Cromatogramas (modo SIR) de um vinho Moscatel para iões: (**A**) *m/z* 197; (**B**) *m/z* 207; (**C**) *m/z* 169; (**D**) *m/z* 179	196
Figura 3.120	Espectro MS/MS do galhato de etilo (*m/z* 197) com diferentes valores de CE: (**A**) 25 V; (**B**) 15 V; (**C**) 10 V	196
Figura 3.121	Espectro MS/MS do cafeato de etilo (*m/z* 207) com diferentes valores de CE: (**A**) 25 V; (**B**) 15 V; (**C**) 10 V	197
Figura 3.122	Cromatogramas SIR de amostras representativas de três produtores de vinho Moscatel de Setúbal para : (**A**) *m/z* 191+207 (**B**) *m/z* 197	198
Figura 3.123	Espectros de absorção dos picos (**A**) t_r 7.967 min (galhato de etilo); (**B**) t_r 5.400 min	198
Figura 3.124	Espectro MS/MS cumarato de etilo (*m/z* 191) detectado em amostras de vinho Moscatel com diferentes valores de CE: (**A**) 15 V; (**B**) 25 V	199
Figura 3.125	Cromatogramas de um vinho Moscatel no modo SIR para os iões: (**A**) *m/z* 353; (**B**), *m/z* 339; (**C**) *m/z* 323, (**D**) TIC	201
Figura 3.126	Espectro de emissão do cafeato de etilo para λ_{ex} de 324 nm	203
Figura 3.127	Espectro de emissão do cafeato de etilo no sistema de eluentes H_3PO_4/acetonitrilo para λ_{ex} de 293 e 324 nm	203
Figura 3.128	Espectro de emissão do galhato de etilo após excitação a 272 e 280nm	204
Figura 3.129	Cromatogramas de vinho Moscatel e solução padrão (10 mgL^{-1}) de galhato de etilo (**59**) e cafeato de etilo (**109**): (**A**) m/z 207 e 197, (**B**) c.d.o. 280 nm, (**C**) FD; (**D**) ED	205
Figura 3.130	Comparação dos teores de galhato de etilo e cafeato de etilo obtidos por LC-MS	208
Figura 3.131	SIR ião *m/z* 229: **(A)** solução padrão de *t*-resveratrol 120 mgL^{-1} e **(B)** extracto de vinho Moscatel de Setúbal C_1 Identificação: **105.** *t*-resveratrol	210
Figura 3.132	Espectro de massa:(**A**) solução padrão de *t*-resveratrol (120 mgL^{-1}); (**B)** extracto de vinho Moscatelde Setúbal C_1 e fragmentos possíveis	211
Figura 3.133	Proposta de fragmentação para os iões *m/z* 119, 135 e 183	212
Figura 3.134	Espectro de emissão de uma solução padrão de *t*-resveratrol (1.0 mgL^{-1}) dissolvido em mistura de eluentes após excitação a c.d.o. (**A**) 300 nm e (**B**) 306 nm	212
Figura 3.135	Cromatogramas de solução padrão do *t*-resveratrol (0.50 mgL^{-1}) e vinho Moscatel: (**A**) c.d.o. 300 nm, (**B**) FD (300/390 nm); (**C**) Espectros de absorção	214
Figura 3.136	Evolução do teor (média ±intervalo de confiança) em *t*-resveratrol durante a vinificação do vinho Moscatel de Setúbal	215
Figura 3.137	Teor em *t*-resveratrol nas amostras dos produtores ACP, JMF e HS	217
Figura 3.138	Cromatogramas a c.d.o. 306 nm (**A**) do vinho Moscatel C_3; (**B**) do vinho Moscatel C_3 após hidrólise enzimática. Identificação: **75**. *t*-piceid; **91**. *c*-piceid; **105**. *t*-resveratrol; **110.** *c*-resveratrol	218
Figura 3.139	Concentração de *c*-resveratrol, *t*-piceid e *c*-piceid em amostras de vinho Moscatel de Setúbal em diferentes fases da vinificação	219
Figura 3.140	Espectros de EPR do controlo (DMSO) e dos extractos de vinho Moscatel de Setúbal A_3, B_3 e C_3	221

Figura 3.141	Curvas da cinética de oxidação das LDL ao longo do tempo após incubação com os extractos de vinho Moscatel A_3, B_3 e C_3 (15 mgL^{-1} em fenóis totais) e do controlo	222
Figura 3.142	Perfis cromatográficos obtidos com ED na análise dos extractos (A_3, B_3 e C_3) de vinho Moscatel de Setúbal.. **Identificação**: **42**. catequina, **47.** ácido cafeico e procianidina, **59.** galhato de etilo; **60.** glucósido do ácido indol láctico e procianidina; **81.** quercetina-3-*O*-glucuronido+NI; **82.** quercetina-3-*O*-glucósido; **109.** cafeato de etilo + NI; **125.** coumarato de etilo +NI	224
Figura 3.143	Viabilidade (%) das células HT29 na presença de extractos de vinho Moscatel A3, B3 e C3 com diferentes teores de fenóis totais (15, 31, 62, 125 e 250 mgL-1) e controlo	226
Figura 3.144	Viabilidade das células Caco-2 (%) na presença de extractos de vinho Moscatel de Setúbal (A_2, B_2, C_2 e B_{com}) após 120 min de exposição	228
Figura 3.145	Cromatogramas da solução aceitadora do extracto A_2 analisada. (**A**) a c.d.o 320 nm (**B**) a c.d.o 254 nm (**C**) a c.d.o 280 nm; (**D**) FD (280/320 nm). (**E**) Espectro de absorção do pico78 (t_r= 54 min)	229
Figura 3.146	Cromatogramas com FD (280/320 nm) na análise das soluções aceitadoras dos extractos A_2, B_2, C_2 e B_{com} recolhidos ao fim de 120 min nos 2 sentidos: (**A**) AP-BL e (**B**) BL-AP	230
Figura 3.147	Representação da % de transporte dos compostos 60 e 62 nos sentidos AP-BL e BL-AP para o extracto C_2	231
Figura 3.148	Representação da % do transporte do composto 78 nos sentidos AP-BL e BL-AP, para o extracto A_2	231
Figura 3.149	Representação da % do transporte do composto 34 e 78 nos sentidos AP-BL e BL-AP, para o extracto B_2	232
Figura 3.150	**(A)** Cromatograma a 280 nm dos extractos de vinho moscatel A_2 e B_2; (**B**) Espectro de absorção do UV-vis do pico **78**	235
Figura 3.151	Comparação das áreas dos picos detectados FD para obtidas durante a vinificação e amostra comercial do produtor A	236
Figura 3.152	Projecção das amostras (n= 70) no plano bi-dimensional definido pelas duas primeiras componentes principais	236
Figura 3.153	Cromatogramas obtidos por FD ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 280/320 nm) para algumas amostras comerciais	237
Figura 3.154	Teor em fenóis totais expresso em mg de ácido gálhico por kg^{-} de peles de uvas obtidos com várias soluções extractantes: 25%; 50%; 75 % e 100 % etanol	238
Figura 3.155	Cromatograma do extracto de peles de uvas aos c.d.o.: (**A**) 360 e (**B**) 280 nm	239
Figura 3.156	Cromatogramas dos iões extraídos *m/z* (**A**) 315, (**B**) 301, (**C**) 285 e de (**D**) TIC obtidos na análise do extracto de peles de uva	240
Figura 3.157	Espectro de massa dos picos que eluem aos (**A**) 77.05 min e (**B**) 55.06 min	241
Figura 3.158	Cromatogramas dos iões extraídos *m/z* (**A**) 447; (**B**) 285 e (**C**) TIC, obtidos na análise de um extracto de peles de uva	242
Figura 3.159	Espectro de massa dos picos que eluem aos (**A**) 62.15 min e (**B**) 86.65 min	243
Figura 3.160	Cromatogramas obtidos FD na análise de (**A**) extracto etanólico de peles de uvas; **(B)** solução padrão de *t*-piceid e *t*-resveratrol	243
Figura BI	Comparação para um extracto de vinho Moscatel C4 de : (**A**) Cromatograma de corrente iónica total obtido em ensaio de "fullMS"; (**B**) Cromatograma de absorção no ultra-violeta para o c.d.o. de 280 nm; (**C**) Mapa de Absorção no ultra-violeta (200-400 nm) entre 0-20 min	283

Figura BII	Comparação para um extracto de vinho Moscatel C4 de : (**A**) Cromatograma de corrente iónica total obtido em ensaio de "fullMS"; (**B**) Cromatograma de absorção no ultra-violeta para o c.d.o. de 280 nm; (**C**) Mapa de Absorção no ultra-violeta (200-400 nm) entre 20-40 min	285
Figura BIII	Comparação para um extracto de vinho Moscatel C4 de : (**A**) Cromatograma de corrente iónica total obtido em ensaio de "fullMS"; (**B**) Cromatograma de absorção no ultra-violeta para o c.d.o. de 280 nm; (**C**) Mapa de Absorção no ultra-violeta (200-400 nm) entre 40-60 min	287
Figura BIV	Comparação para um extracto de vinho Moscatel C4 de : (**A**) Cromatograma de corrente iónica total obtido em ensaio de "fullMS"; (**B**) Cromatograma de absorção no ultra-violeta para o c.d.o. de 280 nm; (**C**) Mapa de Absorção no ultra-violeta (200-400 nm) entre 60-80 min	289
Figura BV	Comparação para um extracto de vinho Moscatel C4 de : (**A**) Cromatograma de corrente iónica total obtido em ensaio de "fullMS"; (**B**) Cromatograma de absorção no ultra-violeta para o c.d.o. de 280 nm; (**C**) Mapa de Absorção no ultra-violeta (200-400 nm) entre 80-100 min	291
Figura BVI	Comparação para um extracto de vinho Moscatel C4 de : (**A**) Cromatograma de corrente iónica total obtido em ensaio de "fullMS"; (**B**) Cromatograma de absorção no ultra-violeta para o c.d.o. de 280 nm; (**C**) Mapa de Absorção no ultra-violeta (200-400 nm) entre 100-115 min	293
Figura EI	Curva cinética da oxidação das LDL ao longo do tempo (min) para o controlo (DMSO) e nos extractos de vinho moscatel A_3, B_3 e C_3	309
Figura EII	Cromatogramas obtidos com o detector de fluorescência (280/320 nm) para os vários extractos (1:20) de vinho Moscatel aplicados diluídos (1:20) (A_2, B_2, C_2 e B_{com}). **Identificação: 34**. ácido *t*-caftárico; **60.** glucósido do ácido indol láctico; **62.** não identificado; **78.** não identificado, procianidina, isoramnetina-3-*O*-rutinósido	313
Figura EIII	Cromatogramas obtidos com o detector de fluorescência (280/320 nm) para a solução dadora (1:10) obtida no sentido AP →BL (A_2, B_2, C_2 e B_{com}) ao fim de 120 min. **Identificação: 34**. ácido *t*-caftárico; **60.** glucósido do ácido indol láctico; **62.** não identificado; **78.** não identificado, procianidina, isoramnetina-3-*O*-rutinósido	313
Figura EIV	Cromatogramas obtidos com o detector de fluorescência (280/320 nm) para a solução dadora (1:10) obtida no sentido BL →AP (A_2, B_2, C_2 e B_{com}) ao fim de 120 min **Identificação: 34**. ácido *t*-caftárico; **60.** glucósido do ácido indol láctico; **62.** não identificado; **78.** não identificado, procianidina isoramnetina-3-*O*-rutinósido	314
Figura EV	Cromatogramas, a 280 nm, de um extracto de peles de uvas obtido com várias soluções extractantes: (A) 25%; (B) 50%; (C) 75 % e (D) 100 % etanol e (E) ampliacão dos cromatogramas entre 55 e 65 min. **Identificação: 81.** quercetina-3-glucuronido; **82.** quercetina-3-*O*-glucósido; **91.** *c*-piceid; caempferol-3-*O*-glucósido; quercetina-3-*O*-ramnósido; **93.** Isoramnetina-3-glucósido; **111.** quercetina	315
Figura EVI	Cromatogramas de um extracto de peles de uvas obtidos com os detectores de : (A) díodos (280 nm) e de (B) fluorescência (280/320 nm). Identificação: 81. quercetina-3-glucuronido; 82. quercetina-3-glucósido; 91. *c*-piceid; caempferol-3-glucósido; quercetina-3-ramnósido; 93. Isoramnetina; 3-glucósido; 111. quercetina+NI	315

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1	Famílias dos compostos não flavonóides presentes nas uvas e nos vinhos	4
Tabela 1.2	Família de flavonóides detectados em uvas e vinhos	8
Tabela 1.3	Teor de alguns compostos fenólicos em peles de uva, grainhas e vinho	11
Tabela 1.4	Caracterização de alguns produtores da região de Setúbal	39
Tabela 2.1	Identificação das amostras dos ensaios de vinificação	46
Tabela 2.2	Programa de eluentes usado na análise por LC-MS (Surveyor-Thermo Finnigan) para analisar o *t*-resveratrol	51
Tabela 2.3	Programa de eluentes usado na análise por LC-MS (sistema Surveyor-Thermo Finnigan)	51
Tabela 2.4	Condições de análise do espectrómetro de massa para as duas fontes de ionização em modo positivo e negativo	52
Tabela 2.5	Optimização das condições de análise para identificação do *t*-resveratrol e outros compostos	52
Tabela 2.6	Programa de eluentes usado na análise por LC-MS no equipamento Waters Alliance	53
Tabela 2.7	Comprimentos de onda de excitação (λ_{ex}) e de emissão (λ_{em}) adequados à identificação e quantificação de compostos fenólicos	54
Tabela 2.8	Cálculos para determinar a percentagem do composto transferida para o compartimento aceitador (AP→BL)	60
Tabela 3.1	Comprimentos de onda de absorção máxima de algumas famílias de compostos fenólicos	66
Tabela 3.2	Estrutura e massa molecular de alguns ésteres etílicos detectados em Champagne	99
Tabela 3.3	Alguns flavanóis detectados no vinho	100
Tabela 3.4	t_r, *m/z* e identificação de compostos	118
Tabela 3.5	Fragmentos de *m/z* obtidos em cada uma das condições de ensaio	123
Tabela 3.6	Fragmentos do ião *m/z* 447 obtidos para diferentes volumes de injecção	128
Tabela 3.7	Tempos de retenção dos picos detectados com o ião *m/z* 447 e respectivos espectros obtidos com diferentes valores de energia de colisão	130
Tabela 3.8	Tempo de retenção dos picos detectados com *m/z* 493 e respectivos fragmentos obtidos com diferentes valores de energia de colisão	130
Tabela 3.9	Iões detectados nas fragmentações dos picos com *m/z* 447	133
Tabela 3.10	Tempo de retenção dos picos detectados com *m/z* 461 e respectivos fragmentos obtidos com diferentes valores de energia de colisão	134
Tabela 3.11	Tempo de retenção dos picos detectados com m/z 507 e respectivos fragmentos obtidos com diferentes valores de energia de colisão	135
Tabela 3.12	Fragmentos do ião *m/z* 475 obtidos com diferentes valores de energia de colisão (10, 20, 30 V)	137
Tabela 3.13	Identificação das variáveis utilizadas no tratamento estatístico das amostras de vinho Moscatel (*ver tabela CV*)	145
Tabela 3.14	Tabela da percentagem da variância individual e acumulada nas 10 componentes principais	147
Tabela 3.15	Tabela da percentagem da variância individual e acumulada nas 4 primeiras componentes principais, consideradas n= 21 amostras e v= 19 variáveis	169
Tabela 3.16	Contribuição das variáveis para a discriminação das amostras no espaço definido pelas 3 componentes principais	171
Tabela 3.17	Correlação entre algumas variáveis	174

Tabela 3.18	Correlação entre as áreas dos picos detectados no detector electroquímico compostos e os testes de actividade antioxidante	175
Tabela 3.19	Contribuição das variáveis para a discriminação das amostras no espaço definido pelas 3 componentes principais	176
Tabela 3.20	Identificação das variáveis utilizadas no tratamento estatístico das amostras de vinho Moscatel dos ensaios de vinificação	180
Tabela 3.21	S/N para os diferentes modos de aquisição do sinal (SIR e ião extraído) e métodos de determinação	190
Tabela 3.22	S/N do cromatograma de uma solução de galhato de etilo para diferentes modos de aquisição do sinal	191
Tabela 3.23	Estrutura, massa molecular e valores de *m/z* de $[M-H]^-$, aducto e MS/MS de alguns ésteres etilícos detectados em vinhos	200
Tabela 3.24	Tempo de retenção, massa molecular (MM) dos ácidos e ésteres de ácido tartárico e de etanol	201
Tabela 3.25	Parâmetros para a quantificação do galhato de etilo e cafeato de etilo	206
Tabela 3.26	Concentração (valor médio), mgL^{-1}, nas amostras de vinho Moscatel de Setúbal	207
Tabela 3.27	Parâmetros de quantificação do *t*-resveratrol	213
Tabela 3.28	Concentração (média±intervalo de confiança) do *t*-resveratrol (mgL^{-1}) em amostras recolhidas nos diferentes produtores para diferentes fases do processo de vinificação	216
Tabela 3.4.1	Valor da Permeabilidade aparente (P_{app}) obtidas nos dois sentidos (AP-BL e BL-AP) no ensaio com células Caco-2 e $P_{razão}$	233
Tabela 3.4.2	Balanços de massa (R %) para os compostos 34, 60, 62 e 78 detectados nos extractos analisados	234
Tabela 3.4.3	Teores em colesterol, triglicéridos, HDL e avaliação da acção anti-inflamatória aguda após a ingestão do extracto de peles de uvas Moscatel de Setúbal	245
Tabela AI	Identificação da empresa, marca, ano de colheita e código das amostras cedidas pela CVRPS	279
Tabela AII	Identificação da empresa, ano de colheita e código das amostras adquiridas no supermercado	280
Tabela CI	Tempos de retenção,c.d.o. máximos, MS e abundância relativa, MS/MS, identificaçãoe MM dos picos detectados	297
Tabela CII	Identificação dos compostos obtidos por LC com os vários métodos de detecção (MS, DAD FD e ED)	301
Tabela DI	Valores médios e o desvio padrão obtidos na determinação da actividade antioxidante:FRAP, DPPH Folin e ORAC) amostras de vinho Moscatel	305
Tabela EI	Resultados do teste de citoxicidade ao fim de 30 min	310
Tabela EII	Resultados do teste de citoxicidade ao fim de 60 min	311
Tabela EIII	Resultados do teste de citoxicidade ao fim de 120 min	312

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos são necessários para satisfazer as necessidades do ser humano em nutrientes essenciais para o funcionamento normal do seu organismo: crescimento e desenvolvimento, manutenção de células e tecidos, obtenção de energia necessária ao trabalho físico e metabólico e regulação de centenas de processos que ocorrem no organismo humano. Paralelamente, os alimentos devem possuir características sensoriais que produzam sensações de prazer.

Os nutrientes presentes nos alimentos dividem-se em 6 classes diferentes: hidratos de carbono, gordura, proteínas, vitaminas, minerais e água. Assim, enquanto alguns nutrientes se destacam por fornecerem a energia/combustível necessário ao organismo (por exemplo hidratos de carbono, lípidos e proteínas) outros são importantes do ponto de vista estrutural (como por exemplo as proteínas) e outros ainda destacam-se pela sua actividade funcional (regulação dos processos no organismo) sendo exemplos as vitaminas e os minerais (macro e micro). No entanto os nutrientes não são os únicos componentes importantes dos alimentos e os denominados fitoquímicos presentes nos frutos e vegetais têm efeitos benéficos para a saúde quando consumidos na alimentação. Estudos epidemiológicos têm mostrado que os fitonutrientes (flavonóides e carotenóides por exemplo) presentes nas frutas, soja e vegetais contribuem para a prevenção de processos degenerativos causados pelo stress oxidativo, melhoram o funcionamento do sistema imunológico e têm efeitos antibacteriano e anti-inflamatório. No entanto estes compostos não se incluem na família dos nutrientes e não são por isso essenciais para a vida.

As mudanças de hábitos alimentares que têm ocorrido nos últimos anos, nomeadamente o consumo de alimentos ricos em gordura, açúcar e com baixo teor em fitoquímicos, têm conduzido a um acréscimo de doenças cardiovasculares, diabetes (tipo II) e problemas de obesidade, sendo este último muito frequente nas gerações mais jovens.

Especialistas na área da nutrição e saúde têm vindo a chamar a atenção para a importância duma alimentação equilibrada, diversificada, adequada às necessidades dos diferentes grupos etários, rica em frutas e vegetais que possam ceder ao organismo compostos que tenham uma actividade preventiva relativamente a doenças que, muitas vezes, só se manifestam mais tardiamente contribuindo para o aumento dos gastos em cuidados de saúde.

Os industriais do sector alimentar também têm estado atentos a estes problemas e, no lançamento de novos produtos no mercado, têm insistido na redução de conteúdos energéticos. Por outro lado podem existir também linhas de produtos enriquecidos em fitoquímicos. Os produtos para enriquecimento podem ser obtidos a partir do aproveitamento de sub-produtos das indústrias alimentares, extraindo os componentes com actividade biológica para posterior incorporação, nomeadamente em situações em que o processamento de alguma forma tenha provocado uma diminuição no seu teor. Estes compostos podem também ser consumidos sob a forma de nutracêuticos.

Para que o consumidor saiba exactamente o tipo de produto que vai adquirir e quais os efeitos que daí podem advir, a sua rotulagem deve ser adequada e deve estar em conformidade com regulamentações comunitárias. As propriedades anunciadas para os produtos alimentares em campanhas publicitárias ou no rótulo, devem estar baseadas em trabalhos de índole científica que suportem o tipo de alegações que estão a ser feitas nos produtos que estão acessíveis no mercado[1]. Actualmente os consumidores já dispõem de mais informação sobre as características, composição química dos alimentos e vantagens de uma alimentação saudável.

De entre os vários componentes não nutrientes que produzem benefícios na saúde humana quando ingeridos, os compostos fenólicos são importantes e têm sido alvo de muitos estudos nos últimos anos. Para além das vitaminas (C e E) e dos carotenóides, os compostos fenólicos aparecem como responsáveis por uma intensa capacidade antioxidante[2-7]. Recentemente têm sido efectuados muitos trabalhos que pretendem descrever a composição química dos produtos alimentares do ponto de vista qualitativo e quantitativo e avaliar as suas características biológicas, tentando relacionar estes dois tipos de abordagem. Assim tem-se vindo a recorrer a estudos *in vitro*, utilizando meios celulares que simulam diferentes órgãos do ser humano, ou a estudos *in vivo*, utilizando animais e ou voluntários saudáveis.

Os compostos fenólicos que se encontram nas plantas são metabolitos secundários que estão presentes em alimentos como o vinho, frutas, chá, azeite, entre outros[8-13] fazendo parte de uma dieta diária saudável, podendo também ser usados como medicamentos e suplementos alimentares. No que se refere ao vinho, a amostra estudada neste trabalho, tem sido atribuído aos compostos fenólicos diferentes propriedades biológicas[14-16] pelo que tem sido sugerido que o seu consumo moderado apresenta efeitos benéficos para a saúde do consumidor. Em 1991, a revista "Lancet" publicou um artigo[17] em que se realçava o facto de em França, a mortalidade por doença cardiovascular ser menor do

que noutros países industrializados, mesmo sendo elevado o consumo na dieta alimentar de gorduras saturadas. Estes resultados foram associados ao consumo regular de vinho tinto e desde então, quando se quer referir este facto, utiliza-se a expressão "French Paradox''[18-21].

Para além de componentes com actividade biológica, os compostos fenólicos têm sido referidos como marcadores taxonómicos na caracterização de castas[22,23], apresentam um papel importante na qualidade da uva e do vinho nomeadamente por contribuírem para as suas características organolépticas (cor, flavour, adstringência) tão apreciadas pelo consumidor e, também por estarem relacionados com a estabilidade e comportamento dos vinhos durante o processo de envelhecimento[24-25].

1.1. Compostos fenólicos em uvas e vinhos

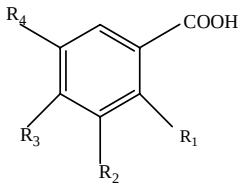
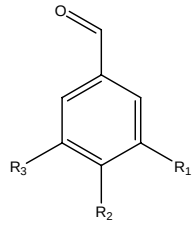
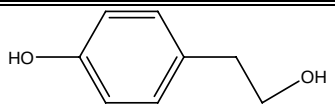
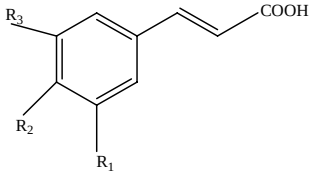
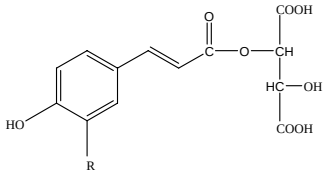
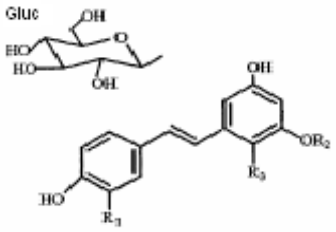
Os compostos fenólicos apresentam uma extensa variedade de estruturas, desde as mais simples às mais complexas e podem ser divididos em 2 famílias: compostos **não-flavonóides** (*tabela 1.1*) como por exemplo ácidos hidroxibenzóicos de estrutura C_6–C_1, ácidos hidroxicinâmicos de estrutura C_6–C_3 e seus derivados, estilbenos de estrutura C_6–C_2–C_6, alcoóis fenólicos, aldeídos e **flavonóides** (*tabela 1.2*) de estrutura C_6–C_3–C_6[26,27] como por exemplo antocianinas, monómeros e polímeros de flavano-3-ol, flavonóis e dihidroxiflavonóis.

Os compostos fenólicos podem formar-se por 3 vias metabólicas: via do acetato, do mevalonato e do chiquimato. As vias do acetato e do mevalonato, que derivam do acetil-CoA e do ácido mevalónico respectivamente, estão associadas à produção de fenóis simples, (floroglucinol) e também de quinonas [28,29].

Na figura 1.1 apresenta-se o esquema da biossíntese[30] de compostos fenólicos solúveis (ácidos *p*-cumárico, cafeico e ferúlico) pela via metabólica do chiquimato. A fenilalanina é formada a partir do ácido chiquímico e desaminada pela enzima fenilalanina amónia liase (PAL) produzindo o ácido cinâmico. Este composto converte-se no ácido *p*-cumárico, catalisado pela enzima cinamato-4-hidroxilase. Da adição de CoA, reacção catalisada pela enzima *p*-coumarato CoA ligase, resulta o *p*-coumaroilCoA[30] que é o substracto na formação do ácido cutárico. A hidroxilação do ácido *p*-cumárico origina o ácido cafeico e a metilação do ácido cafeico origina o ácido ferúlico. Estas reacções são catalisadas pelas enzimas monofenol mono-oxigenase (hidroxilação) e *O*-metiltransferase (metilação). A adição de CoA aos ácidos cafeico e

ferúlico, na presença das respectivas enzimas, origina o *p*-cafeoilCoA e o *p*-feruoilCoA, substractos na formação dos ácidos caftárico e fertárico. Nesta via de biossíntese a fenilalanina é assim o percursor dos compostos e o seu teor nos tecidos celulares assim como o dos ácidos cinâmicos livres e os ésteres de CoA são extremamente baixos[30].

Tabela 1.1. Famílias de compostos não flavonóides detectados em uvas e vinhos [26]

Ácidos benzóicos		**R_1**	**R_2**	**R_3**	**R_4**	
		H	H	OH	H	ácido *p*-hidroxibenzóico
		H	OH	OH	H	ácido protocatechuico
		H	OCH_3	OH	H	ácido vanílico
		H	OH	OH	OH	ácido gálhico
		H	OCH_3	OH	OCH_3	ácido siríngico
		OH	H	H	H	ácido salicílico
		OH	H	H	OH	ácido gentísico
Benzaldeídos		**R_1**	**R_2**	**R_3**		
		OCH_3	OH		vanilina	
		OCH_3	OH	OCH_3	siringaldeído	
Tirosol		tirosol				
Ácidos hidroxicinâmicos		**R_1**	**R_2**	**R_3**		
		H	OH	H	ácido *p*-cumárico	
		OH	OH	H	ácido cafeico	
		OCH_3	OH	H	ácido ferúlico	
		OCH_3	OH	OCH_3	ácido sinápico	
Derivados hidroxicinâmicos		**R**				
		OH	ácido caftárico			
		H	ácido cutárico			
		OCH_3	ácido fertárico			
Estilbenos		**R_1**	**R_2**	**R_3**		
		H	H	H	*t*-resveratrol	
		H	Gluc	H	*t*-resveratrol-3-*O*-glucósido (piceid)	
		H	H	Gluc	*t*-resveratrol-2-*O*-glucósido	
		OH	Gluc	H	*t*-astringina	

Os ácidos hidroxibenzóicos podem ter origem na via metabólica do chiquimato, que é a via principal de obtenção do ácido gálhico (figura 1.1) e também podem ser obtidos pela degradação do ácido hidroxicinâmico[31].

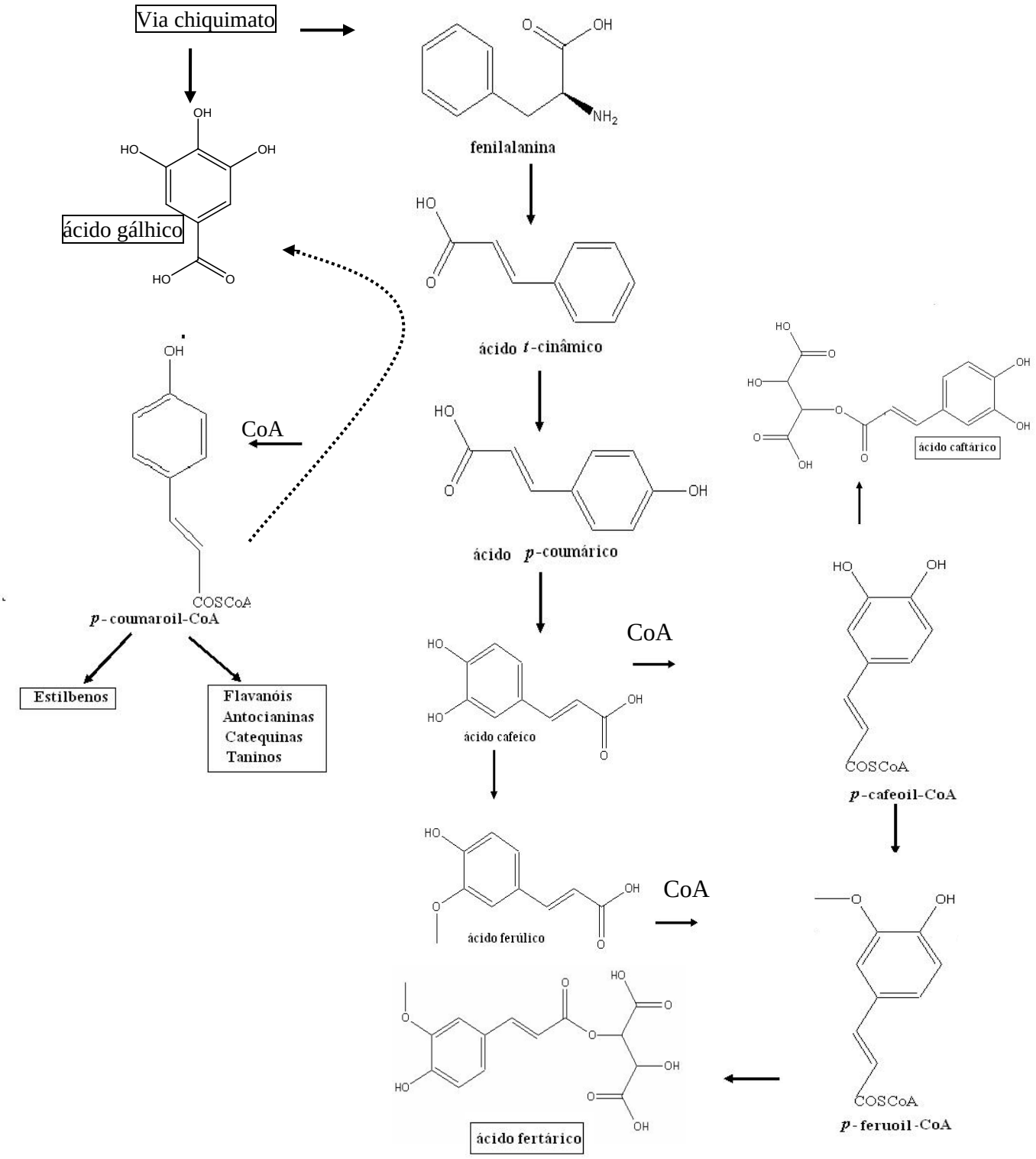


Figura 1.1. Biossíntese de compostos fenólicos solúveis pela via metabólica do chiquimato[31]

O primeiro flavonóide formado por via biossintética é a chalcona e os outros compostos flavonóides são sintetizados a partir da chalcona por outras vias[30] (figura 1.2*)*. A chalcona é originada através da reacção de 3 moléculas de malonil-CoA com o *p*-cumaroilCoA (síntese da chalcona) e é catalisada pela chalcona sintase (figura 1.2). A ciclização da chalcona, catalisada pela chalcona isomerase, origina uma flavanona e das reacções de oxidação, hidroxilação, redução e metilação, catalisadas por enzimas, formam-se outros compostos de flavonóides[30].

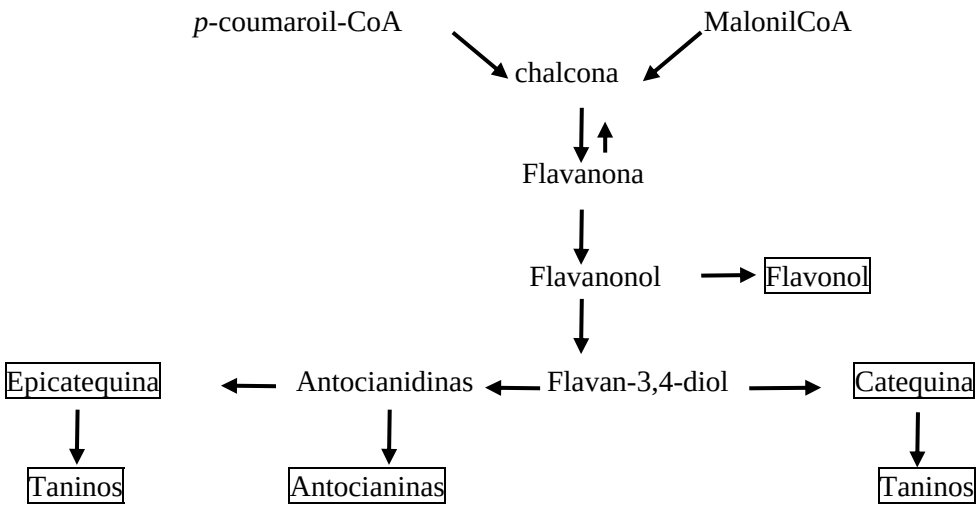


Figura 1.2. Biossíntese de flavonóides detectados nas uvas[30]

A composição fenólica da uva é determinada por factores genéticos e factores não-genéticos que apresentam uma maior influência nos teores em que os compostos estão presentes do que na composição qualitativa[32]. Entre os factores não-genéticos que influenciam a composição fenólica da uva, aparecem a sua casta, solo, clima, localização geográfica, práticas vitivinícolas, estado de maturação, área e rendimento de produção[33-35]. No que se refere às práticas agrícolas, sabe-se que na agricultura biológica, por não serem utilizados pesticidas[36] se obtém um produto final com teor mais elevados de metabolitos secundários, nomeadamente compostos fenólicos, porque as plantas estão mais susceptíveis a infecções por fungos e, como tal, produzem teores mais elevados de alguns metabolitos para sua própria defesa[37, 38].

No que se refere à distribuição destes compostos na uva, os compostos não flavonóides estão presentes na polpa enquanto que os flavonóides aparecem nas peles, grainhas e caules[26,39,40].

Nas uvas estão identificados **ácidos benzóicos** (C_6-C_1), presentes sob a forma glicosilada e esterificada e as formas livres aparecem mais frequentemente nos vinhos, sendo os mais frequentes os ácidos *p*-hidroxibenzóico, protocatechuico, vanílico, gálhico, siríngico, salicílico e gentísico, os dois últimos em concentrações vestígiais.

Os principais **ácidos hidroxicinâmicos** são detectados nas uvas sob a forma de ésteres tartáricos nomeadamente constituindo os ácidos caftárico, cutárico e fertárico, principalmente na forma *trans*, sendo detectados em concentrações vestígiais na forma *cis*. Para além destes, nos vinhos existem ácidos livres como cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico.

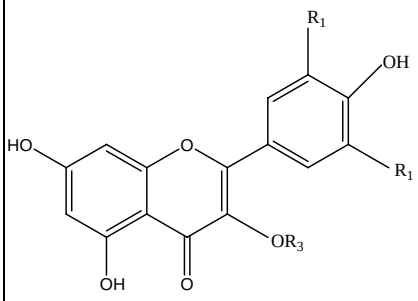
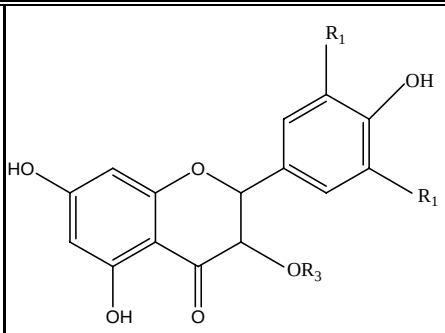
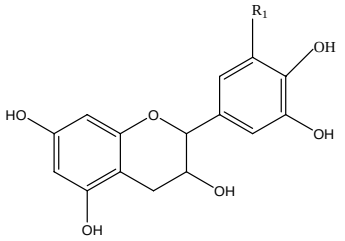
Os **ésteres etílicos** dos ácidos benzóicos (galhato de etilo) e cinâmicos (cafeato e coumarato de etilo) apenas se detectam no vinho e são formados a partir da condensação entre o etanol e os ácidos existentes na uva[41].

O **tirosol,** composto detectado em vinhos brancos e tintos[42], forma-se durante a fermentação alcoólica a partir de um aminoácido, a tirosina. O tirosol presente nos vinhos vai depender da concentração dos açúcares e da tirosina presentes no mosto.

Os **estilbenos** são fitoalexinas sintetizadas pela planta, especialmente na pele, folha e raíz, em resposta a infecções provocadas por fungos e à incidência de radiação ultravioleta. Os principais estilbenos detectados no vinho são o resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno) que corresponde à forma livre e o piceid que corresponde à forma glicosilada (3,4',5-trihidroxiestilbeno-3-β-glucósido)[43]. O *t*-resveratrol ocorre naturalmente nas uvas, mas o *c*-resveratrol não é um constituinte natural das uvas e forma-se por fotoisomerização do *t*-resveratrol[44]. O piceid é facilmente extraído da planta por ser mais hidrofílico e pode ocorrer no vinho em concentração superior à da aglícona (resveratrol). A β-glucosidase[45] hidrolisa o piceid originando o resveratrol. O teor de estilbenos nas peles das uvas depende da casta: nas peles de uvas da casta Castelão, o *t*-piceid foi detectado em maior concentração (67.24 $mgKg^{-1}$), enquanto que na castas Syrah e Tinta Roriz foi o *t*-resveratrol que foi detectado na concentração mais elevada: 20 $mgKg^{-1}$ e 10 $mgKg^{-1}$ [46] respectivamente. Outros glucósidos de estilbenos foram isolados e caracterizados[47] a partir de culturas de células de *Vitis vinifera*, nomeadamente a *t*-astringina (*tabela 1.1*).

Nas uvas brancas as classes de **flavonóides** mais importantes são: os flavonóis, flavanonóis, (também designados por dihidroflavonóis), flavan-3-ois e proantocianidinas (tabela 1.2).

Tabela 1.2. Famílias de flavonóides detectados em uvas e vinhos[26]

Flavonóis		**R_1**	**R_2**	**R_3**	
		H	H	H	campferol
		H	H	gluc[a]	campferol-3-*O*-glucósido
		H	H	gal[b]	campferol-3-O-galactósido
		H	H	gluc	campferol-3-O-glucurónido
		OH	H	H	quercetina
		OH	H	gluc	quercetina-3-*O*-glucósido
		OH	H	gluc	quercetina-3-O-glucurónido
		OH	OH	H	miricetina
		OH	OH	gluc	miricetina 3-*O*-glucósido
		OH	OH	gluc	miricetina 3-O-glucurónido
		OCH_3	H	H	isoramnetina
		OCH_3	H	gluc	isoramnetina-3-*O*-glucósido
Flavanonóis		**R_1**	**R_2**	**R_3**	
		H	H	H	2,3-dihidrocampferol
		H	H	ram[c]	2,3-dihidrocampferol-3-*O*-ramnósido
		H	H	gluc	2,3-dihidrocampferol-3-O-glucósido
		OH	H	H	2,3-dihidroquercetina
		OH	H	ram	2,3-dihidroquercetina-3-*O*-ramnósido
		OH	H	gluc	2,3-dihidroquercetina-3-*O*-glucósido
		Ogluc	H	H	2,3-dihidroquercetina-3'-*O*-glucósido
		OH	H	xil[d]	2,3-dihidroquercetina-3-*O*-xilósido
		OH	OH	ram	2,3-miricetina-3-*O*-ramnósido
Flavan-3-óis		**R_1**	**C_2**	**C_3**	
		H	R	S	(+)-catequina
		OH	R	S	(+)-galhocatequina
		H	R	R	(-)-epicatequina
		OH	R	R	(-)-epigalhocatequina
Proantocianidinas	**<u>Proantocianidinas diméricas</u>**				
	B1	Ec^a-(4β → 8)-Cat^e			
	B2	Ec-(4β → 8)-Ec^f			
	B3	Cat-(4β → 8)-Cat			
	B4	Cat-(4β → 8)-Ec			
	<u>Proantocianidinas diméricas esterificadas com ácido gálhico</u>				
	B1-3-*O*-galhato	Ec-(4β → 8)-Cat			
	B2-3-*O*-galhato	Ec-(4β → 8)-Ec			
	B3-3'-*O*-galhato	Cat-(4β → 8)-Cat			
	B3-3-*O*-galhato	Cat-(4β → 8)-Ec			
	<u>Proantocianidinas triméricas</u>				
	C1	Ec-(4β → 8)-Ec-(4β → 8)-Ec			
	C2	Cat-(4β → 8)-Cat-(4β → 8)-Cat			
	T2	Ec-(4β → 8)-Ec-(4β → 8)-Cat			
	T3	Ec-(4β → 8)-Ec-(4β → 6)-Cat			

[a] gluc-glucósido [b] gal-galactósido [c] ram - ramnósido [d] xil-xilósido
[e]Ec - epicatequina [f]Cat – catequina

Os **flavonóis** são pigmentos amarelos localizados nos vacúolos dos tecidos epidérmicos. Nas uvas *Vitis vinifera* existem sob a forma de *3-O*-glicósidos da miricetina, quercetina, campferol e isoramnetina[48]. Os compostos quercetina-*3-O*-glucuronido, miricetina-*3-O*-glucuronido e campferol-3-*O*-glucuronido também foram detectados nas peles de uvas *Vitis Vinifera*[26, 48] e podem por isso estar presentes nos vinhos.

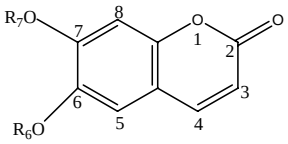
Os **flavanonóis** existem nas uvas principalmente sob a forma glicosídica sendo os 2,3-dihidrocampferol-3-*O*-glucósido, 2,3-dihidroquercetina-3-*O*-glucósido e 2,3-dihidromiricetina-3-*O*-glucósido frequentemente detectados no vinho[26].

Os **flavan-3-ois** são detectados nas uvas sob a forma monomérica, oligomérica e polimérica. Os principais monómeros detectados nas uvas são: a (+)-catequina, a (-)-epicatequina, a (+)-galhocatequina e a (-)-epigalhocatequina. As formas oligoméricas e poliméricas conhecidas como proantocianidinas (PACs), estão associadas a propriedades organolépticas (estabilidade da cor, adstringência e sabor amargo)[49,50] e actividade biológica (propriedades antioxidantes, anticancerígenas e anti-inflamatórias[51,52]). Vários tipos de procianidinas foram identificadas nas grainhas e caules das uvas *Vitis vinifera* e também nos vinhos. Monómeros e dímeros foram também identificados na polpa[53,54].

Nas uvas tintas as antocianinas são a família de compostos fenólicos que são responsáveis pela cor das uvas e dos vinhos novos enquanto que os flavan-3-ois são responsáveis pela adstringência e sabor amargo dos vinhos[55,56].

Relativamente aos compostos não flavonóides presentes nas uvas tintas e brancas, os ácidos fenólicos[57] foram encontrados em maiores concentrações nas peles (0.17-8.23 mgg^{-1}) do que nas grainhas (0.10-0.11 mgg^{-1}) ou no engaço (0-0.04 mgg^{-1}). O teor detectado no mosto variou entre 0.03 e 8.31 mgg^{-1}. Comparativamente aos flavonóides[57] o teor em flavano-3-ois variou entre 3.56-6.15 mgg^{-1} para as grainhas, 0.12-3.38 mgg^{-1} para as peles e 0.22-0.89 mgg^{-1} para os engaços.

As **coumarinas** podem considerar-se derivados dos ácidos cinâmicos (figura 1.3) e podem aparecer na madeira na forma glicosilada (esculina e escopolina) ou na forma de aglícona (esculetina e escopoletina).



Aglicona **Glicósido**

R_6 = H esculetina R_6= Gluc esculina

R_7 = H R_7 = H

R_6 = CH_3 escopoletina R_6 = CH_3 escopolina

R_7 = H R_7 = Gluc

Figura 1.3. Estrutura química das coumarinas[42]

O teor total em compostos fenólicos é um parâmetro normalmente avaliado nos vinhos e que permite rapidamente ter uma ideia da riqueza da amostra no que se refere à composição fenólica. Nos vinhos tintos[58] o teor em fenóis totais varia entre 708 e 4059 mgL^{-1} expresso em equivalentes de ácido gálhico (GAE), enquanto que nos vinhos brancos[58] estão descritos valores que variam entre 165 a 331 mgL^{-1}. Lugasi *et al* (2003)[10], verificaram que no vinho do Porto o teor em fenóis totais variou entre 735 e 1116 mgL^{-1}, enquanto que no vinho Sherry os valores detectados foram inferiores (201-446 mgL^{-1})[59]. Sato[60] *et al*., (1996) detectaram no vinho Madeira um teor em fenóis totais de 720 mgL^{-1}.

Na tabela 1.3 apresentam-se os teores de alguns compostos fenólicos detectados na uva e no vinho. Como já foi referido, o teor destes compostos presentes nos vinhos depende do processo de vinificação usado, já que, alguns dos compostos fenólicos estão presentes em diferentes teores nas diferentes partes constituintes do bago de uva, também as condições de vinificação podem favorecer a extracção a partir dessas matérias primas e por outro lado podem favorecer a ocorrência de reacções químicas. Numa fase inicial do processo de produção do vinho e após o esmagamento da uva, poderá optar-se por contacto pelicular, e esta opção condicionará as características sensoriais e químicas que se pretendem obter para cada vinho. O contacto pelicular pré-fermentativo é um processo durante o qual as peles de uvas esmagadas e desengaçadas são maceradas no seu próprio sumo em condições controladas (tempo e temperatura) antes da fermentação, de modo a obter vinhos de maior qualidade[61,62], sendo por vezes usadas enzimas que facilitam a extracção de compostos. Nos vinhos brancos sujeitos a este processo são extraídos compostos responsáveis pelo aroma[62,63] e componentes fenólicos[64-66] existentes nas peles das uvas. com resultados semelhantes aos de um vinho tinto para a extracção dos compostos fenólicos[67]. Períodos de maceração pré-fermentativa de 12 a 24 h e temperaturas baixas (5ºC) permitiram observar um aumento

do teor de alguns compostos nomeadamente ácido gálhico, caftárico, cafeico, ácidos *p*-hidroxibenzóicos e alguns flavonóides[64-66]. Após esta fase as películas poderão não ser retiradas do contacto com o mosto e a extensão da maceração (contacto pelicular) e o tempo de fermentação, passo seguinte no processo de vinificação, permitem aumentar o teor de fenóis, mas também aumentar a probabilidade de aparecimento de compostos indesejáveis e que causam um aumento da sensação de sabor amargo, adstringência e aparecimento de algum *flavour* atípico (*off-flavour*). Por tudo isto a fase de maceração tem sido muito estudada nos últimos 30 anos. Na fase de fermentação as leveduras transformam o açúcar presente nas uvas em etanol e quando esta ocorre em contacto com as peles das uvas na vinificação de vinhos tintos e alguns vinhos brancos, há uma extracção mais eficaz de compostos a partir das peles das uvas.

Tabela 1.3. Teor de alguns compostos fenólicos em peles de uva, grainhas e vinho

Composto	**Teor**				
	Peles ($mgKg^{-1}$)	**Grainha** ($mgKg^{-1}$)	**Vinho** (mgL^{-1})		
			Branco	**Tinto**	**Licoroso**
2-furaldeído[66,68]			nd-1.17		nd-8.87[S] 0.8-7.8[P]
5-hidroximetilfurfural [66,68]			nd-1.60		nd-63.8[S] Tr-168.7[P] 361[M]
Ácido *p*-cumárico[60,66,68,69]	----------[a]	----------[a]	1.1 – 2.1 nd-3.04	0.5-3.1	1.1 – 2.1[S] nd-4.06[S] 2.7-4.2[P]
Ácido cafeico [40,59,66,68-70]	nd-1.9	----------[a]	6.52 nd-2.71	5.4	1.1-1.5[P] 1.34[S] nd-4.24[S]
Ácido *c*-caftárico[59,69,70]	6.75	----------[a]	0.64	2.1	14.7[S]
Ácido *c*-cutárico[59]	13.03	----------[a]	5.91		
Ácido *c*-fertárico[59]	0.81	----------[a]	0.26		
Ácido ferúlico[69]			nd-0.47	nd-4.0	1.17[S]
Ácido gálhico[59,66, 68,69,71]	nd	8.07	20.05 nd-8.37	1.90-135.20	12.1-30.5[P] nd-10.7[S] 5.3[M]
Ácido protocatechuico[59,66, 68,69,71]	nd	1.33	1.67 nd-4.74	nd-8.96	tr-20.2[P] 4.04[S] nd-14.1[S]

Tabela 1.3. (continuação) Teor de alguns compostos fenólicos em peles de uva, grainhas e vinho

Ácido siringíco[,68,66,69,59]			nd-0.47	nd-12.45	8.0-10.6[P] 0.936[S] nd-2.12[S]
Ácido *t*-caftárico[59,68, 69,72]	28.26	----------[a]	34.20 3.86-27.4	20-75	17.6[S] nd-42.9[S]
Ácido *t*-cutárico[59, 68,69]	48.88	----------[a]	31.17 nd-14.4	2.0-6.2	7.46[S] nd-9.87[S]
Ácido *t*-fertárico[59, 69,14]	2.27	----------[a]	2.50	nd-10.3	
Ácido vanilíco[59,69, 72]			1.6-2.2	nd-1.93	1.78[S]
Cafeato de etilo[41,68,73]			nd-150		nd-1.91[S]
Campferol-3-*O*-glucósido[40]	247.6	20.0	----------[a]	1.22-44.86	5.98[S]
Campferol[40]	----------[a]	----------[a]		0.14-0.57	
Campferol[74]			0.1	0.1-1.5	
Catequina [54,59, 68,69]	5.49	61.73	31.01 nd-11.1	17.25-29.53	36.9[S] nd-3.55
Epicatequina [54,59,68,69]	2.30	58.60	12.78	12.04-13.21	18.8[S] nd-10.4
GRP[14,60]	nd	----------[a]	15.65	nd-8.0	
Isoramnetina-3-*O*-glucósido[40]	----------[a]	----------[a]	0.61-18.84	0.61-18.84	
Isoramnetina[40]	----------[a]	----------[a]		0.14-0.47	
isoramnetina[74]			nd	nd-1.6	
Miricetina[74]			0.1-0.3	0.6-9.8	
Procianidina B2[59,69]	1.39	34.47	8.96	8.96	13.3[S]
Procianina B1[59,68,69]	14.70	26.86	42.47 nd-8.60	42.45	11.6[S] Nd-32.6[S]
Quercetina-3-*O*-glucósido[40,71]	351.7	32.6	----------[a]	65.3	
Quercetina[40,71]	----------[a]	----------[a]	nd-1.2	2.8-28.	
t-astringina[75]	----------[a]	----------[a]	nd-13.4		
Tirosol[68,69,76,77]	----------[a]	----------[a]	10.72	46.5-89.1	nd-45.6[s] 66.9[S]
t-piceid[75,77]	67.24[T]	----------[a]	----------[a]	1.67	
t-resveratrol [47, 78, 79, 75, 80-86, 87]	20 [T] 0.0082-0.291[B]	----------[a]	----------[a]	nd-4.4[b]	nd-1.9[b]

[a] não foram analisadas
[b] vinho de várias origens
nd – não detectado
[S] vinho Sherry
[P] vinho do Porto
[T] uva tinta
[B] uva branca
tr- traços
[M] vinho Madeira

A qualidade do vinho no que se refere ao teor em compostos fenólicos, também pode ser afectada pelas técnicas de clarificação utilizadas na obtenção de vinhos mais límpidos e brilhantes, eliminando substâncias em suspensão bem como alguma instabilidade proteica. Durante este processo ocorre a eliminação de compostos fenólicos de natureza coloidal envolvidos em processos de oxidação e adstringência dos vinhos, contribuindo para a melhoria das características organolépticas dos vinhos obtidos. Os materiais utilizados como a PVPP, gelatina, albumina do ovo e caseína

provocam uma redução dos teores de compostos fenólicos e alteram a cor de alguns vinhos[88-90].

Outros procedimentos como refrigeração dos mostos ou das uva, o aumento da temperatura de fermentação e utilização de enzimas de maceração, têm sido aplicados para aumentar a extracção de compostos e a qualidade do vinho[28,91] contribuindo também para uma maior actividade antioxidante associada a estes produtos.

Durante as fases de maturação e de envelhecimento em cubas e cascos de madeira, os compostos fenólicos sofrem reacções de oxidação e de condensação, formando-se compostos que têm um papel importante na adstringência e na cor do vinho[92]: por exemplo as antocianinas, catequinas e procianidinas reagem para formar procianidinas oligoméricas[93]. Durante a fase de armazenamento o vinho pode sofrer oxidação alterando a sua coloração, o que é particularmente importante no vinho branco, dado que o consumidor pode facilmente avaliar estas alterações antes de comprar e provar o vinho. A utilização de madeira permite a difusão lenta de oxigénio atmosférico para o interior dos cascos, o que causa a oxidação lenta dos compostos fenólicos do vinho e o aparecimento progressivo de uma coloração acastanhada[94].

As alterações na coloração dos vinhos, o chamado escurecimento oxidativo, ocorre porque compostos como *o*-difenóis podem sofrer reacções químicas por 2 vias distintas: via enzimática e via não enzimática. O escurecimento oxidativo dos vinhos brancos está relacionado com o teor de flavanóis[95] e geralmente começa nos estádios iniciais do processo de vinificação devido a reacções enzimáticas[96] em que os ésteres de ácido hidroxicinâmico apresentam um papel crucial[97]. A oxidação enzimática dos fenóis ocorre na presença de polifenoloxidase (PPO) e de oxigénio atmosférico, nas fases iniciais do processamento do vinho. No mosto o escurecimento vai estar relacionado com o teor de hidroxilcinamatos como o ácido caftárico e cutárico e é favorecido na presença de flavanóis. O ácido vai ser oxidado pela PPO resultando uma *o*-quinona do ácido que, sendo um oxidante forte é capaz de oxidar outros componentes importantes provocando alterações na coloração. As quinonas que se formam durante os processos de oxidação também podem reagir com a glutationa formando um derivado não corado conhecido por GRP (Grape Reaction Product). A glutationa é um tripéptido muito redutor com um grupo sulfidrilo livre. A quinona do ácido caftárico pode também conjugar-se com outros agentes redutores do sumo, como o ácido ascórbico, regenerando o ácido caftárico. Pode ainda entrar em reacções sucessivas com flavonóides e GRP, formando-se as quinonas correspondentes, que se combinam depois

com a glutationa para formar ácido S-glutationil-2-caftárico[42] ou GRP2. A importância do ácido caftárico neste processo prende-se com o facto de ser o composto *o*-difenol mais importante nos vinhos brancos. No entanto outros compostos podem sofrer o mesmo processo de oxidação como o ácido gálhico, cafeico e sabe-se que a catequina pode apresentar também um papel importante no aparecimento de colorações acastanhadas nos vinhos.

No processo de oxidação não enzimática, também denominado por oxidação química, mais uma vez os compostos *o*-difenol são os mais susceptíveis a estes fenómenos. Durante este processo o oxigénio é reduzido a água oxigenada (H_2O_2) e podem ocorrer diferentes mecanismos de reacção nomeadamente:

- a oxidação dos compostos fenólicos catalisada por metais como o ferro e o cobre e posterior polimerização dos compostos oxidados,
- a polimerização entre fenóis e outros compostos presentes nos vinhos, incluindo condensação com ácido glioxílico ou acetaldeído.

O acastanhamento pode ser causado por flavanóis num processo de condensação-oxidação que envolve ácido glioxílico, que se forma por oxidação do ácido tartárico numa reacção catalisada por metais como o ferro[101-103]. Este ácido é um dos ácidos orgânicos mais importantes nas uvas e nos vinhos. A (+)-catequina e o ácido glioxílico iniciam uma cadeia de reacções químicas que conduz à formação de compostos corados, que na sua constituição contêm o catião xantílio[98-100]. O espectro de UV–vis destes pigmentos apresenta um máximo aos 440 nm, o que corresponde a uma coloração amarela.

A coloração dos vinhos brancos pode também sofrer alteração devido a reacções de condensação de alguns compostos fenólicos como monómeros de (+)-catequina e oligómeros de flavano-3-ol com o acetaldeído[101-103] que pode ocorrer nos vinhos como resultado do metabolismo das leveduras (processo característico do vinho Sherry) e pela oxidação de etanol catalisada por metais, processo mais habitual nos vinhos.

A oxidação dos compostos fenólicos é mais importante quando as uvas foram atacadas por *Botrytis* dado que estas uvas têm na sua composição a lacase que contrariamente à tirosinase é estável ao pH do mosto e mais resistente ao dióxido de enxofre e é capaz de oxidar o complexo fenol-glutationa a quinona. Se a concentração de glutationa for elevada a quinona formada pode ser parcialmente reduzida a fenol e

este composto já não é oxidado pela lacase[42], assim o efeito da oxidação e o correspondente acastanhamento do vinho são desta forma limitados.

Dada a importância do factor temperatura em todo este processo, Ortega[104] *et al.*, (2003) estudaram as alterações de cor e a fracção fenólica em vinhos sherry brancos, sujeitos a envelhecimento oxidativo em condições industriais com vista à diminuição do tempo de envelhecimento, tendo concluído que para diminuir o tempo necessário para que ocorresse o envelhecimento oxidativo, a temperatura deveria ser aumentada, mas simultaneamente deveria ceder-se uma quantidade suficiente de oxigénio para compensar o seu consumo. Os resultados obtidos nesse trabalho[104] sugerem ainda que o acastanhamento dos vinhos está mais dependente da temperatura de envelhecimento do que dos fenóis fornecidos pela própria madeira durante esse processo.

1.2. Os compostos fenólicos e os efeitos benéficos na saúde

O corpo humano possui mecanismos endógenos, nomedamente a producão de enzimas que têm acção sobre espécies reactivas de oxigénio e azoto que actuam no organismo como oxidantes. Quando ocorre uma produção excessiva destas espécies podem ocorrer danos em biomoléculas importantes como DNA, lípidos e proteínas. Para neutralizar estas espécies reactivas, as células humanas desenvolveram um complexo mecanismo bioquímico que utiliza componentes enzimáticos e não-enzimáticos. Os danos celulares oxidativos induzidos por espécies reactivas têm um papel importante em certas doenças como aterosclerose e cancro e no envelhecimento celular.

Os alimentos, particularmente os frutos e vegetais, têm um papel muito importante na manutenção do equilíbrio redox fisiológico, pois fornecem ao ser humano vários antioxidantes naturais, como a vitamina C, E, β-caroteno e compostos fenólicos. Estes últimos exercem a sua actividade por acção sequestrante de radicais como o radical hidroxilo $OH^{\cdot}$ e o anião superóxido $O_2^{-\cdot}$. Deste modo um aumento no seu consumo na dieta alimentar pode desempenhar um papel importante na prevenção de doenças degenerativas do cérebro[105], apresentam acção anti-inflamatória[106], anticarcinogénica[105,107], antiaterogénica[108] e efeito cardioprotector[109]. Estes compostos podem também activar ou inibir o crescimento microbiano de acordo com o tipo de composto e sua concentração: o ácido gálhico e a catequina estimulam o crescimento do

Lactobacillus hilgardii 5w, mas concentrações elevadas de ácido gálhico (1000-3000 mgL^{-1}) inibem o crescimento microbiano[110].

Os efeitos de um consumo regular e moderado de vinho tinto na prevenção de doenças coronárias tem sido muito discutido pela comunidade científica[20]. Muitos trabalhos têm sido publicados nas últimas décadas acerca da composição química e das propriedades biológicas dos compostos fenólicos dos vinhos[111,112]. O efeito cardioprotector pode estar em parte relacionado com a sua capacidade para melhorar a função endotelial**:** depois do consumo de doses elevadas de vinho tinto a capacidade antioxidante do plasma aumentou significativamente, mas não houve aumento depois de consumir vinho sem álcool que tinha a mesma quantidade aproximada de compostos fenólicos, o que mostra que os compostos fenólicos e o etanol são os componentes chave responsáveis por estes efeitos[108,111,112].

Os vinhos tintos apresentam maior actividade antioxidante comparativamente aos vinhos brancos, o que está relacionado com a presença de maior quantidade de flavonóides das peles das uvas tintas[67]. No entanto deve salientar-se que nem todos os compostos têm a mesma capacidade antioxidante[113,114], pelo que o seu efeito numa amostra como o vinho vai depender do tipo de composto e não da sua quantidade. Situações de sinergias entre compostos presentes em diferentes matrizes também têm sido referidas, pelo que será difícil, com base somente na composição química dos vinhos, concluir acerca da sua actividade biológica relativa.

A relação entre actividade antioxidante e estrutura química ainda não é clara. Sabe-se que os derivados do ácido hidroxibenzóico e do ácido hidroxicinâmico, são antioxidantes potentes e inibem a oxidação *in vitro* de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e os ácidos hidroxicinâmicos apresentam maior actividade antioxidante do que os ácidos hidroxibenzóicos[115]. O grau de lipofilia do composto é uma característica muito importante a considerar dado que controla a capacidade do composto para chegar aos verdadeiros locais onde pode ocorrer um ataque por parte dos radicais livres. Os ésteres etílicos destes ácidos são mais lipofílicos e têm maior efeito protector contra dois tipos de stress oxidativo: peroxidação das LDL catalisada pelo Cu e ataque radicalar das membranas dos eritrócitos pelo AAPH. O cafeato de etilo, que é capaz de inibir a proliferação de células hepáticas HSC induzida por um agente pró-oxidante, é mais lipofílico do que o ácido cafeico, sendo por isso mais rapidamente absorvido pelas membranas celulares[73]. Verificou-se que, comparando a acção dos ácidos, só o cafeico e o sinápico protegiam as LDL de oxidação, os outros ácidos eram pouco efectivos (ácido

ferúlico>ácido gálhico>ácido *p*-cumárico)[41,116]. Estudos acerca dos efeitos fisiológicos do ácido cafeico descrevem também a sua capacidade de actuar como anti-inflamatório e como protector contra a citotoxicicidade induzida pelo peróxido de hidrogénio[117].

Ao resveratrol, composto que tem sido alvo de atenção mais recentemente, foram atribuídos vários efeitos biológicos incluindo actividade contra alguns tipos de cancro (mama, colorectal e próstata) pela sua capacidade de inibir a proliferação de células tumorais e protecção cardíaca[118,119], neuroprotector[120] e antileucémico[120], actividade antioxidante[121] e de inibição da agregação plaquetária[122]. O interesse neste composto prende-se com os efeitos benéficos que apresenta e os baixos teores habitualmente ingeridos durante a alimentação: num estudo efectuado com vinhos portugueses estimou-se o aporte de estilbeno/dia/indivíduo para o consumo de vinho tinto e 1.8 mg de estilbeno/dia/indivíduo para o vinho branco quando se consumiam 160mL/dia/indivíduo dos vinhos analisados[47].

Os flavonóides (catequina, epicatequina e proantocianidinas), são compostos que são absorvidos pela corrente sanguínea, inibindo a actividade enzimática indesejável. São referidos como potentes agentes antioxidantes[51] e quelantes de metais; inibindo a peroxidação lipídica, exibindo várias acções fisiológicas[21,123-125] que incluem efeito anti-inflamatório, antialérgico, anticarcinogénico, anti-hipertensivo, anti-hepatóxico e antimutagénico antiartrítico, antivirais e actividade antimicrobiana.

Estudos *in vitro* efectuados com alimentos como frutos, chá e vinho mostraram que os compostos fenólicos presentes nestas amostras podem apresentar actividade antiproliferativa em várias linhas celulares de carcinoma. Referem ainda que o ácido elágico reduz o crescimento de linhas celulares: MCF-7 (carcinoma da mama), CaSki (carcinoma cervical), MOLT-4 (leucemia linfoblástica aguda) e do DU 145 (carcinoma da próstata)[126].

Embora alguns dos efeitos atribuídos ao consumo moderado de vinho sejam já muito conhecidos, resultados sobre a capacidade antioxidante de sumos de uva são escassos e controversos. Num estudo[37,38] foi comparada a composição do sumo de uva (teor de polifenóis totais, antocianinas, resveratrol, catequina, epicatequina, procianidinas e ácido ascórbico) e a sua actividade antioxidante. Foram analisados sumos de uva branca, tinta e de agricultura convencional e biológica. Os sumos obtidos a partir de uvas produzidas em agricultura biológica apresentaram teores mais elevados de compostos fenólicos e resveratrol quando comparados com os obtidos a partir de agricultura convencional. Também as uvas tintas apresentavam teores mais elevados de

fenóis totais e os ensaios *in vitro* da actividade antioxidante apresentavam uma correlação positiva com o teor total de compostos fenólicos. Estes resultados indicaram assim que os sumos de uvas brancas e tintas são uma fonte importante de compostos antioxidantes[37,38], podem prevenir: a oxidação das LDL, os danos oxidativos do DNA bem como doenças coronárias[58,127]. O efeito anti-hipertensivo, antioxidante e vasodilatador de extractos de peles de uva, fracções ricas em flavonóides já foi demonstrado em ratos[128].

1.2.1. Mecanismo de absorção dos compostos no organismo

A fim de enquadrar a discussão acerca dos compostos fenólicos na alimentação humana, faz-se uma breve descrição do processo de absorção e metabolização dos compostos no organismo. É sabido que há uma grande variabilidade no consumo diário de compostos fenólicos com a alimentação, que depende dos hábitos alimentares do país e da composição química dos alimentos, a qual por sua vez, está dependente do grau de maturação na altura da colheita, factores ambientais, processamento (métodos de culinária e métodos industriais) e armazenamento. O consumo médio[129,130] de polifenóis com a dieta foi estimado ser da ordem de 1g/dia. No entanto os polifenóis mais comuns na dieta não são necessariamente os mais activos no organismo, porque têm uma actividade baixa, porque são pouco absorvidos no intestino, são muito metabolizados ou porque são rapidamente eliminados. As diferenças estruturais entre as diferentes classes de flavonóides (figura 1.4) estão relacionadas com o anel C, as variações no número e distribuição dos grupos hidroxilo na molécula e suas substituições. Embora apresentem características estruturais semelhantes, as propriedades biológicas e bioquímicas variam consideravelmente com modificações mínimas na estrutura.

Por exemplo nos flavonóides[48] há aspectos estruturais importantes que os tornam em compostos com elevada actividade antioxidante:- presença do grupo *o*-catecol no anel B, o qual confere uma estabilidade elevada ao radical formado;

- a conjugação do anel B ao grupo 4-oxo através da dupla ligação 2,3, que assegura a deslocalização electrónica do anel B;

- os grupos 3-OH e 5-OH e grupo 4-oxo que permite a deslocalização electrónica do grupo 4-oxo para ambos os substituintes .

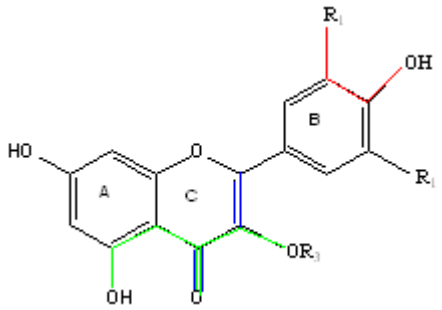


Figura 1.4. Estrutura dos flavonóides: **grupo *o*-catecol no anel B**, **dupla ligação 2,3 e grupo 4-oxo no anel C**; **grupos hidroxilo nas posições 3 e 5 em conjugação com grupo 4-oxo**

Por outro lado os metabolitos encontrados no sangue e nos órgãos alvo e que resultam da actividade digestiva ou hepática podem diferir das substâncias iniciais em termos de actividade biológica. Assim o estudo da biodisponibilidade dos polifenóis, concentrações e formas em que o composto está presente no plasma e tecidos após a ingestão, é essencial se quisermos perceber os seus efeitos benéficos para a saúde.

A digestão dos alimentos

O aparelho digestivo (figura 1.5) tem várias funções essenciais que condicionam a acção dos componentes dos alimentos nos seus locais alvo[131]: ingestão, transporte dos alimentos ingeridos, secreção de enzimas digestivos, ácido, muco e suco biliar, absorção durante a digestão, transporte dos compostos não digeridos e eliminação.

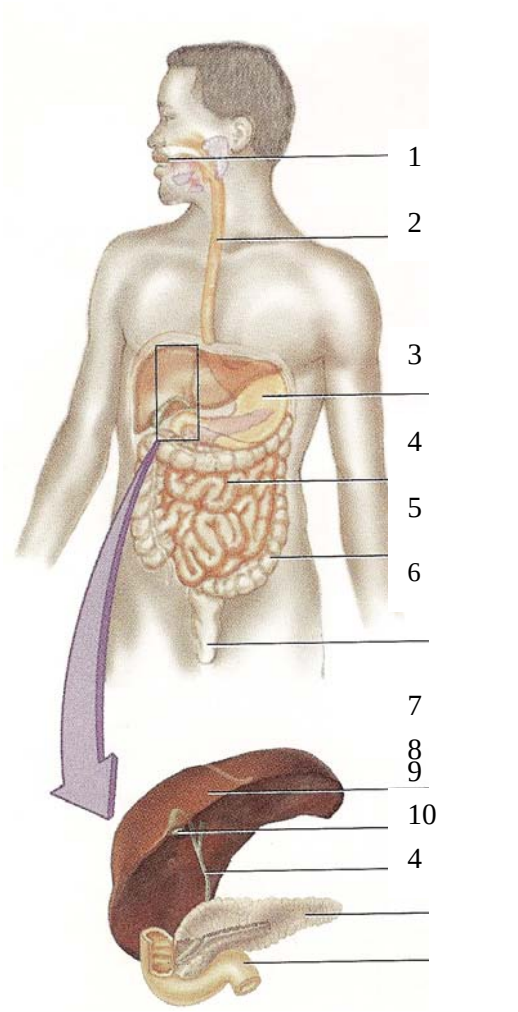


Figura 1.5. Organização anatómica do tracto gastrointestinal. 1- boca; 2- esófago; 3- estômago; 4- intestino delgado; 5- intestino grosso; 6- recto; 7- fígado; 8- vesícula biliar; 9-canal biliar; 10- pâncreas[131]

Na boca e no esófago ocorre a ingestão e digestão, no estômago e intestino delgado a digestão e absorção, no intestino grosso a absorção e eliminação e no recto a eliminação. O fígado a vesícula e o pâncreas produzem e segregam substâncias que ajudam no processo de digestão. A transformação dos alimentos em unidades mais pequenas e finalmente em nutrientes absorvíveis envolve processos químicos e físicos. Primeiro ocorre a desagregação durante a mastigação. Paralelamente os movimentos de contracção continuam o processo de desagregação do alimento e misturam-no com várias secreções. Enzimas (fundamentalmente hidrolases) e alguns compostos químicos que conferem características ácidas ao estômago e básicas ao intestino delgado e bílis, ajudam a que ocorra o processo de desagregação transformando nutrientes e não nutrientes em moléculas mais pequenas para que ocorra a sua absorção

Assim os compostos, dependendo do seu tamanho podem ser directamente absorvidos ou vão ter que ser digeridos primeiro.

No estômago, o pH ácido cria condições óptimas para a digestão de proteínas e ocorre absorção de um número muito reduzido de substâncias. É no intestino delgado (duodeno, jejuno, íleon) que acontece em grande parte a digestão e absorção dos compostos, sendo o pH do meio mais básico de forma a que as enzimas possam actuar.

O transporte de substâncias através da membrana intestinal é um processo complexo e dinâmico que inclui a passagem das mesmas utilizando diferentes vias funcionais em paralelo, através da barreira epitelial intestinal. Esta consiste numa monocamada, composta predominantemente por enterócitos intercalados por células secretoras, que constituem, geralmente, barreiras eficazes a microorganismos e outras partículas. Estas células são ferramentas importantes nos estudos *in vitro* em que se simula as condições fisiológicas quando se ingerem os compostos fenólicos na dieta alimentar. Os mecanismos de absorção[131] dos compostos são 4: difusão passiva, difusão facilitada, transporte activo, endocitose (figura 1.6).

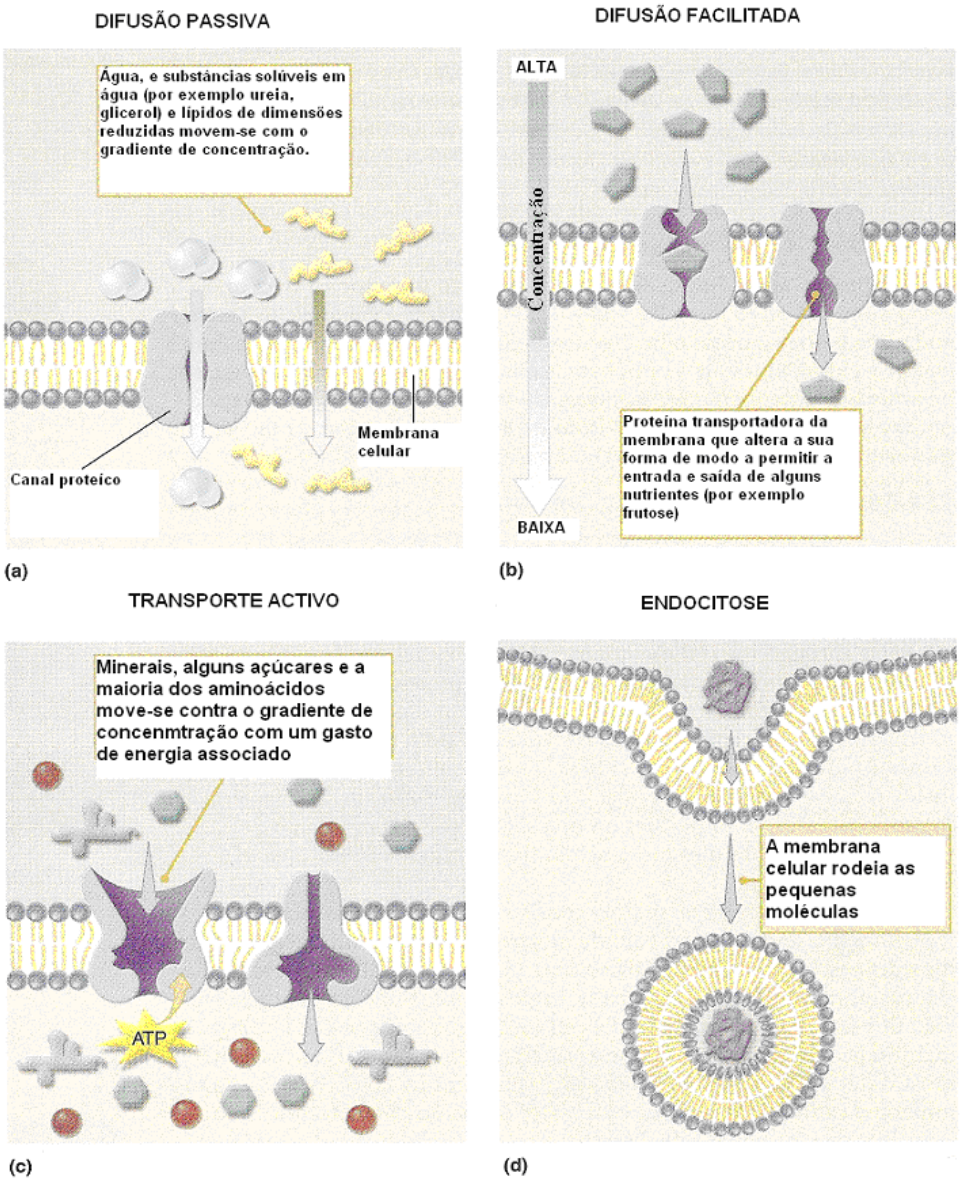


Figura.1.6 Diferentes mecanismos de absorção[131](**a**) difusão passiva; (**b**) difusão facilitada; (**c**) transporte activo; (**d**) endocitose

A difusão passiva consiste no movimento das moléculas sem dispêndio de energia: as moléculas atravessam as membranas celulares com o objectivo de igualar as concentrações nos dois lados da membrana. Quanto maior for a concentração do composto num dos lados da membrana, mais rapidamente este se move através dela para a zona de menor concentração. Como a membrana tem fundamentalmente na sua composição substâncias lipofílicas deixa passar facilmente compostos lipossolúveis. Para algumas moléculas são necessários transportadores especiais (proteínas) que se encontram na membrana celular e este é o mecanismo de difusão facilitada. Quando é necessária energia para que ocorra o transporte de compostos numa direcção não favorável, ou seja contra um gradiente de concentração, carga ou pressão o transporte diz-se activo. A maioria das substâncias são transportadas por um processo denominado de endocitose, no qual uma porção da membrana forma uma vesícula em torno da molécula, introduzindo-a no interior da célula.

Pode também ocorrer um processo em sentido contrário, o denominado efluxo não é mais do que a regurgitação dos compostos pelas células, ou seja, os compostos permeiam para o interior da célula mas depois são transportados de forma activa para o intestino em vez de passarem para o sangue (transporte de absorção).

No intestino grosso a microflora é constituída essencialmente por bactérias pertencentes aos géneros *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, e *Bifidobacterium*. Outras estão presentes em menores quantidades como o género *Escherichia* e *Lactobacillus*. Entre os fungos encontram-se *Candida*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* digerem compostos como a fibra.

1.2.2. A biodisponibilidade dos compostos fenólicos

No que se refere ao movimento dos compostos para ou através dos tecidos após ingestão, em particular a passagem de fitoquímicos como os compostos fenólicos para o tracto gastro-intestinal e depois para a corrente sanguínea, mecanismo de absorção, sabe-se que alguns compostos presentes nos alimentos não são absorvidos pelo organismo, mas devido a reacções que podem ocorrer ao longo do tracto gastro-intestinal são transformados noutros facilmente absorvidos e com actividade biológica.

A biodisponibilidade de um composto, quer seja um princípio activo de um medicamento ou um componente de um alimento, está condicionada pela absorção

intestinal, excreção na forma de glucurónidos para o lúmen intestinal, metabolismo pela microflora, metabolismo intestinal e hepático, cinética plasmática, natureza dos metabolitos, ligação a proteínas como a albumina, concentração celular, metabolismo intracelular, acumulação em tecido e excreção biliar e urinária.

Após o consumo de alimentos ricos em polifenóis estes são absorvidos e observa-se um aumento da capacidade antioxidante do plasma, o que tem sido verificado para uma grande variedade de alimentos[132]. As concentrações de polifenóis atingidas no plasma[133,134] após o consumo de 35 mg de compostos fenólicos em vinho tinto é de 0.09 $\mu molL^{-1}$. Compostos como as procianidinas embora muito abundantes na alimentação são pouco absorvidos e o mesmo parece acontecer com as antocianinas. O aporte de flavonóis, flavonas e flavonóis é pequeno e as concentrações em que se encontram no plasma são geralmente inferiores a 1 $\mu molL^{-1}$. As flavonas e isoflavonas são os flavonóides com melhor biodisponibilidade e a sua concentração no plasma pode atingir 5 $\mu molL^{-1}$. No que se refere aos ácidos sabe-se que a sua concentração nos alimentos é elevada mas a sua esterificação diminui a absorção intestinal. Regra geral, os metabolitos dos compostos fenólicos são rapidamente eliminados do plasma, o que indica que o seu consumo deve ser diário para manter os teores elevados no sangue.

A absorção dos flavonóides depende das suas propriedades físico-químicas como tamanho da molécula e configuração, carácter lipofílico, solubilidade e pK_a. Actualmente pouca informação existe sobre o efeito da matriz do alimento no processo de absorção dos compostos, área em que será importante desenvolver futuros trabalhos. Sabe-se por exemplo que nos vinhos[135] o teor de fibras e compostos fenólicos é comparável 1.2 gL^{-1} e 0.3 gL^{-1} respectivamente em vinho tinto e vinho branco. Sabe-se que os compostos fenólicos podem estar associados com a fibra solúvel[135] o que poderá afectar a sua análise química no vinho, a sua biodisponibilidade e as propriedades biológicas: cerca de 35–60% dos polifenóis totais em vinhos tintos e 10% em vinhos brancos estão associados com a fibra e não são detectados pelos métodos habituais de análise. Este facto pode explicar em parte porque é que o teor de fenóis determinado por LC é geralmente inferior ao valor determinado pelo método de Folin-Ciocalteau. Este último quantifica compostos fenólicos de baixo peso molecular e polifenóis em moléculas altamente polimerizadas, enquanto os métodos de LC determinam compostos de baixo peso molecular. Mas, mais importante do que a quantificação é o facto desta fracção de compostos fenólicos ter sido frequentemente ignorada em estudos que visam

o estudo da biodisponibilidade[136], efeitos biológicos ou clínicos e estudos nutricionais dos compostos fenólicos dos vinhos. Estes compostos fenólicos associados às fibras não vão estar disponíveis para absorção na mucosa intestinal e os complexos atingem o cólon onde os polissacáridos vão ser extensamente fermentados. Os polifenóis e os produtos da sua degradação podem assim contribuir para um ambiente antioxidante nesta zona do intestino e podem ser então absorvidos e metabolizados[10,60].

No que se refere à digestão dos flavonóides eles são absorvidos no intestino mas devem ser digeridos durante o processo de mastigação, pela acção dos fluídos digestivos e dos microorganismos no cólon. A maioria dos flavonóides está presente nos alimentos sob a forma de β-glicósidos, que resistem à hidrólise ácida do estômago, os quais são muito hidrofílicos para serem absorvidos por difusão passiva no intestino delgado e por isso as aglíconas correspondentes é que devem ser absorvidas. O estudo de glucósidos de quercetina em cebolas[137] mostrou que ocorria uma elevada absorção destes compostos no intestino delgado. Pensou-se que se tratava de um transporte[138] efectuado pelo transportador SGLT1 o que implicaria o transporte do glucósido da quercetina através do enterócito e a sua detecção no plasma o que no entanto não se verificava[139]. Actualmente pensa-se que os glucósidos de quercetina são hidrolisados por uma β-glucosidase (LPH - lactase floridzina hidrolase), que existe no intestino delgado[140]. A aglícona libertada desta forma pode ser absorvida através do intestino delgado. A especificidade desta enzima varia substancialmente para os glicósidos (glucósidos, galactósidos, arabinósidos, xilósidos, ramnósidos, galactósidos) de flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas e antocianinas[141]: só os glucósidos são hidrolisados pela LPH independentemente da aglícona. Os glicósidos que não forem utilizados pela enzima são transportados para o cólon onde as bactérias têm capacidade para os hidrolisar e ao mesmo tempo degradam as aglíconas que foram libertadas[142]. Assim, dado que a capacidade de absorção do cólon é muito menor do que a capacidade de absorção do intestino delgado, vai ocorrer uma absorção reduzida de compostos nesta zona, o que acontece com a absorção de quercetina-3-β-rutinósido que é cerca de 20% da absorção de quercetina-4´-β-glucósido[143].

No que se refere às catequinas, estes compostos aparecem nos alimentos como aglíconas e na forma ligada a grupos galhoil. Dados farmacocinéticos mostram que ambas as formas são absorvidas no intestino delgado[144]. Quanto às proantocianidinas só os compostos que tenham até 3 unidades de catequina são absorvidos no cólon. As

moléculas maiores são metabolizadas pelas bactérias do cólon. Sabe-se que a procianidina B2 é pouco absorvida no rato e a B3 não é absorvida. Assim as procianidinas que são compostos muito importantes na dieta alimentar são pouco absorvidas e têm somente uma actividade local no tracto intestinal ou uma actividade mediada pelos ácidos fenólicos produzidos por degradação microbiana. No entanto a sua localização no intestino conjuntamente com os carotenóides produz um efeito antioxidante importante no intestino, dado que outros antioxidantes como as vitaminas C e E já foram absorvidas.

No que se refere à velocidade de absorção dos glicósidos de flavonóis ela pode ser muito rápida, inferior a 0.5 h para a quercetina-4'-glucósido ou demorar até 9 h como é o caso da rutina (quercetina-3-β-rutinósido).

Na sua maioria os compostos fenólicos absorvidos (>90%) são sujeitos à acção da microflora intestinal, que degrada os polifenóis a ácidos orgânicos e fenóis simples. Estes produtos de degradação estão biodisponíveis e representam a maioria dos compostos fenólicos após o seu consumo. Na metabolização dos compostos[145] (figura 1.7) e dos metabolitos resultantes da acção da microflora está envolvido o intestino delgado, o fígado, os rins e o cólon. Os flavonóides que não forem absorvidos pelo intestino delgado e os flavonóides que forem absorvidos e segregados pela bílis vão alcançar o cólon.

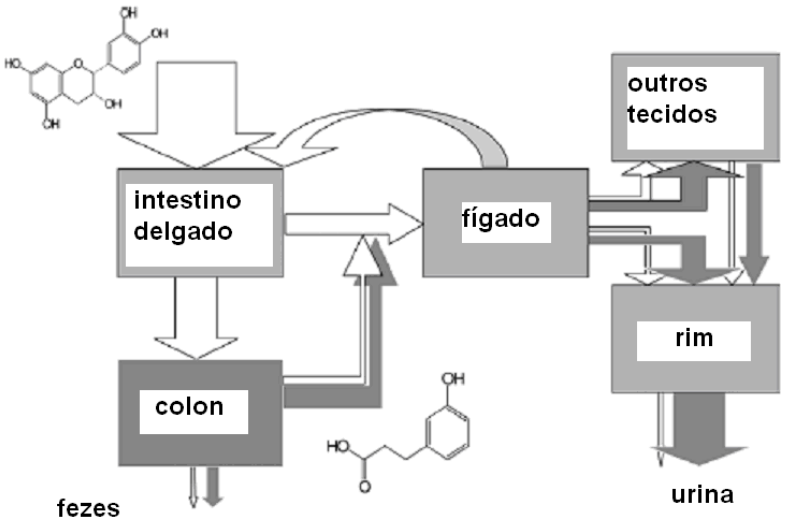


Figura 1.7. Compartimentos envolvidos na metabolização da quercetina-3-*O*-glucósido[145]

As enzimas do fígado e dos rins vão metabolizar os flavonóides, ocorrendo reacções de conjugação dos grupos OH polares com o ácido glucurónico, sulfato ou glicina, tanto para os flavonóides como para os produtos resultantes da sua degradação. A *O*-metilação pela enzima catecol-*o*-metiltransferase tem um papel importante na inactivação do grupo catecol presente nestes compostos. Estes conjugados são os compostos normalmente detectados no plasma, ou seja, relativamente à quercetina encontra-se na forma de 3´-sulfato, 3´-metoxi-3-glucuronido e o 3-glucuronido. A formação de derivados conjugados de glucurónidos e sulfatos facilita a eliminação rápida dos compostos através da urina e da bílis. Os ésteres de sulfato e glucurónidos podem manter alguma capacidade antioxidante e retardam a oxidação *in vitro* das LDL. Alguns estudos mostraram que a glucuronização de flavonóides reduzia a sua potência biológica[146].

Os polifenóis uma vez no cólon são extensivamente metabolizados pela microflora. Os glucurónidos dos flavonóides excretados na bílis podem também ser hidrolisados pela microflora originando a aglícona que pode ser absorvida. As aglíconas são também metabolizadas originando uma grande variedade de ácidos aromáticos de baixo peso molecular e que são facilmente absorvidos. Para além de degradar o anel flavonóide, as bactérias da microflora produzem ainda glucosidases, glucuronidases e sulfatases capazes de destruir os conjugados libertando o flavonóide dos ácidos glucurónicos e sulfatos. Os microorganismos do cólon vão degradar a molécula de flavonóide, ocorrendo a quebra no oxigénio O do anel heterocíclico. Os produtos resultantes são absorvidos e são detectados na urina e no plasma sendo geralmente ácidos carboxílicos com o grupo fenilo hidroxilado. Foram já descritos esquemas diferentes de fragmentação para os flavonóides: degradação dos flavonóis em ácidos fenilacético e fenilpropiónico; as catequinas produzem valerolactonas e ácidos fenilpropiónicos, assim como as flavonas e flavanonas também produzem ácidos fenilpropiónicos. Estes ácidos também eles são sujeitos a degradação pelas bactérias e enzimas nos tecidos, resultando na oxidação dos ácidos fenilpropiónicos a ácidos benzóicos.

Nos vinhos tintos ricos em proantocianidinas que são pouco absorvidas e são metabolizadas no cólon observaram-se rendimentos elevados de ácidos fenólicos.

Por exemplo, os elagitaninos detectados em alimentos como a noz, morango, framboesa, romã e em vinho envelhecido em madeira, não são absorvidos pelo homem. Estes compostos originam por hidrólise o ácido elágico que por sua vez é metabolizado

em derivados dimetílicos de ácido elágico, compostos com actividade biológica anticarcinogénica[126].

Quanto menor for a absorção no intestino delgado maior deverá ser a quantidade de substracto que atinge o cólon e exposição dos tecidos ao metabolito resultantes da degradação pela microflora.

Os poucos estudos em humanos mostram que a quantidade de polifenol intacto na urina varia com o tipo de composto. Para os flavonóides, os teores encontrados de quercetina, rutina e glucósido de quercetina são baixos mas atingem teores elevados para a catequina presente no chá verde, flavanonas dos sumos de citrinos e antocianinas do vinho tinto. As percentagens de recuperação mais elevadas obtêm-se para o ácido cafeico. A excreção urinária relaciona-se com a quantidade de quercetina intacta no plasma: como a absorção dos glucósidos da quercetina é elevada e a excreção de quercetina na urina é baixa, significa que houve uma metabolização importante da quercetina. Uma maior excreção urinária de metabolitos com uma estrutura flavonóide intacta significa que menor é o metabolismo a que o composto está sujeito.

A determinação da biodisponibilidade dos metabolitos dos polifenóis em tecidos pode ser mais importante do que o conhecimento da sua concentração no plasma. Os dados actuais são escassos tendo sido efectuado alguns estudos com polifenóis marcados[147-150].

1.3. Metodologias de identificação, quantificação e estudo da importância biológica dos compostos fenólicos

1.3.1. Metodologias de identificação e quantificação

Em face do anteriormente exposto pode concluir-se que é importante determinar o teor total de compostos fenólicos nos alimentos, mas também identificar e quantificar esses compostos. Para a análise dos compostos fenólicos são normalmente usadas diferentes abordagens: por um lado podem determinar-se parâmetros globais que visam a determinação do teor total em compostos fenólicos, flavonóides e antocianinas, ou pode optar-se pela utilização de técnicas separativas com o objectivo de identificar e quantificar compostos que fazem parte destes grupos. Nas técnicas para determinação dos parâmetros globais são normalmente usadas reacções de coloração, de especificidade discutível e fazem-se medições espectrofotométricas cujo resultado é comparado com rectas de calibração obtidas a partir de um padrão de calibração representativo da amostra.

Dada a importância que tem sido dada à composição fenólica dos alimentos e em face das características das matrizes onde estes compostos podem ser encontrados (alimentos, amostras biológicas), nos últimos anos muitos trabalhos têm sido efectuados com vista à optimização das condições de preparação da amostra, nomeadamente no que se refere à utilização de modos de extracção e concentração adequados e também na optimização da análise por cromatografia. Assim o objectivo da optimização será sempre a detecção de baixos teores de compostos, o que significa aumentar a sensibilidade do método obtendo resultados precisos e exactos.

A preparação das amostras tem como objectivo a extracção dos compostos em estudo a partir de matrizes que podem ser mais ou menos complexas e pode contemplar também a concentração dos analitos, caso se justifique. Por exemplo, quando se analisam amostras de peles e grainhas é necessário um passo inicial em que se faz a maceração dos materiais sólidos com as soluções extractantes (extracção sólido-líquido) com diferentes solventes[151] e em alguns casos recorreu-se já à extracção com fluídos supercríticos[152-154].

A avaliação da capacidade das técnicas extractivas a utilizar não deverá ser feita com base na determinação dos fenóis totais mas sim na estimativa de extracção das diferentes famílias de compostos, dado que o efeito antioxidante deverá estar relacionado com a presença de compostos que apresentem maior actividade.

A preparação da amostra pode compreender também um passo de purificação prévia utilizando extracção líquido-líquido ou extracção em fase sólida (colunas com enchimento de C-18, sílica gel, Toyopearl gel HW-40 ou poliamida), utilizando para eluição diferentes extractantes que diferem no pH e/ou na polaridade. A elevada complexidade das amostras torna essencial a optimização da sua preparação[155] utilizando nos processos extractivos diferentes solventes como metanol, etanol, propanol, acetona, acetato de etilo, dimetilformamida. Como exemplo, na determinação do *t*-resveratrol quando se comparou a extracção líquido-líquido e SPE, obtiveram-se melhores resultados com a extracção líquido-líquido utilizando éter dietílico[156].

Por vezes são usados processos de hidrólise (alcalina, ácida ou enzimática) para a libertação de compostos que estejam ligados a outros componentes da matriz da amostra. Como em qualquer processo extractivo é importante optimizar os tempos de extracção, mas para este tipo de compostos, tempos de extracção longos podem significar que há maior probabilidade dos compostos sofrerem processos oxidativos, a não ser que sejam adicionados agentes antioxidantes aos sistemas de solventes usados.

Por vezes pode justificar-se uma simplificação da amostra recorrendo a técnicas de fraccionamento. Assim por exemplo na análise de flavanóis presentes nas grainhas[157] procedeu-se numa fase inicial a uma cromatografia de baixa pressão utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20, em que se utilizou metanol para eluir compostos de baixa massa molecular e uma mistura de acetona-água (70:30 v/v) para recuperar compostos de massa molecular superior. Também na análise de PACs em produtos de uva, utilizou-se SPE e fraccionamento em Sephadex LH-20[157].

Após a preparação da amostra segue-se a escolha da metodologia analítica mais adequada para a identificação e quantificação dos compostos em estudo. A análise de compostos fenólicos em amostras de produtos da vinha e do vinho é complicada dada a grande diversidade de compostos e os diferentes teores em que estão presentes. A cromatografia líquida é a técnica de eleição para separar e quantificar estes compostos em uvas, vinhos, brandies, aguardentes e extractos de madeira, mas também noutros produtos alimentares. A separação cromatográfica é feita, na maioria dos trabalhos, com colunas de fase reversa C18 com sistemas de solventes binários, usando como eluentes água acidificada e um solvente orgânico polar como o acetonitrilo ou metanol.

Métodos de detecção espectroscópicos que envolvem radiação da zona UV e visível têm sido bastante usados dado que os compostos fenólicos apresentam absorção característica nesta região do espectro e deste modo podem ser facilmente detectados. No entanto as dificuldades na interpretação de cromatogramas tornam necessária a utilização de outras formas de detecção. A utilização de um detector de fluorescência[158] permite reduzir o limite de quantificação de flavan-3-ois e também elimina interferências causadas por outros compostos fenólicos que muitas vezes levam à utilização das técnicas de fraccionamento que são bastante morosas. Devido à sua semelhança química os flavan-3-ois são difíceis de separar e quantificar, no entanto, a análise por LC permite obter bons resultados e a detecção por fluorescência fornece a necessária selectividade e sensibilidade para a quantificação. A utilização de um detector electroquímico conduz à obtenção de cromatogramas ainda mais simples, nos quais são detectados os compostos presentes na amostra capazes de se reduzir ou oxidar, sendo por isso uma ferramenta útil na indicação de componentes com possível actividade antioxidante.

Uma ferramenta importante na identificação de compostos envolve a associação da cromatografia líquida com a espectrometria de massa (LC-MS), permitindo a identificação dos compostos na forma livre, ligado a açúcar ou sob a forma de

oligómeros. A importância desta metodologia é confirmada pelo elevado número de aplicações existentes que utilizam as fontes de ESI e APCI e que têm sido usados na confirmação estrutural de compostos fenólicos em variadas matrizes. As fontes ESI e APCI podem ser utilizadas no modo positivo ou negativo, mas no caso de compostos com grupos acídicos (tais como ácidos carboxílicos e álcoois), a formação de iões negativos produzirá uma corrente iónica mais forte. Uma outra vantagem do modo negativo é o facto de originar menor ruído aumentando a sensibilidade do equipamento. Assim, a utilização deste modo de detecção obriga à optimização das condições de ensaio. Dependendo do tipo de equipamento utilizado (armadilha de iões, triplo quadrupolo, por exemplo), assim o tipo de informação que se poderá retirar poderá ser mais ou menos relevante para os objectivos da análise.

Como já foi referido para analisar os compostos individualmente utiliza-se a técnica separativa como a cromatografia líquida de alta eficiência (**LC)** associada aos vários detectores, mas a avaliação do teor em fenóis totais em vinhos pode ser feita pelo método de Folin-Ciocalteu. Este método[159] baseia-se na acção redutora dos compostos fenolicos, em meio alcalino, sobre uma mistura dos ácidos fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolíbdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), com obtenção de óxidos de tungsténio (W_8O_{23}) e de molibdénio (Mo_8O_{23}), que apresentam uma coloração azul. A coloração obtida tem um máximo de absorção a 750 nm, sendo a sua intensidade proporcional à concentração de fenóis.

1.3.2. Avaliação da actividade biológica

Actualmente sabe-se que a actividade biológica associada aos compostos fenólicos está muito para além da actividade antioxidante. No entanto, o número de trabalhos nesta área tem sido muito elevado Os flavonóides, tais como a quercetina e campferol, são potenciais agentes antioxidantes actuando no tracto intestinal limitando a formação das espécies ROS e capturando os que se formam. Entre os compostos habitualmente afectados pela acção destas espécies encontram-se os lípidos. Após a ingestão, digestão e absorção, as gorduras são transportadas pelo organismo, via lipoproteinas. A lipoproteina, transportadora de colesterol no sangue, é muito sensível à oxidação que é reconhecida como um elemento chave na patogénese da aterosclerose e as substâncias antioxidantes são importantes na protecção contra estas patologias. A peroxidação *in vivo* ocorre via reacção radicalar em cadeia. Existem várias possibilidades de iniciar a

reacção, na qual o radical alquilo ($L^{\cdot}$) é formado pela remoção de um hidrogénio do ácido gordo polinsaturado (LH) da bicamada lipídica, que na presença de oxigénio origina o radical peróxilo lipídico ($LOO^{\cdot}$). Os radicais peróxilo podem oxidar lípidos adjacentes na membrana celular ou na molécula de LDL[160] , que pode resultar na conversão de centenas de cadeias laterais de ácidos gordos em peróxidos lipídicos que alteram a integridade e funções bioquímicas das membranas celulares[160].

A determinação do retardamento da oxidação das LDL por adição de substâncias antioxidantes, através do estudo da cinética da oxidação das lipoproteinas, dá indicações sobre a capacidade antioxidante de um alimento, extracto ou fluído biológico.

A técnica de EPR (ressonância paramagnética electrónica) é uma técnica selectiva que detecta radicais livres mas não identifica substâncias antioxidantes. Nesta técnica os radicais livres formados através de uma reacção vão ser colocados em contacto com a solução. Este método consiste em medir o sinal de EPR e a sua intensidade é proporcional à concentração de radicais livres existentes. Devido à baixa sensibilidade da técnica EPR, os testes de DPPH[161], FRAP[162] e ORAC, são exemplos de metodologias para avaliação da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos, em diferentes matrizes, assim como dos compostos puros. Um conhecimento sobre os componentes das amostras pode dar-nos informação acerca da possível actividade biológica dos compostos e há ensaios que podem ser realizados para avaliar a actividade antioxidante. Como estes testes possuem mecanismos diferentes, a sua resposta depende do radical formado e da substância antioxidante testada.

O teste DPPH é baseado na redução do radical DPPH, que captura de átomos de hidrogénio, passando para a sua forma estável DPPH-H e consequentemente promove a avaliação da actividade antioxidante através da capacidade de captação do radical livre, sendo o produto da reacção detectado por espectrometria (517 nm). No teste de FRAP ocorre a redução do ião Fe^{3+} a Fe^{2+} por um antioxidante a um baixo valor de pH e o produto da reacção também é detectado por espectrofotometria (593 nm). O FRAP é mais adequado para antioxidantes hidrofílicos e o DPPH aplica-se principalmente em antioxidantes lipofílicos[163]. No teste de ORAC usa-se o radical livre peroxilo que é uma espécie reactiva biologicamente importante pela sua abundância e por ser responsável pelos danos oxidativos[164]. Os radicais diminuem a fluorescência da fluoresceína. A substância antioxidante adicionada reage com os radicais doando átomos de hidrogénio e inibindo a diminuição da intensidade da fluorescência. Essa inibição é proporcional à

actividade antioxidante[164]. Este ensaio é aplicado a substâncias antioxidantes hidrofílicas e lipofílicas[163].

Este tipo de testes utilizados para avaliar diferentes amostras é importante, mas deverá ser sempre complementado com estudos que permitam a avaliação da biodisponibilidade dos compostos presentes nessas matrizes em estudo. Os estudos *in vitro* para previsão da biodisponibilidade são muito importantes, porque eliminam a necessidade de utilização de animais e por outro lado são passíveis de automatização. Entre os modelos normalmente utilizados, o modelo Caco-2, um dos modelos mais usados, estuda a permeabilidade de uma camada de células de carcinoma colorectal humano para avaliar a permeabilidade do epitélio intestinal aos compostos em estudo. Embora os modelos celulares forneçam mais informação em termos do transporte activo e previsão do efluxo, são mais morosos (longos ciclos de crescimento das células), há possibilidade de contaminação microbiológica e são mais difíceis de automatizar do que outros modelos *in vitro* que apenas permitem estimar o transporte passivo[165]. Para efectuar estes testes é necessário fazerem-se testes de citotoxicidade[166], nomedamente o teste MTS que se baseia na capacidade das células converterem o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonatofenil)-2H-tetrazolio (MTS) no formazan na presença de metilsulfato de fenazónio (PMS). A quantidade de formazan formado é proporcional ao número de células viáveis.

Para avaliar os efeitos dos compostos "*in vivo*" usam-se modelos experimentais em ratos, uma vez que são considerados próximos dos seres humanos. Um dos modelos existentes para estudar a acção de fármacos com efeito anti-inflamatório baseia-se na capacidade para inibir o edema provocado na pata do rato após injecção de uma substância com efeito lesivo. O processo inflamatório constitui a resposta do organismo vivo a esta agressão e é caracterizado por calor, edema, rubor e dor.

Portanova[167] *et al.*, (1996) desenvolveram estudos de inflamação, com recurso ao modelo da carragenina, na pata de rato. Esta inflamação caracteriza-se pela estimulação dos sistemas de mediadores humorais e celulares e pela libertação de uma grande quantidade de mediadores inflamatórios que conduzem a alterações no tónus microvascular e na permeabilidade da parede vascular. As prostaglandinas derivadas do ácido araquidónico (AA), tais como PGE_2 e PGI_2 e que auxiliam a formação de um edema inflamatório, são favorecidas pelas suas propriedades vasodilatadoras (rubor), e contribuem para o desenvolvimento de hiperalgesia (dor) no local da inflamação. A PGE_2 tem propriedades vasodilatadoras sendo responsável pela formação de edema e

pelo aparecimento de rubor na zona inflamada e contribui também para o estado de hiperalgesia característico do processo inflamatório[168].

O edema da pata induzido pela carragenina é caracterizado por uma fase precoce (1 a 2 horas), em que ocorre a elevação dos níveis de histamina, 5-hidroxitriptamina e bradiquinina, e por uma fase tardia (entre as 3 e 4 horas) em que ocorre libertação de PG's[176]. A resposta à carragenina depende inteiramente da resposta local a uma acção inflamatória, não sendo antigénico e não ocorrendo efeitos sistémicos. A sua reprodutibilidade é bastante elevada, o que aumenta ainda o interesse deste agente[169].

1.4. A produção de vinho Nacional

Portugal tem tradição na produção de vinho e foi dos primeiros países do mundo vitícola a estabelecer e regulamentar uma região demarcada, a Região do Douro[173], em 1756. Em 1907-1908, foi dado início ao processo de demarcação e regulamentação das Regiões dos Vinhos Verdes, Dão, Colares, Carcavelos, Bucelas, Moscatel de Setúbal e Madeira. A Região do Douro actualmente contempla as denominações de origem Porto e Douro. Em 1979 e 1980 foram reconhecidas outras denominações (Bairrada e Algarve), tendo-se procedido à sua demarcação[170]. Actualmente Portugal e os arquipélagos dos Açores e Madeira estão divididos em 29 regiões com denominações de origem[171] (figura 1.8).

O Decreto-Lei 212/2004 de 23/08/2004 estabelece a organização institucional do sector vitivinícola, disciplina o reconhecimento e protecção das respectivas denominações de origem (DO) e indicações geográficas (IG), seu controlo, certificação e utilização. Entende-se como "«Denominação de origem (DO)» o nome geográfico de uma região ou de um local determinado, ou uma denominação tradicional, associada a uma origem geográfica ou não, que serve para designar ou identificar um produto vitivinícola originário de uvas provenientes dessa região ou desse local determinado e cuja qualidade ou características se devem, essencial ou exclusivamente, ao meio geográfico, incluindo os factores naturais e humanos, e cuja vinificação e elaboração ocorrem no interior daquela área ou região geográfica delimitada"[172]. Na rotulagem dos produtos vitivinícolas com direito a uma DO pode existir a menção: Denominação de Origem Controlada (**DOC**)[172]. Esta designação é atribuída a vinhos cuja produção está tradicionalmente ligada a uma região geograficamente delimitada e sujeita a um conjunto de regras consignadas em legislação própria (características dos solos, castas

recomendadas e autorizadas, práticas de vinificação, teor alcoólico, tempo de estágio, etc)[172].

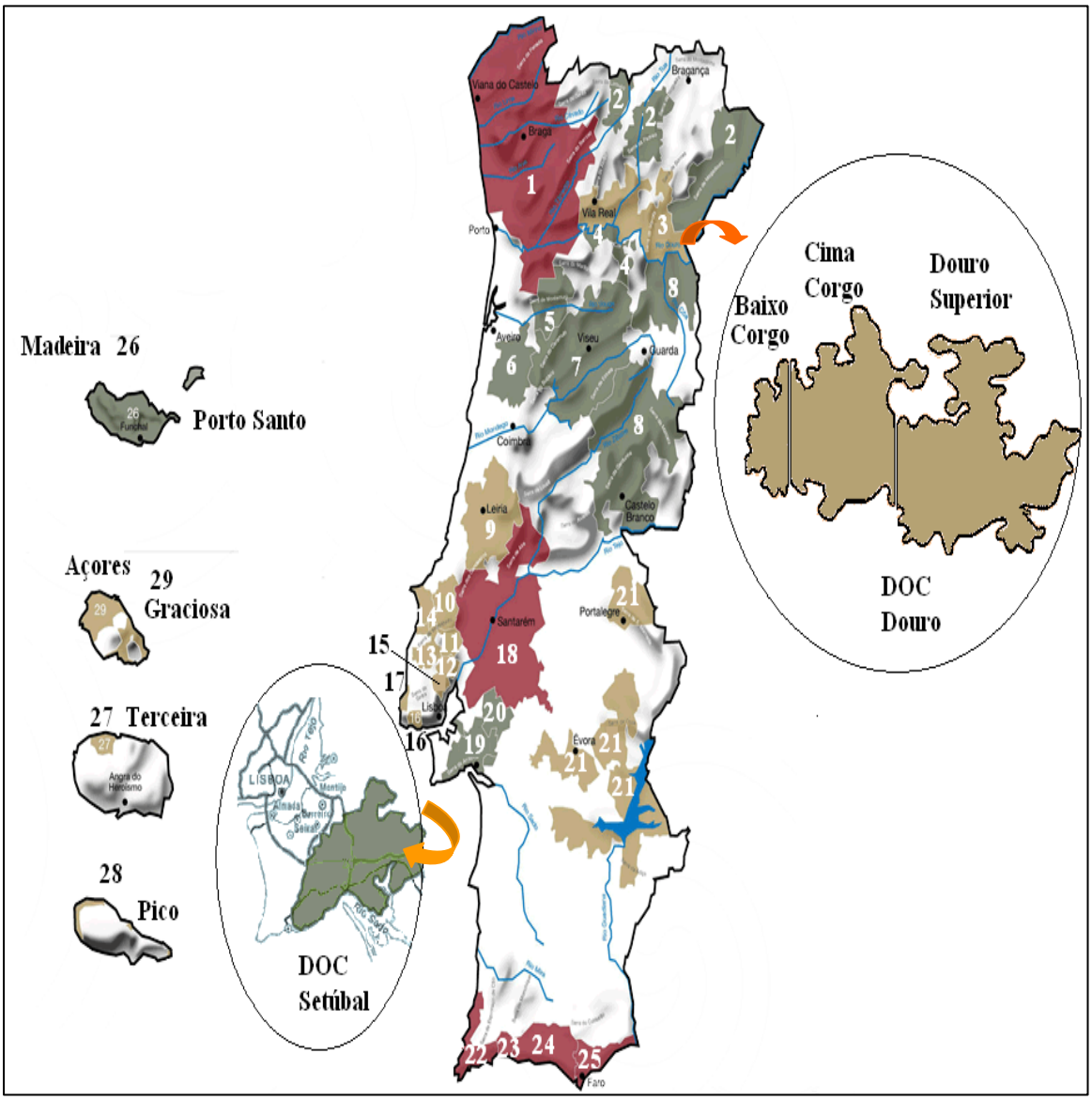


Figura 1.8. Mapa[171] das regiões de Denominação de Origem em Portugal Continental e arquipélagos dos Açores e Madeira . Identificação das regiões DOC: **1**-vinho verde; **2**- Trás-os-Montes; **3**- Douro/Porto; **4**- Távora-Varosa; **5**-Lafões; **6**-Bairrada; **7**-Dão; **8**-Beira Interior; **9**-Encostas de Aire; **10**-Óbidos; **11**- Alenquer; **12**- Arruda; **13**-Torres Vedras; **14 –** Lourinhã; **15** – Bucelas; **16**- Carcavelos; **17**- Colares; **18 –** Ribatejo; **19 –** Setúbal; **20 –** Palmela; **21**- Alentejo; **22 –** Lagos; **23 –** Portimão; **24 –** Lagoa; **25 –** Tavira; **26 –** Madeira/Madeirense; **27** – Biscoitos; **28 –** Pico; **29** – Graciosa

A região de Setúbal foi o berço do vinho Moscatel (Moscatel de Setúbal) e para além desta região também a região do Douro produz vinho Moscatel Douro.

1.4.1. DOC Setúbal

"A denominação «Setúbal», confirmada como denominação de origem controlada (DOC), só poderá ser usada para a identificação do vinho licoroso produzido na área delimitada, que abrange os municípios de Palmela e de Setúbal e do município de Sesimbra parte da freguesia de Nossa Senhora do Castelo, desde que satisfaça as exigências estabelecidas no Decreto-Lei nº 13/92 de 4 de Fevereiro de 1992 e em outra legislação aplicável, integrando-se na categoria dos vinhos licorosos de qualidade produzidos em região determinada (VLQPRD) da nomenclatura comunitária. A área geográfica correspondente à Denominação de Origem Controlada "Setúbal" abrange os concelhos de Palmela e Setúbal e parte da freguesia de Nossa Senhora do Castelo, do concelho de Sesimbra"[173]

Produção de vinho Moscatel de Setúbal

O vinho moscatel de Setúbal é um vinho licoroso cujo processo difere do seguido pelos vinhos tintos ou brancos, por se dispor de um tempo muito curto de fermentação que é interrompida pela adição de aguardente[173] numa percentagem entre 58-77% (v/v). A fermentação que ocorre em contacto com as películas das uvas, é interrompida no momento em que a quantidade de açúcares não fermentados dá ao vinho a doçura pretendida (90-100 gL^{-1} de açúcar residual). A adição de aguardente confere ao vinho características organolépticas peculiares, melhora a estabilidade químico-enológica, permitindo controlar o grau de doçura final do vinho[173].

A produção do vinho inicia-se com a vindima e todo o processo que decorre entre a separação dos bagos de uva da cepa e a sua chegada à adega, determinarão a qualidade final do vinho[174]. A primeira casta a ser vindimada na região é o *Moscatel Roxo*, de forma a assegurar um grau de maturação que garanta a riqueza aromática e o teor de ácidos característicos neste tipo de uva[174]. A vindima acaba normalmente durante as duas primeiras semanas de Outubro, com a vindima do *Moscatel de Setúbal.*

A casta *Moscatel de Setúbal* que se pensa ter tido origem no Egipto, diferencia-se da casta *Moscatel Roxo* pelos seus cachos maiores, cilíndrico-cónicos, com bagos soltos e grandes de forma ovóide e de cor branca, com película e polpa rija e intenso aroma característico a moscatel[174].

Na vinificação deste tipo de vinhos podem ser utilizadas diferentes castas[173]:

1. na produção de vinho branco é recomendada a casta Moscatel-de-Setúbal e são autorizadas as castas Fernão-Pires, Arinto, Boal-e-Alicante, Olho-de-Lebre, Malvasia-Fina, Rabo-de-Ovelha, Roupeiro, Talia, Tamarez e Vital;

2. na produção de vinho tinto é recomendadad a casta Moscatel-Roxo e são autorizadas as castas Castelão-Francês ou Periquita, Alforcheiro, Bastardo, Espadeiro e Monvedro.

A designação de «Moscatel de Setúbal» é usada quando esta casta contribui com, pelo menos, 85% para o mosto[173].

No processo de vinificação é seguido o método e prática de vinificação tradicional legalmente autorizados e que conduzem a vinhos de qualidade superior[173]. Na figura 1.9 apresenta-se o esquema que pretende ilustrar o processo de vinificação usado na região de Setúbal.

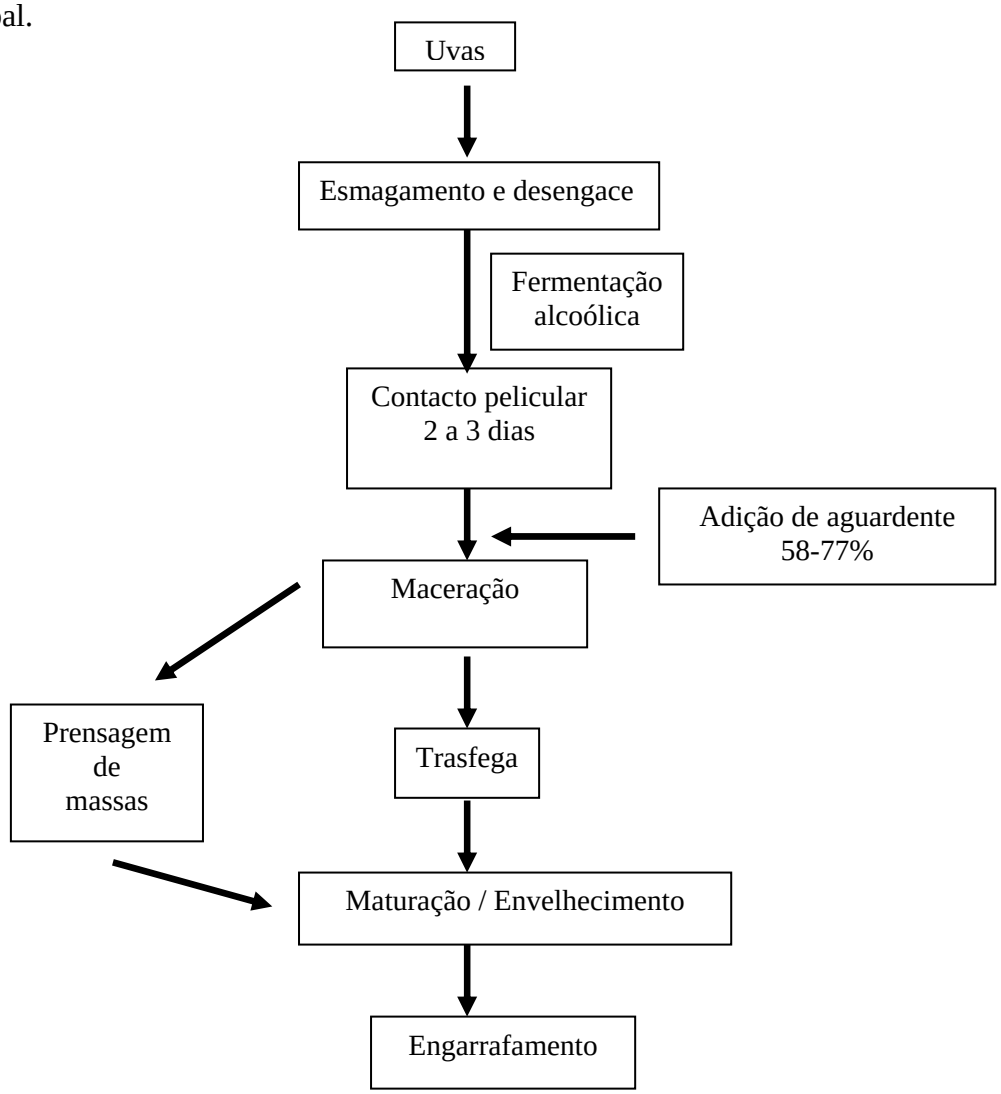


Figura 1.9. Esquema do processo de vinificação do vinho Moscatel de Setúbal

Após um período de maceração com contacto pelicular, o vinho é separado das massas e estas são prensadas de modo a obter-se o vinho «lágrima» que irá ser adicionado ao vinho resultante do processo de trasfega. O produto assim obtido poderá ser posteriormente armazenado em cubas de cimento revestidas a resina durante alguns meses sendo este processo denominado de maturação, ou poderá envelhecer em cascos de madeira de carvalho usada, onde estagia durante um período mínimo de 24 meses. Quando chega a altura do engarrafamento o vinho é previamente estabilizado pelo frio e filtrado e é efectuado um loteamento com vinhos da mesma colheita, de modo a harmonizar as suas características organolépticas.

Os vinhos com denominação de origem devem obrigatoriamente apresentar as seguintes características[173]:

1. o título alcoométrico volúmico adquirido deve estar compreendido entre 16.5% e 22% expresso em volume;
2. a acidez volátil deve apresentar valores máximos de 1.2 gL^{-1} para vinhos de idade igual ou inferior a 10 anos e de 1.5 gL^{-1} para vinhos com mais de 10 anos, ambos expressos em ácido acético, sendo admitida uma tolerância de 15% nestes limites para vinhos não engarrafados, em armazém;
3. os açúcares redutores, expressos em açúcar invertido, devem ter valores máximos de 200 gL^{-1} para vinhos de idade inferior ou igual a 20 anos e de 280 gL^{-1} para vinhos com mais de 20 anos.

Em relação às características organolépticas os vinhos devem obedecer a requisitos definidos pelo regulamento interno da Comissão Vitivinícola Regional da Península de Setúbal (CVRPS) quanto à cor, à limpidez, ao aroma e ao sabor[173]. A certificação da DOC Setúbal é feita pela CVRPS.

A vindima do ano de 2004, correspondente ao ano de colheita dos vinhos utilizados nos ensaios estudados neste trabalho: foi um bom ano de colheita pois os cachos estiveram sãos até à vindima e apresentaram teores adequados de açúcar e compostos fenólicos, bem como de acidez e cor. Foi um ano seco, em que choveu casualmente. O mês de Agosto apresentou temperaturas baixas e o regresso da chuva fez com que as vinhas não regadas completassem a maturação[175]. As uvas neste ano foram vindimadas no final de Setembro e a quantidade de uva, considerada de boa qualidade, em relação à média dos

últimos 5 anos foi de + 5% para os vinhos Moscatel[175]. De realçar que nos vinhos analisados durante o processo de vinificação a casta Moscatel contribuiu com 100%.

Caracterização de alguns produtores da região de Setúbal

O Marquês de Sabugosa, José Maria dos Santos, José Maria da Fonseca e Abel Pereira da Fonseca são nomes sobejamente conhecidos na região da Península de Setúbal e que estão relacionados com o vinho da região, já que prolongaram e engrandeceram a actividade vitivinícola que milhares de anónimos desenvolveram durante muitos séculos. Actualmente existem vários produtores nesta região que continuam com têm dado continuidade a esta tarefa.

Muitos são os produtores da região, mas na impossibilidade de abordar todos, vamos restringir-nos aos produtores cujos vinhos foram utilizados neste trabalho e que são apresentados na *tabela 1.4*.

A quantidade certificada para este tipo de vinho é de 1 250 000 litros e o vinho é praticamente todo consumido nas zonas de Setúbal e Lisboa sendo a sua exportação bastante reduzida [176,177].

Tabela 1.4. Caracterização de alguns produtores da região de Setúbal[175]

Código dos Produtores[a]	Início da actividade	Produção		Observações
		Total (L)	Vinho moscatel (%)	
ACP	1958	8 000 000	10	Tem vindo a actualizar a sua tecnologia, quer de fabrico quer de engarrafamento e actualmente é uma unidade certificadora.
ACA	1881	_____[b]	_____[b]	Empresa com uma longa história, que actualmente integra o grupo Enoport juntamente com as empresas Caves Velhas e Caves Dom Teodósio.
CASI		6 000 000	_____[b]	Nos últimos 15 anos a Cooperativa empreendeu uma estratégia sistemática de modernização e estabilização financeira com o objectivo de melhorar e valorizar os vinhos.
EOSF	1937	_____[b]	_____[b]	Iniciou a sua actividade com a comercialização de vinhos em barril, procurando sempre adaptar-se às condições e características do mercado, no entanto actualmente já não existe.
JMF	1834	5 500 000[c]	9-10	A empresa obedece a uma filosofia de permanente desenvolvimento o que leva a investir sempre em suportes de investigação e de produção, aliando as mais modernas técnicas ao saber tradicional.
HS	< 1900	220 000	18	Fundada por José Carvalho Simões, caracteriza-se por ser uma casa secular no sector vitivinícola. Em 2000 optou por engarrafar os seus produtos, introduzindo inovações nos métodos tecnológicos.
JP	1922	12 000 000	_____[b]	No decorrer da década de 80, criou um novo dinamismo, através da aposta nas mais modernas técnicas de viticultura e enologia
RV	1996	_____[b]	_____[b]	Sede na herdade de Rio Frio que tem como actividade principal a vinha e o vinho, há mais de 100 anos. A vinificação, o envelhecimento e o engarrafamento é feito nas adegas da Herdade.

Tabela 1.4. (continuação) Caracterização de alguns produtores da região de Setúbal

SSVP	1964	_____[b]	_____[b]	Continua a preparar o futuro apoiando-se nas novas tecnologias para poder responder às exigências do mercado.
VCL	1914	_____[b]	_____[b]	A constante actualização tecnológica em modernos equipamentos, aliada ao saber e métodos tradicionais, têm garantido aos seus produtos manterem as características regionais. Os investimentos actuais repartem-se pela técnica de produção, pelo estágio de vinhos em madeiras e outros aspectos.
XSS	1926	_____[b]	_____[b]	Em 1990 entrou no mercado dos vinhos engarrafados actualizando-se tecnologicamente

[a] Consultar apêndice A [b] não há informação [c] vinho branco e tinto do ano de 2006

1.4.2. A DOC Douro

É também reconhecida como denominação vinícola de origem a designação "Douro" e a região demarcada do Douro. Para os vinhos é a mesma região que se encontra demarcada para a produção do vinho do Porto e abrange os distritos, concelhos e freguesias, tradicionalmente agrupadas em três áreas geográficas: Baixo Corgo, Cima Corgo e Douro Superior. A denominação "Moscatel do Douro" deve ser utilizada para designar os vinhos licorosos com direito à denominação "Douro" e estes vinhos são elaborados tradicionalmente utilizando a casta Moscatel Galego e, desde que na sua preparação a referida casta entre com um mínimo de 85% estes podem ser comercializados fazendo referência à esta região do Douro[178].

Produção de vinho Moscatel do Douro

Na elaboração destes vinhos, devem seguir-se os métodos e práticas relativos aos vinhos de curtimenta. No vinho Moscatel de Favaios, produzido a partir da casta Moscatel Galego, tal como no vinho Moscatel de Setúbal dispõe-se de um tempo curto de fermentação. Esta ocorre com temperatura controlada (23 a 25ºC) durante 3 dias com contacto pelicular. A fermentação é interrompida com a adição de aguardente de forma a obter um vinho com cerca de 16.5 graus de álcool e com um elevado teor de açúcar. A aguardente, de origem vínica, deve ser utilizada para interromper a fermentação nas proporções adequadas à obtenção do grau de doçura desejado, não podendo ultrapassar as 130L de aguardente para 420L de mosto[181]. O vinho estagia no mínimo durante 18 meses a partir da data de elaboração, sendo depois engarrafado[178,179]. A certificação deste vinho é feita pelo Instituto de Vinhos do Douro e do Porto[180].

1.5. Objectivos do trabalho e delineamento experimental

O trabalho que se descreve teve como objectivo a caracterização química e funcional de Vinhos Moscatel Portugueses e como modelos foram utilizados vinhos provenientes de três produtores da região de Setúbal. Os produtores foram seleccionados tendo em conta o volume de produção de vinho Moscatel de Setúbal, optando-se por dois grandes produtores e um pequeno produtor da região.

Em face destes objectivos o trabalho experimental desenvolvido foi delineado da seguinte forma:

1- caracterização química de amostras de vinho Moscatel de Setúbal: esta fase do trabalho consistiu na implementação e optimização de métodos de pré-tratamento e análise de vinhos Moscatel, com vista à identificação e quantificação de compostos presentes nas amostras, utilizando técnicas separativas e métodos de avaliação da concentração total de compostos fenólicos. Estudaram-se preferencialmente as amostras obtidas nos 3 produtores seleccionados. A produção foi seguida durante 20 meses. Paralelamente foram efectuados alguns ensaios comparativos com amostras comerciais.

2- caracterização funcional de amostras de vinho Moscatel de Setúbal e extractos de pele de uva da casta Moscatel foi feita com base nos resultados obtidos para alguns testes químicos (DPPH; ORAC, FRAP, EPR) estudo de modelos *in vitro* (modelo Caco-2) e *in vivo* (avaliação da actividade anti-inflamatória em ratos de extractos de pele de uva). Foi dada alguma ênfase ao estudo dos extractos de peles de uvas dado que estas são muito importantes na produção destes vinhos e permitem diferenciá-los em termos de processamento de outros vinhos elaborados a partir de castas brancas, sendo as peles das uvas uma fonte importante de compostos fenólicos.

3- A fim de se obter uma imagem mais fiel daquilo que o consumidor poderá obter adquirindo vinhos no mercado, foram estudadas várias amostras comerciais com o objectivo de comparar os componentes que estão presentes e os resultados obtidos nos testes químicos para avaliação da actividade antioxidante (DPPH; ORAC, FRAP).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes

A água desionizada utilizada na preparação de reagentes, soluções e na diluição de amostras foi obtida com o equipamento MilliQ (Millipore, Bedford, EUA) e o valor da condutividade da água lida no aparelho era de 0.050 $\mu S.cm^{-1}$.

Solventes para LC

Acetonitrilo 99.9 % e metanol (grau *gradiente)*, acetato de etilo (grau de pureza 99.8 %), e dimetilsulfóxido (pureza ≥99.9%) da Lab-Scan (Dublin, Irlanda).

Acetonitrilo (grau LC-MS) da Riedel-de-Häen (Seelze, Alemanha), ácido *o*-fosfórico (grau de pureza 85%) e ácido fórmico (grau de pureza 98%) ambos *p.a.* e etanol absoluto (grau de pureza 99.5 %) da Panreac (Barcelona, Espanha).

Doseamento do teor em fenóis totais

Reagente Folin-Ciocalteu (2.0 N) e carbonato de sódio anidro 99.999 % da Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA).

Reacções de hidrólise enzimática

Na hidrólise enzimática utilizou-se hidróxido de sódio 0.10 N (Absolve) e β-glucosidase obtida a partir de amêndoas (20-40 unidades/mg de sólido) da Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA).

Testes de Actividade antioxidante

ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity): Fluoresceína dissódica (FL) da TCI Europe (Bélgica), dicloridrato de 2,2'-azobis- 2-amidinopropano (AAPH), da Fluka (Suiça).

DPPH (free radical scavenging capacity of 2,2,diphenyl-1-picrylhydrazyl): 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) da Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA) e metanol (grau gradiente) da Lab-Scan (Dublin, Irlanda*)*.

FRAP (*Ferric Reducing/Antioxidant Power*): Ácido 6-hidroxi-,5,7,8,tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) (grau de pureza 97%) da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), tampão de acetato trihidratado, (grau de pureza 99,5%) da Merck (Alemanha), ácido fórmico *p.a* (grau de pureza 98%) da Panreac (Barcelona, Espanha), 2,4,6-Tris(2-iridil)-5-triazine (TPTZ) (grau de pureza 98%) da Sigma (Alemanha), cloreto de ferro hexahidratado (grau de pureza 97%) da Sigma, (Alemanha) e ácido clorídrico (grau de pureza 37%) da Fisher (REINO UNIDO).

Ensaios de EPR (ressonância paramagnética electrónica): Peróxido de hidrogénio *p.a.* (pureza ≥ 30%) da Fluka (Espanha), o N-óxido de 5,5-dimetilpirrolina DMPO (pureza> 97%) da Sigma (Alemanha), sulfato de ferro (II), (pureza > 99.5%) da Merck (Alemanha) e tampão de fosfato (PBS) de pH=7.4 da Sigma (Alemanha).

Ensaios in vitro

Teste Anti-proliferativo: As células HT29 foram fornecidas pela American Type Culture Collection (ATCC, EUA). Usou-se o meio de cultura RPMI 1640 da Gibco Invitrogen (EUA) suplementado com L-glutamina e com 10% de soro de bovino fetal (FBS) da Gibco Invitrogen (EUA). Utilizou-se o kit dos ensaios antiproliferativos, CyQUANT (Invitrogen, Molecular Probes, EUA).

Estudos de Transporte em células Caco-2: As células Caco-2 foram fornecidas pela DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). Usou-se o meio de cultura RPMI 1640 da Gibco Invitrogen (EUA) suplementado com L-glutamina e com 10% de soro de bovino fetal (FBS) da Gibco Invitrogen (EUA) e CellTiter 96_ AQueous Assay da Promega (Madison, WI, EUA).

Meio HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) constituído por cloreto de cálcio (grau de pureza 95%) da Labsolve (distribuído por José Manuel Gomes dos Santos, Lda), cloreto de potássio (grau de pureza 99.5%) da Riedel-de-Haën (Seelze, Alemanha), dihidrogenofosfato de potássio (pureza ≥95%) da Riedel-de-Haën (Seelze, Alemanha), cloreto de magnésio (pureza ≥98%) da Merck (Darmstadt, Alemanha), sulfato de magnésio (grau de pureza ≥99.5%) da May & Baker (Dagenhan, Reino Unido), cloreto de sódio (pureza ≥99.5%) da Fluka (Buchs, Suiça), hidrogenofosfato de sódio (pureza ≥ 99%) da Riedel-de- Haën (Seelze, Alemanha), hidrogenocarbonato de sódio (grau de

pureza 99.95 %) da Fisher Scientific Ltd. (Loughborough, Reino Unido) e D-glucose (pureza ≥99%) da Fluka (Buchs, Suiça).

O dimetilsulfóxido (pureza ≥99.9%) é proveniente da Lab-Scan (Dublin, Irlanda).

2.2. Padrões

Ensaios de identificação e quantificação por LC

Os padrões: ácido gálhico, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), furfural, ácido protocatechuico, catequina, epicatequina, galhato de etilo, quercetina-3-*O*-glucósido, ácido *p*-cumárico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido cafeico, ácido ferúlico, campferol, *t*-resveratrol, vanilina e quercetina eram da Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA) e da Aldrich-Chemie (Steinheim, Alemanha): Foram preparadas soluções-mãe em metanol (10000 mgL^{-1}) excepto para o *t*-resveratrol (1000 mgL^{-1}) e o cafeato de etilo (Cymit Química SL, Barcelona, Espanha) (1000 mgL^{-1}). Todas as soluções-mãe foram armazenadas à temperatura de -20 ºC. Soluções diluídas foram preparadas com água desionizada.

Traçado de espectros de absorção e de emissão do t-resveratrol

Preparou-se uma solução 1.0 mgL^{-1} em *t*-resveratrol a partir da solução-mãe 1000 mgL^{-1}, por diluição com solução constituída por eluentes empregues na fase móvel utilizada na análise por LC: 35% de ácido *o*-fosfórico 0.1 % e 65% de ácido *o*-fosfórico:acetonitrilo:água (1:400:599 v/v/v). Esta solução foi utilizada para traçar os espectros de absorção e de emissão.

Doseamento do teor em fenóis totais

Preparou-se uma solução-mãe de ácido gálhico 100 mgL^{-1} em metanol e a partir desta prepararam-se soluções com diferentes concentrações (0.2-5.0 mgL^{-1}) em água desionizada.

Testes de actividade antioxidante

Método DPPH: preparou-se uma solução de DPPH na concentração de 24 mgL^{-1} em metanol.

Método ORAC: misturou-se 6.3×10^{-8} $molL^{-1}$ de FL e 1.28×10^{-2} $molL^{-1}$ de AAPH em tampão fosfato 75 mM (pH=7.4).

Método FRAP: preparou-se uma solução de Trolox na concentração de 100 mgL^{-1} em metanol e a gama de concentrações utilizada para curva de calibração foi de 0.5 a 4 mgL^{-1}, após diluição em água desionizada.

2.3. Amostras e sua preparação

As amostras de **vinho Moscatel** usadas neste trabalho tiveram diferentes proveniências:

1. foram obtidas em três produtores da região de Denominação de Origem Controlada (DOC) de Setúbal sendo dois deles considerados grandes produtores (A e B) e o outro um pequeno produtor (C) com empresa de características familiares;

2. os vinhos estudados nos ensaios de vinificação foram produzidos durante a vindima de 2004 e as amostras foram recolhidas mensalmente. Do produtor A e B recolheram-se amostras de 3 cubas diferentes (1, 2 e 3) e do produtor C apenas de duas cubas (1 e 2).

Na tabela 2.1 apresenta-se a identificação das amostras recolhidas. As amostras estão identificadas pela letra correspondente ao produtor e mês da colheita que poderá corresponder a diferentes fases do processo de vinificação. Por exemplo, a amostra do ensaio de vinificação C_3 é uma amostra do produtor C recolhida ao fim de 3 meses após o início da vinificação, o que corresponde à fase de maceração (M).

Tabela 2.1. Identificação das amostras dos ensaios de vinificação

Produtor	Maceração (M) (meses)	Maturação (Mt) (meses)	Envelhecimento (meses)
A	1 - 5	6 - 17	18 - 20
B	1 - 4	5 - 20	--------
C	1 - 8	9 - 20	--------

3. Foram também analisados vinhos Moscatel de Setúbal comerciais (60) cedidos pela Comissão Vitivinícola Regional da Península de Setúbal (CVRPS) de 13 produtores diferentes (HS, ACP, JMF, JPV, CCASI, VCL, RV, JDR, SSVP, ACA, SARF, EOSF e XSS). Na tabela AI do apêndice A apresenta-se a caracterização destas amostras, assim

como das amostras adquiridas no supermercado. A identificação é feita com letras e 3 digitos, como por exemplo JMF206.

As **uvas Moscatel** utilizadas são provenientes das três empresas identificadas como A, B e C e correspondem à vindima de 2007.

As amostras de vinho Moscatel e os extractos de peles de uvas Moscatel analisados pelo método Folin-Ciolcateu foram diluídas (1/5, 1/10 e 1/20) com água desionizada.

As amostras de vinho Moscatel para análise por LC foram filtradas por membranas 0.45 μm da Millipore.

2.4.Preparação de extractos de vinhos

Para a análise por LC procedeu-se à preparação de extractos de vinhos em que se sujeitaram as amostras à extracção líquido-líquido com acetato de etilo (**1**) e à extracção em fase sólida (SPE) (**2**):

(1) A amostra de vinho (10 mL) foi evaporada no rotavapor à temperatura de 35ºC, até aproximadamente metade do seu volume, para remover totalmente o etanol. Posteriormente procedeu-se à extracção com 4×7 mL de acetato de etilo. A separação de fases foi efectuada em ampola de decantação. Após as extracções, o extracto total de acetato de etilo foi evaporado sob pressão reduzida à temperatura de 35ºC. O resíduo obtido foi dissolvido em 250 μL de mistura metanol/água (6/4)[181]. Na figura 2.1 apresenta-se o esquema do procedimento.

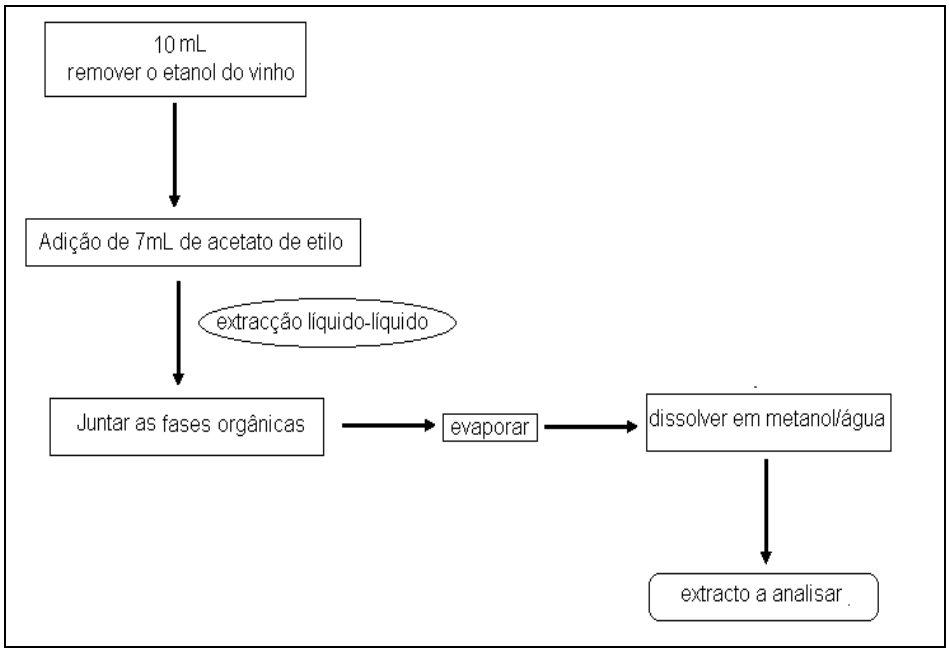


Figura 2.1. Preparação de extractos: extracção líquido-líquido com acetato de etilo

(2) A amostra de vinho (25 mL) de vinho foi evaporada no rotavapor à temperatura de 35ºC, até 12 mL para remover totalmente o etanol e seguidamente aplicou-se no "cartridge" LC-18 (Supelclean, Supelco, EUA). A amostra foi eluída com 20 mL de água e a fracção recolhida que continha os compostos não retidos (por exemplo açúcares e ácidos) foi desprezada. Em seguida procedeu-se à eluição com 25 mL de uma solução metanólica a 30% (fracção **A**), este procedimento foi repetido e juntaram-se as fracções recolhidas. A fracção B foi eluída com 25 mL de metanol e repetiu-se o processo. Evaporaram-se as fracções A e B a pressão reduzida e o resíduo obtido foi dissolvido em 250 µL de uma solução metanol:água desionizada (1:1). Na figura 2.2 apresenta-se o esquema do procedimento.

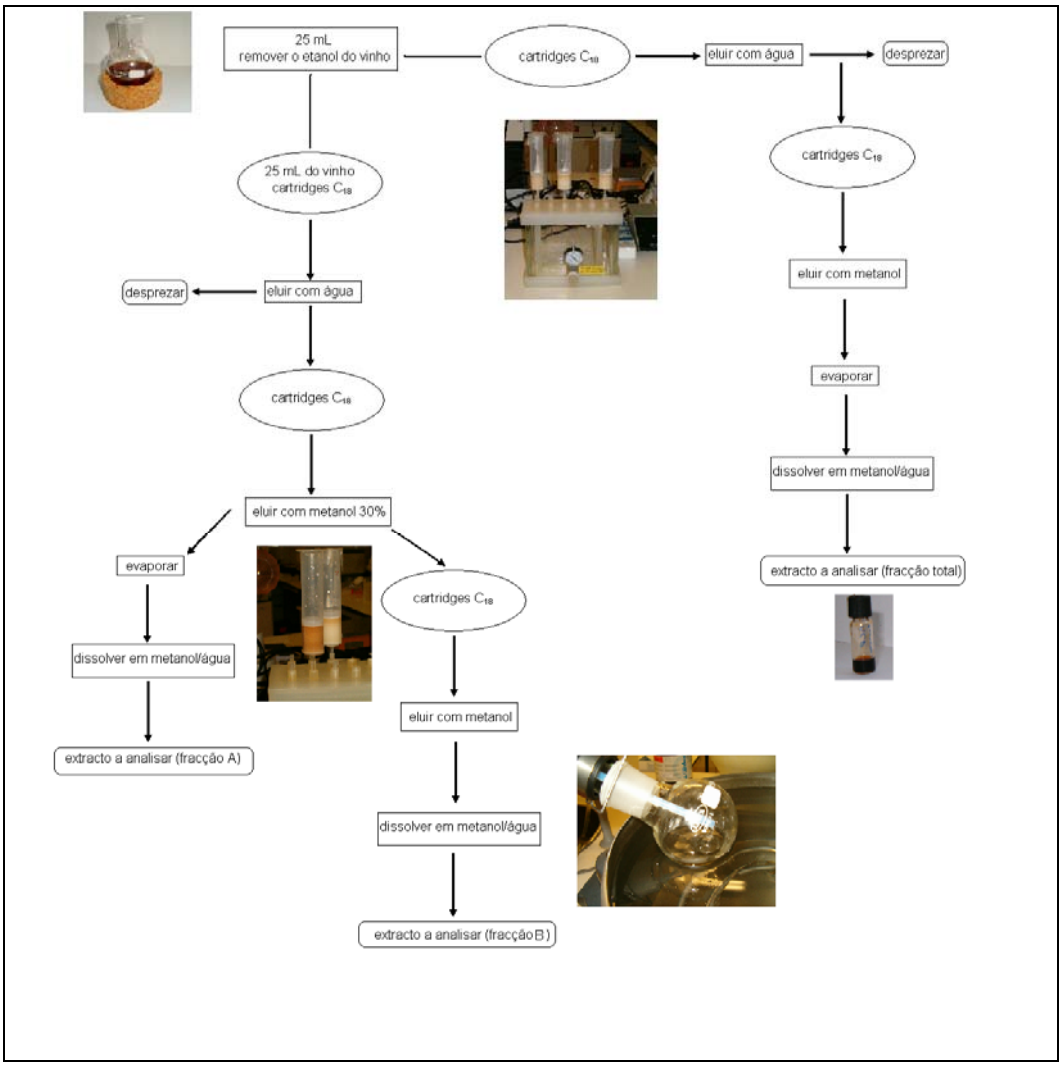


Figura 2.2. Preparação de extractos: extracção em fase sólida

Nas situações em que não se pretendia fraccionar a amostra mas somente retirar açúcares e outros compostos interferentes de tempo de retenção curto, procedeu-se numa primeira fase a eluição com água (20 mL), seguida da eluição com 25 mL de metanol e repetiu-se o procedimento. As fracções metanólicas recolhidas foram evaporadas e o resíduo dissolvido numa solução metanol:água desionizada (1:1)[182].

Para os ensaios da actividade biológica (testes ORAC, EPR, anti-proliferativos e com o modelo celular Caco-2) os extractos também foram preparados segundo o esquema apresentado na figura 2.2 mas o resíduo foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO).

Os extractos de peles da uva Moscatel foram preparados segundo duas metodologias, consoante o tipo de análise a ser efectuada posteriormente:

(1) Análise por LC[153]

Separaram-se manualmente as peles e as grainhas, pesou-se e procedeu-se à extracção com 30 mL de metanol durante 30 min (figura 2.3). Este procedimento foi repetido 4 vezes e as soluções foram misturadas, filtradas e evaporadas a pressão reduzida de forma a obter 2 mL de extracto em metanol.

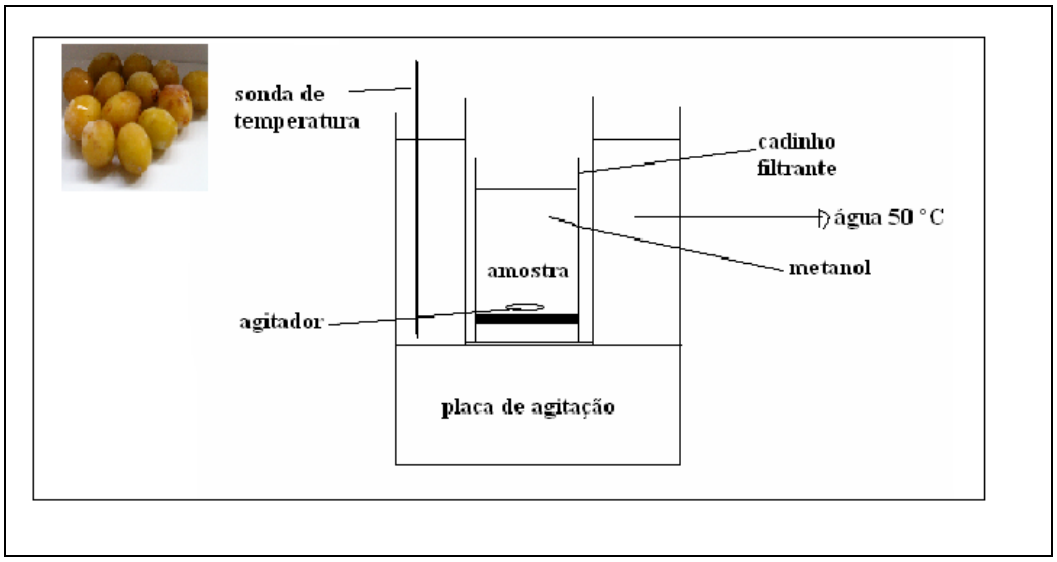


Figura 2.3. Preparação de extractos de peles de uva Moscatel para análise por LC[155]

(2) ***Ensaios in vivo,*** método de preparação adaptado de Ahna[183] *et al.,* (2002): separaram-se manualmente as peles, pesaram-se e fez-se a extracção com diferentes soluções de etanol 25, 50, 75 e 100% (V/V), durante 4 h com uma

agitação de 130 rpm, para escolher qual a solução extractante mais adequada. Usou-se um volume de 50 mL por cada 10 g de peles. Determinou-se o teor de fenóis totais nas 4 soluções e optou-se pela solução extractante que permitia obter uma maior concentração de compostos fenólicos.

2.5. Análise por Cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de díodos e de espectrometria de massa

2.5.1 Equipamento e condições de análise

As amostras em estudo foram analisadas num equipamento Surveyor-Thermo Finnigan (San José C.A., EUA) associado a um detector de díodos (Thermo Finnigan—Surveyor, San Jose, CA, EUA) e a um espectrómetro de massa LCQ Advantage da Thermo Finnigan, equipado com um analisador de armadilha de iões (ion trap) e com duas fontes de ionização: electrospray (ESI) e ionização química à pressão atmosférica (APCI). Recorreu-se ao software Xcallibur (versão 1.3, Thermo Finnigan-Surveyor) para o controle e análise dos resultados (figura 2.4).

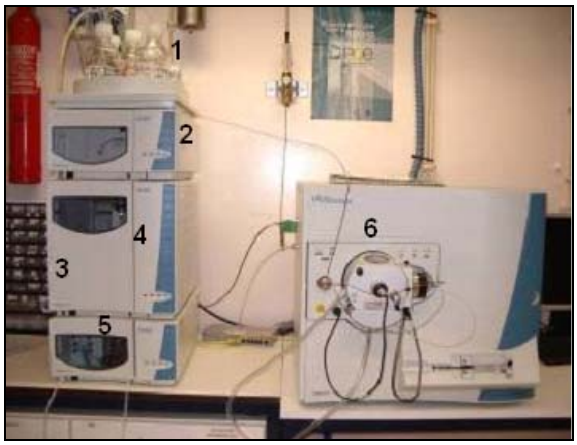


Figura 2.4. Equipamento LC Surveyor- Termo Finnigan e Espectrómetro de Massa *LCQ ion trap* (Thermo Finnigan, San José C.A., EUA). **Legenda**: **1-** Sistema de eluentes; **2-** Detector de Díodos; **3**-Amostrador; **4-** Forno e Coluna; **5-** Bomba; **6-** Espectrómetro de Massa

2.5.2 Condições de análise

As amostras foram injectadas utilizando um "loop" de 20 μL. A fase móvel era constituída por dois eluentes: eluente A – água: ácido fórmico (99.5:0.5) e o eluente B – água:acetonitrilo:ácido fórmico (59.5:40.0:0.5).

Na análise do *t*-resveratrol utilizou-se o programa de eluentes apresentado na tabela 2.2 e um fluxo de 250 μLmin^{-1}. Utilizou-se uma coluna da Thermo RP-18 (5 μm 100×2.1 mm *i.d.*) e uma pré-coluna com o mesmo enchimento, à temperatura de 35ºC.

Tabela 2.2. Programa de eluentes usado na análise por LC-MS (Surveyor-Thermo Finnigan) para analisar o *t*-resveratrol

Tempo de análise (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0-4	85	15
4-20	85-60	15-40
20-30	60-45	40-55

Na identificação de outros compostos fenólicos a separação foi efectuada a 35ºC com uma coluna LiChrospher RP-18 (5 μm, 250×4 mm *i.d.*) da Merck e estava instalada uma pré-coluna com o mesmo tipo de enchimento. Utilizou-se o programa de eluentes apresentado na tabela 2.3., sendo o fluxo da fase móvel 700 μLmin^{-1}.

Tabela 2.3. Programa de eluentes usado na análise por LC-MS (sistema Surveyor-ThermoFinnigan)

Tempo de análise (min)	Eluente B (%)
0-15	0-20 (gradiente linear)
15-25	20
25-70	20-70 (gradiente linear)
70-75	70
75-85	70-100 (gradiente linear)
85-100	100
100-101	0
101-110	0

Na tabela 2.4 apresentam-se as condições de operação do espectrómetro de massa usadas na identificação dos compostos fenólicos e do *t*-resveratrol.

Tabela 2.4. Condições de análise do espectrómetro de massa para as duas fontes de ionização em modo positivo e negativo

	APCI				ESI	
	t-resveratrol		Outros compostos		Outros compostos	
	positivo	negativo	positivo	**negativo**	positivo	negativo
Temperatura de vaporização (ºC)	**470**	470	465	**465**		
Intensidade de corrente (μA)	**5.00**	5.00	5.00	**10.00**	80.00	80.00
Voltagem da fonte (kV)	**6.00**	6.00	6.00	**6.00**	3.70	3.00
Voltagem do capilar (V)	**10.00**	-8.00	16.00	**-20.00**	3.00	- 24.00
Temperatura do capilar (ºC)	**175**	175	200	**200**	280	280
Fluxo do gás "sheath" (unidades arbitrárias)	**80**	80	80	**80**	80	80
Fluxo do gás auxiliar (unidades arbitrárias)	**20**	20	20	**20**	20	20

Na selecção da fonte de ionização para identificação do *t*-resveratrol e de outros compostos fenólicos o sinal do espectrómetro foi optimizado ("Tune") para um determinado valor de *m/z* e a gama de massas adquiridas ao longo do tempo de análise também variou (tabela 2.5).

Tabela 2.5. Optimização das condições de análise para identificação do *t*-resveratrol e outros compostos

	Modo	Segmento	Tempo (min)	"Tune" *m/z*	Massas adquiridas *m/z*
APCI[b]	positivo	1	0-115	229	100-1000
	negativo	1	0-115	435	100-1000
ESI	positivo	1	0-115	229	100-1000
	negativo	1	0-115	435	100-1000
APCI	positivo	1	0-30	229	228-230[a]
APCI	negativo	1	0-45	289	80-2000
		2	45-115	463	80-2000

[a] modo SIR

Após a selecção da fonte de ionização e da polaridade na análise do *t*-resveratrol, as análises foram efectuadas nas condições destacadas na tabela 2.4. A energia de colisão usada na fragmentação MS^2 e MS^3 foi de 35% e 40% respectivamente.

Um equipamento Waters Alliance (2695 LC Pump e Waters996 PDA) também foi utilizado na identificação e quantificação de compostos. O volume de injecção das amostras foi de 4 μL e a fase móvel era constituída por dois eluentes: eluente A (solução aquosa de ácido fórmico 0.1%) e eluente B (acetonitrilo). A separação dos compostos na coluna LiChrospher RP-18 (5 μm, 250×4 mm *i.d.*) da Merck foi efectuada a 35ºC. O fluxo da fase móvel era de 300 $\mu Lmin^{-1}$. Na análise utilizou-se o programa de eluentes apresentado na tabela 2.6.

Tabela 2.6. Programa de eluentes usado na análise por LC-MS no equipamento Waters Alliance

Tempo de análise (min)	**Eluente B (%)**
0-10	5-80 (gradiente linear)
10-12	80
12-15	5

As condições de operação da fonte ESI no espectrómetro de massa foram:

Voltagem do Capilar= 3 KV; Voltagem do cone= 32 V;

Temperatura de fonte = 120 ºC; Temperatura de Desolvatação = 350 ºC;

Fluxo do gás no cone= 50 Lh^{-1}; Fluxo do gás de desolvatação = 750 Lh^{-1}

Potencial das lentes= 0.5 V

2.6. Análise por Cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de díodos, fluorescência e electroquímico

2.6.1. Equipamento

A análise foi executada com o equipamento Surveyor-Thermo Finnigan equipado com 3 detectores em série: detector de díodos (Surveyor-Thermo Finnigan—Surveyor, San Jose, CA, EUA), detector electroquímico (Dionex, ED 40) e na detecção por fluorescência foram usados dois detectores: Shimadzu, (RF-535) e Thermo Finnigan (FL 3000).

2.6.2. Condições de análise

As amostras foram injectadas utilizando um "loop" de 20 µl. A fase móvel era constituída pelo eluente A – água: ácido ortofosfórico (99.9:0.1) e pelo eluente B – água:acetonitrilo:ácido ortofosfórico (59.9:40.0:0.1). O fluxo dos eluentes era de 700 $\mu Lmin^{-1}$ e a separação foi feita à temperatura de 35ºC. Na análise, utilizou-se o programa de eluentes apresentado na tabela 2.3.

A detecção com o DAD foi efectuada entre 200-600 nm, com uma aquisição mais rápida a diferentes c.d.o. seleccionados (254, 272, 280, 306, 320 ou 324 nm) consoante o(s) composto(s) a analisar. O detector de fluorescência Thermo Finnigan (FL 3000) estava equipado com uma lâmpada de xénon que emite nos comprimentos de onda 200-650 nm. Os comprimentos de onda seleccionados para excitação (λ_{ex}) e de emissão (λ_{em}) variaram de acordo com o objectivo da análise: quando se queria ter uma ideia sobre todos os compostos presentes na amostra utilizou-se o λ_{ex} = 280 nm e λ_{em} = 320 nm, para compostos específicos utilizaram-se os c.d.o. mais adequados a cada um deles, conforme se apresenta na tabela 2.7.

Tabela 2.7. Comprimentos de onda de excitação (λ_{ex}) e de emissão (λ_{em}) adequados à identificação e quantificação de alguns compostos fenólicos

Composto	λ_{ex}	λ_{em}
t-resveratrol	300[a]	390[a]
c-resveratrol	260	400
t-piceid	290	390
c-piceid	260	400
galhato de etilo	272[a]	374[a]
cafeato de etilo	324[a]	442[a]
outros compostos fenólicos	280	320

[a] ver *2.7.*

O detector electroquímico tinha na sua constituição um eléctrodo de carbono vítreo e efectuava medições de sinal por voltametria integrada na gama de potenciais entre -1.0 V a 1.0 V com um varrimento no tempo de 1.00 s.

Os resultados obtidos com o detector de fluorescência e electroquímico foram adquiridos à frequência de 50 Hz com um conversor analógico/digital utilizando o programa 4880 da Unicam. No detector de díodos usou-se o sistema de controlo e

aquisição de dados Chromquest versão 4.0 (Thermo Finnigan-Surveyor, San José, CA, EUA).

2.7. Traçado dos espectros de absorção e de emissão

Os espectros de absorção do *t*-resveratrol (1.0 mgL^{-1}), cafeato de etilo (1.0 mgL^{-1}) e galhato de etilo (2.0 mgL^{-1}) foram obtidos com um espectrofotómetro Beckmann DU-70 da Beckman Instruments, Inc. (Fullerton, EUA). O espectro de emissão das mesmas soluções foi obtido num espectrofluorímetro (SLM Aminco,EUA) equipado com a lâmpada de Xenon (Muller Elektronik Optic). Para o traçado dos espectros foram usadas células de quartzo de 1 cm de percurso óptico.

Os espectros de absorção das soluções padrão de t-resveratrol foram traçados na gama de c.d.o. 250 a 400 nm. No traçado do espectro de emissão utilizou-se o comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) de 300 e 306 nm. Para o galhato de etilo os valores de λ_{ex} foram 272 nm e de 293 e 325 nm para o cafeato de etilo. As fendas de excitação foram ajustadas de modo a proporcionar uma banda de 8 nm. A aquisição de dados foi efectuada com o software Model 8100 Spectrofluorometer versão 4.20 1998 Spectronic Instruments, Inc.

2.8. Análise do teor em fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu

Espectrofotómetro Beckmann DU-70 da Beckman Instruments, Inc. (Fullerton, EUA) e células de vidro ou de plástico de 1 cm de percurso óptico.

Foi usado o método do índice de Folin-Ciocalteu[159]: o desenvolvimento da reacção realiza-se a frio, durante 30 min, com leituras espectrofotométricas a 750 nm. As amostras e as soluções padrão foram preparadas e analisadas em triplicado.

2.9. Ensaios de hidrólise enzimática de amostras de vinho [184]

Mediu-se 5 mL de vinho e o valor de pH foi ajustado a 6.0 com solução de NaOH (0.1 N). Posteriormente adicionou-se 5 mg de β-glucosidade (1 mg/mL) e incubou-se durante 9 horas à temperatura de 50ºC. Findo este tempo, colocou-se a amostra em gelo para parar a reacção. Filtrou-se a amostra (membrana Millipore 0.45 μm) e analisou-se por LC tendo em conta as condições de análise e o equipamento mencionado em *2.6.*

2.10. Ensaios de avaliação da Actividade Antioxidante pelos métodos: DPPH, ORAC e FRAP

Método DPPH[185]*:* Em 2 mL de solução metanólica de DPPH (24 mgL-1), foram adicionados 50 µL de amostra e a absorvância foi lida de imediato a 517 nm. Após 16 minutos de reacção fez-se novamente a leitura da absorvância. Neste teste usou-se o metanol como branco.

A percentagem de inibição do radical DPPH pelas amostras foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{Absorvância_{16\,min} - Absorvância_{0\,min}}{Absorvância_{0\,min}} \times 100$$

em que $Absorvância_{0min}$ é a absorvância ao tempo zero e $Absorvância_{16min}$ é a absorvância após 16 minutos[192]. Todas as análises foram efectuadas em triplicado.

Método ORAC[186]*:* Neste método, utilizou-se uma mistura de 6.3×10^{-8} M de FL, 1.28×10^{-2} M de AAPH em 75 mM de um tampão fosfato (pH=7.4) e uma amostra diluída (1/250, 1/500 e 1/1000) com água até ao volume de 200 µL. A mistura é colocada na célula à temperatura de 37ºC e a reacção é iniciada quando se adiciona AAPH. A fluorescência emitida é medida em cada min durante 30 min para λ_{em}=515 nm e λ_{ex}=493 nm. O tampão fosfato foi usado como branco e o Trolox em concentrações 10, 20, 30, 40 e 50 µmolL^{-1} foi usado como padrão de calibração. Todas as amostras, branco e padrão de controlo foram analisadas em triplicado. O valor, expresso em equivalentes de Trolox (µmol $TEACL^{-1}$), foi determinado através da equação em que se relaciona a concentração de Trolox e a curva correspondente ao decaimento da área da FL.

Método FRAP[187]*:* Para efectuar as determinações, foram adicionados 100 µL de amostra diluída (1/20) com água desionizada, a 3 mL de reagente FRAP (25 ml de tampão acetato, 300 mmolL^{-1} a pH 3.6 (o pH foi estabilizado com ácido fórmico, 98%) + 2,5 mL de TPTZ, 10 mmolL^{-1} em HCl, 40 mmolL^{-1} + 2,5 ml de $FeCl_3.6H_2O$, 20 mmolL^{-1}) e o reagente FRAP foi utilizado como branco. Os resultados são expressos em mg de equivalentes de Trolox por 1000 mL de amostra (mg TEAC L^{-1}). Todas as análises foram feitas em triplicado e as absorvâncias foram lidas a 593 nm, ao fim de 10 minutos, porque a este comprimento de onda o Fe(II)-TPTZ tem coloração azul intensa.

No método DPPH e FRAP foi utilizado o espectrofotómetro Beckmann DU-70 da Beckman Instruments, Inc., (Fullerton, EUA) e células de vidro ou de plástico de 1 cm de percurso óptico. No método ORAC foi usado um fluorímetro de microplaca FL800 (Bioteck Instruments, EUA).

2.11. Teste de Oxidação da LDL[188]

Uma solução de lipoproteína de baixa densidade, (Sigma, EUA), em NaCl (0.15 $molL^{-1}$) e EDTA (0.01%) a pH 7.4 foi eluída numa coluna PD-10 (Amersham Biosciences, Alemanha) para remover o EDTA. Utilizou-se o reagente de Bradford (Sigma, EUA) para determinar o teor total em proteína das fracções eluídas de LDL e a albumina (Sigma, EUA) foi usada como padrão. Incubou-se a proteina LDL (0.1 $mgmL^{-1}$) com os extractos de vinho Moscatel preparados (fracção B) e 500 μM do radical, α'-cloreto de 2,2'azobis 2-metilamidinopropano, AAPH (Sigma, EUA) numa célula de quartzo a 37ºC durante 10 h.

A absorvância a 234 nm foi lida no espectrofotómetro ThermoSpectronic Genesys10uv (Thermo, San José C.A., EUA))

2.12. Análise por ressonância paramagnética electrónica (EPR)[189]

Os ensaios foram efectuados à temperatura ambiente e à pressão atmosférica. Os radicais hidroxilo, $HO^{\bullet}$, foram produzidos pela adição de 100 μL da solução de água oxigenada em água (10mM) a uma solução contendo 100μL de DMPO (48 mM) e 100 μL de sulfato de ferro II (2mM em PBS, pH 7.4). Em seguida 100 μL de extractos de vinho Moscatel foram adicionados ao sistema. No ensaio de controlo utilizou-se 100 μL de DMSO. A formação dos radicais foi seguida pela medição da intensidade do espectro de DMPO/ $HO^{\bullet}$ registado 3 min após se ter iniciado a reacção. Todos os ensaios foram repetidos 2 vezes. Todas as medidas de EPR foram efectuadas no espectrómetro EPR (Bruker EMX6/1, 1998).

2.13. Testes in vitro para avaliação da actividade anti-proliferativa

2.13.1 Condições de cultura das células

As células HT29 (linhagem de células do carcinoma do colorectal humano) foram obtidas a partir American Type Culture Collection (ATCC, EUA). As células foram mantidas e desenvolvidas em frascos de cultura de 175 cm^3 à temperatura de 37ºC numa atmosfera de 5% de CO_2 num meio de crescimento constituído por RPMI 1640 (Gibco), suplementado com L-glutamina e com 10% de soro de bovino fetal (FBS) (Gibco).

2.13.2. Ensaios anti-proliferativos

As células HT29 (1×10^4células/poço) foram colocadas em placas de 96 poços. Após 24 h, as células foram incubadas com extractos de vinho Moscatel (concentração de compostos fenólicos expressa em ácido gálhico: 15, 31, 62, 125 e 250 mgL^{-1}) diluído 0.5% no meio de cultura de FBS durante 48 h. No fim do período de incubação, o meio foi trocado e as células foram cuidadosamente lavadas com solução tampão de fosfato (PBS) congeladas em microplacas a 70ºC. A viabilidade celular foi medida usando o kit dos ensaios antiproliferativos, CyQUANT (Invitrogen, Molecular Probes, EUA). As microplacas foram descongeladas à temperatura ambiente e 200µL of CyQUANT GR foi adicionada a cada poço no escuro. A fluorescência foi medida na microplacaao fim de 5 min para λ_{ex}=480 nm e λ_{em}=520 nm, usando um fluorímetro (modelo Cary Eclipse, Varian). Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.14. Modelo de transporte in vitro: ensaio com células Caco-2

2.14.1. Preparação de soluções

Para o teste de citotoxicidade prepararam-se extractos das amostras de vinho dos três produtores diluídos no meio de cultura RPM 1% de FBS com as concentrações de: 31, 63, 125, 250, 500, 1000 e 2000 mgL^{-1} expressas em ácido gálhico. A percentagem de DMSO na solução era 5%. No estudo do transporte foram preparados os extractos com a concentração de 1000 mgL^{-1} no meio de transporte HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). Os extractos e o meio de transporte foram filtrados com filtro PALL de 0.2 µm.

2.14.2. Condições de cultura das células

As células Caco-2 (linhagem de células do carcinoma do colorectal humano) foram obtidas na DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). As células foram mantidas e desenvolvidas em frascos de cultura à temperatura de 37ºC numa atmosfera de 5% de CO_2 num meio de crescimento constituído por RPMI 1640, suplementado com L-glutamina e com 10% de soro de bovino fetal (FBS).

2.14.3. Testes de citotoxicidade

As células Caco-2 (1×10^5células/cm^2) foram colocadas em placas de 96 poços, contendo 200 μL de meio de cultura e incubadas a 37ºC e 5% de CO_2 até se formar uma monocamada de células. Após este período procedeu-se aos testes de citotoxicidade. O meio de cultura foi substituído por 200 μL de extracto diluído no meio de cultura, tendo-se em seguida incubado na estufa à temperatura de 37ºC com 5% de CO_2 durante 2 h. Ao fim deste tempo retirou-se o meio com os extractos, sendo este substituído por meio de cultura e seguidamente adicionou-se 20 μL da solução combinada de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonatofenil)-2H-tetrazolio(MTS)/ metilsulfato de fenazónio (PMS). Incubou-se novamente à temperatura de 37ºC com 5% de CO_2 e registou-se a absorvância a 490 nm ao fim de 30, 60 e 120 min. Antes de cada leitura, as placas foram agitadas durante 5 minutos e a viabilidade das células (%) foi calculada com base na seguinte expressão:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{Absorvância_{média}}{Absorvância_{controlo}} \times 100$$

2.14.4. Estudos de transporte

No estudo de transporte as células cresceram nos em *inserts* Transwell (membrana de policarbonato de 12 mm de diâmetro, 0.4 μm de tamanho do poro, Corning Costar, NY) até à densidade de 1.0×10^5 célulascm^{-2}. Os *inserts* foram colocados em placas de 12 poços contendo o meio de cultura. Estes ensaios foram realizados à temperatura de 37ºC em que se substituiu o meio de cultura pelo meio de transporte, HBSS. As células foram lavadas 2 vezes com HBSS (figura 2.5) antes de cada ensaio e os extractos das amostras (1000 mgL^{-1}) foram preparados no meio de transporte por diluição a partir de soluções-mãe e foram adicionados aos compartimentos apical e ou basolateral. As amostras

foram recolhidas do compartimento aceitador (200 µL), para tempos que variaram entre 10 a 120 min, substituindo-se sempre por igual volume de HBSS. Os ensaios foram realizados em triplicado.

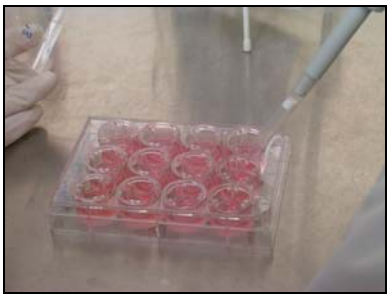


Figura 2.5. Lavagem das células com o meio de transporte HBSS

A percentagem do composto transportado, para os vários tempos, foi calculada a partir da área do pico detectado no cromatograma obtido por LC-DAD-FD-ED (ver *2.6)*

Na tabela 2.8 exemplificam-se os cálculos para o compartimento basolateral (V= 1.5 mL):

Tabela 2.8. Cálculos para determinar a percentagem do composto transferida para o compartimento aceitador (AP→BL)[a]

Tempo (min)	Percentagem do composto transferida no sentido AP→BL (%)
10	$[(A_{10}\times 0.0015)/ (A_{\text{dadora (120 min)}} \times 0.0005)] \times 100$
30	$[(A_{30}\times 0.0015)+ (A_{10}\times 0.0002)/ (A_{\text{dadora (120 min)}} \times 0.0005)] \times 100$
60	$[(A_{60}\times 0.0015)+ (A_{30}\times 0.0002) + (A_{10}\times 0.0002) / (A_{\text{dadora (120 min)}} \times 0.0005)] \times 100$
120	$[(A_{120}\times 0.0015)+ (A_{60}\times 0.0002) + (A_{30}\times 0.0002) + (A_{10}\times 0.0002) / (A_{\text{dadora (120 min)}} \times 0.0005)] \times 100$

[a] Na determinação da percentagem do composto no sentido (BL→AP) o compartimento da solução aceitadora tem um volume de 0.0005L e o da solução dadora 0.0015L

A permeabilidade dos compostos (cms^{-1}), foi calculada tendo em conta a equação:

$$\text{Papp} = \frac{J}{A_s C_0}$$

em que J é a velocidade de aparecimento do composto no compartimento aceitador, A_S a área da célula e C_0 a concentração inicial no compartimento apical. A velocidade de aparecimento do composto foi calculada a partir do declive do gráfico correspondente à percentagem de composto transportado em função do tempo (0, 10, 30 60 e 120 min).

Os balanços de massa, calculados em percentagem e tendo-se em consideração as áreas dos picos, foram determinados da seguinte forma:

$$\% = \frac{(A_{aplicada} \times V_{compartimento}) - \left[(A_{dadora} \times V_{compartimento}) + (A_{aceitadora} \times V_{compartimento})\right]}{(A_{aplicada} \times V_{compartimento})} \times 100$$

A resistência eléctrica das células transepiteliais (TEER) foi medida no início e no fim do ensaio como se pode observar na figura 2.6,

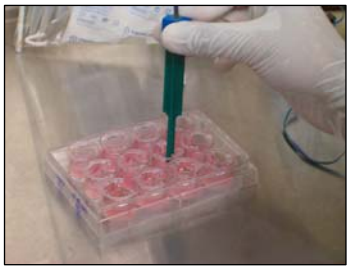


Figura 2.6. Medição da resistência das células TEER

em que se usou um condutímetro do tecido epitelial (World Precision Instruments, EUA)

2.15. Ensaios in vivo para avaliação da actividade biológica

Nesta parte do trabalho avaliou-se o efeito do extracto de peles de uvas em ratos após uma alimentação suplementada e o efeito num processo de inflamação aguda:

1. *Estudo do efeito do extracto em parâmetros bioquímicos*

O presente estudo foi realizado durante 21 dias, em 10 ratos Wistar que foram divididos em 2 grupos: grupo controlo (n=5) – alimentado *ad libitum* com ração de manutenção e grupo teste (n=5) - alimentado *ad libitum* com ração de manutenção suplementada com 0,6mLdia^{-1} de extracto de peles de uvas. Após os 21 dias de tratamento os ratos foram anestesiados e foi recolhido sangue por punção cardíaca. O sangue foi centrifugado e no soro foram realizadas as análises bioquímicas.

2. *Estudo do efeito do extracto num processo de inflamação aguda*

O presente estudo foi realizado em 12 ratos Wistar que foram divididos em 2 grupos: grupo controlo (n=6) – indução da inflamação com carragenina e grupo teste (n=6) –

tomaram 1mL de extracto e 30-60 min depois ocorre a indução da inflamação com carragenina.

Todos os animais foram manuseados em concordância com *Guidance in the Operation of the Animals* (*Scientific Procedures*) *Act 1986*, publicada pela *Her Majesty's Stationery Office*, bem como com as regulamentações da Comunidade Europeia (Jornal Oficial da Comunidade Europeia L 358/1 de 18/12/1986).

2.15.1. Parâmetros bioquímicos avaliados no soro do rato

O sangue colhido, em jejum, foi centrifugado e foram feitas as determinações de colesterol, HDL e triglicéridos. Os valores determinados aos 0 dias (início do tratamento) serviram de controlo para cada um dos indivíduos em estudo.

Colesterol

Foi utilizado o Kit Cholesterol CHOP-PAP da Roche Diagnostics GmbH para fazer o teste colorimétrico enzimático do colesterol. O equipamento usado era o Analisador Roche/Hitachi modelo 717. Padronização: o método do colesterol foi calibrado contra diluição isotópica/espectrometria de massa. Esta padronização está em conformidade com os requisitos do National Institute of Standards and Technology. S1: NaCl a 0.9% S2: C.f.a.s. (Calibrator for automated systems), Ref. 759350. Os analisadores da Roche/Hitachi calculam automaticamente a concentração de colesterol de cada amostra.
Factores de conversão: $mgdL^{-1} \times 0.026 = mmolL^{-1}$

$mmolL^{-1} \times 38.66 = mgdL^{-1}$

Colesterol HDL

Foi utilizado o Kit HDL-C plus da Roche Diagnostics GmbH. para fazer o teste colorimétrico enzimático do HDL. O equipamento usado era o Analisador Roche/Hitachi modelo 717. Padronização: Trata-se de um método relacionado com o método de beta quantificação, definido nas recomendações do HDL Cholesterol Method Certification Protocol for Manufactures S1: NaCl a 0.9% S2: C.f.a.s. (Calibrator for automated systems), Ref. 2172623. Os analisadores da Roche/Hitachi calculam automaticamente a concentração de colesterol HDL de cada amostra:
Factores de conversão: $mgdL^{-1} \times 0.026 = mmolL^{-1}$

$mmolL^{-1} \times 38.66 = mgdL^{-1}$

Triglicéridos

Foi utilizado o Kit Triglicéridos GPO-PAP da Roche Diagnostics GmbH. O equipamento usado era o Analisador Roche/Hitachi modelo 717. Padronização: O método de triglicéridos GPO-PAP foi calibrado contra o método ID-MS: S1: NaCl a 0.9% e S2: C.f.a.s. (Calibrator for automated systems), Ref. 759350. Os analisadores da Roche/Hitachi calculam automaticamente a concentração de colesterol HDL de cada amostra

Factores de conversão: $mgdL^{-1} \times 0.0113 = mmolL^{-1}$

$mmolL^{-1} \times 87.5 = mgdL^{-1}$

2.15.2. Estudo do efeito anti-inflamatório agudo

Todos os animais foram identificados, pesados e distribuídos aleatoriamente pelos grupos experimentais. Administrou-se 1mL de extracto aos ratos em teste. Marcou-se com tinta a articulação da pata esquerda de cada rato (ao nível do maléolo), procedendo-se de seguida à medição do volume da pata por pletismografia.

A carragenina foi administrada por via intraplantar na pata esquerda de cada rato (excepto no grupo controlo, ao qual se administrou soro fisiológico) ao fim de 30-60 min. Ao momento da administração da carragenina atribuiu-se o tempo zero (t=0h), procedendo-se então à medição do volume da pata esquerda, repetindo-se esta medição 3 e 6 horas após a administração da carragenina (t=3h e t=6h). O volume medido antes de qualquer administração é designado por V, o volume medido às 0 horas é designado por V_0 e o volume medido às 3 horas é designado por V_3 e o volume medido às 6 horas é designado por V_6.

Todas as medições do volume da pata foram efectuadas num pletismómetro (Digital Plethysmometer LE 7500 – Letica® Scientific Instruments). A pata foi mergulhada num vaso contendo a solução do pletismómetro (solução de Triton X-100 a 0.15% (V/V) e cloreto de sódio a 0.1% (m/V) em água desionizada) fazendo coincidir a marcação na articulação da pata esquerda com a marcação existente no vaso (deste modo, a pata é mergulhada sempre à mesma altura). Todos os resultados são expressos como média ± erro padrão. Os resultados obtidos foram comparados pelo método ANOVA, seguido do teste Bonferroni e considerados significativos quando $P < 0.05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como já foi referido neste trabalho, amostras de produtos naturais são geralmente complexas dada a variedade de compostos presentes e concentrações muito diferentes em que estes se apresentam na matriz: o vinho não constitui excepção. Desde as matérias primas até aos produtos finais, há nos vinhos um grande número de compostos, os quais em contacto com o ar podem reagir e combinar-se entre si até se obter um produto com uma composição "harmoniosa", que seja capaz de corresponder às expectativas de consumidores muito diversos que poderão apreciar as características sensoriais desses vinhos e, eventualmente, prestar atenção aos aspectos funcionais associados ao seu consumo.

Relativamente à variabilidade na composição química destes produtos, além de ser previsível grandes diferenças entre produtores, há que ter em conta que, para cada produtor, há uma variação de composição ao longo do tempo e para cada ano de produção.

A importância de alguns compostos presentes nos vinhos, seja do ponto de vista da sua actividade biológica, da contribuição para as características organolépticas, como marcador de um processo tecnológico, ou mesmo para identificação de situações de genuinidade ou de fraude, não está normalmente associada à sua ocorrência em concentrações elevadas, pelo que se torna essencial a utilização de metodologias de preparação de amostra que permitam detectar a sua presença em concentrações baixas, mesmo vestigiárias. Ao pretender-se caracterizar uma realidade química tão complexa, haverá que recorrer a técnicas de separação eficientes associadas a detectores mais selectivos.

Para discutir este assunto apresentam-se os resultados obtidos quando se utilizou a técnica de LC-DAD-MS na análise de um extracto de uma amostra de vinho Moscatel de Setúbal (C_4), que vai ser considerado como exemplo para os vinhos Moscatel estudados. Na figura 3.1. apresentam-se os cromatogramas desta com detecção a vários c.d.o. 254, 280, 320 e 360 nm característicos de diferentes famílias de compostos (tabela 3.1.). A metodologia usada (cromatografia líquida) permitiu a separação de um grande número de compostos mas, mesmo utilizando condições de trabalho que obrigam a um tempo de análise longo (120 min) é notório pela observação do cromatograma, que muitos compostos não estão resolvidos de modo adequado, apresentando um factor de resolução inferior a 1. Alguns compostos estão presentes nas

amostras em concentrações elevadas e por isso obtêm-se picos cromatográficos facilmente detectáveis, mas outros compostos presentes em baixas concentrações, ou que apresentam baixa absortividade, apresentam picos relativamente pequenos e por vezes difíceis de diferenciar da própria linha de base.

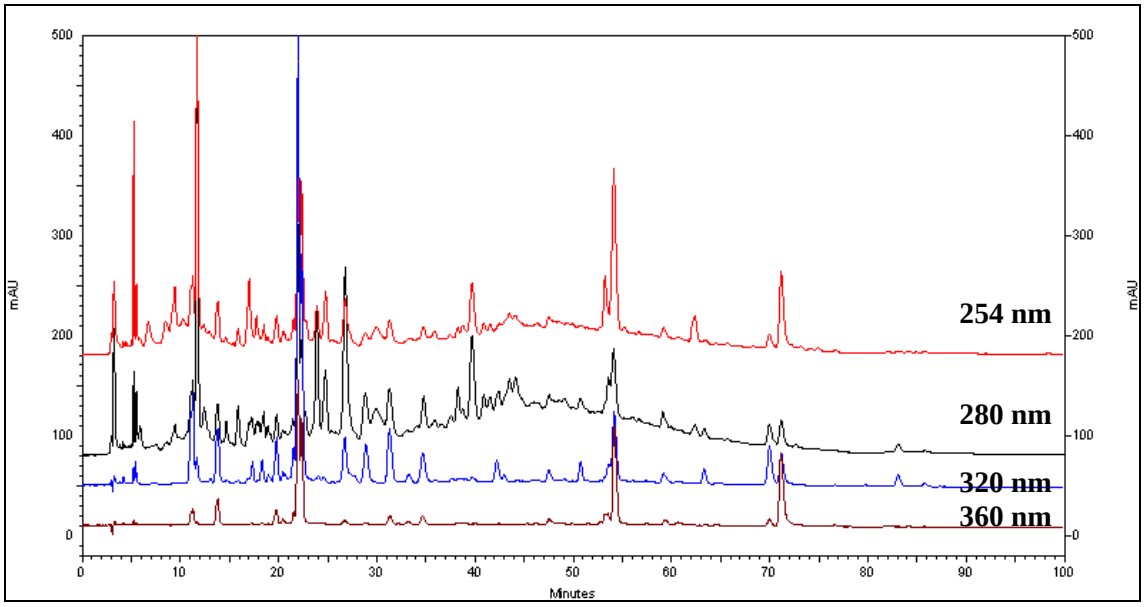


Figura 3.1. Cromatogramas da amostra de vinho Moscatel C_4 aos c.d.o. 254, 280, 320 e 360 nm

Tabela 3.1. Comprimentos de onda de absorção máxima de algumas famílias de compostos fenólicos[190]

Família de compostos	**Banda II[a] c.d.o. (nm)**	**Banda I[a] c.d.o. (nm)**
Ácidos benzóico	270-280	
Ácidos cinâmicos	(290-300)[b]	305-330
Flavonóis	250-295	(300-330)[b]
		350-380
Flavonas	250-270	330-350
Flavanonas	270-295	(300-330)[b]
Flavan-3-ol	270-280	

[a] solvente usual é metanol [b] "ombro"

Nesta técnica, quando se utiliza uma coluna de fase reversa os compostos mais polares presentes na amostra eluem primeiro seguidos de compostos com polaridade inferior. Como exemplo, pode referir-se que o ácido benzóico e compostos derivados eluem antes dos correspondentes ácidos cinâmicos e seus derivados. A substituição dos grupos OH no anel benzénico por grupos metoxi diminui a polaridade do composto e o tempo

de retenção aumenta. A ordem de eluição cromatográfica para a família dos flavonóides é por isso: glicósidos de flavanonas seguido de glicósidos de flavonóis, depois glicósidos de flavonas e por fim as aglíconas na mesma ordem de eluição[190].

A utilização de detectores mais selectivos, como por exemplo a detecção por fluorescência e a detecção electroquímica, podem dar origem a cromatogramas mais simples e em que a sensibilidade é maior para alguns desses compostos (figura 3.2).

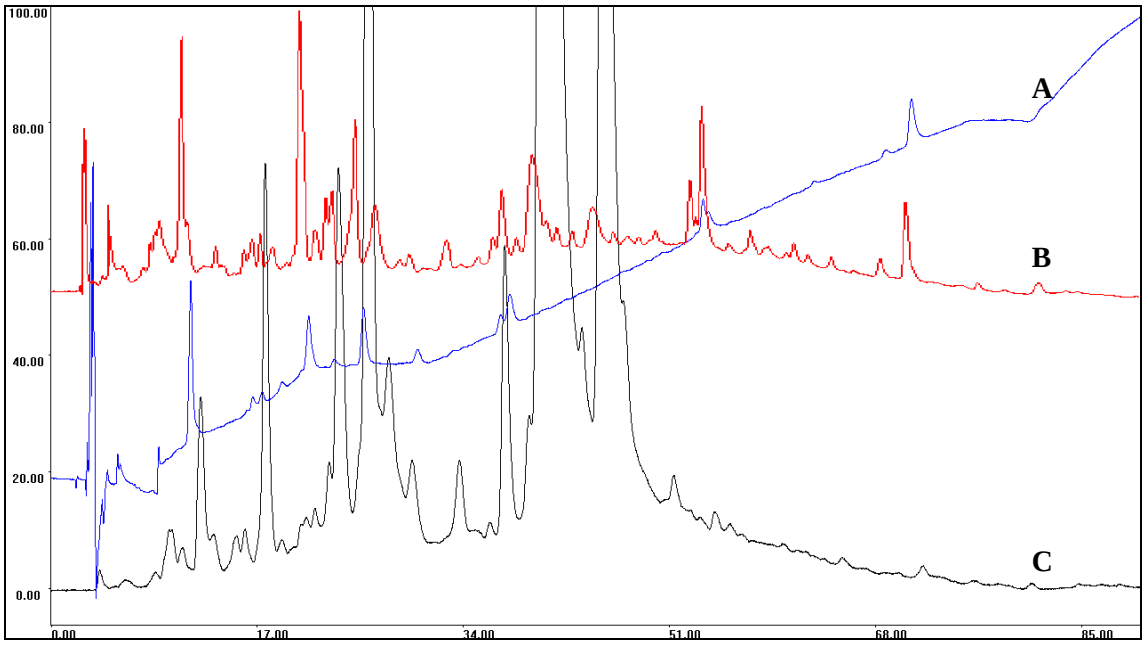


Figura 3.2. Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) detecção electroquímica, (**B**) detecção espectrofotométrica ao c.d.o. 280 nm e (**C**) detecção fluorimétrica (280/320 nm)

O perfil cromatográfico obtido com o detector electroquímico mostra que se detecta um menor número de picos sem interferência de outros compostos que co-eluem ou que eluem com tempos de retenção próximos na detecção por DAD, o que torna esta técnica mais selectiva. A utilização do detector electroquímico dá-nos pistas sobre a eventual contribuição dos compostos detectados para a actividade biológica da amostra: compostos como o ácido gálhico, ácido *t*-caftárico, ácido cafeico, galhato de etilo, quercetina-3-*O*-glucósido, cafeato de etilo e quercetina originam um sinal no detector electroquímico e é já conhecida a sua contribuição para a actividade antioxidante das amostras em que estão presentes.

A técnica da fluorescência também é útil na quantificação de alguns compostos presentes no vinho Moscatel pois só um número reduzido de compostos é fluorescente e por isso os cromatogramas podem ser mais simples. Por outro lado, é possível detectar com maior sensibilidade compostos que existem nas amostras em baixas concentrações,

como se pode observar na figura 3.2. para os picos a eluir entre 36 e 54 min. No entanto, como se pode verficar, o cromatograma correspondente ao vinho apresenta ainda muitos picos, o que mais uma vez vem ilustrar a complexidade desta amostra.

O conjunto de informação obtida a partir da utilização destes detectores permitirá um conhecimento mais exacto sobre os constituintes das amostras. Por exemplo os flavonóis (miricetina, quercetina, campferol, isoramnetina e seus derivados) são compostos de cor amarela que apresentam um máximo de absorção ao c.d.o. aproximado de 360 nm e os ácidos cinâmicos (ácido caftárico, coutárico, cafeico, fertárico, cumárico, ferúlico) bem como o GRP (Grape Reaction Product), estilbenos e seus derivados são detectados ao c.d.o. 320 nm. Os flavano-3-ois (catequina e epicatequina), não apresentam um c.d.o. específico de absorção apresentando um máximo a 280 nm, como a maior parte dos compostos fenólicos.

No entanto estes compostos apresentam fluorescência para $\lambda_{em}/\lambda_{ex}$ 280/320 nm enquanto que a quercetina praticamente não é detectada nos $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de 280/320 nm. Os c.d.o. $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de 264/420 nm são referenciados na bibliografia como os adequados para a detecção da quercetina[158]. Deste modo a sensibilidade e selectividade do método pode ser aumentada pela optimização dos comprimentos de onda de excitação (λ_{ex}) e de emissão (λ_{em}), tornando-se uma ferramenta útil na quantificação. Os cromatogramas apresentados na figura 3.3. mostram perfis obtidos em diferentes condições de fluorescência de acordo com dados publicados na bibliografia[155]. Os c.d.o. de $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 280/320 nm foram usados para a identificação de tirosol, catequina, epicatequina e procianidinas; 260/400 nm para o *c*-piceid e *c*-resveratrol e 300/390 nm para o *t*-piceid e *t*-resveratrol. Nos cromatogramas obtidos a c.d.o. de $\lambda_{ex}/\ \lambda_{em}$ 280/320 nm detecta-se um maior número de compostos, como se pode observar na figura 3.3. Os cromatogramas traçados aos outros c.d.o. 260/400 e 300/390 nm mostram que a emissão de fluorescência nestas condições ocorre para compostos que apresentam tempos de retenção superiores.

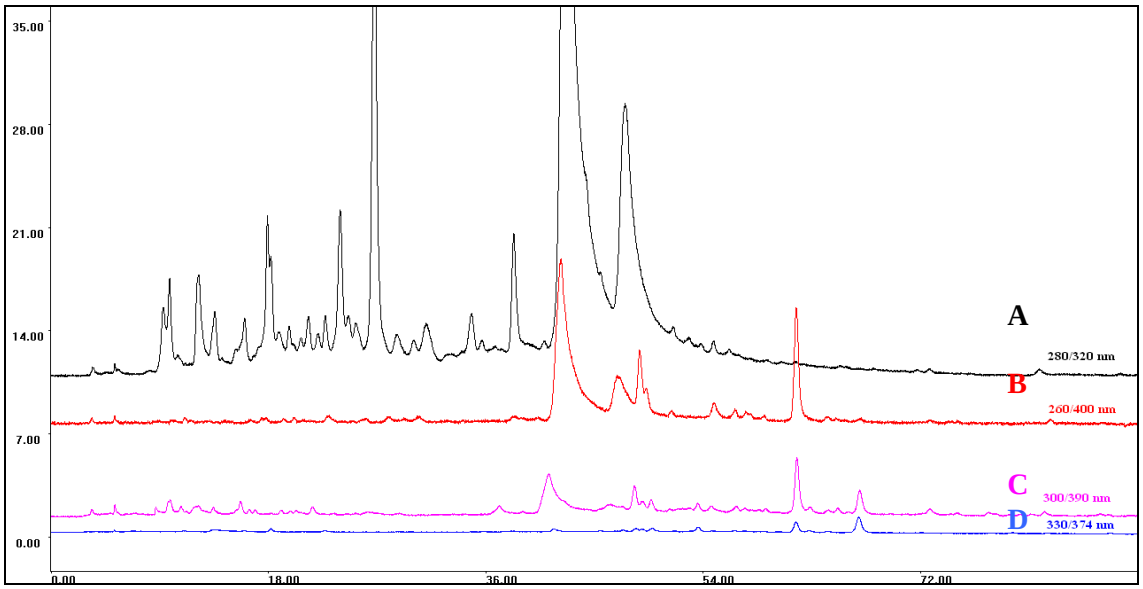


Figura 3.3. Cromatograma da amostra de vinho Moscatel de Setúbal após detecção fluorimétrica a diferentes c.d.o. λ_{ex}/ λ_{em}: (**A**) 280/320 nm; (**B**) **260/400 nm**, (**C**) **300/390 nm**; (**D**) **330/374 nm**

Para além destes modos de detecção, a espectrometria de massa tem sido uma ferramenta muito útil na identificação de compostos. Utilizada como detector na LC tem permitido grandes avanços na confirmação da identificação e quantificação de compostos. Pelas razões apresentadas, neste trabalho que visa a caracterização de amostras de vinho Moscatel, foi utilizada a técnica de cromatografia líquida associada a diferentes modos de detecção, nomeadamente por UV-vis, fluorescência (FD), electroquímica (ED) e também por espectrometria de massa (MS). Comparam-se os resultados, para as amostras de vinho Moscatel analisadas e efectuou-se o doseamento de compostos que são habitualmente referidos por terem uma contribuição importante como antioxidantes. A determinação dos fenóis totais e alguns testes para avaliação da actividade biológica complementam a informação sobre o papel fundamental destes compostos.

Sempre que justificável, as amostras foram sujeitas a pré-tratamento de modo a facilitar a sua posterior análise.

3.1. Pré-tratamento da Amostra

Para identificação e quantificação de componentes nas amostras, é por vezes necessário recorrer a técnicas de preparação que possibilitem ter os compostos em concentrações mais elevadas (pré-concentração) e/ou diminuir as concentrações de

outros componentes (limpeza da amostra) a fim de permitir ou simplificar a realização das análises.

Neste trabalho, foram aplicadas e comparadas metodologias de preparação de amostra, de modo a obter sinais mais intensos para detecção de compostos presentes em baixas concentrações, nomeadamente quando se utilizou a técnica de LC-MS que apresentava uma sensibilidade relativamente baixa.

Utilizou-se a técnica de extracção líquido-líquido com acetato de etilo, permitindo reduzir as concentrações de compostos solúveis em água como, por exemplo, os açúcares, o que é vantajoso para não prejudicar a análise por espectrometria de massa pois, além de poderem contaminar a fonte iónica, como são compostos que não se separam numa coluna RP-18 vão provocar aparentes variações da linha de base do cromatograma. Também se utilizou a técnica de extracção em fase sólida (SPE), utilizando "cartridge" RP-18 que também permite eliminar facilmente os compostos mais polares. Estas técnicas (extracções líquido-líquido e em fase sólida) foram escolhidas por serem de fácil execução e já estarem bem descritas na literatura.

A extracção líquido-líquido permite a extracção de componentes das amostras que tenham afinidade para o solvente usado. A posterior evaporação do solvente permitirá obter extractos concentrados nesses componentes. No entanto, durante estes processos alguns compostos podem alterar-se por reacção ou perder-se por ocorrer precipitação após a sua extracção e evaporação. Esta será uma das desvantagens da utilização destas metodologias. Outra desvantagem será a utilização de solventes orgânicos e todos os problemas associados a essa utilização: manuseamento adequado e cuidados especiais na sua destruição.

Na extracção em fase sólida, se forem utilizados solventes de diferentes polaridades, a amostra poderá ser, para além de concentrada também fraccionada. A utilização de um processo de extracção não adequado poderá levar à perda de alguns compostos, que pode acontecer por ocorrer uma eluição dos compostos alvo em fracções que estão a ser rejeitadas ou por outro lado à sua retenção na fase estacionária usada.

As técnicas referidas, por apresentarem alguma selectividade não permitem a concentração de todos os componentes de igual modo e podem dar uma ideia errada das proporções relativas em que estes estão presentes nas amostras. No entanto as técnicas não foram usadas com o objectivo de quantificar os compostos mas sim facilitar a sua identificação e para as análises quantitativas efectuadas neste trabalho, as amostras de vinho foram analisadas sem qualquer tratamento prévio.

Neste trabalho, a extracção líquido-líquido foi efectuada com acetato de etilo extraindo-se os compostos fenólicos como os ácidos benzóicos, ácidos cinâmicos, estilbenos e flavonóides[181]. Para a técnica de SPE após acondicionamento da coluna e aplicação da amostra, procedeu-se à lavagem da coluna com água para eluir os compostos mais polares, como os açúcares e ácidos e posteriormente procedeu-se à eluição dos componentes da amostra com metanol. A técnica foi utilizada para limpeza e concentração da amostra. Na figura 3.4 comparam-se os cromatogramas obtidos na análise directa de uma amostra de vinho Moscatel (cromatograma A) e após terem sido preparados extractos utilizando as duas metodologias referidas: cromatograma B- extracto obtido por extracção líquido-líquido com acetato de etilo; cromatograma C- extracção em fase sólida. As condições de análise foram as mesmas para as várias amostras ensaiadas. A comparação dos cromatogramas obtidos mostra-nos que a extracção líquido-líquido permite obter extractos que apresentam cromatogramas mais simples, em que os compostos responsáveis pelo aumento da linha de base na detecção ao c.d.o. 280 nm não vão ser extraídos, o que poderá facilitar a identificação dos compostos utilizando outras metodologias de análise como, por exemplo, a espectrometria de massa, dado que não vai ocorrer a sua co-eluição.

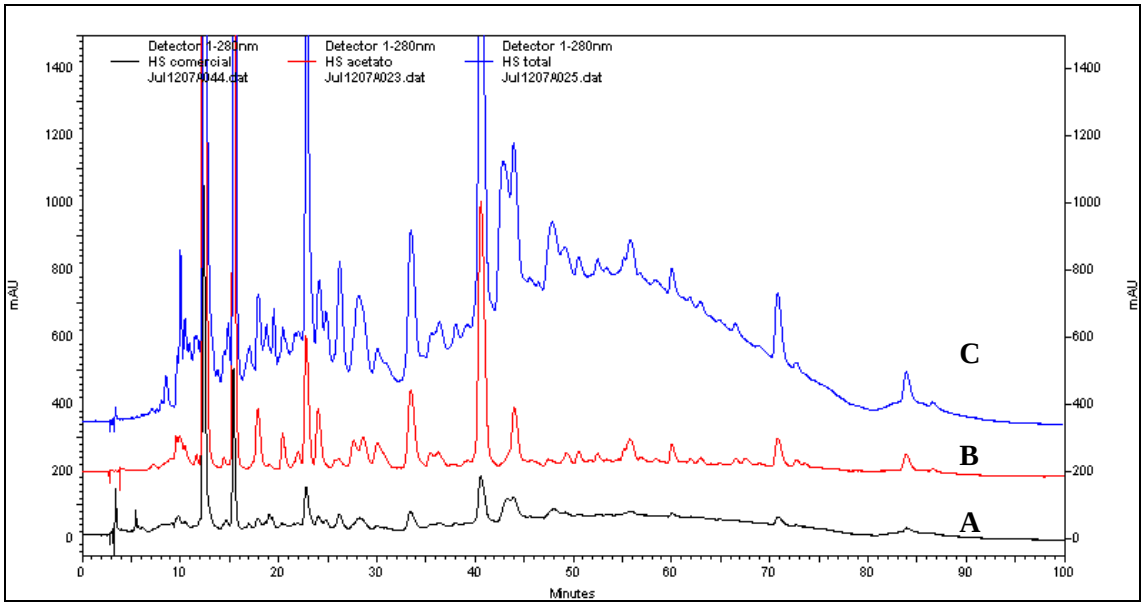


Figura 3.4. Cromatogramas (c.d.o. 280 nm): (**A**) injecção directa do vinho Moscatel de Setúbal; (**B**) extracto de vinho obtido por extracção líquido-líquido; (**C**)extracto de vinho obtido por SPE

Na extracção líquido-líquido com acetato de etilo o volume inicial de vinho utilizado foi de 50 mL e o volume final de 1.3 mL o que corresponde a uma relação de volumes de 38.5 vezes. Na extracção por SPE partiu-se do mesmo volume (50 mL) e concentrou-se até ao volume final de 1 mL que aponta para um factor de concentração de 50 vezes.

Medidas as áreas dos picos dos cromatogramas obtidos em cada uma das situações apresentadas na figura 3.4. e fazendo a sua soma com a área correspondente ao aumento da linha de base, verifica-se que os valores estão na seguinte proporção relativamente à amostra de vinho original: 2 vezes para a amostra sujeita a extracção líquido-líquido e 7 vezes para a amostra sujeita a tratamento por SPE. Destes resultados pode concluir-se que as amostras foram concentradas mas com factores de concentração inferiores a 38.5× ou 50×, correspondentes às relações de volumes. Estas diferenças podem ser explicadas pelo facto da extracção líquido-líquido não ter sido completa, por perdas ocorridas na passagem da amostra pelo ”cartridge” de SPE e por precipitação de compostos na operação final de redução de volume.

Neste trabalho a extracção em fase sólida (SPE) foi utilizada para preparar extractos da amostra de vinho, em que numa primeira fracção os compostos retidos na coluna eram eluídos com uma solução metanol:água, 30:70 (fracção A) e posteriormente com metanol a 100% (fracção B). Desta forma era possível dividir a amostra em 2 fracções: compostos que eluiam entre os 0 e os 40 min (fracção A) e os compostos que eluem a partir dos 40 min. Optou-se por seleccionar o metanol por ser descrito na bibliografia como o solvente que frequentemente se utiliza na extracção em fase sólida. A selecção da % de metanol a usar para obtenção da fracção A foi feita com base na composição química da fase móvel usada na análise por LC (*ver 2.6)* ao fim de 40 min de croamtograma (36.7% de acetonitrilo), tendo em conta as condições de análise aplicadas na técnica de LC-DAD. Na figura 3.5 apresentam-se os cromatogramas obtidos na análise destas duas fracções.

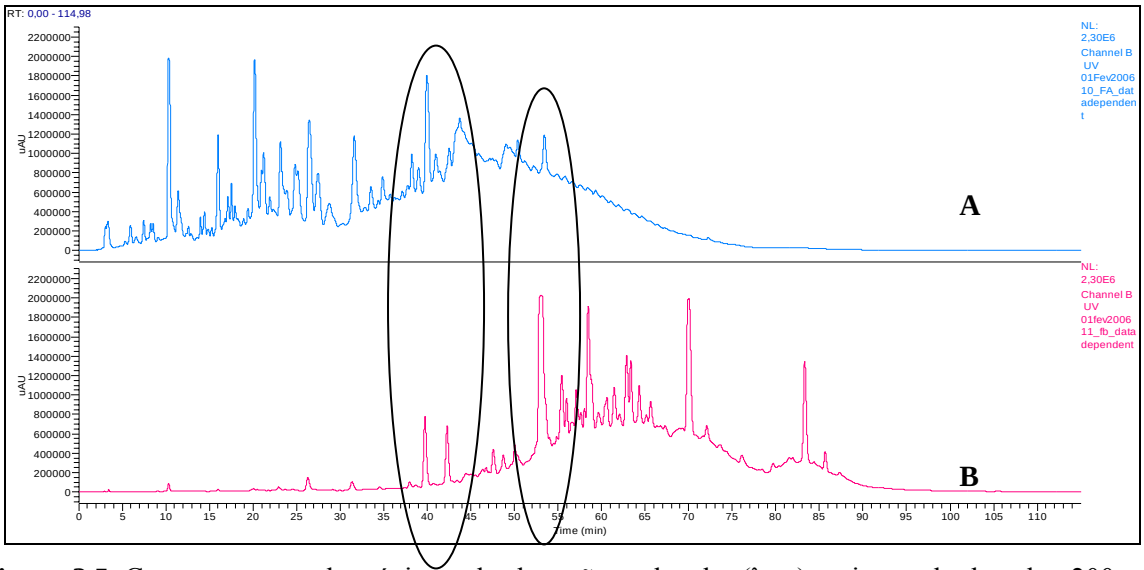


Figura 3.5. Cromatogramas de máximos de absorção molecular ($\lambda_{máx}$) no intervalo de c.d.o. 200 a 400 nm obtidos na análise de uma amostra de vinificação C_3: (**A**) fracção A; (**B**) fracção B

Alguns compostos foram detectados nas duas fracções (A e B) e as áreas correspondentes aos picos assinalados na figura são consideráveis. Muito provavelmente um volume superior da solução metanol:água, (30:70) seria necessário para que os compostos eluíssem totalmente com esta fase móvel. Mesmo assim pode considerar-se que a separação e concentração foi conseguida de acordo com os objectivos propostos.

3.2. Identificação dos compostos fenólicos no vinho Moscatel por LC-DAD-MS

Com vista à caracterização química das amostras de vinho Moscatel, procedeu-se á análise de vinhos e extractos por LC-DAD-MS utilizando-se um espectrómetro de massa do tipo "armadilha de iões" com 2 fontes de ionização: electrospray (ESI) e ionização química à pressão atmosférica (APCI). Houve necessidade de optimizar as condições do espectrómetro de massa de modo a conseguir detectar no cromatograma um maior número de compostos, permitindo posteriormente a sua identificação. (*ver tabela 2.5)*.

Na figura 3.6 comparam-se os cromatogramas de corrente iónica total (TIC) obtidos com as duas fontes (APCI e ESI) nos modos positivo e negativo, na análise de uma amostra de vinho.

Da comparação dos resultados é possível concluir-se que a fonte de ionização APCI permitia a detecção de um maior número de compostos e relativamente ao modo negativo ou positivo, a relação sinal/ruído era maior no modo negativo. Por estas razões optou-se por utilizar a fonte de APCI a operar em modo negativo para analisar as amostras.

Na bibliografia consultada, a grande maioria dos trabalhos efectuados com vista à identificação de compostos fenólicos, nas mais variadas matrizes, utiliza preferencialmente a fonte de ESI, muito provavelmente por estar mais difundida a sua utilização e o modo negativo é geralmente o escolhido. Esta fonte é normalmente referida como mais adequada para a análise de compostos mais polares e de massa molecular maior, enquanto que a fonte de APCI é mais adequada para moléculas de massa molecular menor e menos polares. A fonte de ESI também foi utilizada neste trabalho, como se referirá oportunamente, mas num equipamento do tipo "triplo quadrupolo".

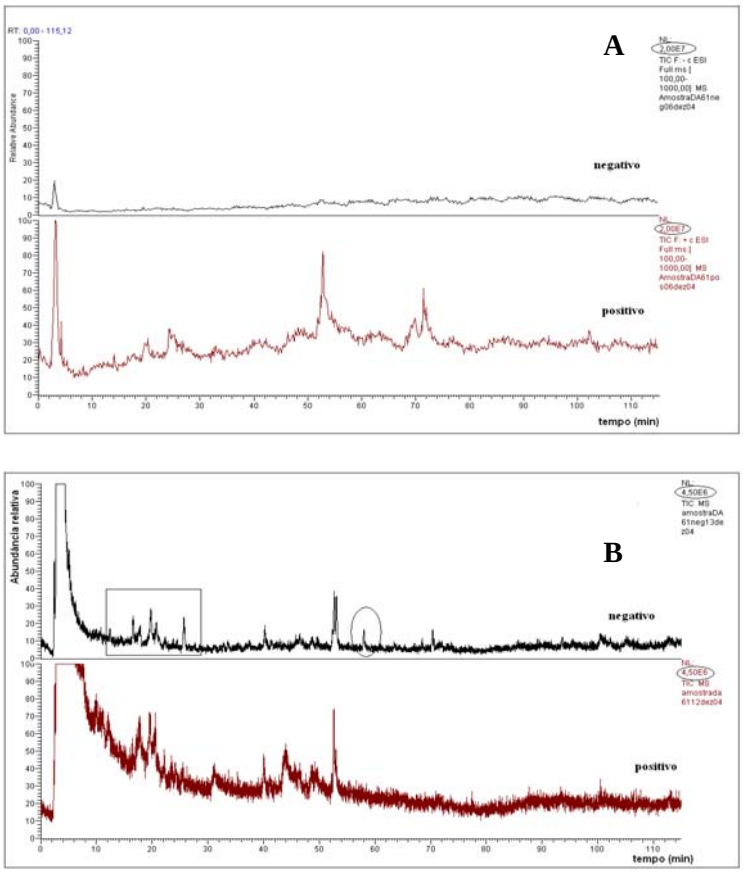


Figura 3.6. Cromatogramas TIC obtidos na análise por LC-MS de uma amostra de vinho Moscatel de Setúbal: (**A)** fonte ESI em modo positivo e negativo; (**B)** fonte APCI em modo positivo e negativo

Escolhidas as melhores condições de detecção, procedeu-se à preparação e análise de um extracto obtido por extracção líquido-líquido em acetato de etilo com vista à identificação dos compostos presentes nas amostras. Como anteriormente referido, escolheu-se o extracto da amostra C_4 dado que era a amostra que apresentava os compostos em maiores quantidades e como tal nos poderia dar mais informação sobre este tipo de vinhos. Por outro lado, como já foi referido, este tipo de extracto era mais simples por se terem eliminado das amostras um conjunto de compostos que de algum modo iriam interferir na análise por LC-MS.

Para enquadrar a discussão da vasta informação obtida num ensaio de LC-DAD-MS, apresenta-se na figura 3.7 quatro representações em paralelo que resumem os resultados deste ensaio:

A. Mapa de absorção no ultra-violeta (200-350 nm);

B. Mapa de intensidades de espectro de massa (*m/z* 100-800);

C. Cromatograma de absorção no ultra-violeta para o c.d.o. de 280 nm

D. Cromatograma de corrente iónica total obtido em ensaio de "full MS"

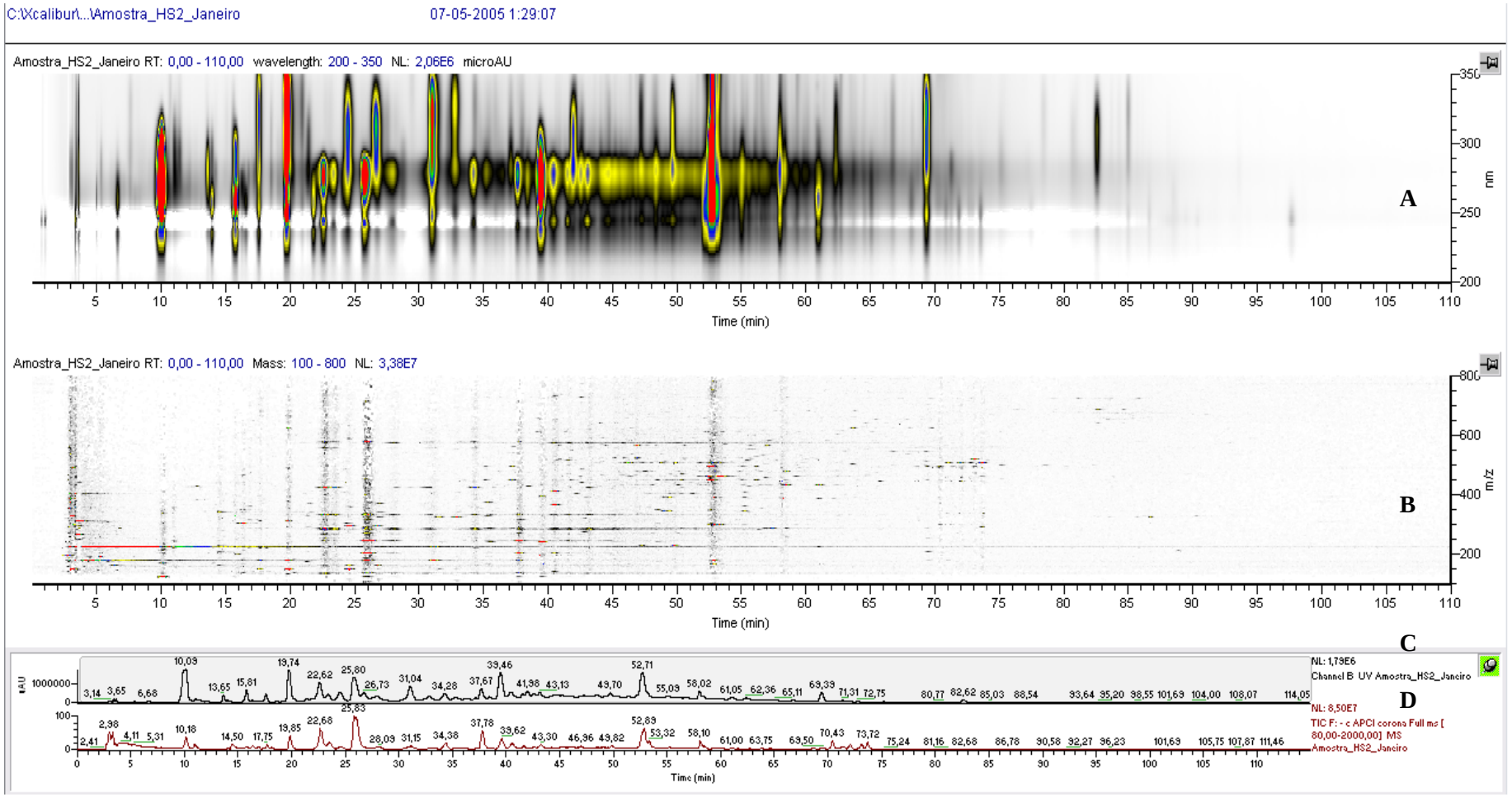


Figura 3.7. Cromatogramas de um extracto de vinho Moscatel C_4: (**A**) Mapa de absorção (c.d.o. 200-350 nm); (**B**) Mapa de intensidades de massa (*m/z* 100-800); (**C**) c.d.o. 280 nm; (**D**) TIC

O mapa de UV apresentado na figura 3.7A permite ver um grande número de compostos detectados sendo previsível a impossibilidade de os separar a todos numa única análise cromatográfica.

Tendo em conta o c.d.o. de 280 nm, que é muito utilizado para a detecção de compostos fenólicos, facilmente se verifica que na zona de tempos de retenção entre 20 e 70 minutos há sobreposições parciais de picos pelo que não é de estranhar que quando se apresentam os resultados na forma de cromatograma aparentemente tudo se passa como se as linhas de base se afastassem do valor zero.

O mapa de intensidades de massa (figura 3.7B) mostra que para alguns valores de *m/z* aparecem "linhas" na figura em vez de "pontos". Mais uma vez, estamos a observar os efeitos da separação incompleta dos compostos ou arrastamento de picos o que terá como consequências o aparecimento no cromatograma de uma linha de base que se afasta muito do valor zero, aspecto este que será designado ao longo do trabalho por "bossa". Nas figuras 3.7 C e D podem notar-se "bossas" que se observam no cromatograma obtido na detecção com o detector de díodos mas também no cromatograma de corrente iónica total obtido com o espectrómetro de massa.

A partir dos resultados apresentados nas figuras 3.7.B e C pode concluir-se que a partir dos 100 min há eluição de compostos mas em concentrações tão baixas que não é possível caracterizá-los pelas suas propriedades espectroscópicas.

Os sistemas de tratamento de dados cromatográficos dispõem de "software" que permite a detecção de picos cromatográficos e obtenção das respectivas áreas bem como outras informações de interesse, tais como os tempos de início e fim dos picos. Esse tratamento foi aplicado aos cromatogramas C e D da figura 3.7. a fim de se fazer uma avaliação acerca da adequação do método cromatográfico de análise para o estudo destas amostras. Para isso, usou-se o mesmo algoritmo para reconhecimentos de picos (ICIS do software utilizado) mantendo os valores de defeito para os parâmetros de integração do cromatograma TIC. Alguns resultados obtidos a partir desses tratamentos estão representados na figura 3.8.

Para o cromatograma a 280 nm foram detectados 196 picos que apresentavam uma largura média de 0,42 min. Para o cromatograma de TIC foram detectados 185 picos com uma largura média de 0.61 min. Fazendo um cálculo muito simples em que se dividiu o tempo útil total do cromatograma (aproximadamente 113 min) pelas larguras médias observadas, obtém-se 266 e 185 para os cromatogramas de UV e TIC respectivamente. Isso quer dizer que nestas condições e no caso mais favorável, em

que picos de igual largura estariam regularmente distribuídos seria possível detectar aproximadamente 200 picos o que corresponde a um valor que é pouco maior que os números de picos detectados.

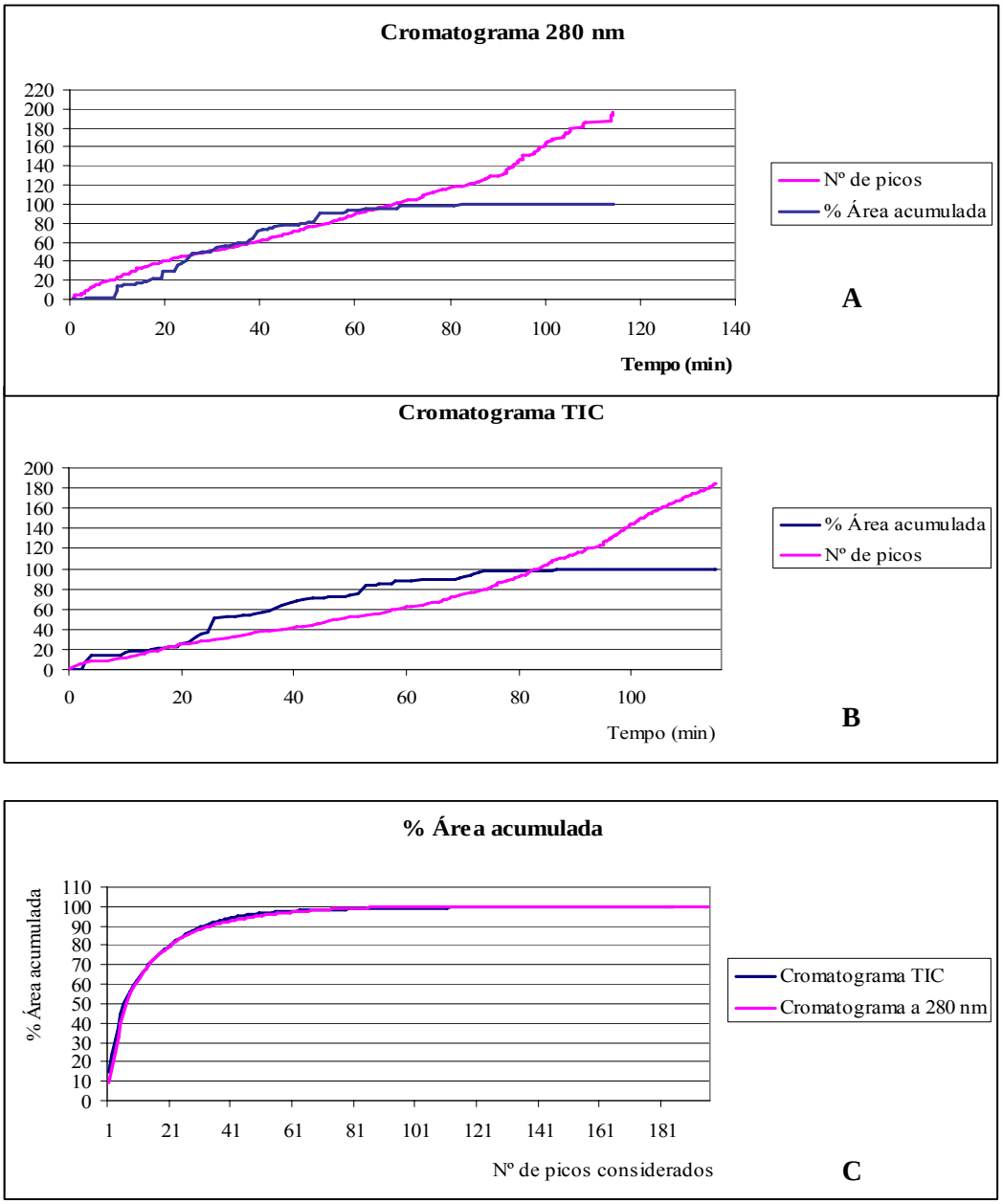


Figura 3.8. Representações da % de áreas acumuladas em função do tempo para os cromatogramas (**A**) a 280 nm; (**B**) TIC; (**C**) % de áreas acumuladas em função do número de picos (previamente ordenados por ordem decrescente de áreas)

Também se apresentam nos gráficos a contagem do número (acumulado) de picos detectados bem como a área de picos (acumulada) ao longo do cromatograma. Pode verificar-se que a sua distribuição parece ser regular nos primeiros 80 minutos de cromatograma que contêm cerca de 98% da área total detectada em picos cromatográficos e pode afirmar-se que o método de análise se pode considerar

adequado para o estudo desta amostra. As condições de análise utilizadas a partir dos 100 min permitem assegurar a lavagem da coluna e para salvaguardar a possibilidade de se analisar uma amostra com compostos que apresentem tempos de retenção superiores.

Outro modo de avaliar a informação contida nestes cromatogramas consistiu em ordenar os picos detectados no cromatograma por ordem decrescente e representar graficamente as áreas acumuladas em função do nº de picos (figura 3.8C): observa-se que a 99% de área correspondem 77 e 89 picos para os cromatogramas de UV (280 nm) e de TIC respectivamente. Isto quer dizer que, para caracterização de muitos picos, será difícil nestes ensaios obter mais informação relevante para além da localização (t_r) desses compostos no cromatograma pois são picos cromatográficos com área muito reduzida.

Depois desta discussão geral do cromatograma do extracto de vinho Moscatel C_4 interessa ver até que ponto se podem tirar mais conclusões mediante uma ampliação de zonas do cromatograma destinados a permitir uma discussão em pormenor. Para isso, considerou-se o cromatograma dividido em segmentos de cerca de 20 min, tal como é assinalado nas figuras BI (0-20 min), BII (20-40 min), BIII (40-60 min), BIV (60-80 min), BV (80-100 min) e BVI (100-115 min) apresentadas no apêndice B. As identificações dos picos apresentam-se na tabela CI (apêndice C) em que se indicam os tempos de retenção, $\lambda_{máx}$, valores *m/z* obtidos por MS e por MS/MS e os valores de massa molar (MM). Na tabela CII apresentam-se todos os picos detectados utilizando os dois sistemas cromatográficos associados aos diferentes modos de detecção (LC-MS e LC-DAD-FD-ED).

Efectuou-se a contagem do número de picos detectados no mapa de absorção no ultra-violeta (200-400 nm), tendo sido detectados 142 picos, inferior ao valor estimado (200 picos). Alguns picos presentes nas amostras foram identificados comparando os espectros de massa obtidos em ensaios de "full MS" e MS/MS do extracto de vinho Moscatel C_4, com o espectro de massa de padrões testados nas mesmas condições de análise, quando o padrão estava disponível no mercado ou em alternativa, por comparação com dados da literatura. Nas figuras B (apêndice B) apresenta-se a numeração para cada pico detectado no mapa do UV e na tabela CI (apêndice C) a respectiva identificação.

Alguns compostos presentes no vinho não foram detectados por MS o que poderá ser devido a dois aspectos: (**a**) as condições de trabalho utilizadas na detecção por espectrometria de massa não serem as ideais para a fragmentação de todos os componentes da amostra, havendo por isso necessidade de optimização para diferentes compostos ou famílias de compostos; (**b**) os compostos estarem em concentrações que não eram suficientes para permitir a sua detecção. Outros detectores (díodos e/ou fluorescência) foram assim usados e na tabela CII associa-se a identificação obtida com os vários detectores utilizados no trabalho.

Alguns dos compostos detectados e identificados no cromatograma de TIC confirmaram as identificações feitas após sobrecarga da amostra com os padrões existentes no laboratório, ou por comparação dos espectros de UV-vis e os respectivos tempos de retenção. Para apresentar estes resultados, que correspondem à confirmação da identificação de picos já descritos na bibliografia, pareceu mais fácil fazê-lo tendo em conta as diferentes famílias de compostos fenólicos mais importantes neste tipo de amostra:

1. Ácidos benzóicos e derivados;
2. Ácidos cinâmicos e derivados;
3. Flavonóides;
4. Estilbenos;
5. Outros compostos.

Como dentro de cada uma destas famílias já são conhecidos muitos compostos, consideraram-se os valores de *m/z* para cada um deles e traçou-se o "cromatograma de ião extraído" de modo a evidenciar no cromatograma as zonas onde os compostos poderão estar presentes. Os espectros de absorção do UV-vis, os resultados obtidos com os detectores de fluorescência e electroquímico, bem como os tempos de retenção permitiram complementar a informação para identificação. Para os compostos que não foi possível identificar e que designamos por "compostos não identificados", são dadas algumas pistas sobre estruturas possíveis, com base nos espectros de massa obtidos e fragmentações observadas em ensaios de MS/MS.

3.2.1 Ácidos benzóicos e derivados

Os ácidos benzóicos presentes nos vinhos em maiores concentrações são o ácido gálhico (MM=170) e o ácido protocatechuico (MM=154). No entanto, em menores concentrações, também se detecta o ácido *p*-hidroxibenzóico (MM=138), o ácido vanílico (MM=168), o ácido siríngico (MM=198), o ácido salicílico (MM=138) e o ácido gentísico (MM=154).

Quando se traça o cromatograma de ião extraído correspondente ao ácido gálhico (m/z=169*)*, são detectados vários picos no cromatograma como se pode observar na figura 3.9.

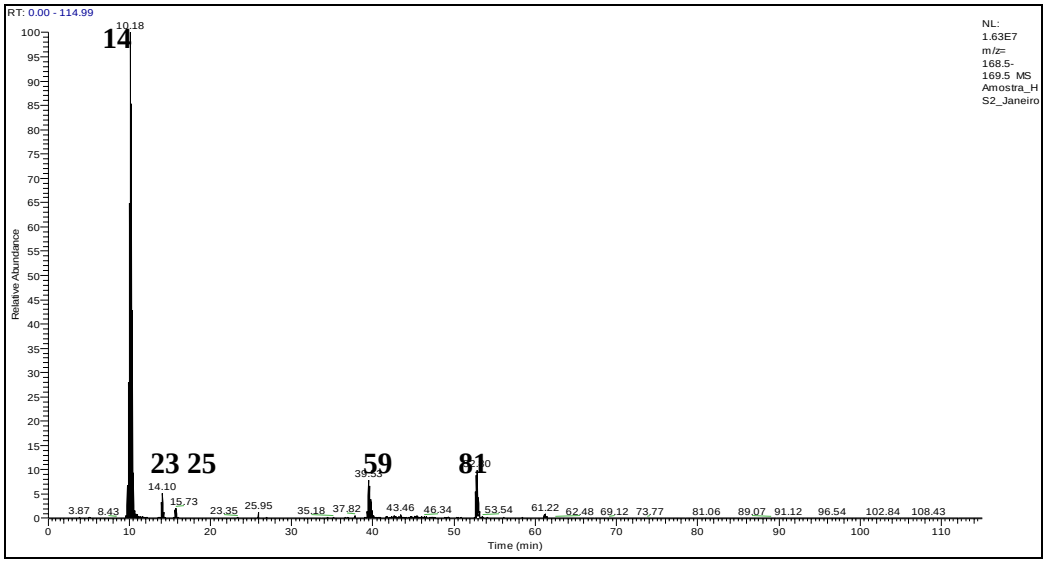


Figura 3.9. Cromatograma do extracto do vinho Moscatel de Setúbal C_4 para *m/z*= 169

Na figura 3.10 apresentam-se os espectros de massa e de absorção no UV do pico (14) com um t_r de 10.18 min. No espectro de massa são detectados os fragmentos de *m*/*z*: **169**; 214.5, 224.5 e 338.7 (*ver tabelas CI e CII, apêndice C*). Dado que a detecção decorreu em modo negativo o ião *m/z* 169 deverá corresponder ao ião $[M-H]^-$ do ácido gálhico e o ião *m/z* 214.5 deverá corresponder ao aducto $[M+HCOO]^-$ com o ácido fórmico constituinte da fase móvel.

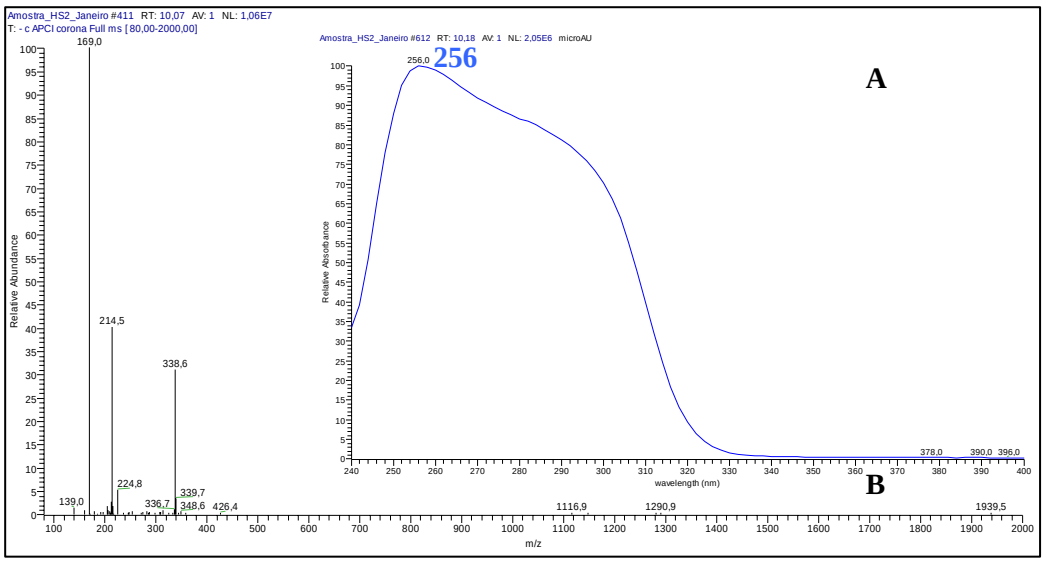


Figura 3.10. Pico (**14**) t_r=10.18 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectro de UV (200-400 nm); (**B**) Espectro de massa (*m/z* 90-2000)

A figura 3.11 apresenta o resultado da análise em MS/MS do ião *m/z* 169. O aparecimento do fragmento *m/z* 125 é explicado pela perda de uma molécula de CO_2 correspondente a 44 Da que é justificada no esquema de fragmentação apresentado[31]e o fragmento *m/z* 150.9 pela perda de uma molécula de H_2O.

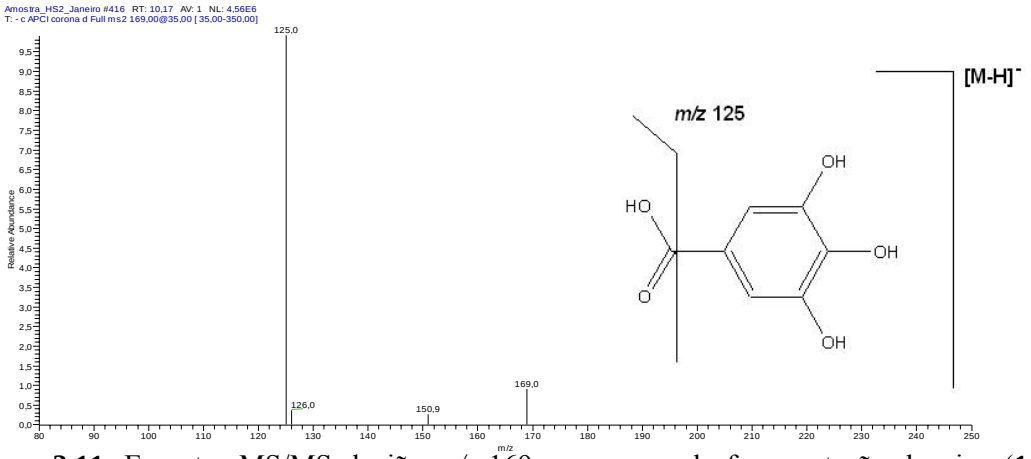


Figura 3.11. Espectro MS/MS do ião *m/z* 169 e esquema de fragmentação do pico (**14**) t_r= 10.18 min

Para o mesmo tempo de retenção (t_r= 10.18 min) é detectado o fragmento de *m/z* 339. A fragmentação deste ião origina o fragmento *m/z* 169 e deve tratar-se de um dímero de ácido gálhico $[2M-H]^-$, dado que quando se procedeu à análise da solução do mesmo padrão (100 mgL^{-1}) nas mesmas condições, também foi detectado este ião (figura 3.12) o que significa que se pode ter formado na fonte iónica. De facto, os fragmentos resultantes da fragmentação do ião *m/z* 339, que foram: 125.1; **169.1** confimam a presença de ácido gálhico no composto detectado (*ver tabela CI*).

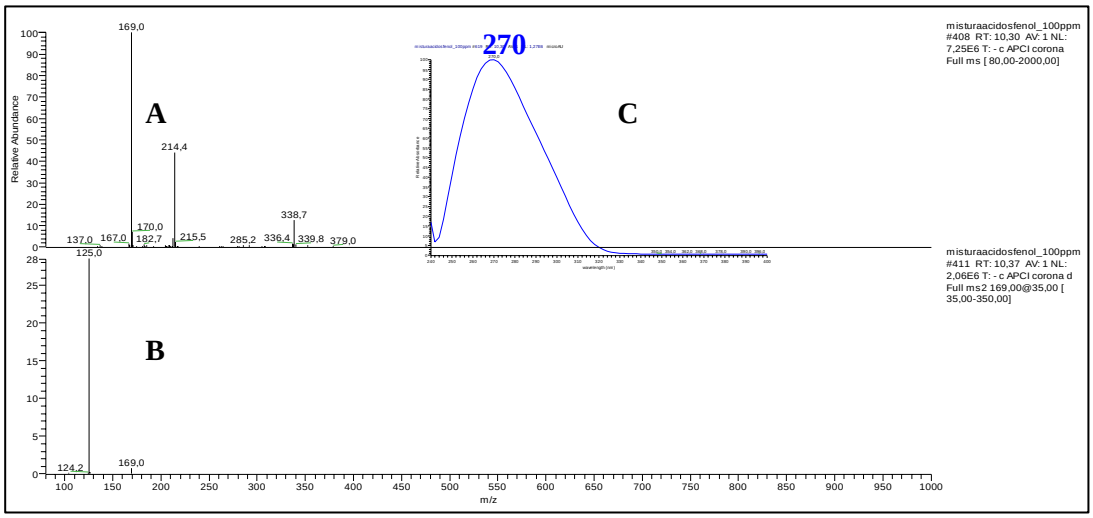


Figura 3.12. Padrão de ácido gálhico (100 mgL^{-1}): (**A**) Espectro de massa (*m/z* 80-200); (**B**) Espectro MS/MS do ião *m/z* 169; (**C**) Espectro de absorção (240-400 nm)

O padrão de ácido gálhico origina um único máximo de absorção típico[191] ao comprimento de onda de 270 nm (figura 3.12A), mas o espectro de absorção do(s) composto(s) correspondente ao mesmo pico (**14**) no cromatograma da amostra apresenta um máximo de absorção aos 256 e 300 nm (figura 3.10A). O espectro de absorção revela que neste tempo de retenção devem estar a coeluir mais compostos que não foram detectados nas condições de ensaio por LC-MS. No que se refere à detecção por fluorescência a 280/320 nm não se detecta nenhum pico no tempo de retenção do ácido gálhico, quer para a amostra quer para a solução padrão analisada, contrariamente ao que acontece com o perfil cromatográfico obtido com o detector electroquímico que apresenta um pico para este tempo de retenção.

O pico (**59**) que elui aos 39.53 min apresenta um ião $[M-H]^-$ de *m/z* 197 de acordo com o espectro apresentado na figura 3.13A. No espectro de massa também se detecta o ião correspondente ao aducto $[M+HCOO]^-$ de *m/z* 242.5 (197+46) e *m/z* 169 que se obtém pela perda do grupo $-CH_2CH_2$ o que mostra que deve tratar-se do **galhato de etilo**. O ião *m/z* 394.8 poderá ser um dímero $[2M-H]^-$, que tal como o dímero do ácido gálhico pode formar-se na fonte iónica do espectrómetro de massa. O espectro MS/MS do ião 197 assim como o espectro de absorção do composto correspondente ao pico (**59**) são apresentados na figura 3.13B e C respectivamente. O espectro de absorção apresentou um perfil característico de um derivado dum ácido benzóico, com um máximo de absorção a 272 nm e, no espectro de massa, há apenas os fragmentos correspondentes ao ácido gálhico, o que reforça a identificação do pico (**59**) como

galhato de etilo. Maior ênfase será dada a este composto no capítulo referente à quantificação dos ésteres etílicos em amostras de vinhos comerciais (*ver 3.3.4.).*

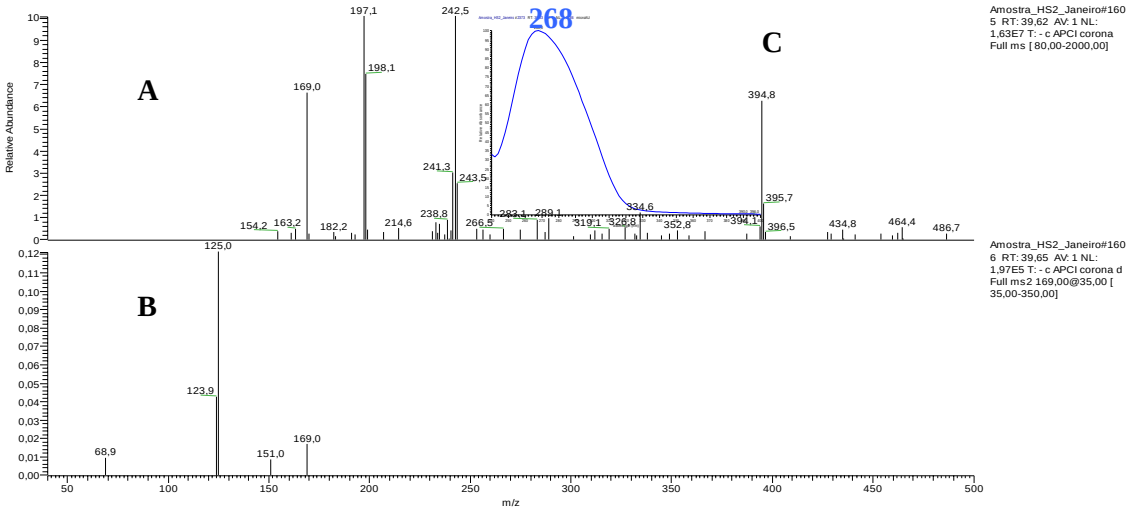


Figura 3.13. Pico (**59**) t_r= 39.53 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectro de massa (*m/z* 40-500); (**B**) espectro MS/MS do ião *m/z* 197; (**C**) espectro de absorção (200-400 nm)

O pico **81** (t_r 52.85 min) corresponde a um composto derivado da quercetina (quercetina-*3*-*O*-glucuronido) e por isso a discussão será feita mais à frente (*ver 3.2.3).*

Ao t_r=15.73 min (pico **25**) eluem compostos que não estão identificados (*ver tabelas CI e CII, Apêndice C*), e que apresentam valores de MM de 170, 316, 332 e 494 e também o pico correspondente ao ácido protocatechuico. Na figura 3.14 apresenta-se o cromatograma do ião extraído correspondente ao ião de m/z=153, o qual corresponde ao **ácido protocatechuico** (MM=154). O cromatograma revela a presença de 3 picos (figura 3.14) ao t_r de: 15.95 min (25), 16.93 min (26) e 52.85 min (81).

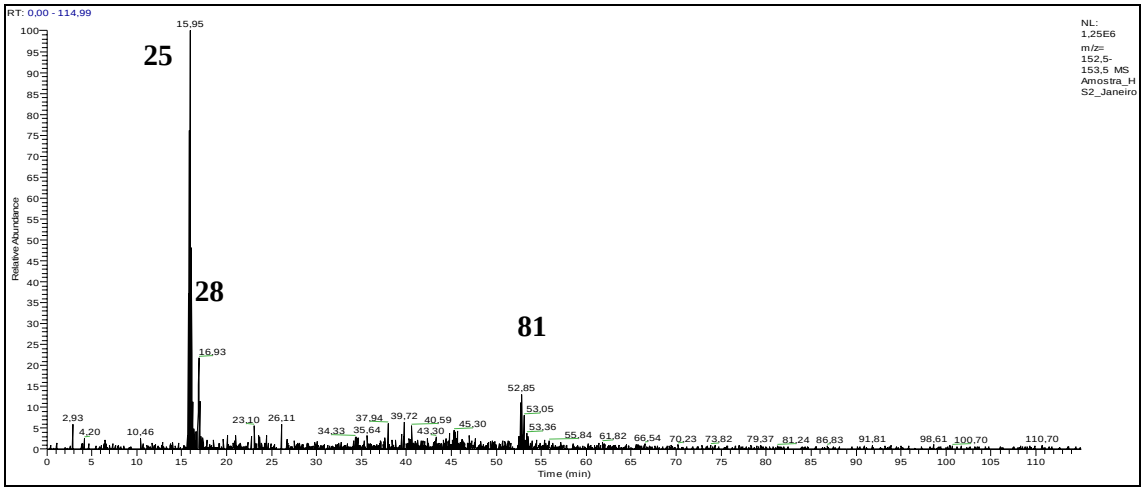


Figura. 3.14. Cromatograma do extracto do vinho Moscatel de Setúbal C_4 para *m/z* 153

Relativamente ao pico **25**, na figura 3.15 apresentam-se os espectros de massa e de MS/MS do ião *m/z* 153. No espectro de massa (figura 3.15A) há um conjunto de iões com diferentes valores de *m/z* **153**, 198.9, 206.8, 224.8, 315.1, 330.9, 360.7, 376.7 e 492.7 (*ver tabelas CI e CII, apêndice C*). No espectro, os fragmentos *m/z* 198.9 (153+46) *m/z* 206.8 (161+46), *m/z* 224.8 (179+46), *m/z* 360.7 (315+46) e *m/z* 376.7 (331+46) correspondem a aductos com ácido fórmico $[M+HCOO]^-$. A fragmentação (MS/MS) do ião *m/z* 153 (figura 3.15B) mostra o aparecimento do fragmento *m/z* 109 (*ver tabelas CI e CII, apêndice C*) por perda de CO_2 correspondente a 44 Da, no ião inicial. A análise do padrão de ácido protocatechuico (100 mgL^{-1}) conduz a um espectro de massa semelhante e o pico elui com o mesmo t_r pelo que se confirma a presença deste composto na amostra em estudo. O possível esquema de fragmentação[31] que está de acordo com os resultados obtidos é apresentado na figura 3.15. Este composto não é detectado por fluorescência (280/320 nm) e dá origem a um sinal no detector electroquímico.

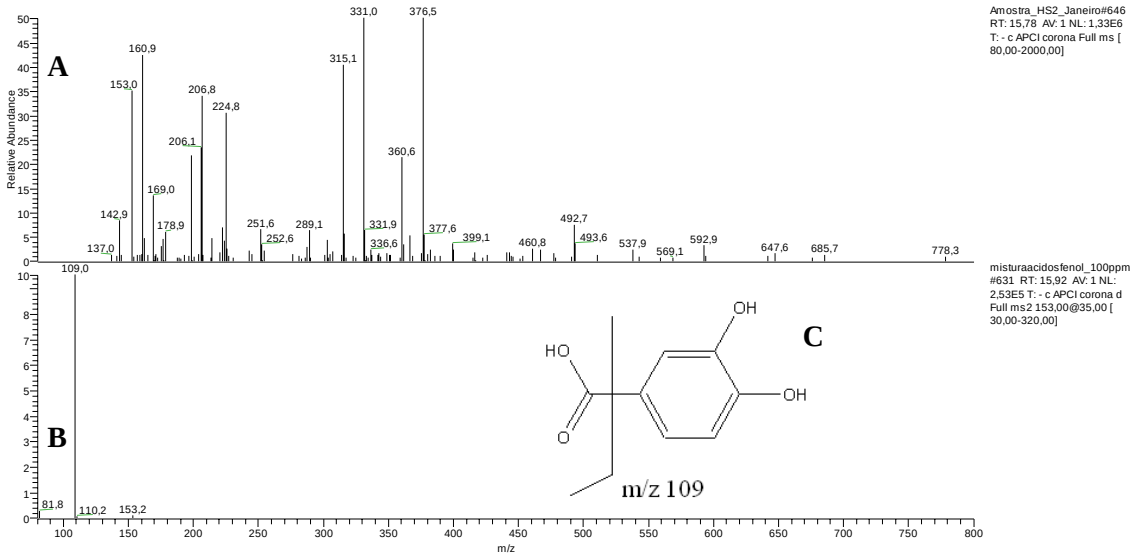


Figura 3.15. Pico (**25**) t_r= 15.73 min: (**A**) Espectro de massa (*m/z* 80-500), (**B**) espectro MS/MS do ião *m/z* 153; (**C**) Esquema de fragmentação do ácido protocatechuico

Ao t_r=16.93 min (pico **28**) eluem compostos que não estão identificados (*ver tabelas CI e CII, Apêndice C*) e que apresentam valores de MM de 174 e 316. Estes compostos apresentam máximos de absorção aos 276 nm, mas não apresentam fluorescência a 280/320 nm nem propriedades electroquímicas.

O padrão de **ácido gentísico** (t_r= 25 min) também apresenta o ião $[M-H]^-$ de *m/z* 153 assim como a fragmentação (MS/MS) deste ião também origina o ião *m/z* 109. Analisado o vinho Moscatel em que foi efectuada a sobrecarga com este padrão, os

resultados indicam que o ácido gentísico não é detectado na amostra de vinho Moscatel. Este composto também não é detectado por fluorescência (280/320 nm) e não tem actividade electroquímica.

Na análise de uma solução padrão de **ácido *p*-hidroxibenzóico** (100 mgL^{-1}) este composto apresenta um t_r aproximadamente aos 22 min, é detectado a 280 nm e por fluorescência ($\lambda_{ex.}/\lambda_{em.}$ 280/320 nm), mas não é detectado nas condições utilizadas por espectrometria de massa. A análise do padrão e sobrecarga das amostras com o ácido ***p*-hidroxibenzóico** por LC-DAD-FD-ED confirmaram a existência deste composto nas amostras de vinho Moscatel.

O **ácido salicílico** tem a mesma massa molar do ácido *p*-hidroxibenzóico (MM= 138) apresenta um t_r 59 min e quando se efectuou sobrecarga da amostra com o padrão confirmou-se que não era detectado na amostra de vinho nas condições utilizadas em qualquer dos modos de detecção usados.

Os iões característicos dos **ácidos vanílico** (MM=168) e **siríngico** (MM=198) que são respectivamente os iões *m/z* 167 e 197 também não foram detectados por espectrometria de massa. A análise de soluções padrão e respectiva sobrecarga na amostra confirmou que estes compostos não são detectados no extracto do vinho nas condiçõse em que a análise foi efectuada.

Apesar de dados bibliográficos descreverem que todos estes compostos são detectados em vinhos, nas condições usadas apenas foi possível identificar no vinho Moscatel de Setúbal os ácidos gálhico, protocatechuico e *p*-hidroxibenzóico. A identificação dos ácidos gálhico e protocatechuico foi possível por espectrometria de massa, detecção no UV, fluorescência e electroquímica, mas o ácido *p*-hidroxibenzóico apenas foi detectado por UV e fluorescência.

3.2.2- Ácidos cinâmicos e derivados

Os ácidos cinâmicos presentes nos vinhos, ácido *p*-cumárico (MM=164), cafeico (MM=180), ferúlico (MM=194) e sinápico (MM=224) podem existir em concentrações baixas nas formas livres mas encontram-se preferencialmente sob formas esterificadas com o ácido tartárico, respectivamente ácido cutárico (MM=296), ácido caftárico (MM=312), ácido fertárico (MM=326), ou sob a forma de glucósidos[76]. A pesquisa destes compostos na amostra vai ser feita através da análise do cromatograma correspondente aos iões $[M-H]^-$ dos compostos e respectivos aductos com o ácido

fórmico $[M+HCOO]^-$. Os cromatogramas obtidos ao c.d.o. de 280 nm são também apresentados bem como outro c.d.o. que seja característico da família do composto a ser pesquisado.

Tendo em conta a massa molecular do **ácido *p*-cumárico** traçou-se o cromatograma correspondente ao ião $[M-H]^-$ e aducto (*m/z*=163+209). Vários picos são detectados no cromatograma (t_r 6.47; 14.52; 21.52; 22.64; 24.70; 26.0 e 26.77 min) mas só alguns (t_r =24.70, 26.0 e 26.77) apresentam um valor de absorção superior para o c.d.o. de 320 nm, o qual é característico dos compostos da família dos ácidos cinâmicos (figura 3.16). No entanto, os ensaios realizados por LC-MS com a solução padrão de ácido *p*-cumárico (t_r= 45 min) confirmam que não ocorre a detecção deste composto nas condições de trabalho utilizadas. A tentativa de identificação nas amostras por LC-DAD por sobrecarga da amostra com o padrão confirmou que este composto não é detectado no extracto do vinho analisado.

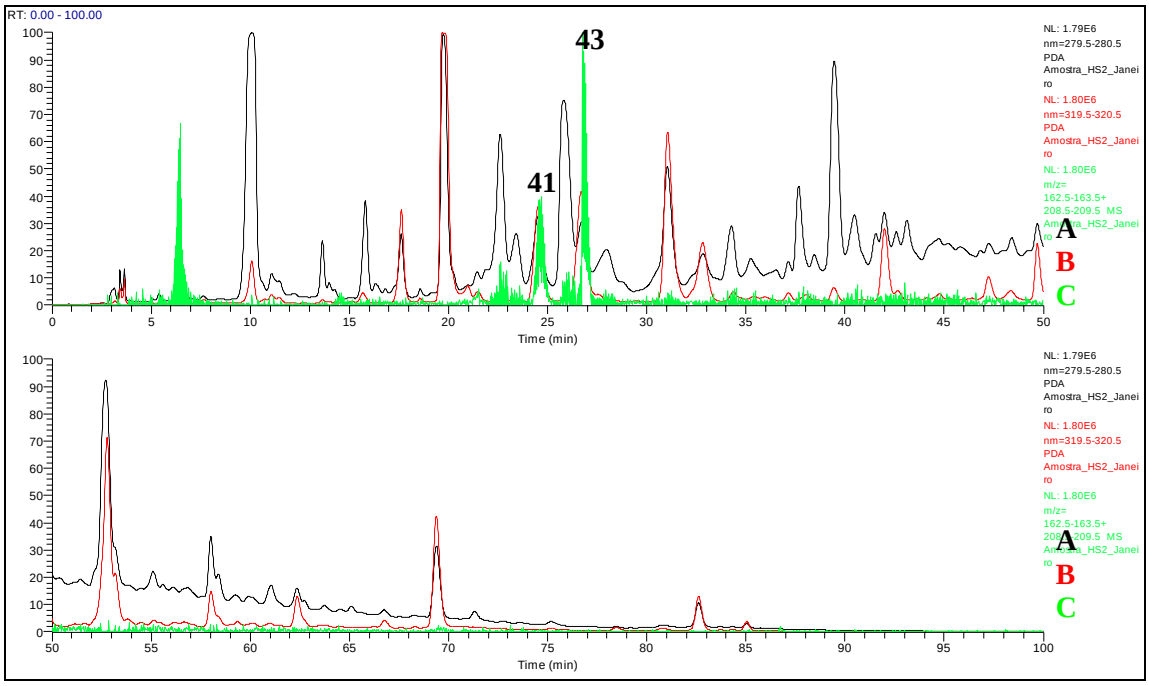


Figura 3.16. Cromatogramas do extracto de vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (B) c.d.o. 320 nm; (**C**) **m/z (163+209)**

O ácido *p*-cumárico existe preferencialmente no vinho sob a forma de éster tartárico (**ácido cutárico**) e os espectros de massa dos compostos que eluem a 24.70 (**41**) e 26.77 min (**43**) (figura 3.17) apresentam o ião predominante *m/z* 295 $[M-H]^-$ característico do ácido cutárico e o ião *m/z*=163 resultante da perda de um fragmento neutro de 132 Da correspondente a ácido tartárico (MM=150 Da: 150-18=132).

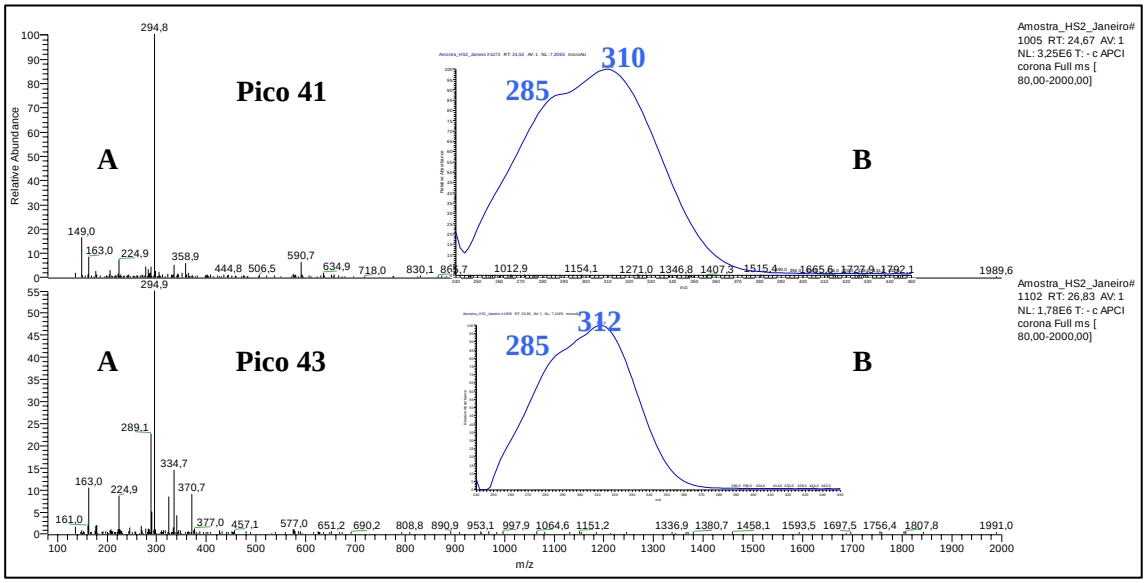


Figura 3. 17. Picos (**41**) e (**43**) no extracto de vinho Moscatel: **(A)** Espectros de massa (m/z 80-600); (**B**) espectros de absorção (c.d.o. 240-400 nm)

Ensaios de MS/MS do ião *m/z* 295 mostram que os fragmentos obtidos correspondem aos previstos para a fragmentação destes ácidos (figura 3.18 e *tabela CI*). Por sua vez ensaios MS/MS do ião *m/z*=163 originam o fragmento *m/z*=119 (163-44) por perda de CO_2. Estes resultados confirmam que se trata de um derivado tartárico do ácido cumárico[183,184].

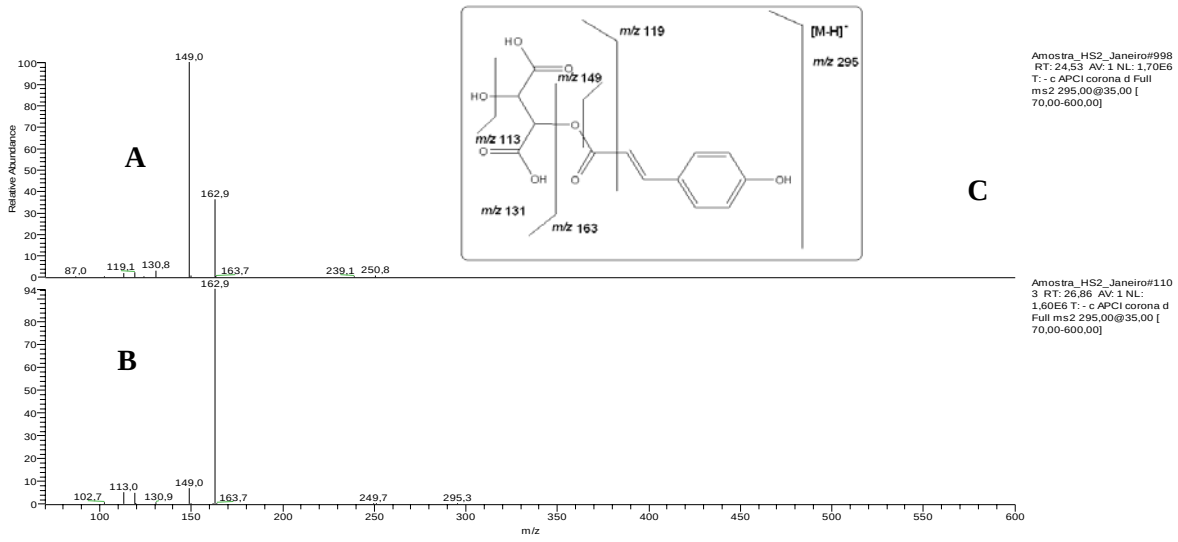


Figura 3.18. Espectros MS/MS do ião *m/z* 295: (**A**) *c*-cutárico tr= 24.53 min; (**B**) *t*-cutárico tr=26.86 min (**C**) esquema de fragmentação do ácido cutárico

Os espectros de absorção no UV correspondentes aos picos detectados e identificados como **ácidos *c*- e *t*-cutárico** correspondem ao perfil característico de um

derivado de um ácido cinâmico e na figura 3.19 apresentam-se os cromatogramas correspondentes à detecção a 280 e 320 nm e à soma dos iões m/z 295+341.

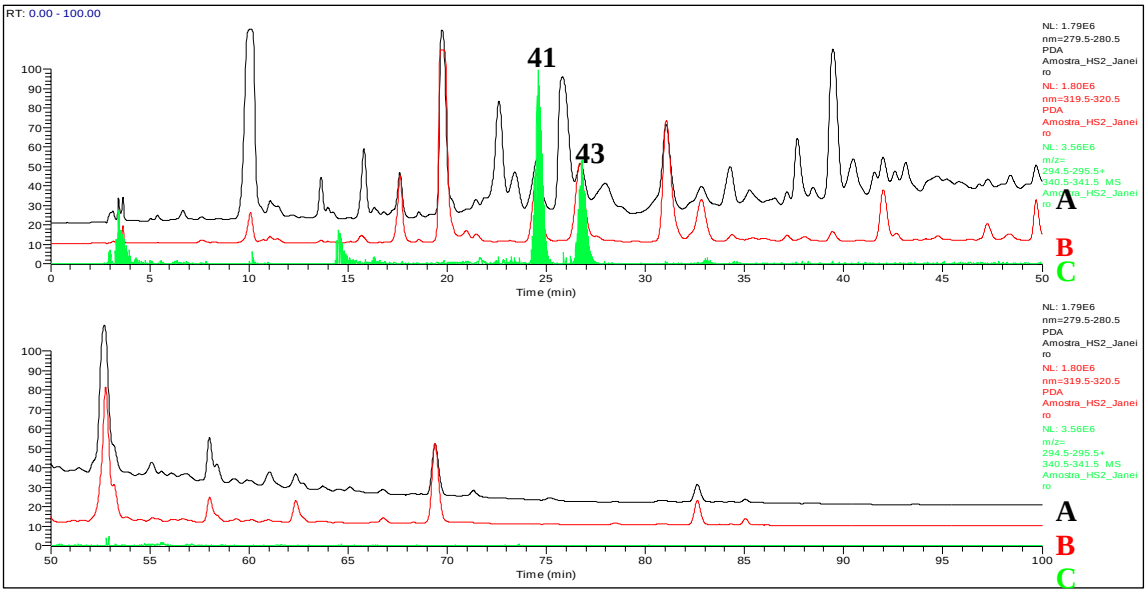


Figura 3.19. Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (**B**) **c.d.o. 320 nm**; (**C**) **m/z (295+341)**

Os picos (**41**) e (**43**) apresentam a absorção a 320 nm superior à absorção a 280 nm o que está de acordo com o perfil característico do espectro de absorção no UV-vis desta família de compostos. O conjunto de resultados obtidos está de acordo com dados já publicados[40].

No espectro de massa apresentado na figura 3.20 correspondente ao pico 43 (ácido *t*-cutárico) é detectado um ião e respectivo aducto de *m/z*: ião 325 e 371 (325+46) que corresponde a outro composto que co-elui a este tempo de retenção. Este composto não foi identificado e apresenta uma MM de 326.

No cromatograma de ião extraído para *m/z* 179+225, característicos do **ácido cafeico** (figura 3.20), são detectados picos nos t_r: 17.7, 19.84, 25.90, 31.19, 37.81 e 52.91 min. Analisada uma solução padrão de ácido cafeico (100 mgL^{-1}) nas mesmas condições analíticas, verificou-se que o t_r deste composto correspondia a 31.19 min (pico **47**) e o seu espectro de massa coincidiu com o espectro do composto detectado na amostra para o mesmo t_r. Ensaios de MS/MS efectuados para o ião *m/z* 179 detectado no extracto de vinho Moscatel mostram que este dá origem ao ião *m/z* 135, que se forma pela perda de uma molécula de CO_2 (44 Da) proveniente do grupo carboxilo do ácido cafeico (figura 3.21D)[193].

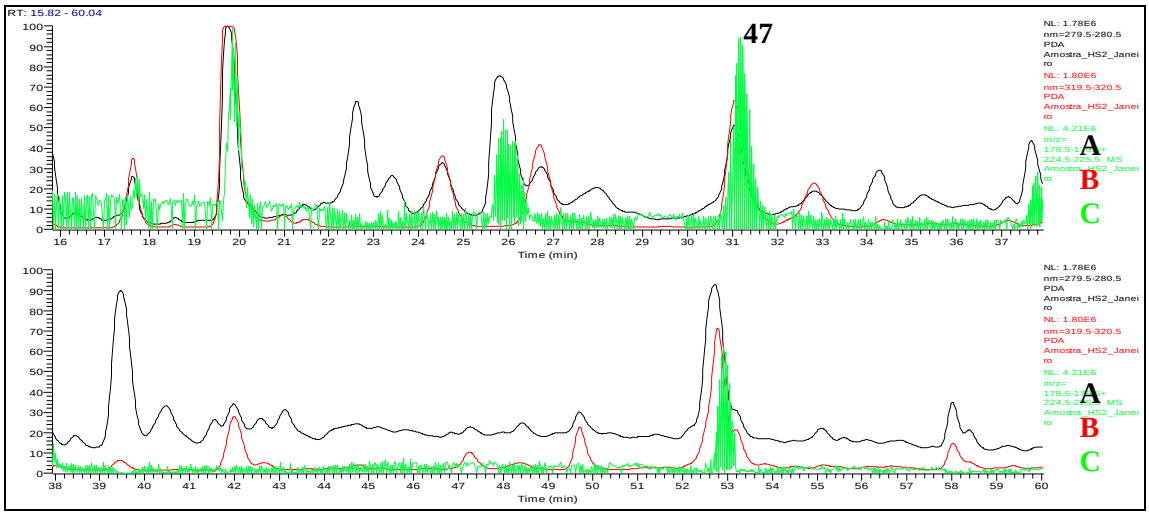


Figura 3.20. Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (**B**) **c.d.o. 320 nm**; (**C**) **m/z (179+225)**

O espectro de absorção apresentado na figura 3.21C mostra as 2 bandas típicas desta família de compostos, aos c.d.o. de 288 e 322 nm. A sobrecarga da amostra com padrão do ácido cafeico confirmou a presença deste composto na amostra de vinho Moscatel.

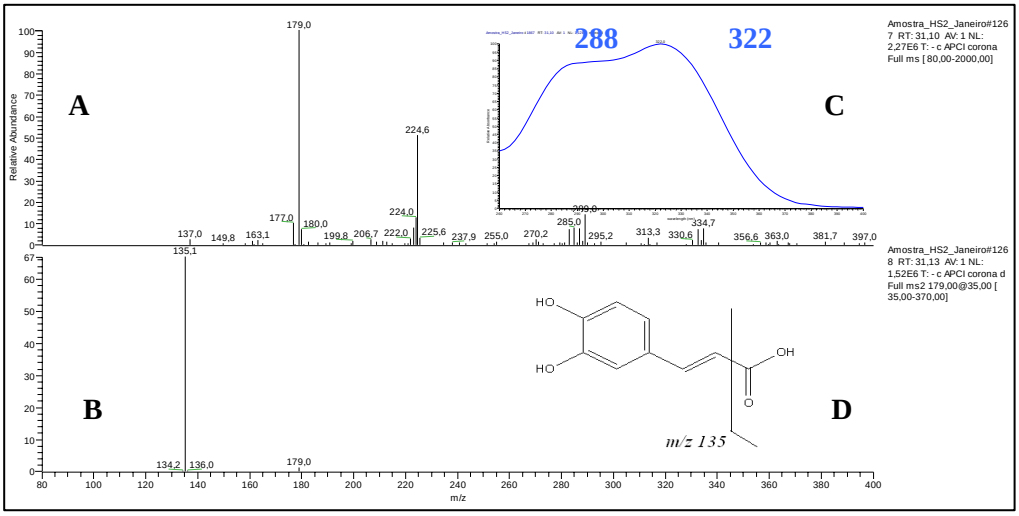


Figura 3.21. Pico (**47**) t_r=31.10 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) espectro de massa (m/z 80 a 400); (**B**) espectro MS/MS do ião *m/z* 179; (**C**) espectro de absorção (240-400 nm) e (**D**) esquema de fragmentação

O ácido cafeico também pode existir neste tipo de amostras sob a forma de éster do ácido tartárico: **ácido *c*-caftárico** e **ácido *t*-caftárico** com ião $[M-1]^-$ *m/z* 311. Na figura 3.22 apresentam-se os cromatogramas referentes à detecção no UV e à soma dos iões *m/z* 311+357.

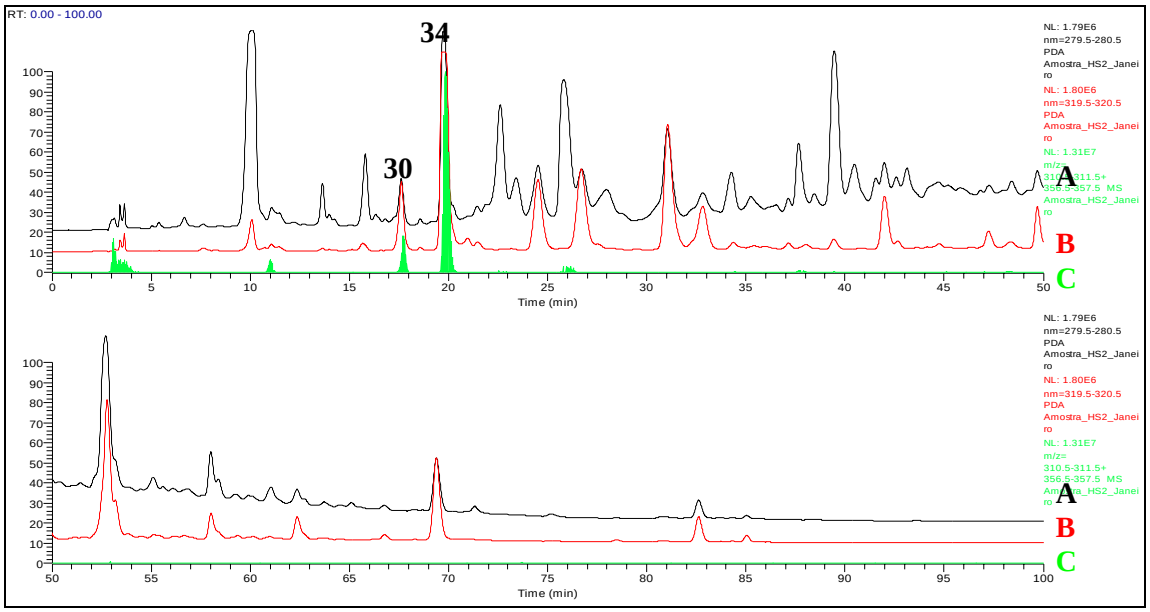


Figura 3.22. Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (B) **c.d.o. 320 nm**; (C) **m/z (311+357)**

São detectados dois picos (**30** e **34**) para os quais a absorção a 320 nm é superior à absorção a 280 nm o que está de acordo com o tipo de espectro desta família de compostos. Os espectros de massa correspondentes aos picos **30** e **34** (figura 3.23) mostram que o ião *m/z* 311 é importante e alguns iões são comuns nos dois compostos: *m/z* 149, 179, 225.

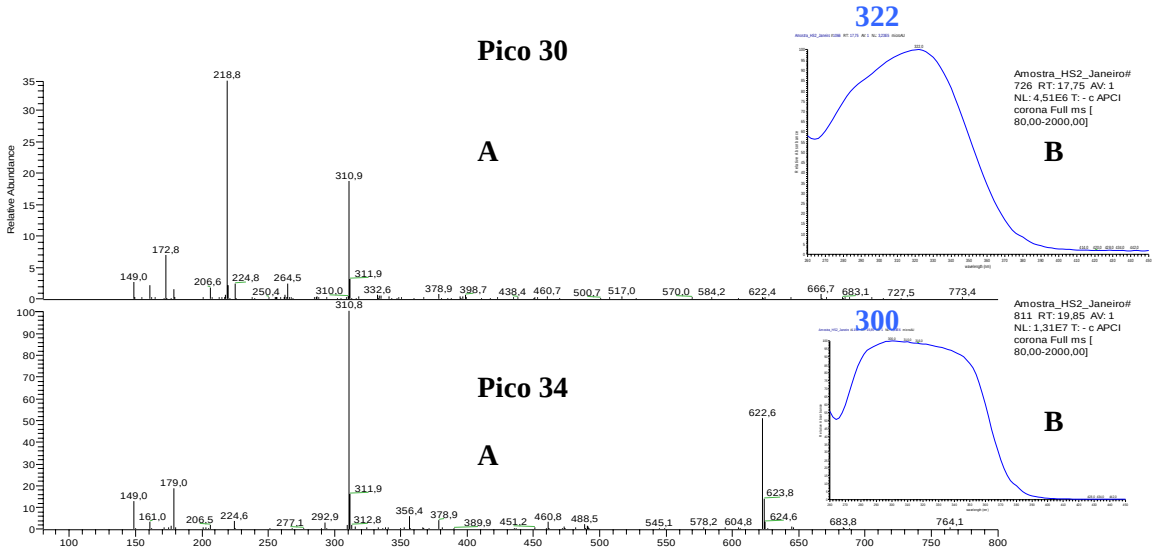


Figura 3.23. Pico (**30**) t_r= 17.75 min e (**34**) t_r= 19.85 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectros de massa (m/z 80-800); (**B**) espectros de absorção (c.d.o. 240-400 nm)

Ensaios de MS/MS para o ião 311 originam os fragmentos de *m/z* 135, 149 e 179 (figura 3.24). O fragmento *m/z* 179 corresponde ao ião molecular $[M-H]^-$ do ácido cafeico e forma-se pela perda de parte da molécula do ácido tartárico[26] (132 Da)

conforme ilustrado na figura 3.22B. O fragmento *m/z*=135 é originado pela perda do grupo CO_2 do ácido cafeico como descrito anteriormente para a fragmentação deste ácido. O ião *m/z* 149 corresponde ao ião $[M-H]^-$ do ácido tartárico (150-1).

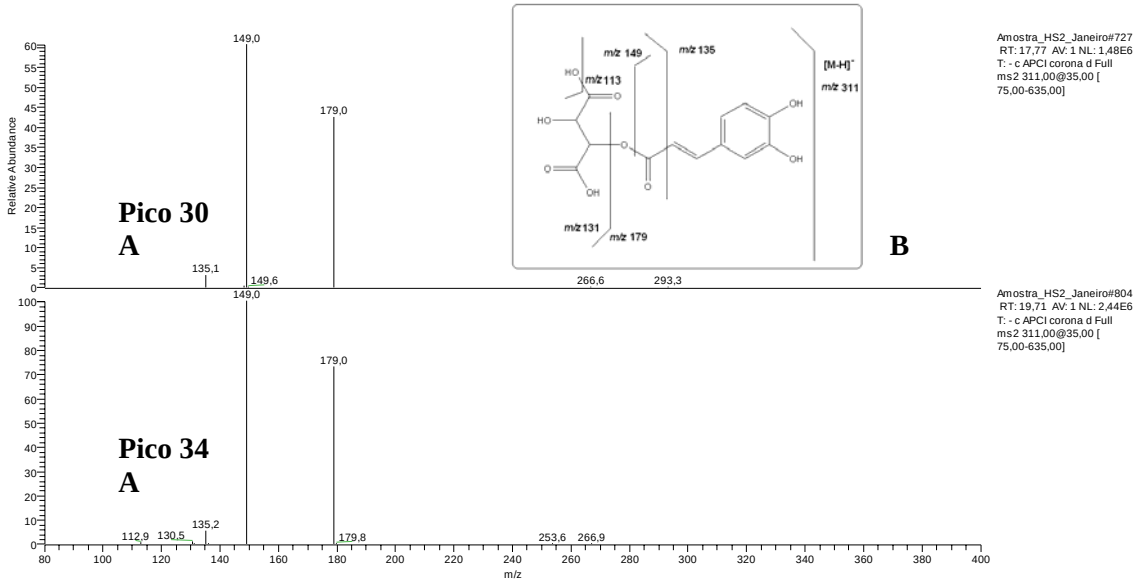


Figura 3.24. Pico (**30**) t_r= 17.77 min e (**34**) t_r= 19.71 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectro MS/MS do ião m/*z* 311; (**B**) esquema de fragmentação

O espectro de massa do pico **30** apresenta ainda dois fragmentos com *m/z* 173 e 219 (aducto de ácido fórmico do composto com massa molar 174) (figura 3.23) que também foi detectado para outros tempos de retenção (14.10, 16.91, 17.75 e 18.19 min) mas os compostos não foram identificados. No espectro de massa do pico **34** (figura 3.23) também é detectado o ião *m/z* 622.7 que, à semelhança do que acontecia com o ácido gálhico, poderá corresponder ao dímero $[2M-H]^-$ do ácido caftárico que se poderá ter formado na fonte iónica.

Os espectros de absorção dos picos **30** e **34** apresentam perfis diferentes e por sua vez o espectro do pico 34 difere do espectro característico apresentado pelos derivados do ácido cinâmico com um máximo aos 322 nm e um "ombro" aos 286 nm (*ver tabela 3.1)*. Muito provavelmente ao t_r do pico 34 estão a co-eluir outros compostos que não são detectados nas condições utilizadas no LC-MS. O detector electroquímico apresenta um sinal intenso a estes valores de t_r quando se analisam extractos de vinho Moscatel, o que era de esperar, dado que se sabe que compostos deste tipo apresentam uma importante actividade antioxidante.

Relativamente ao detector de fluorescência e nas condições ensaiadas para os extractos de vinho (280/320 nm) são detectados picos pouco intensos aos t_r de

aproximadamente 17 e 19 min. Em face dos resultados obtidos foi possível concluir que aos picos **30** e **34** correspondem os ácidos *c*- e *t*-caftárico mas outros compostos estão a co-eluir.

O ião *m/z* 179 detectado a outros tempos de retenção poderá ter origem na fragmentação de outros compostos, como por exemplo catequina (*m/z*=289), epicatequina (*m/z*=289) e quercetina (*m/z*= 301). No cromatograma para tempos de retenção curtos (figura 3.25) detecta-se também este ião que pode corresponder à presença de hexoses (MM=180) nos extractos analisados, o que explica o facto de não apresentar absorção nos 280 nm. Esta possibilidade será discutida mais à frente neste trabalho (*ver 3.2.5*)

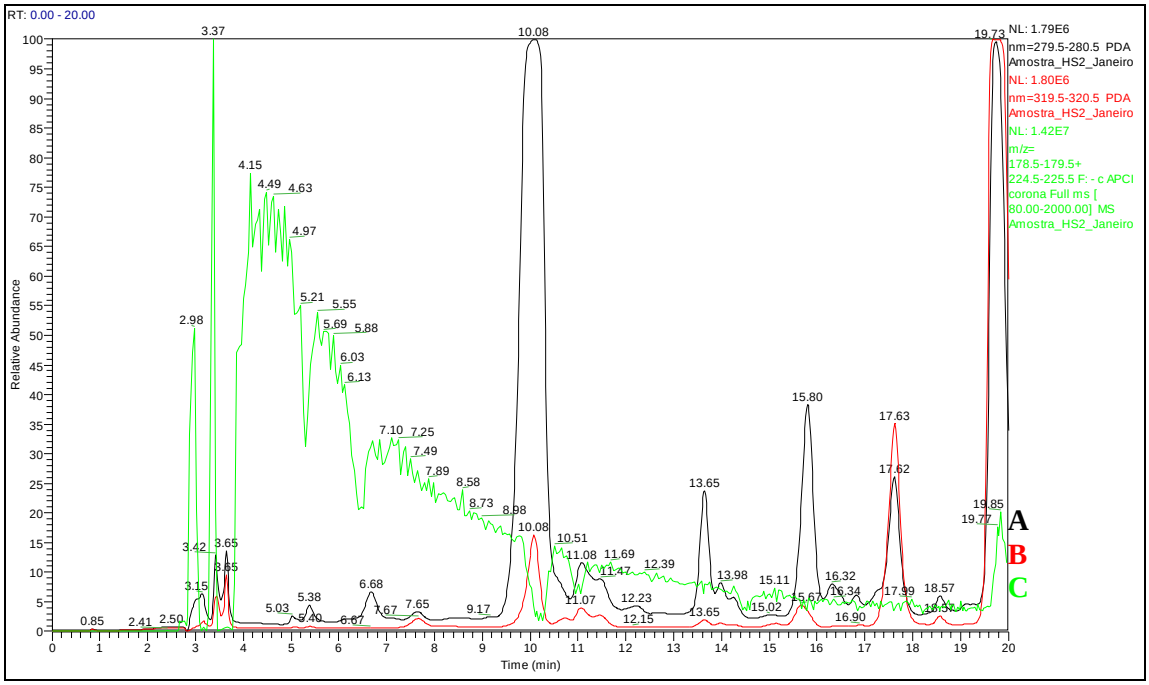


Figura 3.25. Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (**B**) **c.d.o. 320 nm**; (**C**) **m/z (179+225)**

O cromatograma para *m/z* 193+239 (Figura 3.26C) correspondente ao **ácido ferúlico** e respectivo aducto (193+46) mostra dois picos que se confirmou não corresponderem ao ácido ferúlico, já que quando se analisou uma solução padrão deste ácido nas condições de análise descritas, não foi detectado este ião característico, o que poderia significar que as condições de MS utilizadas não eram adequadas para este composto. Dados bibliográficos[26,40,192] referem que ensaios de MS/MS para o ião *m/z* 193 origina os fragmentos de *m/z* 134, **149** (perda de CO_2, *m/z*=193-44) e 178 (perda do grupo CH_3 *m/z*=193-15) mas traçado o cromatograma correspondente ao somatório dos sinais

obtidos para cada uma destas massas não foi possível detectar nenhum pico que sugerisse a presença deste ácido. A análise da solução padrão com detector de díodos permitiu a detecção de um pico aos 47.28 min, com espectro característico desta família de compostos e por isso a detecção nas amostras foi feita com base nos resultados obtidos neste modo de detecção e no modo electroquímico.

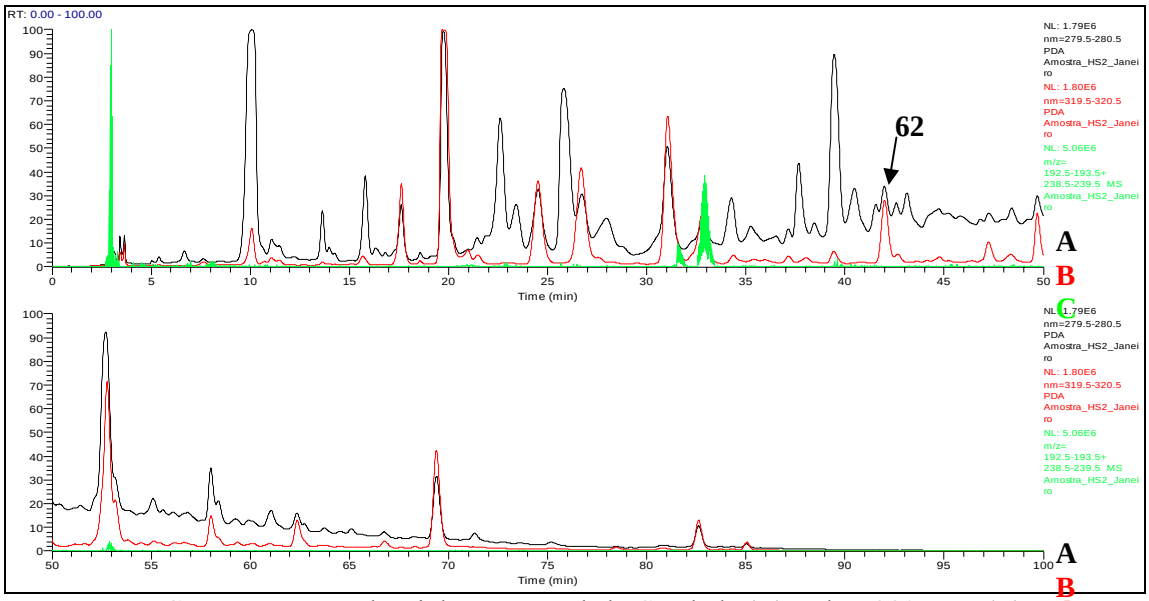


Figura 3.26 Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (**B**) **c.d.o. 320 nm**; (**C**) **m/z (193+239)**

No cromatograma do extracto de vinho Moscatel (figura 3.22) foram detectados 4 picos com os tempos de retenção de: 25.71, 25.99, 31.57 e 32.95 min e que apresentam o ião típico do ácido fertárico e o aducto correspondente (*m/z* 325 e 371).

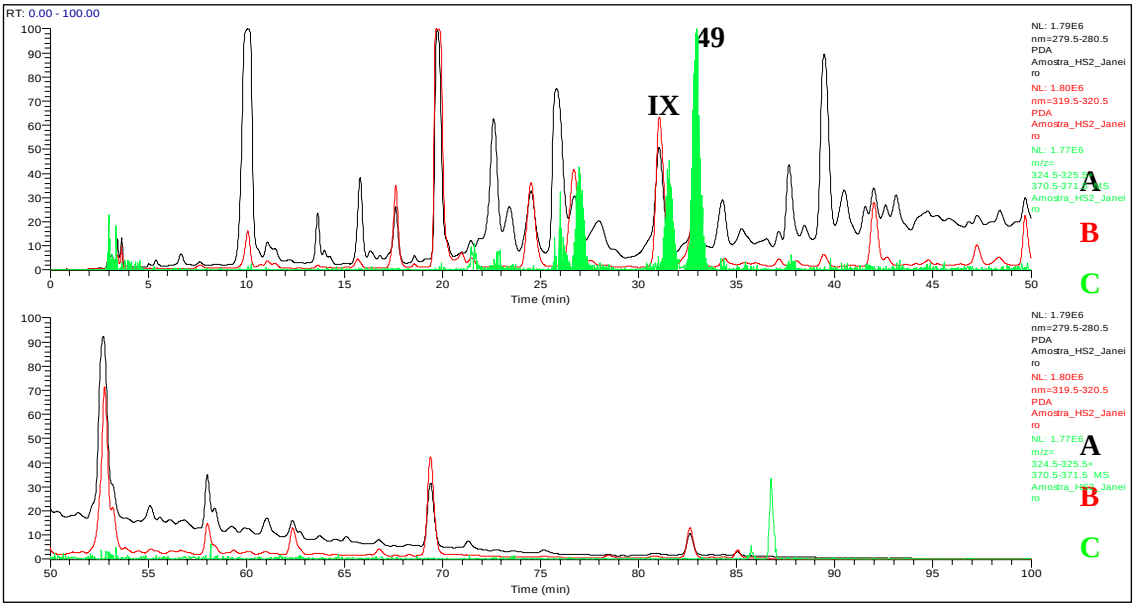


Figura 3.27. Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (**B**) **c.d.o. 320 nm**; (**C**) **m/z (325+371)**

Os compostos detectados nos tempos de retenção de 31.57 e 32.95 min foram identificados como **ácidos *c* e *t*-fertárico** respectivamente. A figura 3.28 compara os espectros de absorção e os espectros de massa destes compostos. Os espectros de absorção (figura 3.28B) apresentam máximos de absorção a 284 e aproximadamente aos 320 nm. No entanto este perfil não é característico do espectro de absorção de um derivado do ácido cinâmico pois a intensidade de absorção da banda II (*ver tabela 3.1*), é maior do que seria de esperar. Muito provavelmente ocorre co-eluição com outros compostos. Relativamente aos espectros de massa o ião com *m/z* 325 corresponde ao ião molecular na forma $[M-H]^-$ dos ácidos *t e c*- fertárico e além deste ião também são detectados iões com valores de *m/z* 577 de abundância relativa pequena. O *m/z* 577 está associado a uma procianidina, o que pode confirmar a co-eluição referida anteriormente.

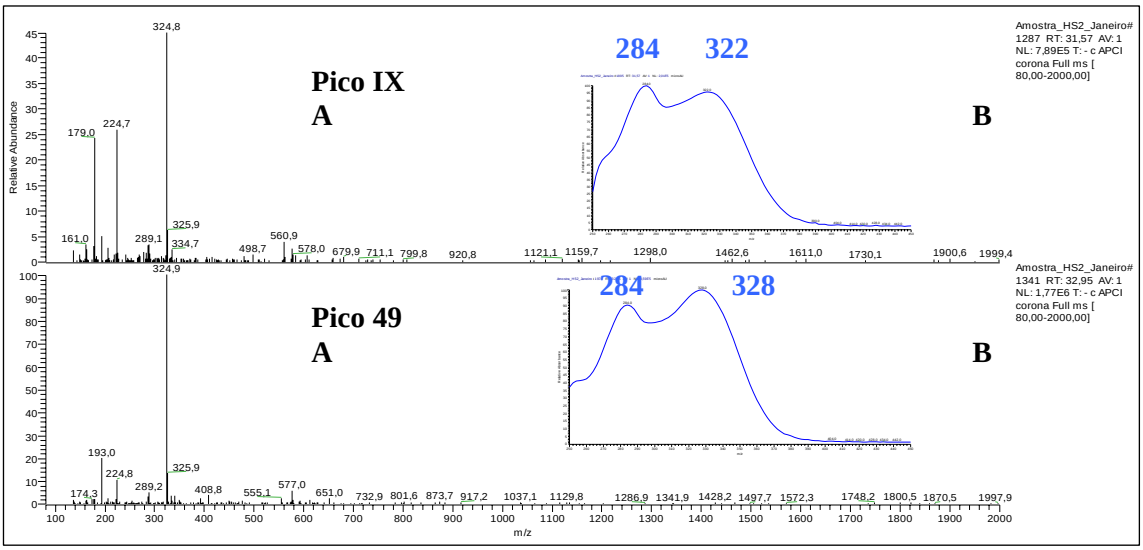


Figura 3.28. Pico **IX** t_r= 31.57 min e (**49**) t_r= 32.95 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectro de massa (m/z 100-2000); (**B**) espectros de absorção (c.d.o. 250-450 nm)

A fragmentação do ião *m/z* 325 origina os iões *m/z* 149 e 193 que correspondem respectivamente ao ião $[M-H]^-$ característico do ácido tartárico e do ácido ferúlico (figura 3.29).

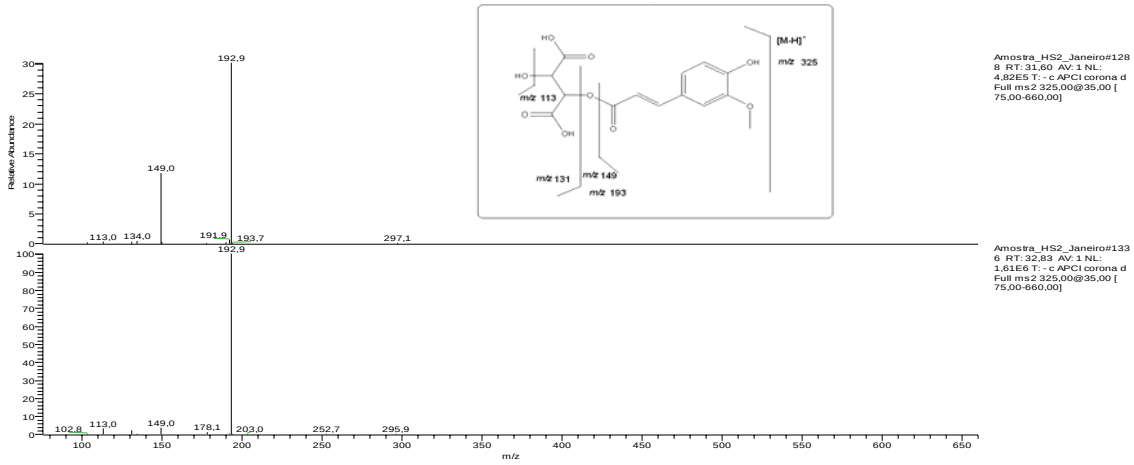


Figura 3.29. Espectro MS/MS do ião m/*z* 325 (**A**) pico **IX** t_r= 31.57 min), (**B**) pico (**49**) t_r= 32.95 min; (**C**) esquema de fragmentação

Aos 86.78 min (figura 3.27) também é detectado um pico não identificado que apresenta os iões *m/z* 325 e 677 e 808 (*ver tabelas CI e CII, apêndice C*). O espectro de absorção deste pico (**133**) apresenta dois máximos de absorção a 254 e 276 nm. A fragmentação do ião *m/z* 325 origina com maior abundância relativa o fragmento *m/z* 307 que se forma pela perda de uma molécula de água (18 Da).

Relativamente ao **ácido sinápico**, o cromatograma correspondente aos iões *m/z* 223+269 $[M-H]^-$ e $[M+HCOO]^-$ apresentado na figura 3.30 permite a detecção de vários picos, no entanto nenhum deles apresenta a absorção característica deste tipo de composto ao c.d.o. de 320 nm e por outro lado a análise por LC-DAD de uma solução padrão (t_r= 55 min) e de uma amostra com sobrecarga do padrão, confirmam que este composto não é detectado no extracto de vinho Moscatel analisado.

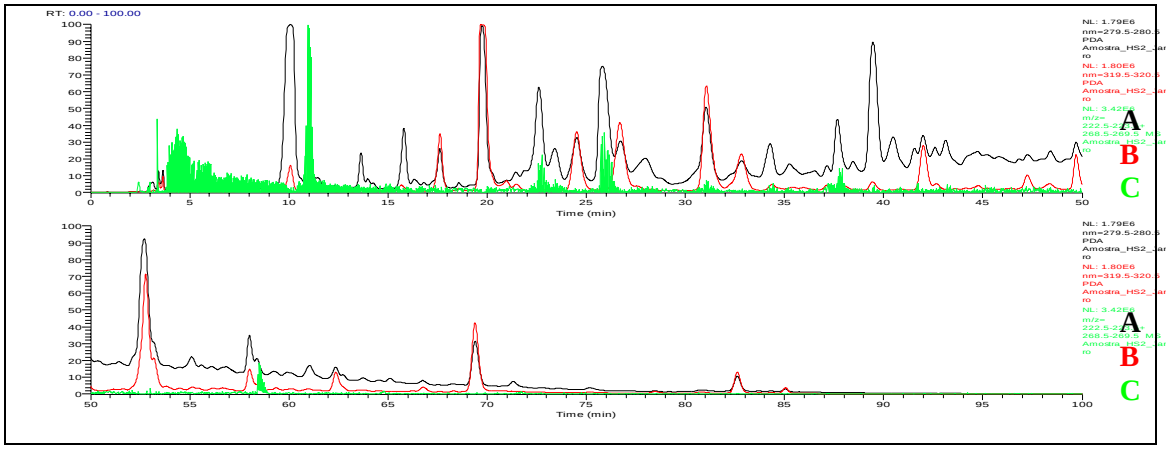


Figura 3.30. Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (**B**) **c.d.o. 320 nm**; (**C**) **m/z (223+269)**

A ordem de eluição dos ácidos: cafeico (t_r= 30 min) < cumárico (t_r= 45 min) < ferúlico (t_r= 51 min) < sinápico (t_r= 55 min) e dos seus isómeros *c* e *t* está de acordo com dados da bibliografia[193] e pode ser explicada pelo número de grupos -OH e –OCH_3 presentes na molécula de cada um destes ácidos. Como já foi referido, nestas condições de análise, os compostos mais polares eluem primeiro seguidos dos compostos de polaridade menor. O ácido cafeico por apresentar na sua estrutura dois grupos hidroxilo (-OH) ligados ao anel benzénico será o composto mais polar. No ácido cumárico apenas existe um grupo -OH e o ácido ferúlico só apresenta um grupo OH e um grupo metoxi (-OCH_3) e por isso a sua polaridade é menor. Relativamente ao ácido sinápico ele apresenta ligado ao anel um grupo –OH e 2 grupos -OCH_3 o que poderá justificar o facto de ser o composto menos polar. Para os ésteres do ácido tartárico a ordem de eluição é semelhante à observada para os ácidos livres.

Foram assim identificados nas amostras os seguintes compostos: ácidos ***c*** e ***t*-caftárico** (picos **30** e **34**), ***c*** e ***t*-cutárico** (picos **41** e **43**) e ***c e t*- fertárico** (picos **IX** e **49**).

Para além dos ésteres do ácido tartárico, os ácidos cinâmicos formam **ésteres etílicos** com o etanol presente nas amostras de vinho. Compostos como o caftarato de etilo, caftarato de dietilo, cafeato de etilo e cumarato de etilo já foram identificados em amostras de vinho branco[26].

A figura 3.31 apresenta o cromatograma obtido para o ião $[M-H]^-$ do **cafeato de etilo**, *m/z* 207 e para o aducto $[M+HCOO]^-$ *m/z* 253 sendo detectado um composto com t_r 69.53 min (**109**).

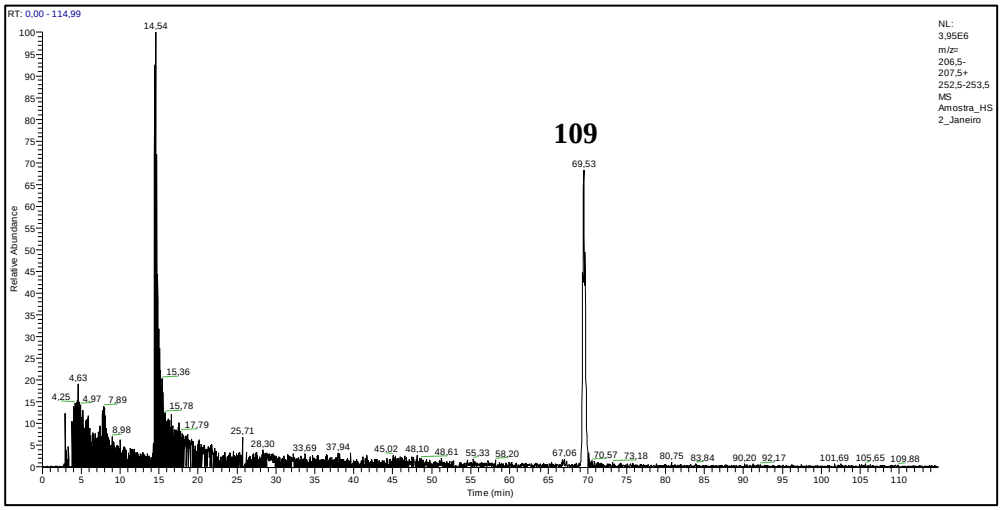


Figura 3.31. Cromatograma do extracto do vinho Moscatel de Setúbal para *m/z* (207+ 253)

O espectro de massa do composto é apresentado na figura 3.32 bem como o resultado do ensaio MS/MS para o *m/z* 207 (figura 3.32B) que origina principalmente os iões *m/z*: 135.2, 161.2 e 179.1. O fragmento *m/z* 179 corresponde ao ião $[M-H]^-$ do ácido cafeico, o qual por perda de uma molécula de H_2O (18 Da) $[M-H-H_2O]^-$ pode originar o fragmento m/z 161 e por perda da molécula de CO_2 (44 Da) origina o fragmento m/z 135 de acordo com o esquema apresentado na figura 3.32D[46] e já anteriormente descrito O espectro de absorção obtido (figura 3.32C) apresenta o perfil característico de um derivado do ácido cinâmico. A identificação do cafeato de etilo (**109**) nas amostras também foi confirmada por detecção por díodos e fluorescência ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 324/442 nm) após sobrecarga das amostras com a solução padrão de cafeato de etilo ($5mgL^{-1}$). Mais pormenores relativos ao cafeato de etilo serão discutidos noutra parte deste trabalho em que se procedeu à sua quantificação em amostras de vinhos comerciais e nos ensaios de vinificação.

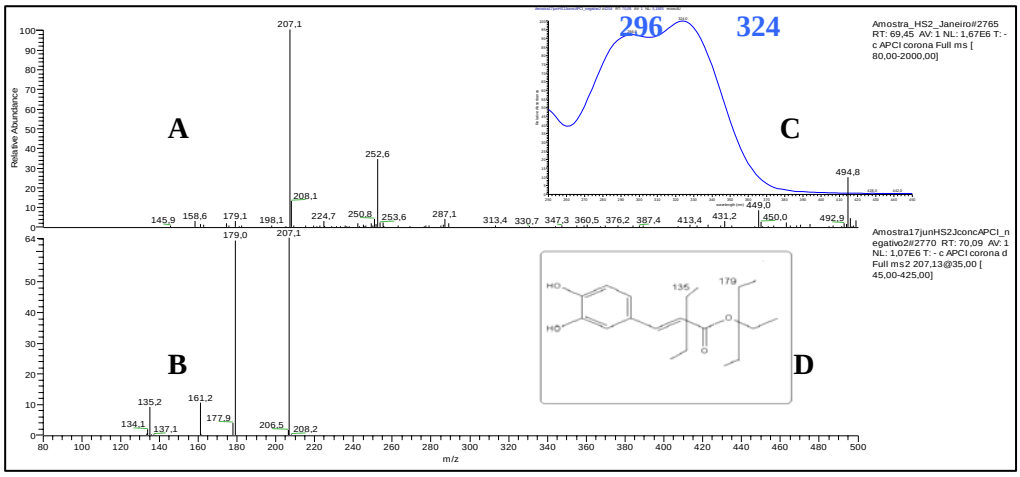


Figura 3.32. Pico **109** tr= 69.53 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectro de massa (m/z 80 - 500); (**B**) Espectro MS/MS do ião *m/z* 207; (**C**) Espectro de absorção (250-450 nm); (**D**) esquema de fragmentação do cafeato de etilo

Utilizando o equipamento do tipo "armadilha de iões" com fonte de APCI não foi possível identificar nas amostras em estudo o pico correspondente ao **cumarato de etilo** (MM=192), (figura 3.33), mas era de esperar que, em face dos resultados obtidos na detecção a 280 nm e 320 nm, que correspondesse ao composto com t_r aproximado de 82.5 min (**125**).

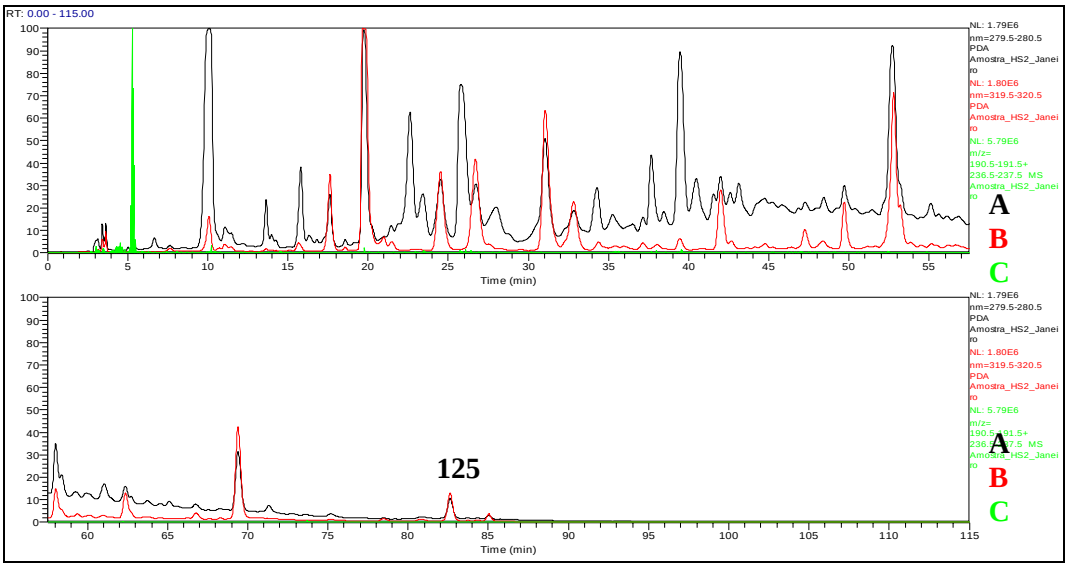


Figura 3.33. Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (**B**) **c.d.o. 320 nm**; (**C**) **m/z (191+237)**

A utilização de um espectrómetro de massa com uma fonte de ESI e equipado com um analisador do tipo quadrupolo tornou possível a sua detecção após fragmentação do ião $[M-H]^-$ do cumarato de etilo *m/z* 191 dando origem aos iões de *m/z*: 119, 145 e 163. Na figura 3.34 apresenta-se o esquema de fragmentação.

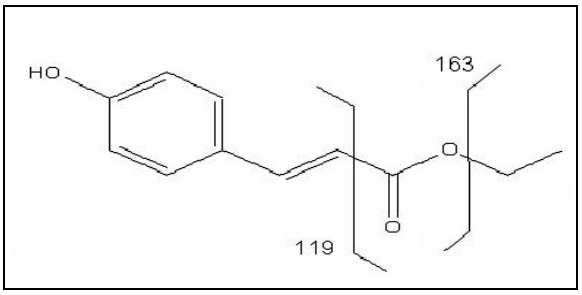
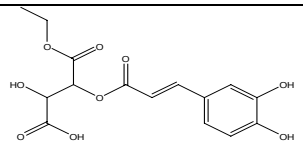
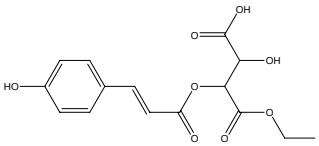
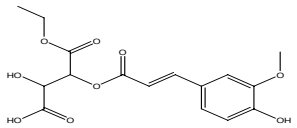
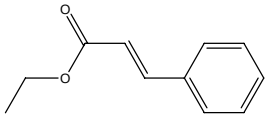
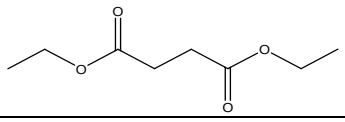


Figura 3.34. Esquema de fragmentação do cumarato de etilo

O fragmento *m/z* 163 e *m/z* 119 correspondem respectivamente à perda de 28 Da (CH_2CH_2) e de 72 Da (CO_2+CH_2CH_2) no ião $[M-H]^-$. O ião *m/z* 145 $[M-H-H_2O]^-$ corresponde à perda de uma molécula de H_2O (18 Da) pelo ião *m/z* 163.

Outros ésteres como o **caftarato de etilo**, **cutarato de etilo**, **fertarato de etilo**, **cinamato de etilo** e **succinato de etilo** foram detectados em amostras de Champagne[194,195] e foram por isso pesquisados na amostra de vinho Moscatel. Na tabela 3.2. apresentam-se as estruturas e a massa molar desses compostos.

Tabela 3.2. Estrutura e massa molecular de alguns ésteres etílicos detectados em Champagne

Nome do composto	Fórmula	Massa molar
Caftarato de etilo		340
Cutarato de etilo		324
Fertarato de etilo		354
Cinamato de etilo		176
Succinato de dietilo		174

Foi possível, utilizando a fonte de ESI e o modo SIR para pesquisa dos iões $[M-H]^-$ específicos fazer uma possível identificação nas amostras de vinho analisadas (*ver 3.3)*.

3.2.3. Flavonóides

Os principais grupos de flavonóides[26] presentes nas uvas e no vinho são os flavonóis, flavan-3-ol (flavanóis) e antocianinas. As antocianinas não estão presentes na maioria das amostras estudadas dado que se trata de vinhos resultantes de vinificação a partir de uvas brancas.

Flavonóis

Os **flavonóis** existem como aglíconas (miricetina, quercetina, campferol e isoramnetina), 3-*O*-glicósidos e diglicósidos e na tabela 3.3. apresentam-se alguns desses compostos assim como os valores da massa molar (MM) respectivas.

Tabela 3.3. Alguns flavanóis detectados em vinho[26]

Composto	MM
dihidroquercetina-3-*O*-ramnósido (astilbina)	450
dihidrocampferol	288
dihidrocampferol-3-*O*-glucósido	450
dihidromiricetina-3-*O*-ramnósido	446
dihidroquercetina-3-*O*-glucósido	466
dihidroquercetina-3-*O*-xilósido	436
dihidrocampferol-3-*O*-ramnósido (engeletina)	434
quercetina-3-*O*-galactósido	464
quercetina-3-*O*-glucósido	464
quercetina-3-*O*-glucuronido	478
dihidroquercetina (taxifolina)	304
miricetina	318
isoramnetina	316
quercetina	302
campferol	286

Tendo em conta a massa molar da **quercetina** traçou-se o cromatograma (Figura 3.35) correspondente ao ião $[M-H]^-$ e aducto (*m/z*=301+347) e observa-se que são detectados no cromatograma vários picos (t_r; 52.47; 52.93; 53.32; 70.53 min) que podem corresponder à aglícona e seus derivados. A quercetina (111) elui aos 70.53 min e nos outros t_r são detectados os glicósidos: quercetina-3-*O*-galactósido (**79**), quercetina-3-*O*-glucuronido (**81**) e quercetina-3-*O*-glucósido (**82**)**.**

Comparados os perfis obtidos no UV a c.d.o. 280 e 360 nm observa-se que estes compostos apresentam uma absorção importante a 360 nm e que é característico desta família de compostos. A separação pouco eficaz entre os vários picos torna necessário recorrer a técnicas de separação mais eficazes de forma a melhorar os resultados obtidos e a possibilidade de usar o modo SIR em LC-MS pode resolver este problema e facilitar a identificação assim como a quantificação.

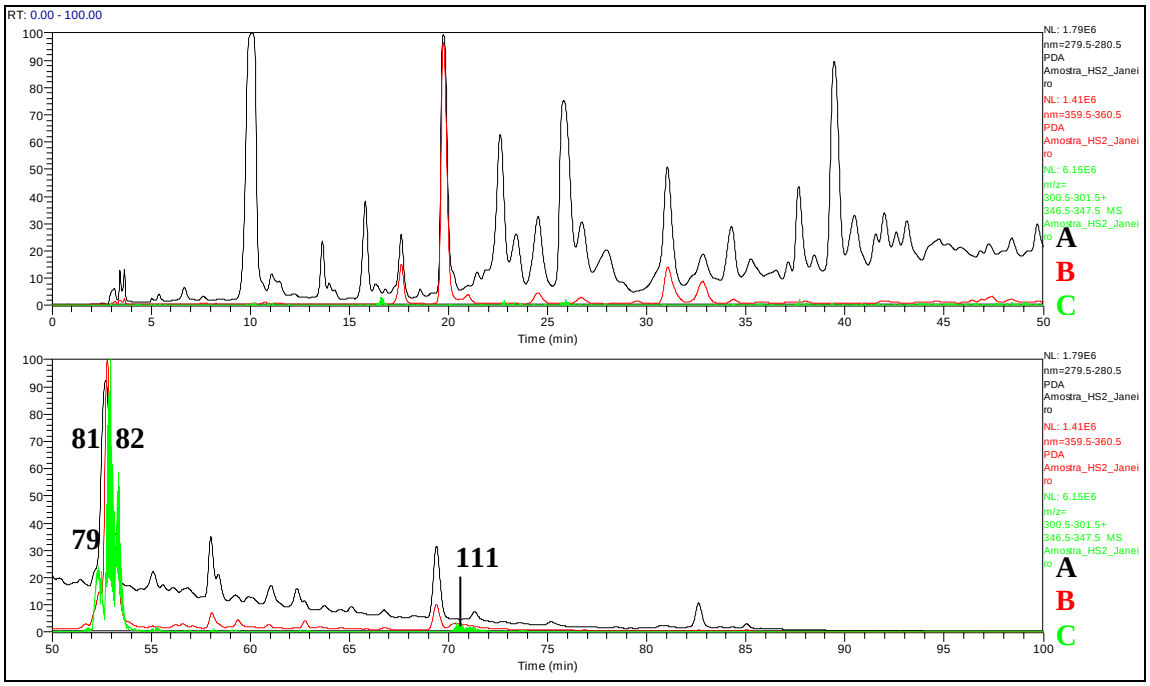


Figura 3.35. Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (**B**) **c.d.o. 320 nm**; (**C**) **m/z (301+347)**

Analisada uma solução padrão de **quercetina** (33 mgL^{-1}) nas mesmas condições das amostras, verificou-se que o t_r deste composto correspondia a 70.47 min (pico **111**). Os ensaios de MS/MS para identificação do ião *m/z* 301 na amostra foram efectuados num outro extracto de vinho Moscatel (B_4) que apresentava um pico com uma área superior para o compsotos que se suspeitava corresponder à quercetina. Foi possível detectar os fragmentos *m/z* 273 por perda do grupo CO (28 Da), o fragmento *m/z* 257 que resultou da perda de uma molécula de CO_2 e o fragmento *m/z* 179 que se forma por retrociclização da quercetina[196] (figura 3.36). Estes resultados eram semelhantes aos obtidos para o padrão. O espectro de absorção do composto apresentava as 2 bandas típicas dos flavonóis aos c.d.o. de 256 e 370 nm. Relativamente ao detector de fluorescência este composto não é detectado a λ_{ex} /λ_{em} 280/320 nm, no entanto verificou-se que apresentava actividade electroquímica. Confirmou-se assim a presença de quercetina (**111**) nas amostras.

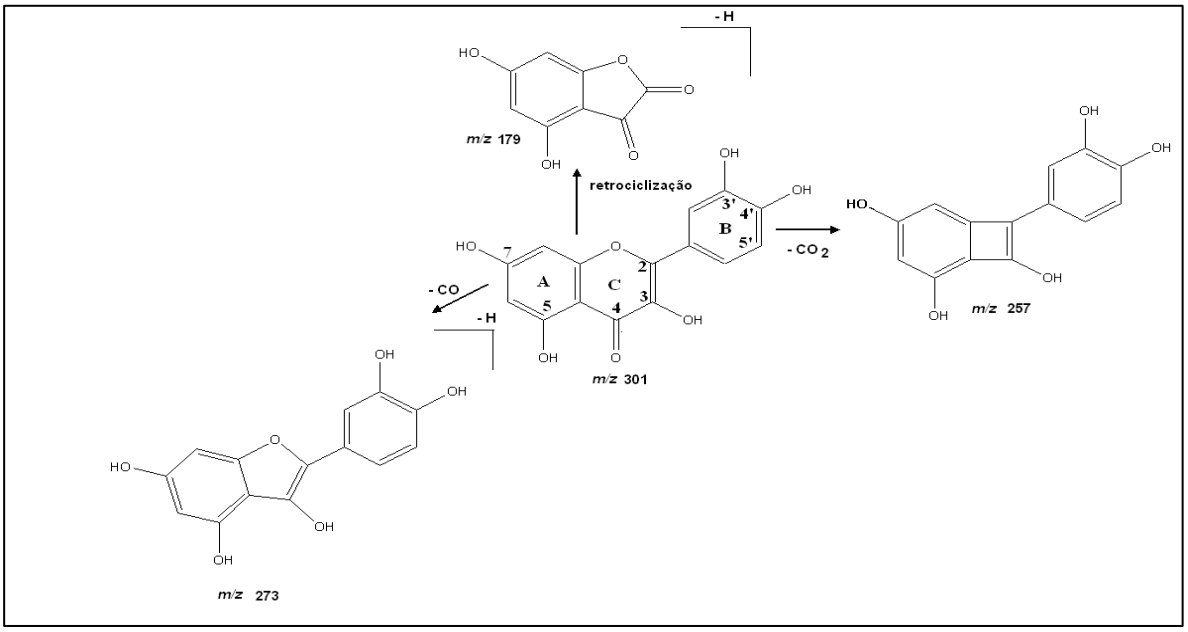


Figura 3.36. Esquema de fragmentação da quercetina[196]

Para os restantes picos detectados no cromatograma tentou-se, em face dos dados bibliográficos existentes, proceder à detecção e confirmação da presença dos derivados da quercetina. O ião *m/z* 463 foi detectado nos tempos de retenção de 52.47 e 53.32 min. Dado que a detecção decorreu em modo negativo o ião *m/z* 463 (picos **79** e **82**) corresponde ao ião molecular na forma $[M-H]^-$ do composto de massa molar 464 e que corresponde respectivamente à **quercetina-3-*O*-galactósido (79)** e **quercetina-3-*O*-glucósido (82)**. O ião correspondente ao aducto com ácido fórmico da fase móvel $[M+HCOO]^-$ que é *m/z* 509 (463+46) também é detectado. A fragmentação de *m/z* 463 origina sempre o fragmento correspondente à quercetina (*m/z* 301) por perda de 162 Da equivalente ao açúcar.

A identificação da quercetina-3-*O*-glucósido **(82)** foi confirmada pela comparação do espectro de massa e do tempo de retenção de uma solução padrão (33 mgL^{-1}) analisada nas mesmas condições da amostra (*ver 2.5)*. Na figura 3.37 comparam-se os espectros de massa do pico presente na amostra (B) e da quercetina-3-*O*-glucósido (D), assim como os espectros de absorção no UV-vis (A e C). Os espectros de absorção na amostra e no padrão (figura 3.37A e B) não são exactamente iguais o que se deve a co-eluição com um composto que apresenta alguma absorção a 285 nm e que não está a ser detectado nas condições utilizadas em espectrometria de massa. Pode considerar-se que o espectro de absorção apresenta o perfil característico de um flavonóide (banda II – 256 nm; banda I 352 nm com um "ombro" a 300 nm).

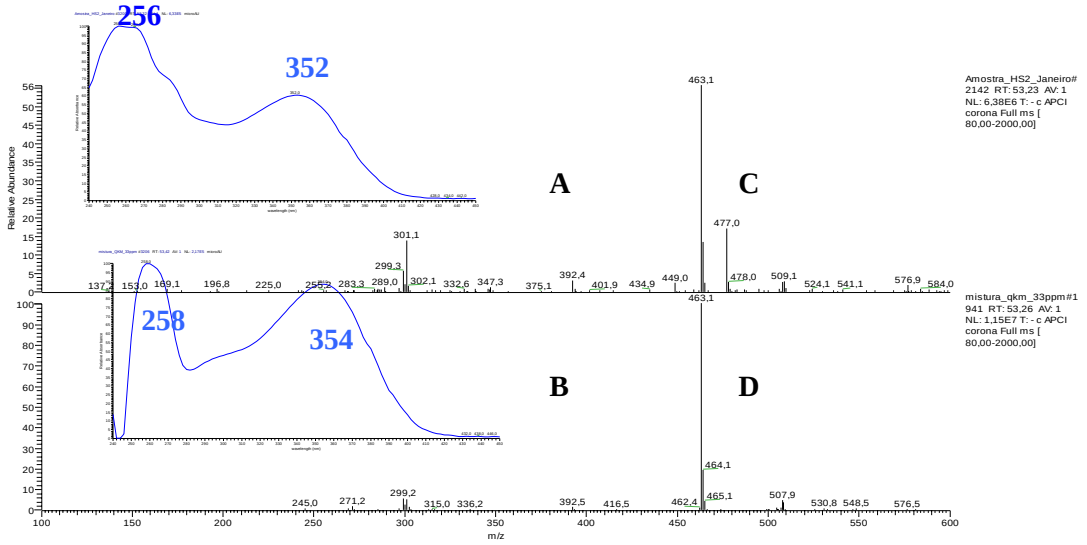


Figura 3.37. Pico **82** tr= 53.2 min espectro de absorção (240-400 nm): (**A**) no extracto de vinho Moscatel (**B**) no padrão de quercetina-3-*O*-glucósido. Espectros de massa (**C**) no extracto da amostra de vinho Moscatel; (**D**) no padrão de quercetina-3-*O*-glucósido

O pico **79** detectado no t_r de 52.47 (figura 3.38A) caracteriza-se por apresentar um ião de *m/z* 463 e ensaios de MS/MS deram origem ao fragmento *m/z* 301, como se pode observar na figura 3.38C, tendo o composto sido identificado como **quercetina-3-*O*-galactósido** (MM=464).

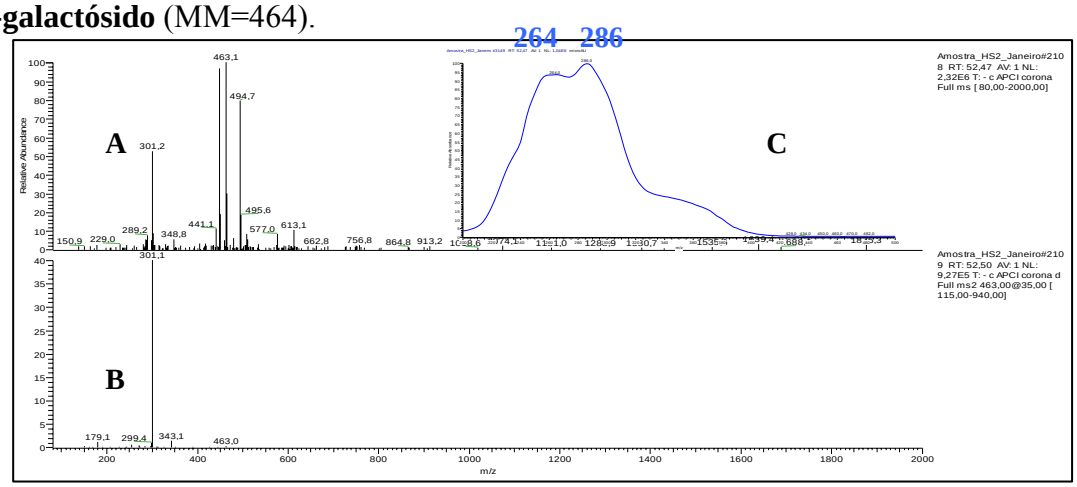


Figura 3.38. Pico (**79**) t_r= 52.47 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectro de massa (90-2000); (**B**) Espectro Ms/MS do ião *m/z* 463; (**C**) espectro de absorção (200-500 nm)

Dados bibliográficos[26] descrevem que o espectro de absorção do UV-vis deste composto apresenta máximos de absorção ao c.d.o. 256 nm, 354 nm e um "ombro" a 300 nm. No espectro de absorção obtido no UV-vis e apresentado na figura 3.38C, observa-se um perfil diferente com 2 máximos a 264 e 286 nm e um"ombro" a 355 nm e esta diferença pode-se explicar pela co-eluição de outros compostos, o que era de esperar em face do espectro de MS obtido em que eram detectados outros iões que podiam corresponder a compostos de MM 450 (NI) e 578 (procianidina).

No tempo de retenção de 52.85 min elui um composto de massa molar de 478 identificado como **quercetina-3-*O*-glucuronido (81)**, identificação feita com base em comparação com dados bibliográficos[92]. No espectro de massa é detectado o ião molecular $[M-H]^-$ de *m/z* 477 e correspondente aducto do ácido fórmico (*m/z* 523). Ensaios de MS/MS do fragmento *m/z* 477 mostram que por perda do grupo glucuronido (176 Da) se forma o ião *m/z* 301 característico da quercetina.

A ordem de eluição dos derivados de quercetina, quercetina-3-*O*-galactósido (t_r= 52.47 min) < t_r quercetina-3-*O*-glucuronido (t_r= 52.93 min) < t_r quercetina-3-*O*-glucósido (t_r= 53.32 min) em face dos resultados obtidos, está de acordo com o descrito na bibliografia[26], embora não fosse possível a confirmação com padrões dado que no laboratório só existia o padrão de quercetina-3-*O*-glucósido. Nesta amostra também é detectada a quercetina-3-*O*-ramnósido, que elui aos 58.20 min depois da quercetina-3-*O*-glucósido e que será referido mais à frente.

Outro flavonóide importante é a miricetina. O cromatograma correspondente ao ião $[M-H]^-$ e aducto (*m/z*=317+363) deste composto que é mostrado na figura 3.39 permite detectar vários picos a diferentes valores de t_r: 23.08; 26.56; 31.49, 38.33, 52.87 e 55.27 min, no entanto nenhum deles apresenta a absorção característica dos flavonóis.

Por outro lado a comparação dos cromatogramas obtidos na detecção por díodos de uma solução padrão de **miricetina,** MM=318 (t_r= 60 min) e de **miricetina-3-*O*-glucósido**, MM=480 (t_r= 52 min) e de uma amostra com sobrecarga em padrão, confirmou que aglicona miricetina, assim como a miricetina-3-*O*-glucósido não são detectadas no extracto de vinho Moscatel analisado.

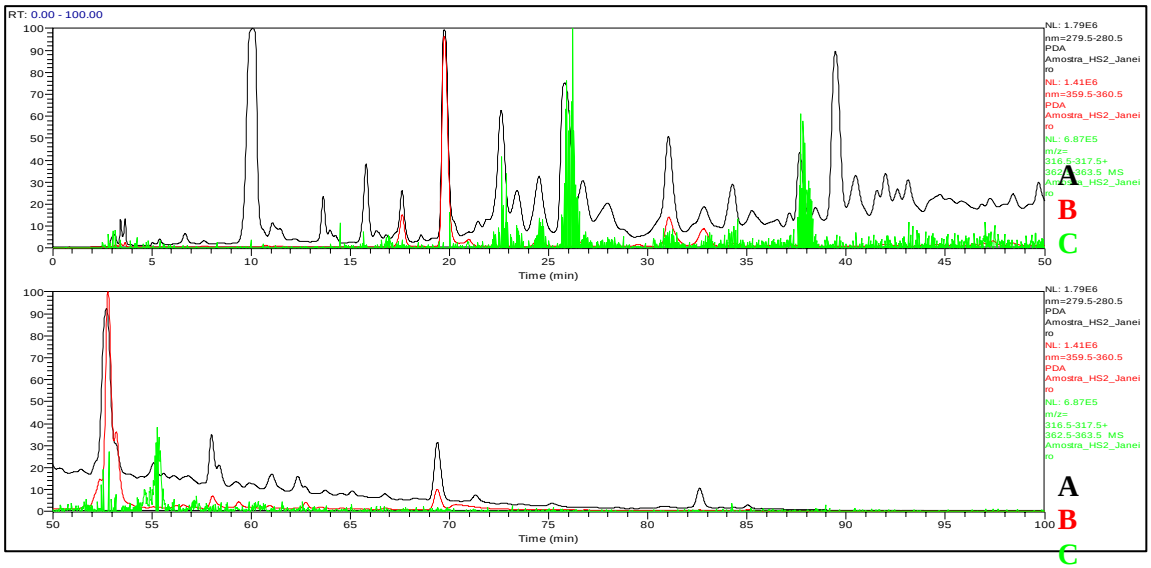


Figura 3.39. Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (**B**) **c.d.o. 360 nm**; (**C**) ***m/z* (317+363)**

A **miricetina-3-*O*-ramnósido** (pico **X**) é detectada no vinho Moscatel, pois a fragmentação do ião *m/z* 463 (t_r=59.21 min) origina o fragmento de *m/z* 317 que resulta da perda do grupo ramnósido 146 Da (*ver figura BIII e tabelas CI e CII, apêndice B e C*). Além deste ião outros são detectados com valores de *m/z*: 179, 215, 289, e 299. O fragmento *m/z* 299 resultou da perda de uma molécula de H_2O (18 Da) pelo ião *m/z* 317 e o fragmento *m/z* 289 resulta da saída do grupo CO ou do grupo C_2H_4 (28 Da).

Tendo em conta a massa molecular da **isoramnetina** (MM=316) traçou-se o cromatograma correspondente ao ião $[M-H]^-$ e aducto (*m/z*=315+361) que se apresenta na figura 3.40.

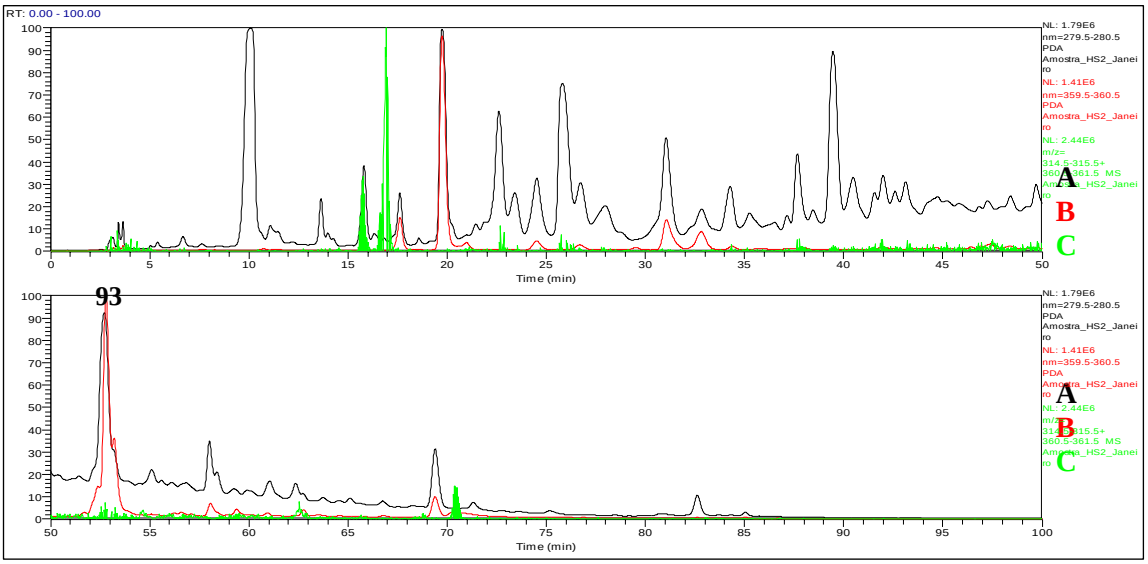


Figura 3.40. Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (**B**) **c.d.o. 360 nm**; (**C**) ***m/z* (315+361)**

Vários picos são detectados no cromatograma (t_r 15.78; 16.93; 22.68; 25.75; 37.78; 52.76, 62.55 e 70.41 min) mas só alguns (t_r 52.76 e 62.55 min) apresentam um valor de absorção superior para o c.d.o. de 360 nm característico dos flavonóis. Os resultados obtidos mostram que este composto não é detectado no extracto de vinho Moscatel analisado.

No cromatograma do ião extraído *m/z* 477 detecta-se aos 59.48 min o pico **93** (isoramnetina-3-*O*-glucósido) e a fragmentação deste ião origina o fragmento *m/z* 315 por perda de uma molécula de glucose (162 Da) (figura 3.41). Estão publicados[40] trabalhos em que se identificou a isoramnetina-3-*O*-glucósido em uva branca e tinta. O espectro de absorção (figura 3.41C) mostra que outros compostos estão a coeluir com a isoramnetina.

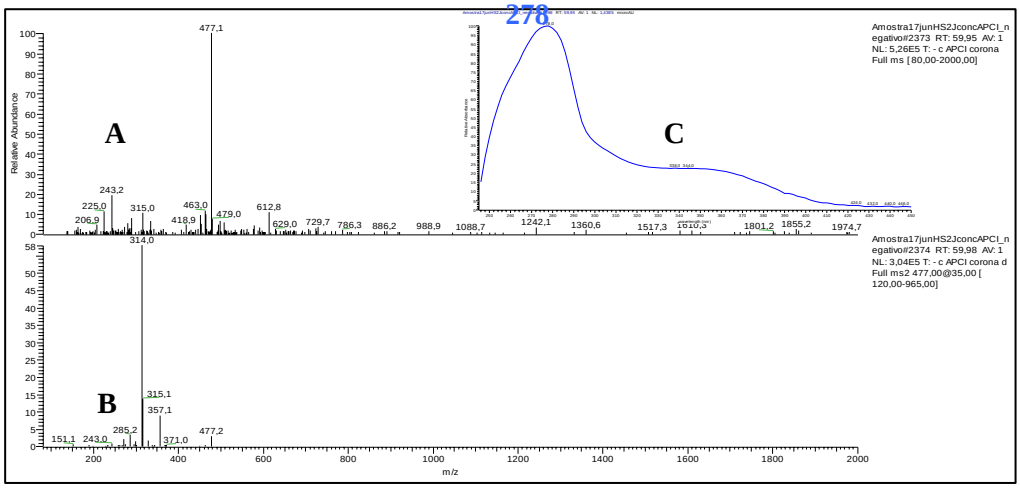


Figura 3.41. Pico **93** tr= 59.48 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectro de massa (m/z 80 - 500); (**B**) fragmentação do ião com *m/z* 477; (**C**) espectro de absorção (240-450 nm)

Hernández[197] *et al.,* (2006) identificaram em amostras de vinho tinto a **isoramnetina-3-*O*-rutinósido** (MM 624). Quando se traçou o cromatograma do ião extraído a *m/z* 623+669 detectou-se um pico de fraca intensidade no cromatograma aos 51.46 min (pico **78**) que pode ser indicativo da presença deste composto nas amostras de vinho Moscatel.

Relativamente ao campferol traçou-se o cromatograma correspondente ao ião $[M-H]^-$ e seu aducto (*m/z*=285+331) e detectaram-se vários picos no cromatograma (figura 3.42).

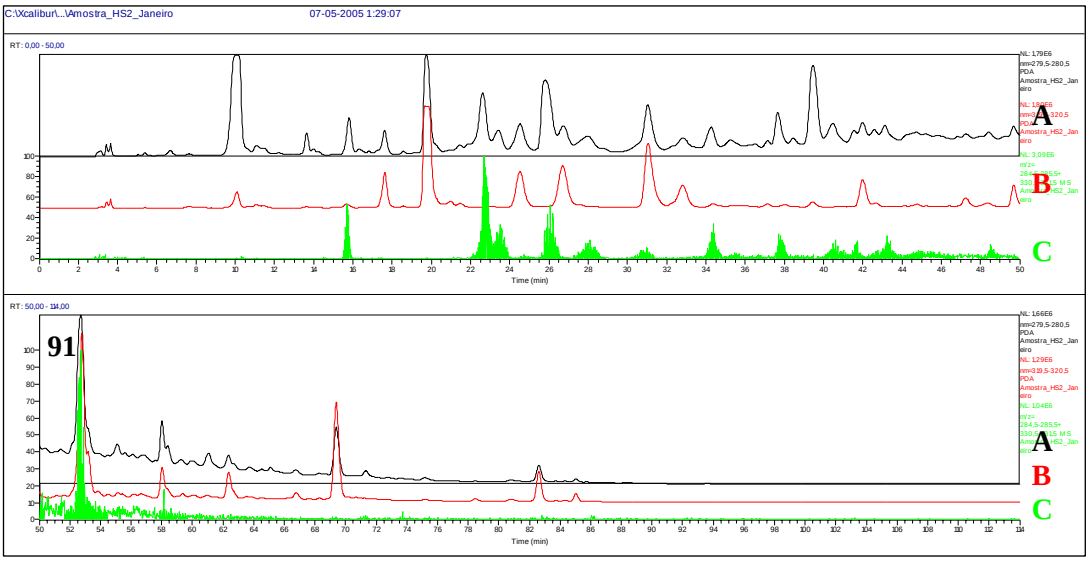


Figura 3.42. Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (**B**) **c.d.o. 360 nm**; (**C**) ***m/z* (285+331)**

O **campferol-3-*O*-glucósido** (**91**) caracteriza-se pelo ião molecular *m/z* 447, que ao fragmentar perde o açúcar (162 Da) e origina o ião *m/z* 285 do campferol[26,198] $[M-H]^-$**.**

O espectro obtido e o esquema de fragmentação são apresentados na figura 3.43. Este composto co-elui com a quercetina-3-*O*-ramnósido (*m/z*=447), pois na fragmentação do ião *m/z* 447 além de se originar o ião *m/z* 285 também se forma o ião *m/z* 301. Ensaios de MS realizados com uma solução padrão de quercetina-3-O-ramnósido (33 mgL^{-1}) e de campferol-3-glucósido, (33 mgL^{-1}), confirmaram que estes compostos eluem com o mesmo t_r. O espectro de absorção correspondente ao pico **91** (58.20 min) não apresenta um perfil característico de um flavonóide, devido a co-eluição.

O ião *m/z* 461 detectado na figura 3.43 poderá corresponder ao **campferol-3-*O*-glucuronido** (**91**) de MM=462 que foi identificado noutros extractos de vinho com o t_r de 58.20 min. Ao ser fragmentado este composto perde o grupo glucuronido (176 Da) e origina o ião *m/z* 285 ião molecular $[M-H]^-$ do campferol

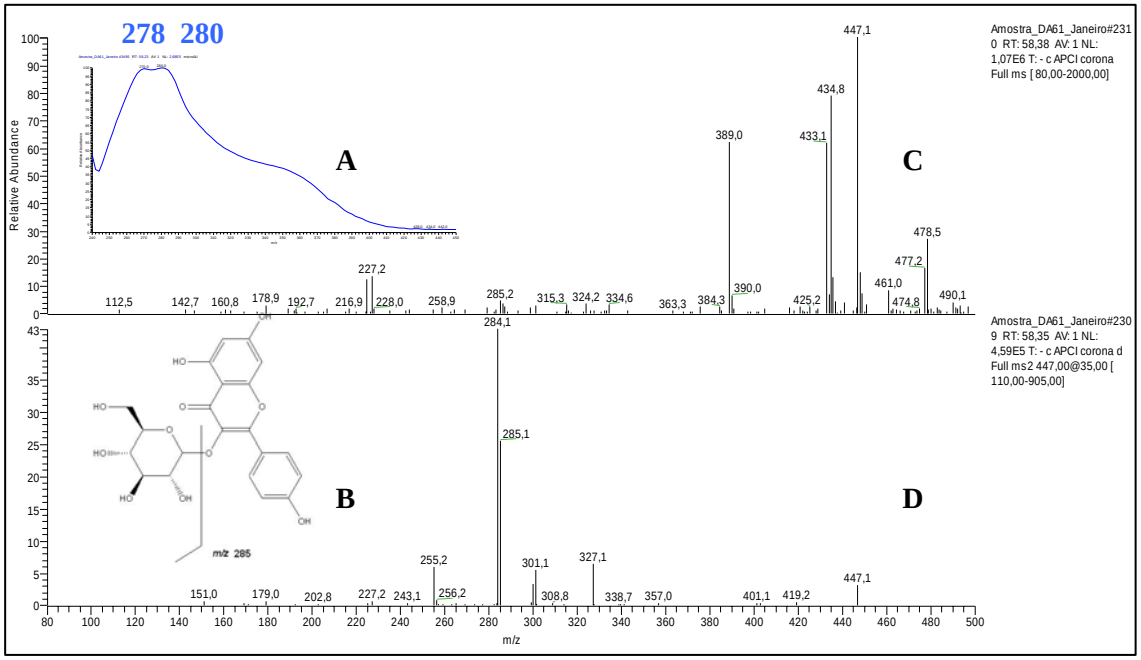


Figura 3.43. Pico **91** tr= 58.4 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectro de absorção (240-450 nm) (**B**) esquema de fragmentação do campferol-3-*O*-glucósido; (**C**) Espectro de massa (80-500); (**D**) Espectro MS/MS do ião *m/z* 447

Considerado este ião e o respectivo aducto *m/z* 507 traçou-se o cromatograma correspondente a estes dois fragmentos (figura 3.44) e são detectados vários picos ao longo do cromatograma salientando-se um grupo importante de compostos aos 70-75 min, que serão abordados mais à frente (*ver 3.2.5*). Quando se utilizou o equipamento do tipo "triplo quadrupolo" equipado com uma fonte de ESI foi possível a identificação deste composto.

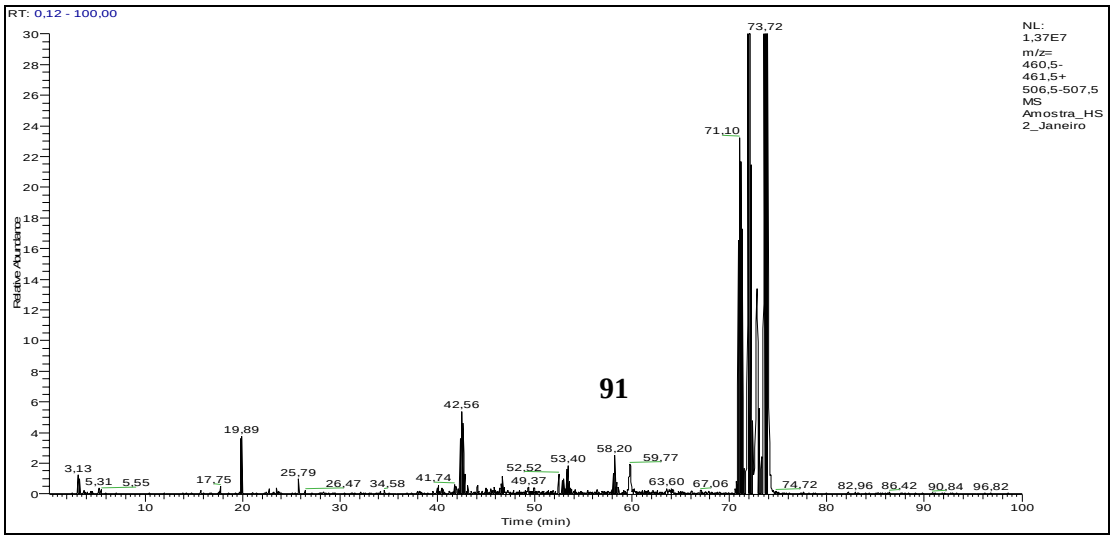


Figura 3.44. Cromatograma do extracto do vinho Moscatel de Setúbal para *m/z* 461 e 507

Foram também detectados por LC-MS outros compostos nas amostras de vinho Moscatel analisadas: **dihidrocampferol-3-*O*-glucósido** (**55**), **dihidroquercetina-3-*O*-glucósido** (**66**), **dihidromiricetina-3-*O*-ramnósido** (**66**) e **dihidroquercetina-3-*O*-xilósido** (**68**).

No caso do **dihidrocampferol-3-*O*-glucósido** (t_r=37.26 min) o ião molecular *m/z* 449 ao fragmentar perde o açúcar (162 Da) e origina o ião característico do ião molecular do dihidrocampferol $[M-H]^-$ *m/z* 287. No tempo de retenção 44.26 min também é detectado o ião molecular *m/z* 449 e ensaios MS/MS realizados com outra amostra, permitiram obter os fragmentos *m/z* 151; 177.1; 269.3; 285.2; 303.0, 323.1 e 431.1. Dados bibliográficos referem a presença dos iões *m/z* 303 (dihidroquercetina) e 285 por perda de uma molécula de água[26], como resultado da fragmentação da **dihidroquercetina-3-*O*-glucósido** também designada por astilbina[26] (*m/z* 449).

A **dihidromiricetina-3-*O*-ramnósido** e a **dihidroquercetina-3-*O*-xilósido** caracterizam-se pelos iões moleculares *m/z* 463 e 435 respectivamente e por fragmentação dão origem às respectivas aglíconas: dihidromiricetina e dihidroquercetina por perda dos açúcares correspondentes (ramnose e xilose).

Mais experiências de espectrometria de massa deverão ser efectuadas no sentido de confirmar estas identificações, nomeadamente experiências MS^n. A confirmação deste conjunto de compostos também poderá ser feita com os respectivos padrões, caso estejam disponíveis.

flavan-3-ol

Os **flavan-3-ol** tais como a (+)-catequina, a (−)-epicatequina, a (+)-galhocatequina, a (−)-epigalhocatequina e as procianidinas são compostos importantes de um vinho[26].

A **(+)-catequina** (MM=290*)* e **(-)-epicatequina** (MM=290*)* são monómeros detectados nas uvas e as **procianidinas** são um grupo de compostos constituído por monómeros de flavan-3-ol e, como já referido na introdução a este trabalho, existem vários tipos de procianidinas: diméricas (B1 e B2 de MM=577), diméricas esterificadas com ácido gálhico (proantocianidina dimérica B1-3-*O*-galhato de MM=729) e triméricas C1 (MM=866).

Na figura 3.45 apresentam-se os cromatograma dos iões extraídos para *m/z* 289 e o seu aducto *m/z* 335 (289+46) bem como o ião *m/z* 577 e o aducto *m/z* 623 (577+46).

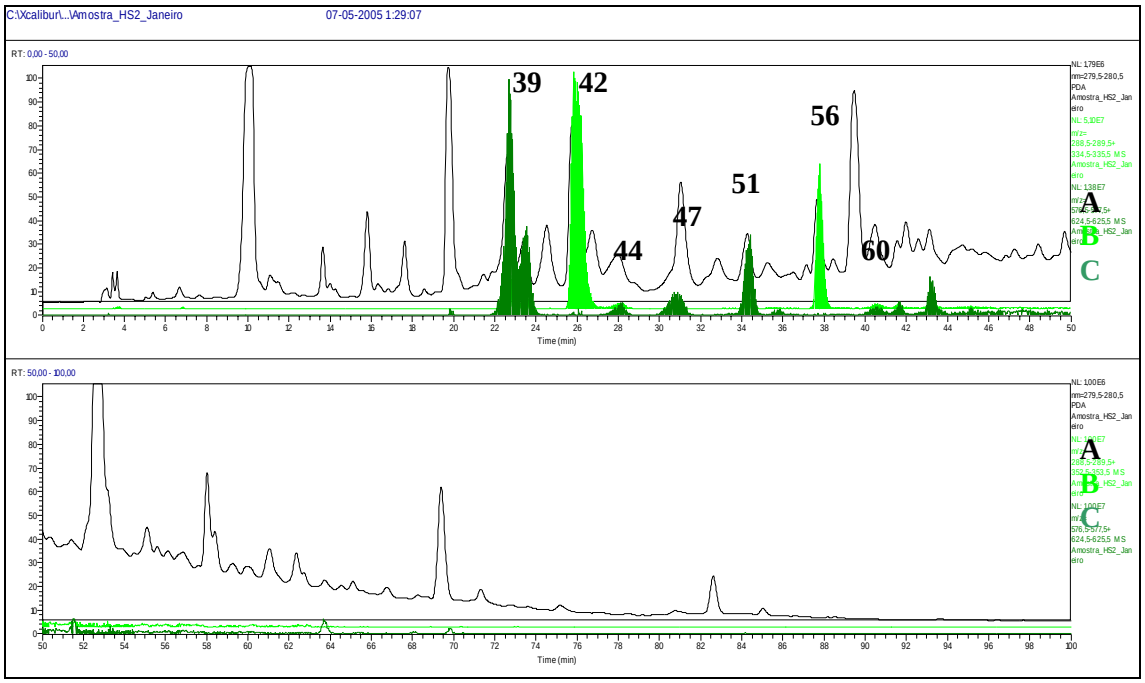


Figura 3.45. Cromatogramas do vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (**B**) *m/z* (289+335); (**C**) *m/z* (577+625). **Identificação**: **39**. Procianidina B1; **42.** catequina+NI; **44.** procianidina; **47.** ácido cafeico+ procianidina**;** **51.** Procianidina B2; **56.** epicatequina; **60.** glucósido do ácido indol-láctico

Na figura 3.46A foram identificados a **catequina** (pico 42) e a **epicatequina** (pico 56), com tempos de retenção de 25.83 min e 37.82 min respectivamente. Dado que se dispunha do padrão de catequina a sua identificação na amostra foi confirmada por comparação do tempo de retenção, espectro de massa e espectro de absorção do UV-vis (figura 3.46). O espectro de absorção (Figura 3.46C) apresenta um perfil característico dos flavan-3-ol (máximo de absorção 272 nm), apesar de existir um

"ombro" no comprimento de onda de 288 nm e que pode ser explicado pela co-eluição de um composto não identificado com MM=428 (*ver tabela CI e CII*). No que se refere ao espectro de massa e de acordo com os resultados apresentados na figura, a fragmentação do ião *m/z* 289 origina os fragmentos *m/z* 165, 179, 205, 231, 245 e 271. O fragmento *m/z* 205 resulta da perda do anel flavonóide A, o fragmento *m/*z 245 pode resultar da perda do grupo $–CH_2CHOH$, o fragmento *m/*z 271 resulta da perda de 18 Da equivalente a uma molécula de água[199]. O fragmento *m/z* 179 pode formar-se por perda do anel B do flavonóide (figura 3.47). Os fragmentos *m/z* 231 e 165 formam-se por perda de 14 Da (CH_2) dos fragmentos *m/z* 245 e 179 respectivamente.

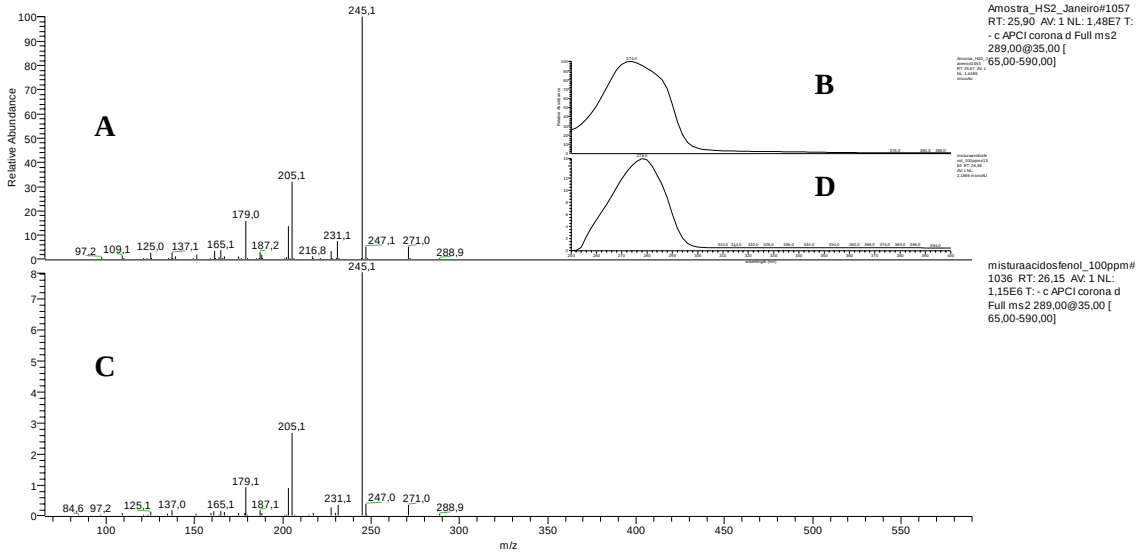


Figura 3.46. Pico (**42**) t_r= 25.98 min: Espectro MS/MS do ião *m/z* 289 (**A**) no extracto de vinho Moscatel; (**B**) do padrão de catequina. Espectro de absorção (250-400 nm): (**C**) no extracto de vinho Moscatel; (**D**) do padrão de catequina

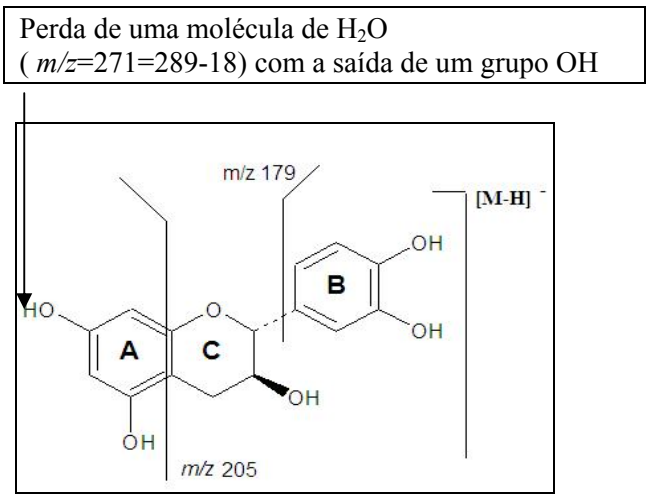


Figura 3.47. Esquema de fragmentação da catequina[199]

A identificação da epicatequina (**56**) foi feita a partir dos iões originados nos ensaios de MS^2 do ião *m/z* 289 detectado aos 37.82 min e são os mesmos que se encontraram para a catequina. Como para este composto também se dispunha do padrão a detecção na amostra também foi comparado o tempo de retenção e foi efectuada a sobrecarga da amostra de vinho com padrão de epicatequina.

Vários picos com iões correspondentes aos das **procianidinas** (*m/z* 577) foram detectados no extracto de vinho Moscatel (figura 3.45C) mas apenas foram identificadas as procianidinas B1 aos 22.68 min (pico **39**) e B2 aos 34.42 min (pico **51**). Foi também feita a sobrecarga da amostra e comparação dos espectros de massa e de UV (figura 3.48) com padrões destas procianidinas disponíveis no laboratório.

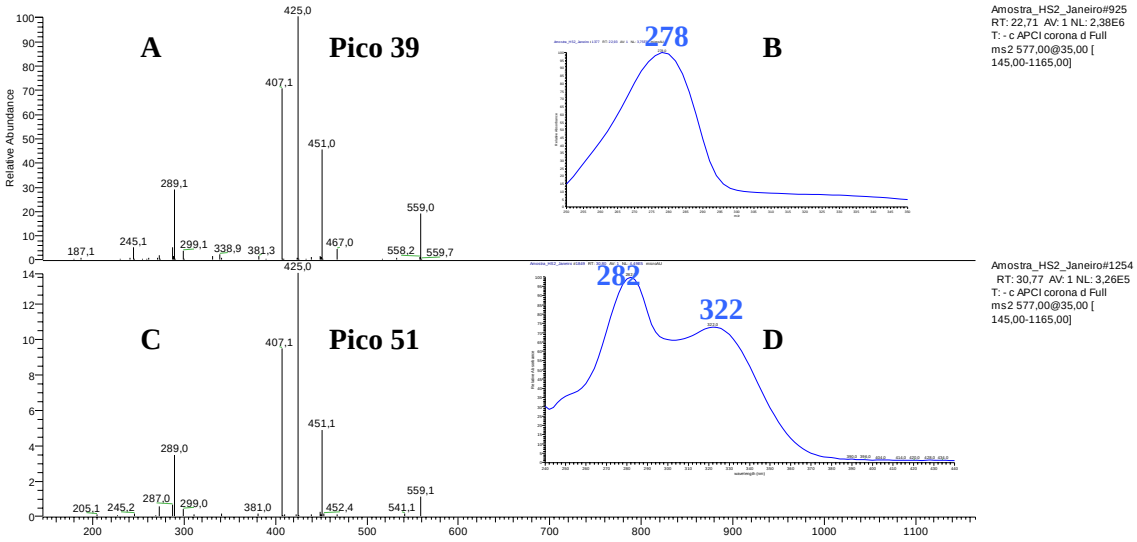
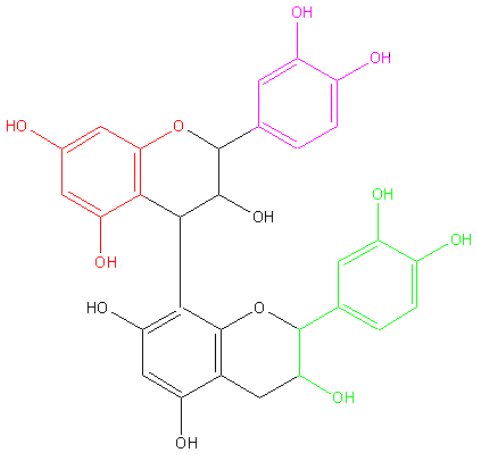


Figura 3.48. Pico **39** t_r= 22.88 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectro de MS/MS do ião *m/z* 577; (**B**) espectro de absorção (250-350 nm). Pico **51** t_r= 34.42 min no extracto de vinho Moscatel: (**C**) espectro de MS/ MS do ião *m/z* 577; (**D**) espectro de absorção (240-440 nm)

Os espectros de absorção apresentados nas figura 3.48C e D apresentam um perfil diferente. De facto o pico 39 apresenta um perfil característico de um flavanol com máximo de absorção ao c.d.o. de 276 nm, mas relativamente ao pico 51 é visível uma co-eluição. No que se refere à comparação dos espectros de massa eles são muito semelhantes. A fragmentação do ião *m/z* 577 apresentada na figura 3.48 pode ser explicada pela perda de uma molécula de água (18 Da) que origina o ião *m/z* 559, a perda de um fragmento neutro equivalente a uma unidade de floroglucinol[54] ($C_6H_6O_3$ MM 126), assinalado a vermelho na estrutura representada a seguir resulta o fragmento *m/z* 451 e que pode ser interpretado como processo inverso à formação das proantocianidinas.



A diferença existente entre os fragmentos *m/z* 451 e 467 é de 16 Da, que corresponde a um oxigénio. O ião *m/z* 467 forma-se pela perda de $C_6H_6O_2$ (110 Da), assinalado a roxo na estrutura. A reacção Retro-Diels-Alder (RDA) do anel heterocíclico do dímero conduz à perda de um fragmento neutro 152 Da assinalado a verde e origina o ião *m/z* 425. Este ao perder uma molécula de água origina o ião *m/z* 407. Outros fragmentos detectados: *m/z* 205.1, 245.2 já apareciam no espectro de massa da catequina e epicatequina e o fragmento *m/z* 289 corresponde a estes monómeros.

Outros flavan-3-ol[26] que têm sido descritos nas uvas e no vinho são a **galhocatequina** (MM=306); **epigalhocatequina** (MM=306); galhato de epigalhocatequina (M=458) e galhato de epicatequina **(**MM=442). Na figura 3.49 apresentam-se os cromatogramas do ião molecular extraído e respectivo aducto a *m/z* 305 e 351; 441 e 487, 457 e 503. Apenas se detecta o ião de *m/z* 305, que está associado aos compostos galhocatequina (**26**) e epigalhocatequina (**41**).

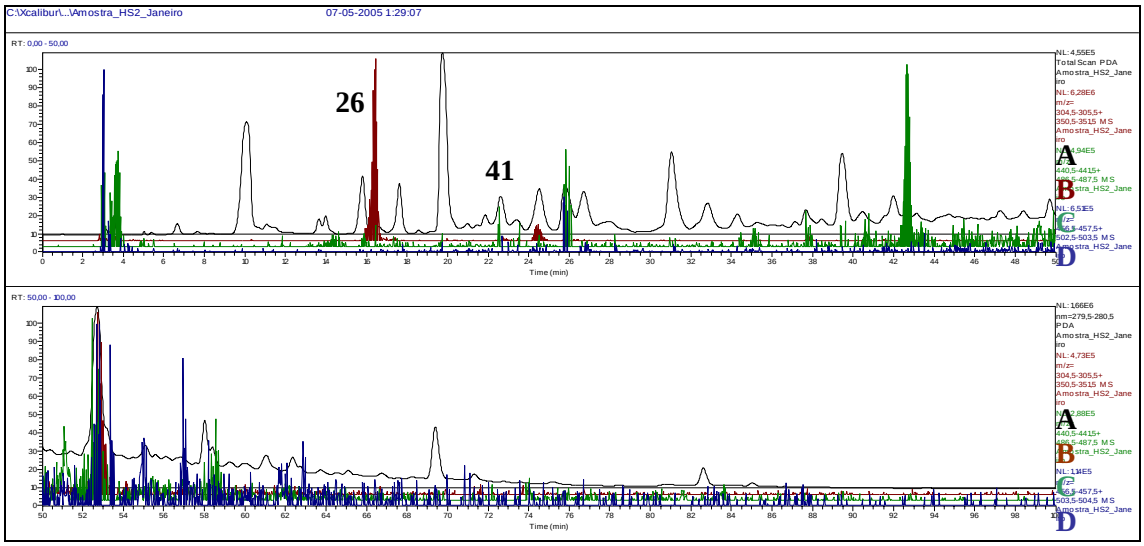


Figura 3.49. Cromatogramas do extracto de vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (**B**) *m/z* (305+351); (**C**) *m/z* (441+487); (**D**) *m/z* (457+504)

A figura 3.50 apresenta o espectro de massa (**A**) do pico detectado correspondente à galhocatequina (**26**) obtendo-se principalmente o ião *m/z* 305 e o seu aducto de ácido fórmico *m/z* 351. A fragmentação MS/MS do ião *m/z* 305, cujo esquema se apresenta na figura 3.51 origina os fragmentos *m/z* 125, 165, 179, 221, 247, 261 e 287: o ião *m/z* 261 resulta da perda do grupo CO_2, o fragmento *m/z* 221 resulta da perda do anel flavonóide A e o fragmento *m/z* 179 pode formar-se devido à perda do anel B do flavonóide (m*/z* 125). O fragmento *m/*z 287 resulta da perda de 18 Da correspondente a uma molécula de água. Os fragmentos *m/z* 247 e 165 formam-se por perda de 14 Da (CH_2) dos fragmentos *m/z* 261 e 179 respectivamente. Estes resultados confirmam a presença da galhocatequina no extracto de vinho Moscatel.

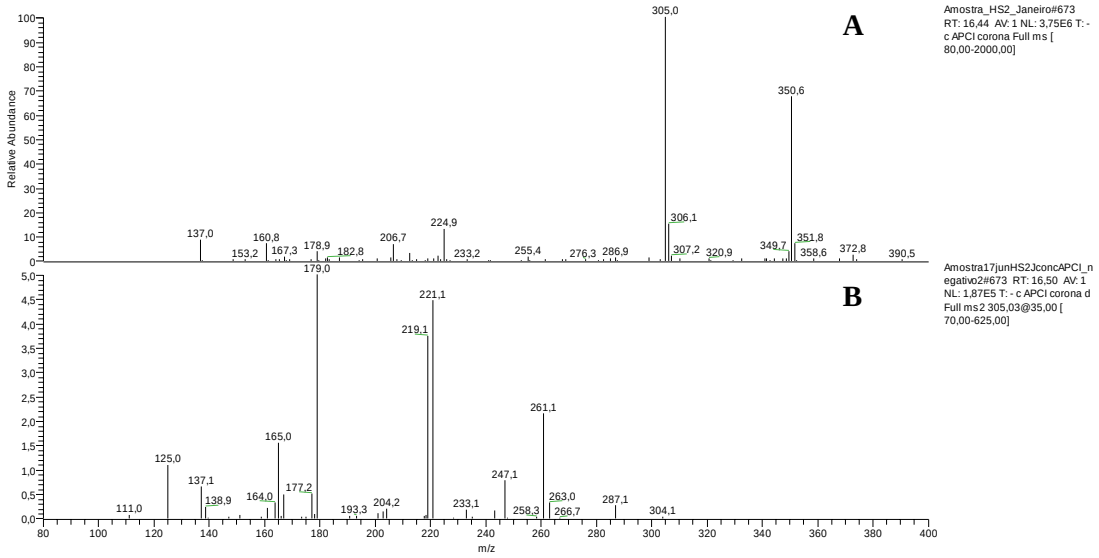


Figura 3.50. Pico **26** t_r= 16.44 min (**A**) Espectro de massa (80-400); (**B**) espectro MS/MS do ião *m/z* 305

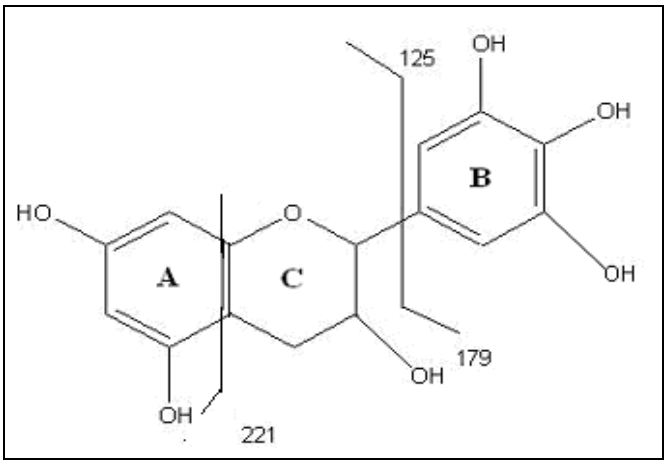


Figura 3.51. Esquema de fragmentação da galhocatequina

Aos 24.41 min elui um pico (**41**) em cujo espectro de massa (figura 3.52A) são detectados os iões com *m/z* 305 e o respectivo aducto com *m/z* 351. Neste tempo de retenção não foi efectuada a fragmentação do ião *m/z* de 305 para se fazer a respectiva confirmação, no entanto suspeita-se que se trata do composto correspondente à epigalhocatequina. Outros valores de *m/z* também são detectados: 149 (ião do ácido tartárico), 179 (forma-se devido à perda do anel B do flavonóide, *ver figura 3.51*), 225 (aducto 179+46), 163 (corresponde ao ião $[M-H]^-$ do ácido cumárico), 295 (ião $[M-H]^-$ do ácido cumárico) e 443 (não identificado) o que indica co-eluição com ácido *c*-coutárico e outro composto não identificado com MM 444, o que também é confirmado pelo espectro de absorção do UV-vis (figura 3.52B).

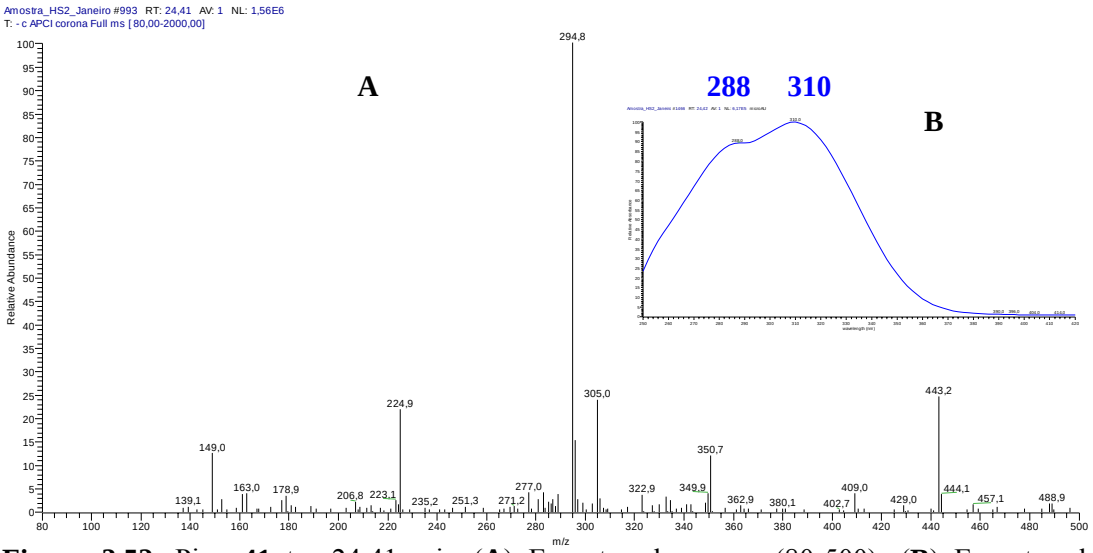


Figura 3.52. Pico **41** t_r= 24.41 min (**A**) Espectro de massa (80-500); (**B**) Espectro de absorção (250-420 nm)

A utilização de soluções padrão correspondentes confirmou o tempo de retenção da galhocatequina e epigalhocatequina. Quando se efectuou a sobrecarga da amostra com o padrão, utilizando os detectores de fluorescência, díodos e electroquímico, apenas foi confirmado a presença de galhocatequina nas amostras de vinho, o que pode ser explicado pela baixo teor de epigalhocatequina presente na amostra. Este composto elui próximo da catequina que apresenta um pico muito intenso a 280/320 nm, o que dificulta a identificação da epigalhocatequina para estes valores de $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$.

Os cromatogramas de ião extraído para *m/z* 441 (galhato de epicatequina) e 457 (galhato de epigalhocatequina) mostram que não são detectados compostos para estes valores de massa.

3.2.4. Estilbenos

O ***c***- e o ***t*-resveratrol** (MM=228) assim como os respectivos glucósidos (***c*** e ***t*-piceid**, MM=390) estão presentes nas uvas e vinhos. Mais pormenores relativos ao *c* e o *t*-resveratrol serão discutidos noutra parte deste trabalho (*ver 3.3)* em que se procedeu à sua quantificação em amostras de vinhos comerciais e nos ensaios de vinificação. Nesta parte será dada ênfase à identificação dos glucósidos respectivos.

Na figura 3.53 apresenta-se o cromatograma do ião extraído *m/z* 389 (***c*** e ***t*-piceid**) e do respectivo aducto 435 (389+46).

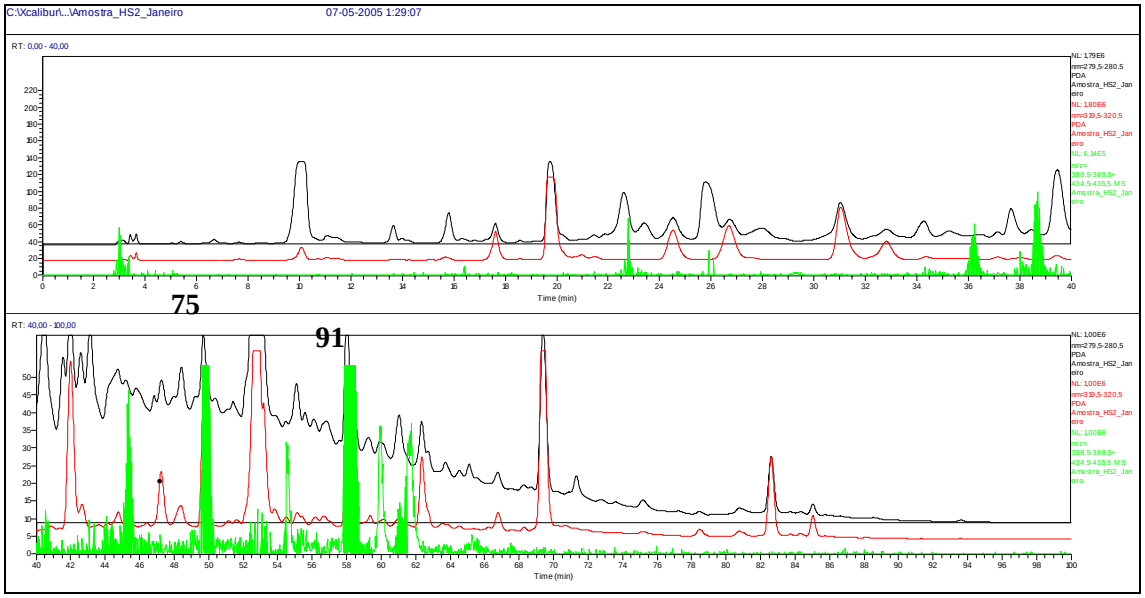


Figura 3.53. Cromatogramas do extracto de vinho Moscatel de Setúbal: (**A**) c.d.o. 280 nm; (**B**) **c.d.o. 320 nm**; (**C**) ***m/z* (389+435)**

O ***t*-piceid** (**75**) o ***c*-piceid** (**91**) de massa molar 390 eluem com os t_r de 49.82 e 58.15 min respectivamente e apresentam no seu espectro de massa o ião $[M-H]^-$ *m/z* 389.

Na figura 3.54 apresenta-se o espectro de massa dos dois picos (75 e 91), assim como o espectro de absorção. Foi efectuada a comparação entre os espectros de massa obtidos com a amostra e o padrão de *t*-piceid (12 mgL^{-1}) confirmando-se a presença dos compostos *c* e *t*- piceid nas amostras de vinhos. A identificação da forma *cis* foi efectuada a partir de uma solução padrão de *t*-piceid que foi irradiada com radiação UV (254 nm) durante 47 min, de forma a converter o *t*-piceid em *c*-piceid.

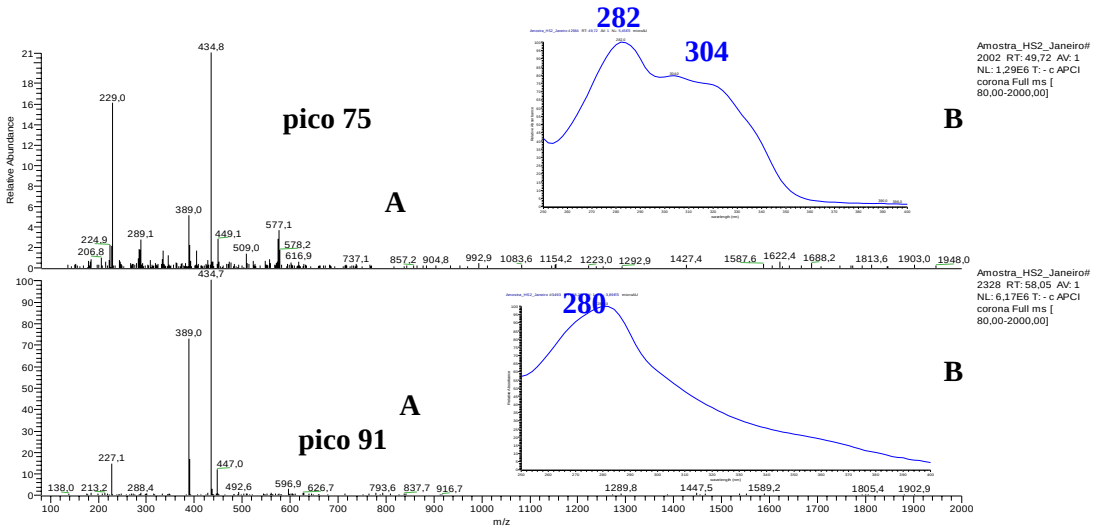


Figura 3.54. Pico (**75**) t_r= 49.72 min e (**91**) t_r= 58.05 min no extracto de vinho Moscatel: (**A**) Espectros de massa (m/z 90-2000); (**B**) espectros de absorção (c.d.o. 250-400 nm)

A identificação também foi efectuada com base na fragmentação do ião *m/z* 389, que origina o fragmento *m/z* 227 pela perda da parte glucose (162 Da). Os espectros de absorção do UV-vis pelo menos para o *t*-piceid são indicativos da co-eluição com outros compostos com máximo de absorção a 280 nm. O *t*-piceid elui com o composto de *m/z* 229 e o *c*-piceid com derivados do campferol e da quercetina conforme já referido anteriormente.

3.2.5. Outros Compostos

Compostos de baixo tempo de retenção

Na zona inicial do cromatograma (figura BID, apêndice B) nota-se uma banda "alargada" que deve corresponder a um conjunto de compostos que não estão separados. Apesar de se ter injectado um extracto de vinho em acetato de etilo é possível que ainda existam concentrações apreciáveis de componentes polares dos vinhos como, por exemplo **açúcares** (hexoses e pentoses), **ácido quínico**, **ácido chiquímico** e **ácido tartárico**. Nesta zona inicial do cromatograma as condições de separação são más e como há bastantes compostos não é de estranhar que o cromatograma de corrente iónica total apresente picos mal separados e na figura 3.7B (mapa de MS) se notem algumas "linhas" em vez do mapa de pontos dispersos que costuma ser típico destas representações gráficas. Compostos como açúcares, ácido

quínico, ácido chiquímico, ácido tartárico ou outros ácidos que podem estar a eluir nesta zona do cromatograma absorvem pouco no UV.

Vamos começar por discutir o segmento do cromatograma entre 2 e 10 min. Nesta zona, facilmente se nota que os valores *m/z* dos iões como maior intensidade no espectro de massa são 179 e 225 que deverão corresponder a hexoses (MM=180) e aos respectivos aductos com ácido fórmico (225=179+46). No entanto outros valores de *m/z* também são detectados: 161, 177, 179, 180, 223, 224, 225 e 226. Na figura 3.55 apresenta-se o cromatograma do ião extraído para os valores de *m/z* acima referidos e observam-se picos negativos, que estão assinalados na figura e que correspondem à localização de compostos que ocorrem nesta zona de banda "alargada" e impedem as hexoses de apresentar um perfil de forma mais regular. Na tabela 3.4 apresentam-se os valores de *m/z* obtidos para os picos assinalados. Um dos picos negativos é o ácido gálhico que elui aos 10.18 conforme já discutido anteriormente.

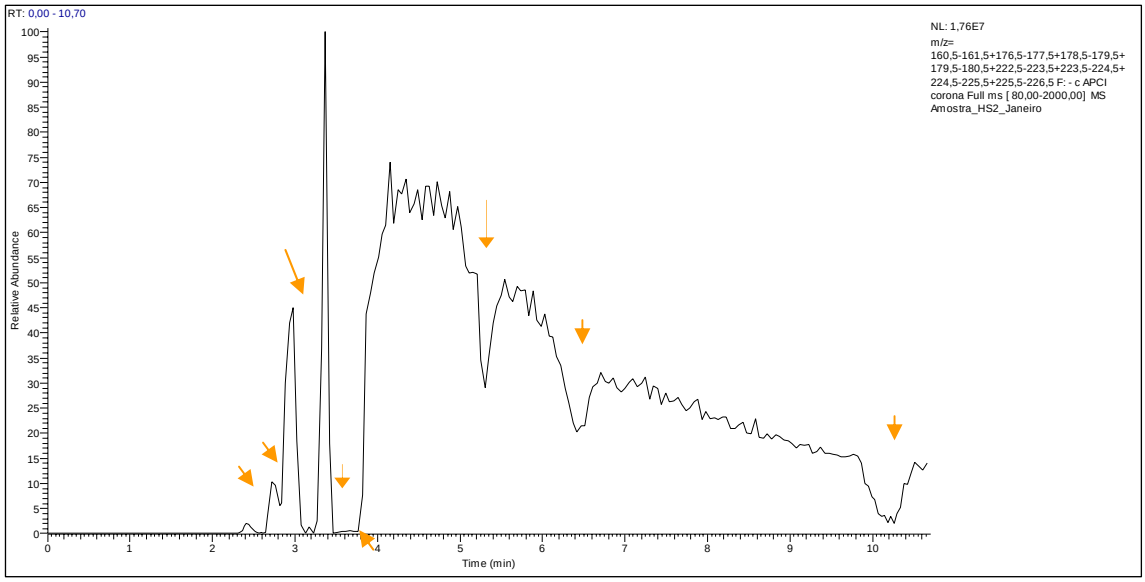


Figura 3.55. Cromatograma do extracto do vinho Moscatel de Setúbal *m/z* (161+177+179+180+223+224+225+226)

Tabela 3.4. t_r, *m/z* e identificação de compostos

t_r (min)	***m/z***	**Identificação**
2.57	143, 195 e 321	NI
2.81	143, 159, 177, 189, 195, 241, 293, 355, 369, 419, 453 e 467	NI
3.13	149, 193, 299, 311, 329, 373 e 491	NI
3.47	149, 249, 267, 283, 289, 295 e 313	ácido tartárico
3.57	149, 191, 249, 267, 289, 295, 313	ácido quínico
5.31	173, 179, 191, 225 e 259	ácido chiquimico
6.47	163, 179, 225 e 297	NI
10.18	169, 215 e 339	ácido gálhico

A análise por LC-DAD a c.d.o. 210 nm dos padrões de ácido tartárico (t_r=3.64 min) ácido quínico (*m/z* 191) (t_r=3.80 min) de ácido chiquímico (*m/z* 173) (t_r=4.71 min) e as sobrecargas de padrão efectuadas na amostra, confirmam a presença destes compostos no extracto analisado.

ácido S-glutationil-2-trans-cafeoiltartárico

Outro composto habitualmente descrito na literatura como importante componente nos vinhos brancos, embora minoritário, é o ácido **S-glutationil-2-*trans*-cafeoiltartárico**, habitualmente designado por **GRP** (Grape Reaction Product).

Em ensaios efectuados com uma amostra de vinho (B_2) detectou-se aos 20.80 min um pico com *m/z* 616 (figura 3.56). O ácido **S-glutationil-2-*trans* cafeoiltartárico** tem um peso molecular de 617, pelo que quando analisado por LC-MS em modo negativo dá origem ao ião molecular *m/z* 616 e ao seu aducto com ácido fórmico *m/z* 662 (616+46).

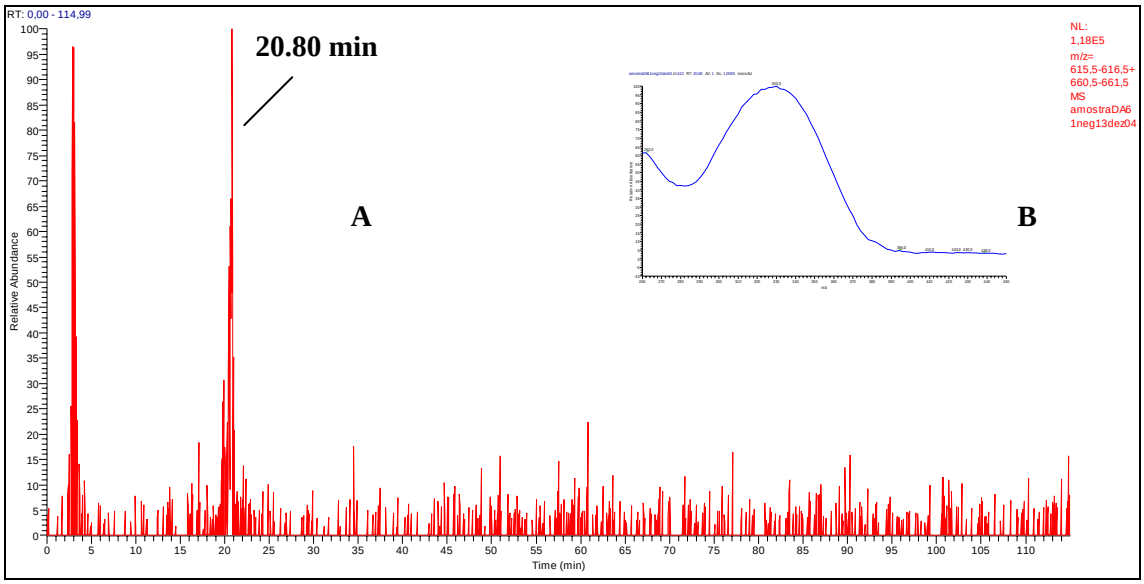


Figura 3.56. Amostra de vinho Moscatel (B_2): (**A**) cromatograma *m/z* (616+662); (**B**) espectro de absorção (260-450 nm) do pico com t_r 20.80 min

O espectro de absorção apresenta um máximo de absorção aos 330 nm e dados bibliográficos referenciam o valor de 325 nm como o máximo de absorvância do ácido S-glutationil-2-*trans* cafeoiltartárico.

Parte do trabalho referente à identificação deste composto, foi efectuado no equipamento do tipo "triplo quadrupolo" com a fonte ESI. Procedeu-se à análise em SIR dos iões *m/z* 616 e 662. Na figura 3.57 comparam-se os cromatogramas para as fracções A e B da amostra do ensaio de vinificação A_2 e a fracção A da amostra B_2.

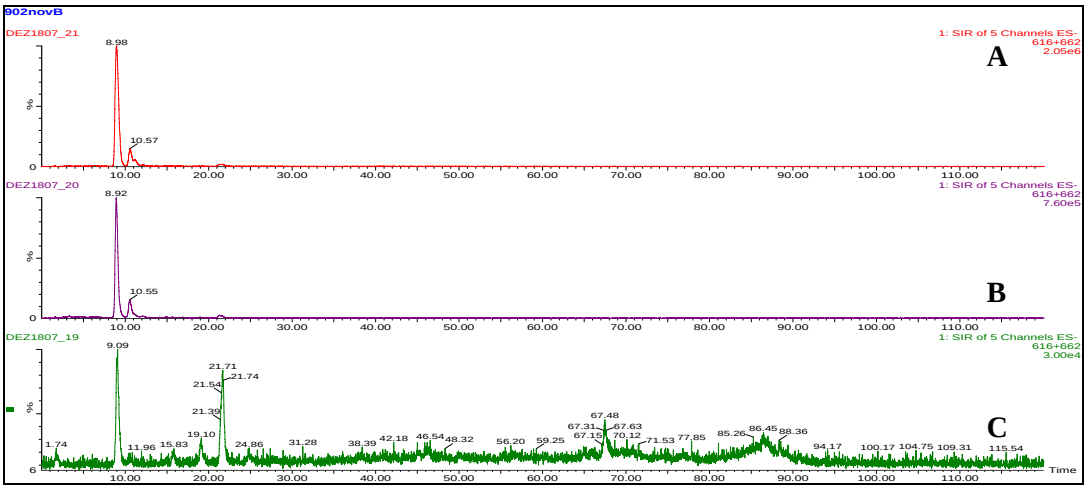


Figura. 3.57. Cromatogramas *m/z* (616+662) dos extractos de vinho Moscatel dos diferentes produtores (**A**) amostra B_2 (fracção A) (**B**) amostra A_2 (fracção A) e (**C**) amostra A_2 (fracção B)

Comparando as fracções A e B da amostra A_2 é visível que o GRP, composto com t_r de aproximadamente 9 min está presente numa concentração inferior na fracção B, o que era de esperar, dado que o composto foi concentrado na fracção A dos extractos.

Das amostras ensaiadas a B_2 apresenta um teor superior que se traduz numa intensidade de sinal cerca de 3 vezes superior ao da amostra A_2. Para confirmação da identificação analisou-se a amostra B_2 (fracção A) em modo "Daughter Scan" (DS) utilizando diferentes valores de energia de colisão (CE) de modo a obter os fragmentos correspondentes. Na figura 3.58 apresentam-se os espectros obtidos quando se seleccionou o fragmentou m/z 616 e se aplicaram os diferentes valores de energia de colisão.

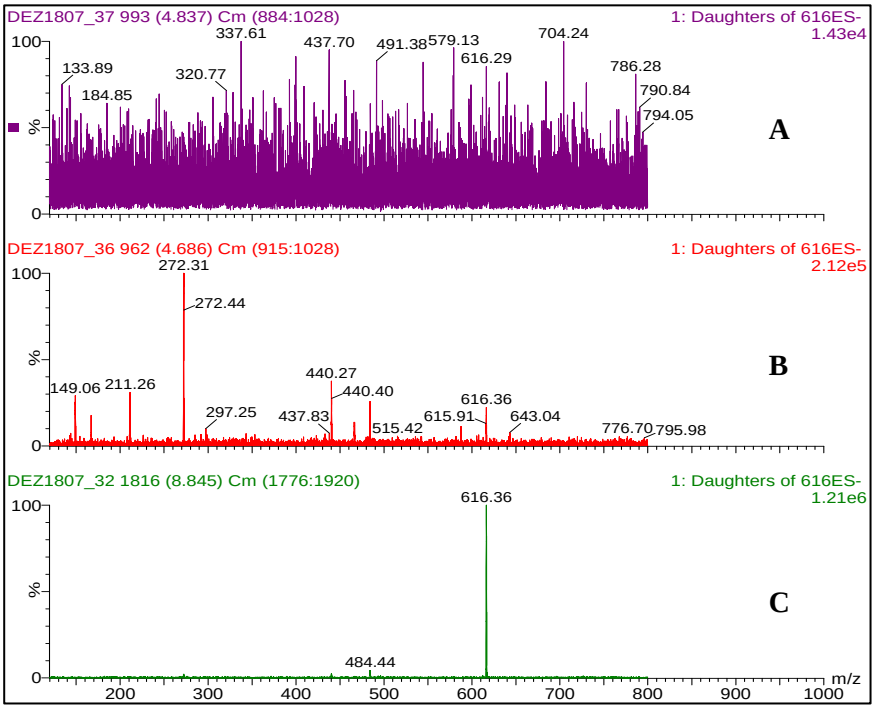


Figura 3.58. Espectros MS/MS do ião *m/z* 616 com diferentes valores de CE: (**A**) 30V; (**B**) 20V; (**C**) 10V

Da análise da figura observa-se que quando se aplica a energia de colisão inferior se detectam só os fragmentos de *m/z* 616 (maioritário) e uma pequena quantidade de *m/z* 484 (figura 3.58C). Para uma energia de colisão muito elevada as condições de análise foram excessivas (figura 3.58A). Nas condições de ensaio aplicadas na figura 3.58B a fragmentação do *ião m/z* 616 origina os iões *m/z*: 149.1; 211.3; 297.3, 272.3; 440.3 e 486 correspondentes ao esquema de fragmentação do ácido S-glutationil-2-*trans* cafeoiltartárico[41] (figura 3.59).

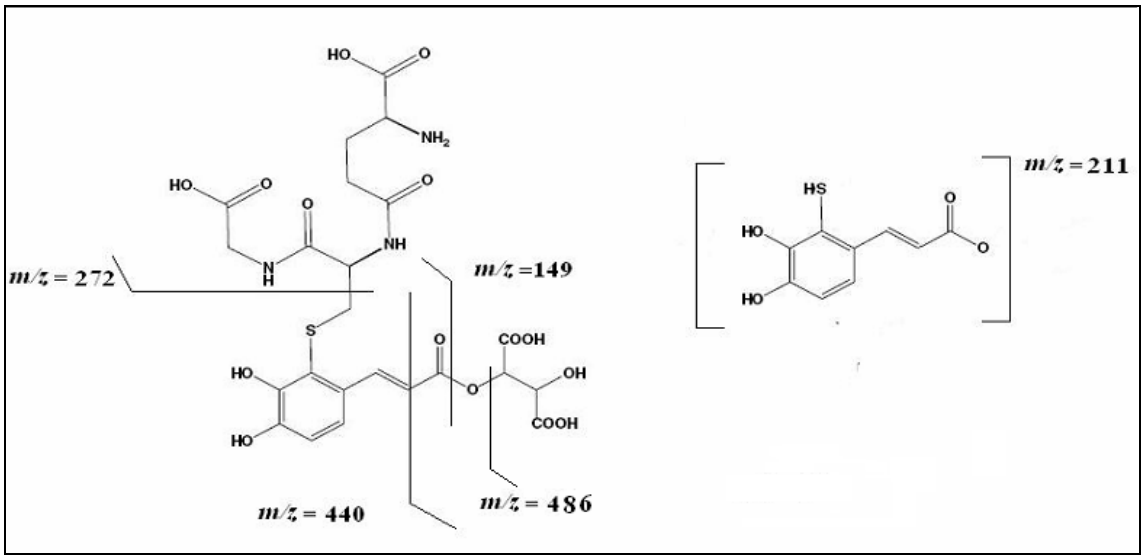


Figura 3.59. Fragmentação do ácido S-glutationil-2-trans-cafeoiltartárico[41]

Foi possível utilizando a técnica de LC-MS identificar nas amostras de vinho Moscatel analisadas o ácido S-glutationil-2-trans-cafeoiltartárico e em trabalho futuro seria interessante comparar o teor deste composto em amostras provenientes de vários produtores deste vinho.

Tirosol e triptofano

Os compostos **tirosol** (MM=138) e o **triptofano** (MM=162), que são produtos resultantes da fermentação, não foram detectados por LC-MS nas condições utilizadas.

Dados publicados na bibliografia[200] referenciam os fragmentos *m/z* 93, 106 e 119 resultantes da fragmentação do ião *m/z* de 137 característico do tirosol. No cromatograma do ião extraído para *m/z* 137 detectam-se vários picos que não foram fragmentados e por isso a identificação deste composto não foi efectuada com esta técnica. A presença do tirosol na amostra também foi avaliada por LC-DAD-FD através do tempo de retenção (23 min) e por sobrecarga em amostras de vinho, e verificou-se que a detecção por fluorescência (280/320 nm) permite a quantificação do tirosol nas amostras o que é discutido noutra parte deste trabalho (*ver 3.3).* Verificou-se que co-elui com o ácido *t*-caftárico (34) e para o t_r de 20.01 min detecta-se o valor de *m/z* 137 com uma abundância relativa muito pequena

O **triptofano** não foi detectado por LC-MS nas condições aplicadas, e a análise do padrão e sobrecarga de amostra por LC-DAD-FD confirmaram que este composto não está presente no vinho analisado.

Compostos não identificados

Composto caracterizado por ião m/z 366

Na figura 3.60 apresenta-se o cromatograma do ião extraído *m/z* 366, o espectro de massa do composto eluído aproximadamente aos 40 min assim como a fragmentação do ião *m/z* 366, quando se utilizou o equipamento do tipo "armadilha de iões".

Os valores de *m/z* pares sugerem a presença de outros átomos no composto além dos átomos de C, O e H, explicando uma massa molar ímpar (367). Para tentar obter mais informação sobre este composto procedeu-se à análise num equipamento de características diferentes (triplo quadrupolo), dado que a informação que se obtinha no equipamento do tipo "armadilha de iões" não permitia obter mais informações para o esclarecimento da estrutura.

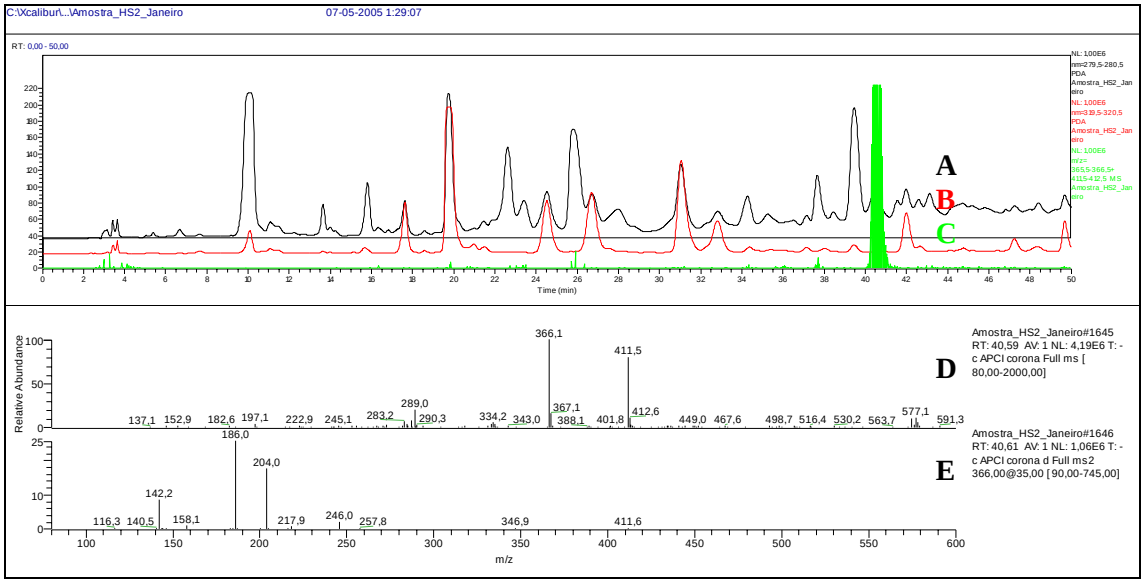


Figura 3.60. Cromatogramas do extracto de vinho Moscatel: (**A**) c.d.o. 280 nm; (**B**) **c.d.o. 320 nm**; (**C**) ***m/z* (366+412).** (**D**) espectro de massa (80-600) do pico t_r= 40.59 min; (**E**) espectro MS/MS do ião *m/z* 366

O método de análise usado neste equipamento era diferente, pelo que a eluição do composto ocorria de com um t_r mais curto. Embora num equipamento armadilha de iões haja a possibilidade de se fazerem fragmentações sucessivas de massas seleccionadas, devido à perda de sensibilidade os resultados das fragmentações em MS/MS foram difíceis de obter. Para o ião em estudo (*m/z* 366) aplicaram-se diferentes valores de CE: 10 V não era suficiente para fragmentar este ião e para a CE de 50 V verifica-se que ocorrem 2 possíveis fragmentações, como se pode observar na figura

3.61 e na tabela 3.5, onde se apresenta um resumo dos fragmentos obtidos em cada uma das condições de ensaio.

Tabela 3.5. Fragmentos de *m/z* obtidos em cada uma das condições de ensaio

CE (V)	10	20	30	40	50[b]
Fragmentos *m/z*	366[a]	366, 204, **186,** 142	204, 186, 158, **142**	158, **142**	**142**, 116**,** 130 e 126 **142**, 130, 116, 71

[a] no espectro a massa *m/z* 366 é muito intensa e nota-se que estão presentes as massas 323, 287, 267, 237 mas podem ser ruído.
[b] resultados obtidos em dois ensaios de fragmentação

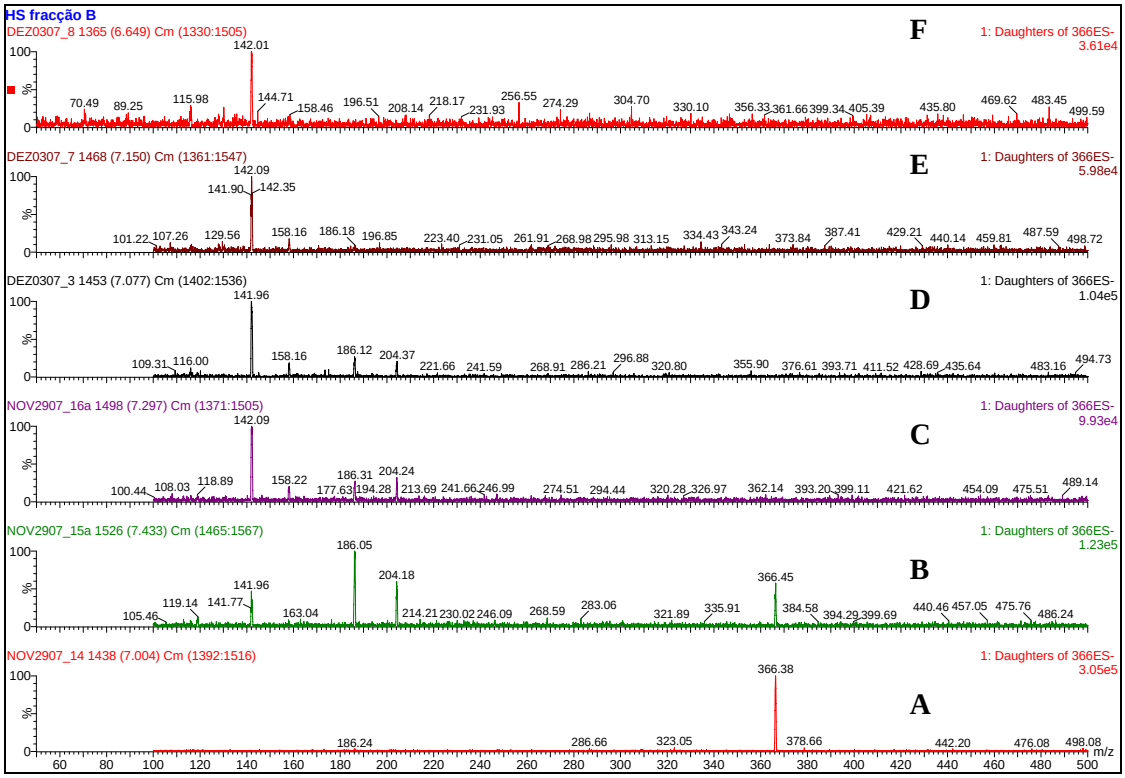


Figura 3.61. Espectros MS/MS do pico t_r= 7 min com diferentes valores de CE: (**A**) 10 V; (**B**) 20 V; (**C**) 30 V; (**D**) 40 V, (**E**) e (**F**) 50 V

No equipamento de triplo quadrupolo pode determinar-se qual o fragmento que deu origem a outro, ou seja a determinação do ião "pai" (modo Parent Scan), determinando-se assim o ião que originava os iões de *m/z* 142 e 158. Na figura 3.62 apresentam-se os cromatogramas obtidos em modo Parent Scan para *m/z* 142 e 158 e em ambos os casos o fragmento "pai" foi o ião de *m/z* 366 assinalado na figura.

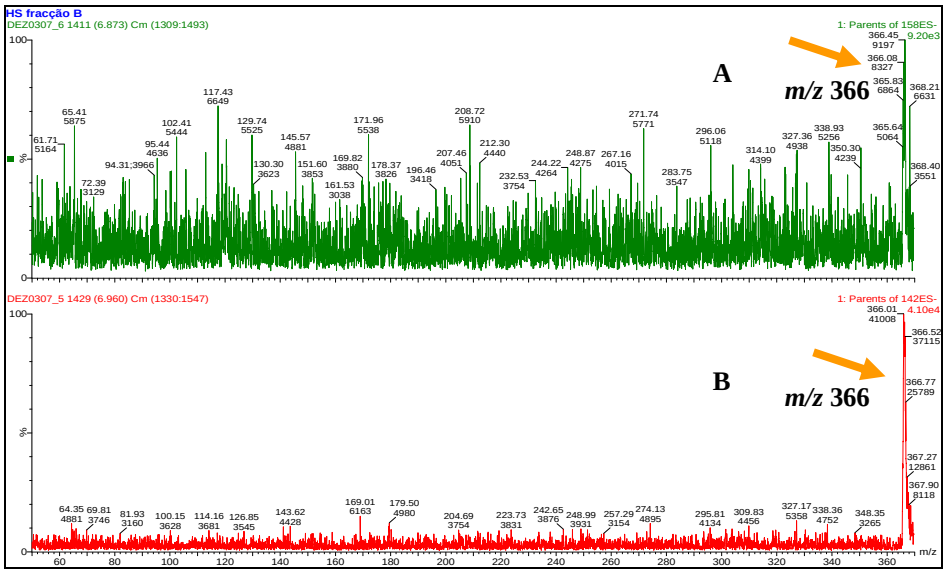


Figura 3.62. Cromatogramas obtidos em modo Parent Scan para *m/z* (**A**) 158 e (**B**) 142

Tentou-se ainda fragmentar o ião 142 mas só se conseguiu detectar ruído no espectro.

Uma estrutura possível para este composto e respectiva fragmentação são apresentadas na figura 3.63.

Perda de uma molécula de água *m/z*186 (204-18) com formação duma dupla ligação mais a saída de CO_2 (44) permitem explicar a formação do ião derivado de vinil indol *m/z* 142

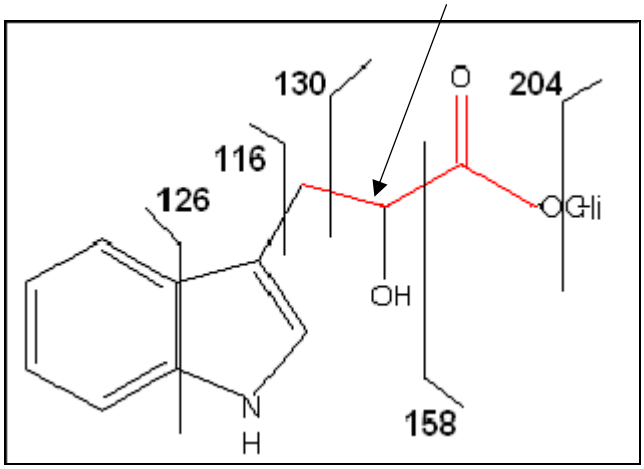


Figura 3.63. Fragmentação do ião *m/z* 366: glucósido do ácido indol-láctico

Em face dos valores de *m/z* que foram detectados no espectro de massa e que se apresenta na tabela 3.2 pode-se dizer que a perda de uma molécula de açúcar [M-1-162]$^-$ origina o ião *m/z* 204. A formação do indolacetaldeído implica além da saída do açúcar também a perda de HCO_2H (M-1-162-46) formando-se o ião *m/z* 158. A saída

de uma molécula de água permite formar uma dupla ligação e por perda do grupo CO_2 (44 Da) obtém-se o fragmento *m/z* 142 que será o ião derivado de vinil-indol. O ião *m/z* 130 detectado no espectro corresponde ao ião derivado do metil-indol (MM=131) e com a saída do grupo metilo forma-se o ião *m/*z 116 que corresponde ao indol (MM=117). Além disso a saída de uma molécula de benzeno (78Da) origina o ião *m/z* 126. O ião *m/z* 71 detectado no espectro corresponde ao ácido acrílico (MM=72) cuja parte na estrutura está assinalado na figura 3.63 com as ligações a vermelho.

A confirmação da estrutura deste composto teria que ser efectuada com o respectivo padrão, que não está disponível no mercado, mas que poderá ser sintetizado. A realização de outros ensaios como por exemplo a aplicação da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) a amostras, assim como reacções de hidrólise enzimática, podem ser ferramentas importantes na confirmação da presença deste composto nas amostras. As análises por LC-DAD-FD-ED com solução padrão de ácido indol-láctico (t_r=46 min) e as sobrecargas efectuadas em amostra mostraram que o ácido indol-láctico não é detectado na amostra de vinho Moscatel. No entanto o t_r era superior ao do composto detectado nos vinhos com MM=367, correspondente supostamente ao glucósido. Dados bibliográficos[201] descrevem que o ácido indol-láctico é o percursor do composto *o*-aminoacetofenona responsável por flavour atípico no envelhecimento de vinhos.

Na figura 3.64 apresenta-se o cromatograma em modo SIR para o fragmento 366 quando se utilizou um programa de análise de 60 min. É possível concluir que aparecem ainda outros 2 picos com tempos de retenção mais curtos e de menor intensidade.

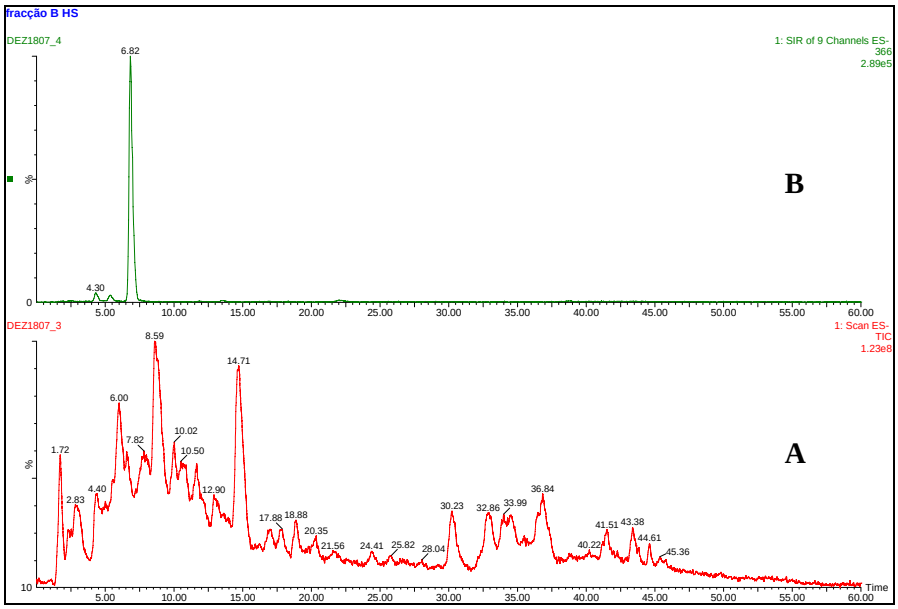


Figura 3.64. Cromatogramas do extracto de vinho Moscatel: (**A**) TIC; (**B**) *m/z* 366

Quando se compararam extractos de vinhos de diferentes produtores foi possível concluir que na amostra do produtor JMF2001 não era detectado o pico correspondente ao composto e a concentração mais elevada correspondia à amostra A_2, como se pode observar na figura 3.65.

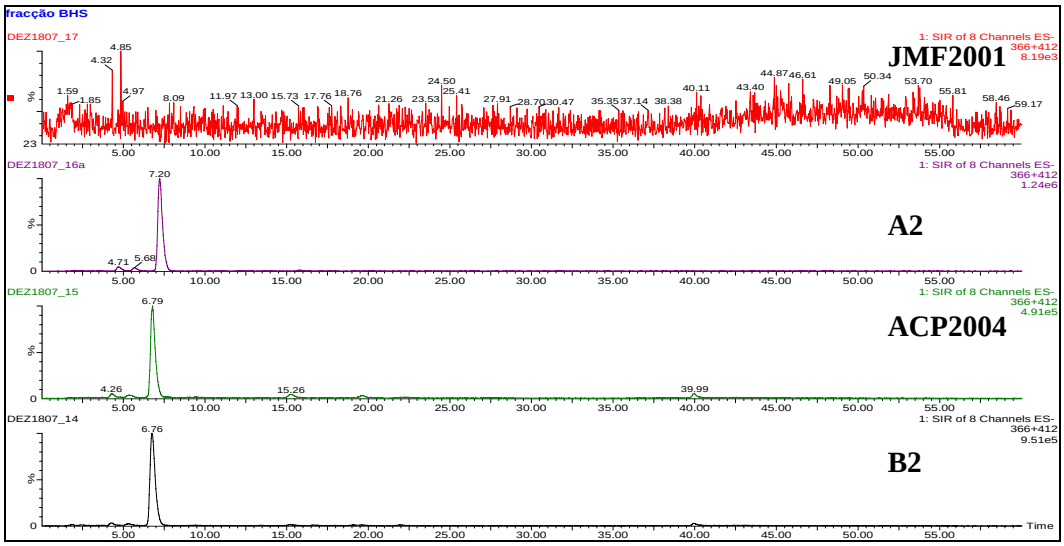


Figura 3.65. Cromatogramas obtidos em modo SIR para *m/z* 366+412 obtidos na análise de extractos concentrados (fracção B) das amostras de JMF2001, A_2, ACP2004 e B

Quando se compararam as figuras 3.60 e 3.65 observaram-se diferenças nos valores dos t_r que são explicadas pela utilização de um programa de eluentes diferente em equipamentos diferentes (armadilha de iões e triplo quadrupolo) com uma coluna diferente embora do mesmo tipo (RP 18).

Como se tinham preparado as fracções A correspondentes, estas também foram analisadas com um programa de eluentes mais demorado, utilizando o equipamento "triplo quadrupolo". Na figura 3.66 apresentam-se os traçados de corrente iónica total para as fracções A e B das amostras de A_2 que se comparam com a fracção A da amostra B_2. O teor é superior na fracção A e o extracto da amostra A_2 apresenta um teor superior.

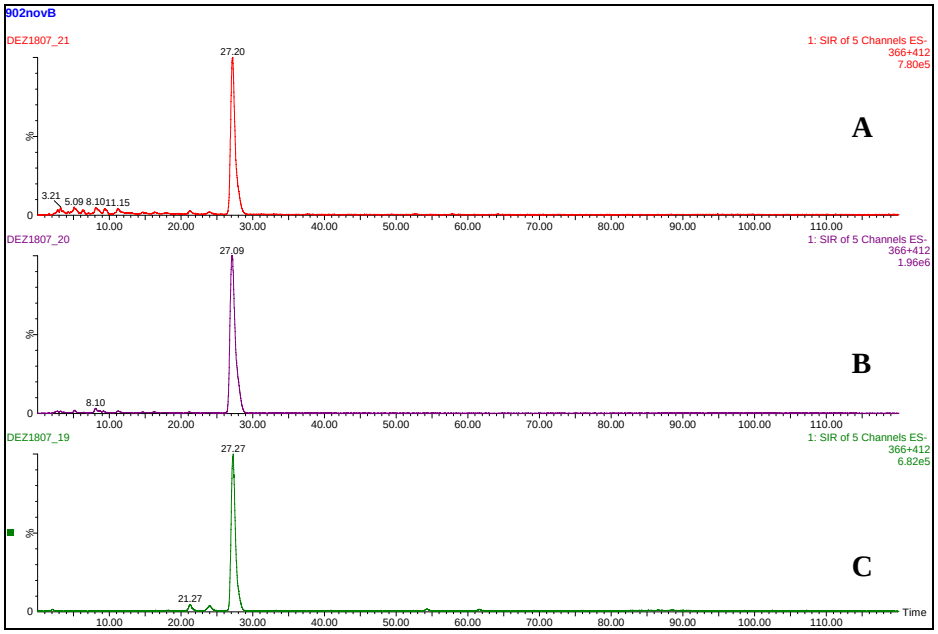


Figura 3.66. Cromatogramas obtidos em modo SIR para *m/z* 366+412 obtidos na análise de extractos concentrados (fracção B) das amostras (**A**) A_2 (fracção B), (**B**) A_2 (fracção A) e (**C**) B_2 (fracção A)

Compostos caracterizados por ião m/z 447

O interesse na identificação dos compostos com *m/z* 447 surgiu devido ao facto de que, quando se comparam os resultados obtidos por LC-MS, estes compostos destacavam-se no cromatograma obtido por espectrometria de massa na zona de tempos de retenção 64-74 min usando um programa de eluentes de 120 min. Nesta zona do cromatograma, também são detectados, com menores intensidades, compostos com valores de *m/z* 461 e 475 e que vão ser discutidos mais à frente.

Um extracto de vinho Moscatel (HS2002) foi analisado por LC-DAD-MS e na figura 3.67 comparam-se os cromatogramas obtidos nos 2 modos de detecção utilizando um equipamento com espectrómetro de massa do tipo "triplo-quadrupolo". Nesta parte do trabalho utilizou-se um gradiente de eluentes mais rápido, pelo que os compostos com interesse eluem entre os 30-40 min.

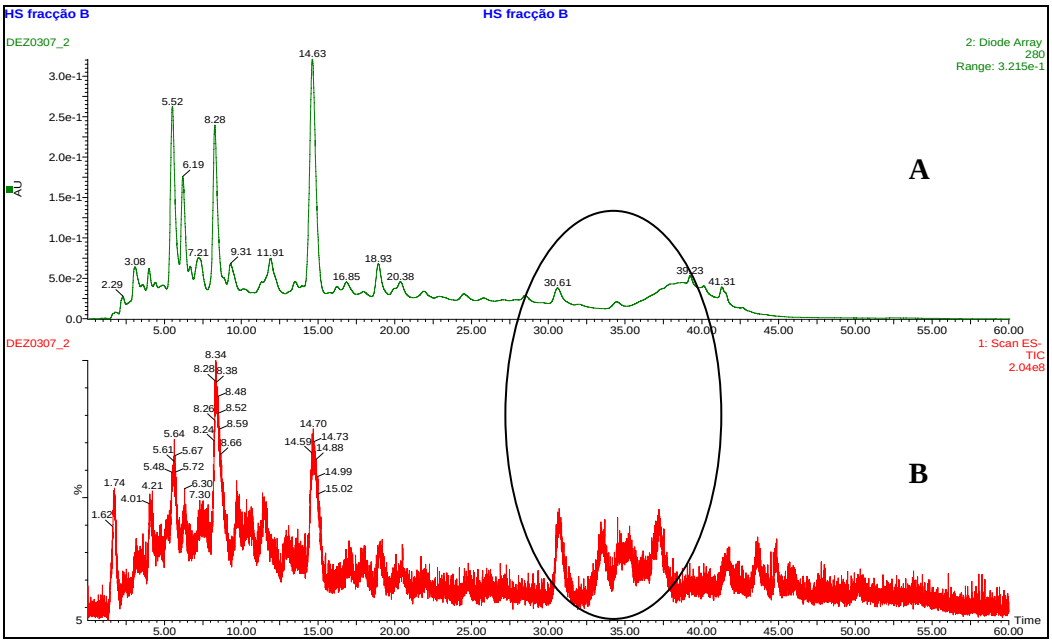


Figura 3.67. Cromatogramas de uma amostra de extracto de vinho Moscatel (**A**) c.d.o. 280nm; (**B**) TIC

Os espectros obtidos apresentavam sinais pouco intensos pelo que se experimentou aumentar a quantidade de amostra a fim de melhorar a qualidade dos espectros de massa. Para tal, comparam-se os resultados obtidos com injecções de 2 µL, 5 µL e 10 µL para os tempos de retenção de 30 e 31.8 min na tabela 3.6 e que mostram que a injecção de 10 µL poderá ter vantagem porque foi detectado um maior número de iões para estes compostos.

Tabela 3.6. Fragmentos do ião *m/z* 447 obtidos para diferentes volumes de injecção

Tempo de retenção (min)	Volume de injecção (µL)		
	2	5	10
30.0	**447**, 315, 159, 131	**447**, 315, 175, 161, 131	**447**, 326, 315, 284, 351, 161, 131
31.8	447 e muitos pequenos		

Procedeu-se à fragmentação do *m/z* 447 em modo "Daughter Scan" aplicando diferentes valores de energia de colisão (CE): 10, 20, 30, 40 e 50 V.

Para a energia de colisão de 20 V e para diferentes tempos de retenção o fragmento 447 originou os espectros de massa que se apresentam na figura 3.68.

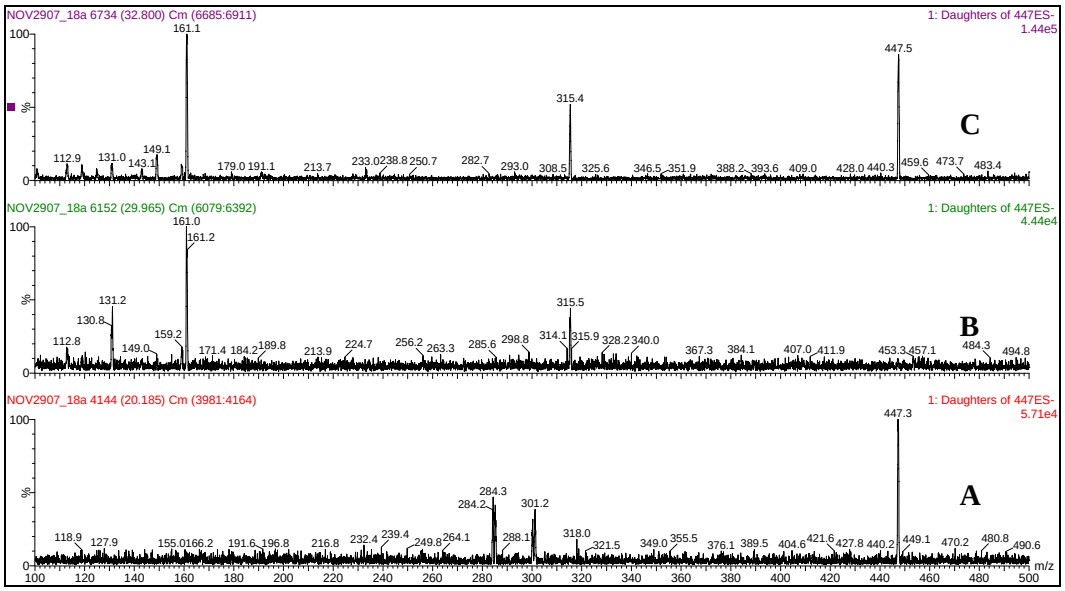


Figura 3.68. Espectros de massa para diferentes tempos de retenção (**A**) 20.185min; (**B**) 29.965 min; (**C**) 32.800 min

Os espectros anteriores diferem porque para o composto com t_r=20.185 aparece o fragmento 301 que foi identificado como quercetina e, neste caso, o ião *m/z* 447 corresponderá ao ramnósido de quercetina (ramnose MM=164 e 164-18=146). Além disso, também é detectado o ião *m/z* 284/285 que poderá corresponder ao ião derivado de campferol (aglícona tem MM=286) resultante da fragmentação do ião *m/z* 447. Como já referido atrás pode-se estar na presença da quercetina-3-*O*-ramnósido e do campferol-3-*O*-glucósido, que eluem com o mesmo tempo de retenção o que tinha sido confirmado experimentalmente com os respectivos padrões.

Para os compostos com *m/z* 447 detectados a valores de t_r superiores a 30 min há semelhanças nos espectros de massa observados, embora em alguns picos haja muita fragmentação a CE 10 V enquanto noutros não acontece o mesmo, como se pode observar na tabela 3.7.

Tabela 3.7. Tempos de retenção dos picos detectados com o ião *m/z* 447 e respectivos espectros obtidos com diferentes valores de energia de colisão

Tempos de retenção (min)	CE (V)		
	10	20	30
30.29	**447,** 315, 131	315, **161**,131, 113	**161**, 145,131, 113
32.93-33.22	**447**, 161, 131	447, 315, **161**	**161**, 159, 149, 143, 131, 125, 113
34.19-34.48	**447**, 315, 281, 251, 221, 179, 149, 131	191, 179, 149, **131**, 119, 113	
35.63-35.68	**447**, 149	447, 315, 191, 179, 173, 161, **149**, 143, 131, 119, 113	191, 161, 149, 131, **119**, 113
36.59-36.84	**447**, 149	447, 315, 191, 179, 161, **149**, 143, 131, 125, 119, 113	191, 161, 149, 131, **119**, 113
37.23-37.345	**447**, 315, 296, 266, 221, 207,149, 123		

Para o aducto correspondente (*m/z* 493) a fragmentação obtida é semelhante à observada para o ião *m/z* 447 e na tabela 3.8 apresenta-se um resumo dos resultados obtidos.

Tabela 3.8. Tempo de retenção dos picos detectados com *m/z* 493 e respectivos fragmentos obtidos com diferentes valores de energia de colisão

Tempos de retenção (min)	CE(V)		
	10	20	30
30.1	**493**, 447	447, **315**, 161,131	**161**, 131, 113
32.2	**493**, 447	**447**, 315, 179, 149, 131	**131**,161
33.3	493, **447**	**447**, 315, 161	447, 315, **161**, 149, 143
34.5	**493**, 447	447, 315, 191, 179, **149**, 131	191,149,131, **119**

Os espectros de massa obtidos para *m/z* 447 e 493 (tabela 3.2.5 e 3.2.6) mostram que para o ião *m/z* 447, existem compostos com fragmentações distintas:

1. picos com menores tempos de retenção (30-33 min) para os quais é possível detectar para maiores valores de CE (20 V) o fragmento 315 e o fragmento principal no espectro tem *m/z* 161;
2. pico com t_r 34.2 com pico base *m/z* 131 a CE (20 V).
3. picos com maiores tempos de retenção (35.6 e 36.6 min) para os quais é possível detectar o fragmento 315 e o fragmento principal do espectro obtido para CE (20 V) tem *m/z* 149 e, para CE (30 V), *m/z* 119;
4. pico com t_r 37.2 em que só são detectados iões a CE (10 V).

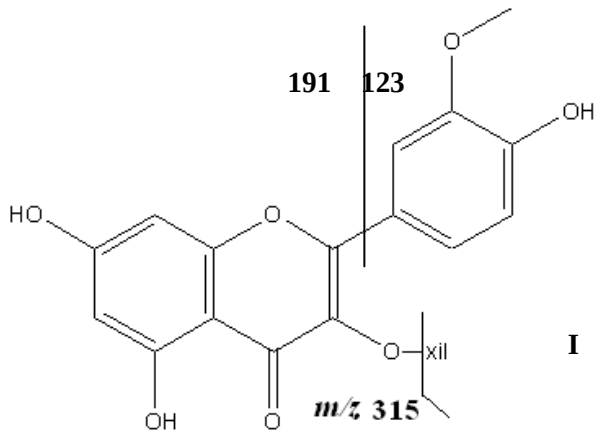
Da fragmentação do ião *m/z* 447 resulta o ião *m/z* 315. Esta diferença de 132 (447-315) corresponde à saída de um fragmento neutro de 132 Da que poderia corresponder a uma pentose ou a uma molécula de ácido tartárico (MM=150 para ambos e 150-18=132). Vamos admitir por hipótese que se trata de moléculas de flavonóides ligados a pentoses e a que corresponderiam massas de aglíconas de 316 Da. Considerando as estruturas possíveis para esta massa (*m/z* 447) e em que ao mesmo tempo haja indícios de que sejam compostos que possam ocorrer nos vinhos, existe a fórmula molecular $(C_{15}H_5O_2)(OH)_4(OCH_3)$ com MM=448 em que $(C_{15}H_{10}O_2)$ corresponde ao grupo flavona. Para os outros compostos detectados para *m/z* 461 e 475, e seguindo o mesmo raciocínio, possíveis fórmulas moleculares seriam:

$(C_{15}H_5O_2)(OH)_3(OCH_3)_2$ (MM=462) e $(C_{15}H_5O_2)(OH)_2(OCH_3)_3$ (MM=476).

Estas 3 fórmulas poderiam ser consideradas como derivadas da quercetina mediante a substituição de um grupo OH por OCH_3: a primeira (monometoxi) poderia ser a isoramnetina ou isómero. Nos vinhos existem várias pentoses (xilose, arabinose e ribose) e Baderschneider[202] *et al*., (2001) já tinham identificado a existência de dihidroquercetina-3-*O*-xilósido em vinhos brancos e que também foi detectado nas amostras de vinho Moscatel analisadas (referenciado anteriormente como pico 68).

Por outro lado, as fórmulas semelhantes com mais um ou dois grupos metilo permitiriam explicar a existência dos compostos caracterizados por iões com valores de *m/z* iguais a 461 e 475 que serão discutidos a seguir.

Na figura 3.69 apresenta-se uma estrutura hipotética (I) para o composto com *m/z* 447.



I

Figura 3.69. Hipotética estrutura **I** do composto correspondente ao ião *m/z* 447

A diferente localização do grupo metoxi e a ligação a xilose ou outra pentose poderiam explicar a ocorrência de isómeros.

A fragmentação da ramnetina e isoramnetina em MS^2 envolvem a perda do grupo metilo[203] o que origina iões como 300 (315-15). Por outro lado, são importantes os iões 121, 151 e 97 para a ramnetina[204] e 151 e 107 para a isoramnetina[203,204] o que não acontece nos espectros obtidos pelo que será de procurar e discutir outras estruturas hipotéticas que possam explicar os valores observados.

Uma combinação de dois ácidos fenólicos com ácido tartárico como, por exemplo, ácidos (gálhico + cutárico) ou ácidos (protocatechuico + caftárico) que é apresentado como exemplo na figura 3.70 podia explicar a ocorrência de vários compostos com MM=448 bem como iões observados nos espectros de massa.

Além disso, considerando ácidos fenólicos com grupos metoxi (vanílico em vez de protocatechuico ou/e ferúlico em vez de cafeico) seria possível explicar a ocorrência de compostos caracterizados por iões com *m/z* iguais a 461 e 475 que também foram detectados nesta zona de tempos de retenção e serão discutidos a seguir.

Considerando a estrutura proposta, pode-se pôr em dúvida a formação destes compostos hipotéticos pois a esterificação de grupos fenólicos é difícil (e não há exemplos destes compostos descritos na literatura) embora no caso de ácidos fenólicos orto-di-hidroxilados possa haver formação de quinonas altamente reactivas que permitem formar ligações com outros compostos.

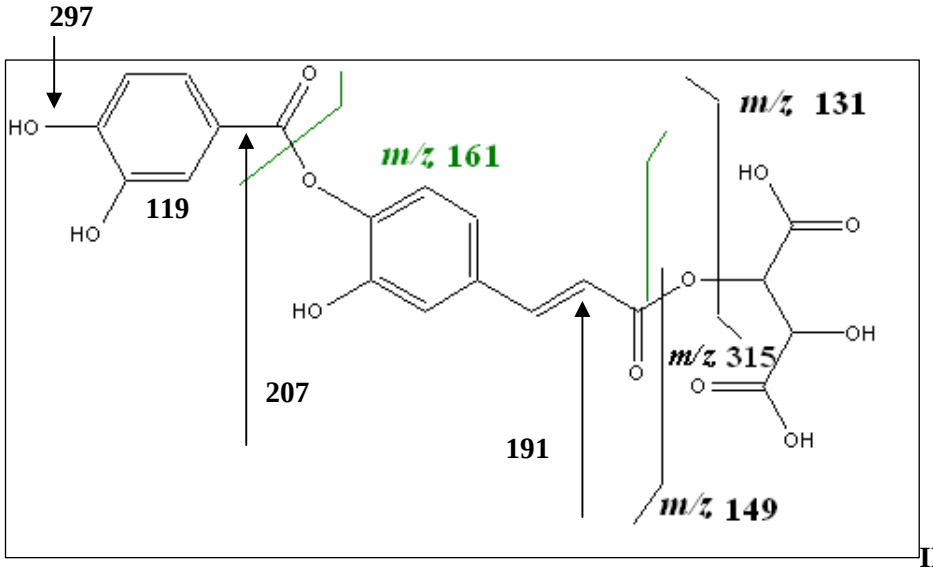


Figura 3.70. Estrutura hipotética II para composto correspondente ao ião *m/z* 447

Vamos retomar a discussão da natureza destes compostos tendo em conta os iões observados nos espectros de massa. Na forma de quadro (tabela 3.9), apresenta-se um conjunto ordenado de valores retirados da tabela 3.7: para alguns valores situados em linhas observam-se diferenças de 30 Da enquanto há diferenças de 18 Da para valores alinhados por colunas. Estas diferenças de 18 Da devem corresponder à saída de moléculas de água e as diferenças de 30 ou múltiplos de 30 são típicas de hidrato de carbono: um grupo CH_2O corresponde a 30 Da. Assim, nas moléculas em estudo deve existir uma parte constituída por "hidrato de carbono" que permite explicar estas diferenças de massa.

Tabela 3.9. Iões detectados nas fragmentações dos picos com *m/z* 447

								179					**149**	**119**
447	**315**		281	251		221	191	**161**	159	145			**131**	
	296	266			207		173	143			123		113	
								125						

Em ensaios de MS^2 apontados para a massa 315, observaram-se os iões com m/z 179, 161 e 113 o que sugere que o ião 315 contenha uma hexose (MM=180). A fim de obter informação acerca da parte restante deste ião admite-se que havia uma ligação éster à parte hexose e calcula-se: 315+1+18-180=**154**. Este valor de MM=154 Da pode corresponder a ácido protocatechuico ou hidroxitirosol que existem nestes vinhos.

A parte restante desta molécula vai ser discutida de modo semelhante admitindo que há outra ligação éster à parte hexose: 447+1 +18×2-180-154= **150**.

Se esta molécula (com MM=448) incluísse duas unidades glicosídicas (hexose + pentose) ou hexose e ácido tartárico que também tem MM = 150 Da, o tempo de retenção devia ser bastante mais baixo. Assim, vamos discutir a possibilidade de se ter uma hexose ligada a uma molécula com MM=150 Da e que não seja incompatível com um tempo de retenção nesta zona do cromatograma. Por exemplo, pode sugerir-se álcool cumarílico e na figura 3.71, apresenta-se a estrutura III proposta para estes compostos.

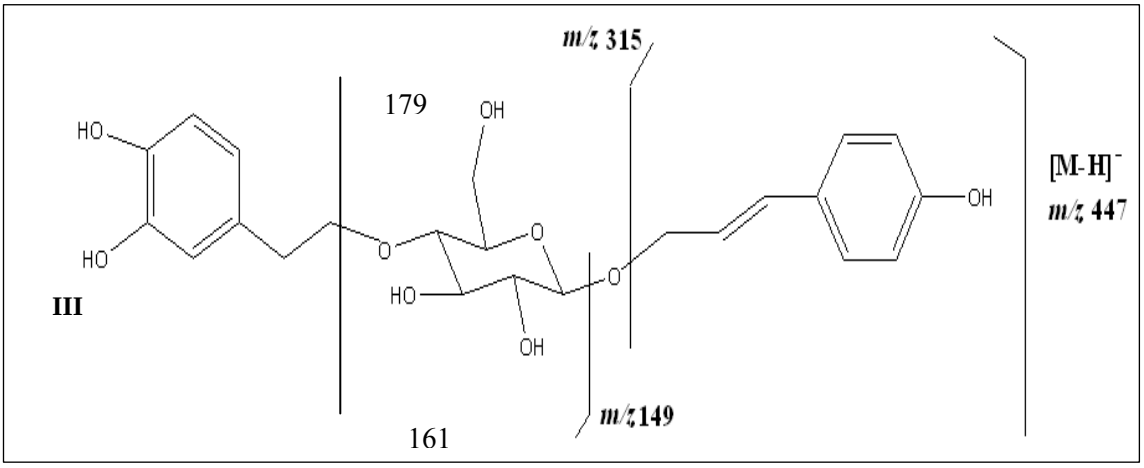


Figura 3.71. Estrutura hipotética III para composto correspondente ao ião *m/z* 447

Compostos caracterizados por ião m/z 461

Para o valor *m/z* 461 aparecem vários picos e a fragmentação do ião *m/z* 461 com diferentes valores de EC (10, 20 e 30 V), origina vários fragmentos que se apresentam na tabela 3.10.

Tabela 3.10. Tempo de retenção dos picos detectados com *m/z* 461 e respectivos fragmentos obtidos com diferentes valores de energia de colisão

Tempos de retenção (min)	CE (V)		
	10	20	30
19.8	461, 285	285	285 (campferol)
33.5	**461**, 293, 149	293, **167**, 149, 131, 125, 113	**167**
34.9	**461**, 293	461, 315, **167**, 161, 149, 131, 125	**167**, 161
36	**461**, 293	293, **167**, 149	**167**
36.8	461, **293**	293, **149** e outros	ruído

Para o tempo de retenção 19.8 min e um valor de CE=10 V, não ocorre praticamente fragmentação embora já seja possível detectar o ião m/z 285 com intensidade muito baixa. Para valores de CE superiores, o ião inicial já não é detectado aparecendo em maior quantidade o ião *m/z* 285, característico do campferol. Um composto descrito na literatura, é o campferol-3-*O*-glucuronido, com uma massa molecular de 462, pelo que quando analisado por LC-MS em modo negativo dá origem ao ião molecular *m/z* 461 e a sua fragmentação origina o ião de *m/z* 285 com a saída de um fragmento neutro de massa 176 Da.

Para o aducto *m/z*=507 procedeu-se de modo semelhante ao descrito para o estudo da fragmentação do ião *m/z* 461 utilizando diferentes valores de CE. Os resultados obtidos apresentam-se na tabela 3.11.

Tabela 3.11. Tempo de retenção dos picos detectados com m/z 507 e respectivos fragmentos obtidos com diferentes valores de energia de colisão

Tempos de retenção (min))	**CE (V)**		
	10	**20**	**30**
33.912	**507**, 461, 293	461, **293**, 252, 233, 191, 167, 149, 131, 125	**167**, 149, 138
35.033		**461**,410,345,316,293, 221, 191,167, 160, 149, 120, 125, 130	191, **167**, 161, 150 130
35.734	**507**, 461, 293, 245(?)		
36.552		**293**, 207, 191, 180, 160, 149,125, 13?, 13?	
37.127	**507**, 461, 293, 149	**293**, 25?, 23?, 221, 191, **149**, 125	233, 191, 167, 149, 13?, 110, 120
37.575		461, 293, 268, 235,**163**, 149, 12?	
38.023	**507**, 461, 293		

É possível concluir que a CE 10 V além de fazer surgir o ião 461 já provoca a fragmentação que origina o ião m/z 293.

Neste caso, não dispomos de informação de MS^2 mas vamos proceder de modo semelhante ao que fizemos no final da secção anterior (figura 3.71). O ião *m/z* 293 que foi detectado em todos os picos será considerado como resultante duma hexose com ligação (éster) a uma molécula com 150 Da (293 +1+18×2-180) que, tal como no caso anterior, poderia ser o álcool cumarílico. Neste caso, considerou-se que, na fragmentação, o oxigénio da ligação éster fica ligado à hexose o que levou a somar mais 18 Da correspondente a mais uma molécula de água.

A parte restante da molécula corresponde a: 461+1+ 18×2 -180 -150 = **168**. Pode sugerir-se o ácido vanílico (MM= 168) para fazer parte da estrutura hipotética proposta e que é apresentada na figura 3.72.

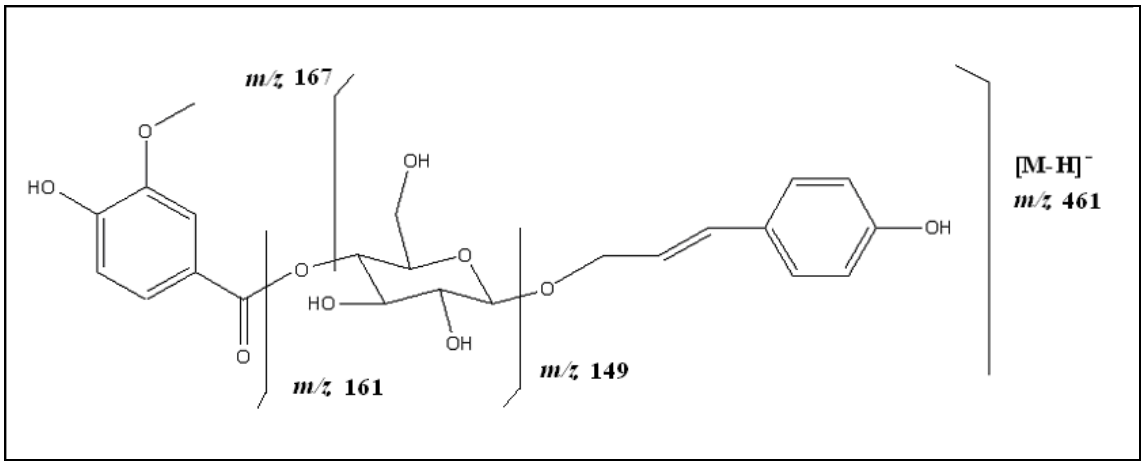


Figura 3.72. Estrutura hipotética para composto correspondente ao ião *m/z* 461

Tal como foi afirmado na secção 3.2.1, não se encontraram vestígios de ácido vanílico nos extractos de vinho Moscatel analisados e neste momento está em discussão a possibilidade de estar ligado a hexose como parte da estrutura proposta. Fez-se então uma pesquisa no cromatograma tentando encontrar o glucósido de ácido vanílico (MM= 168+180-18 = 330) a que corresponderiam os iões 329 e 375 (329 + 46 do aducto com ácido fórmico): foi detectado um pico pouco intenso a 35.38 min com estes iões. No entanto, comparando com o tempo de retenção do padrão de ácido vanílico (28-29 min) conclui-se que se trata de outro composto pois o glucósido devia ter um tempo de retenção inferior ao do ácido.

Poderia agora tentar-se encontrar mais compostos com MM=168 menos polares que o ácido vanílico. Por exemplo, podia considerar-se o 3,4-dihidroxifenilppropanol, que é conhecido como produto de redução de 3',4'-dihidroxiflavonoides[204] mas desconhece-se a existência deste composto em vinhos.

Composto caracterizado por ião m/z 475

Para o ião *m/z* 475 e respectivo aducto (521) só é detectado um pico. No entanto procedeu-se de modo semelhante ao descrito para o estudo da fragmentação utilizando diferentes CE (10, 20 e 30 V) mas não se conseguiu fragmentar o ião *m/z*=475. No entanto, foi possível fragmentar o aducto (*m/z*=521) e apresenta-se na tabela 3.12 a fragmentação obtida.

Tabela 3.12. Fragmentos do ião *m/z* 475 obtidos com diferentes valores de energia de colisão (10, 20 e 30 V)

Tempos de retenção (min)	CE (V)		
	10	**20**	**30**
37.28	**521**, 475	375, 307, 167, **163**, 124	**167**, 163, 124?

Para um valor de CE=10 V apenas se detecta o fragmento *m/z* 475. Para valores de CE superiores este ião já não é detectado aparecendo com maiores intensidades os iões *m/z* 163 e 167.

Tendo em conta os iões detectados e usando argumentos paralelos aos utilizados para os compostos correspondentes ao ião *m/z* 461, pode sugerir-se uma estrutura hipotética construída a partir da ligação de uma hexose (MM=180) com ácido vanílico (MM=168) e ácido cumárico (MM=164) que explicariam o aparecimento do iões *m/z* 167 e 163, como se pode observar na figura 3.73.

O ião 307 corresponderia à saida do ácido vanílico como fragmento neutro e o ião *m/z* 375 resultaria da saída de um fragmento neutro de 146 Da que poderia ser atribuído a ácido cumárico com perda de uma molécula de água (164-18).

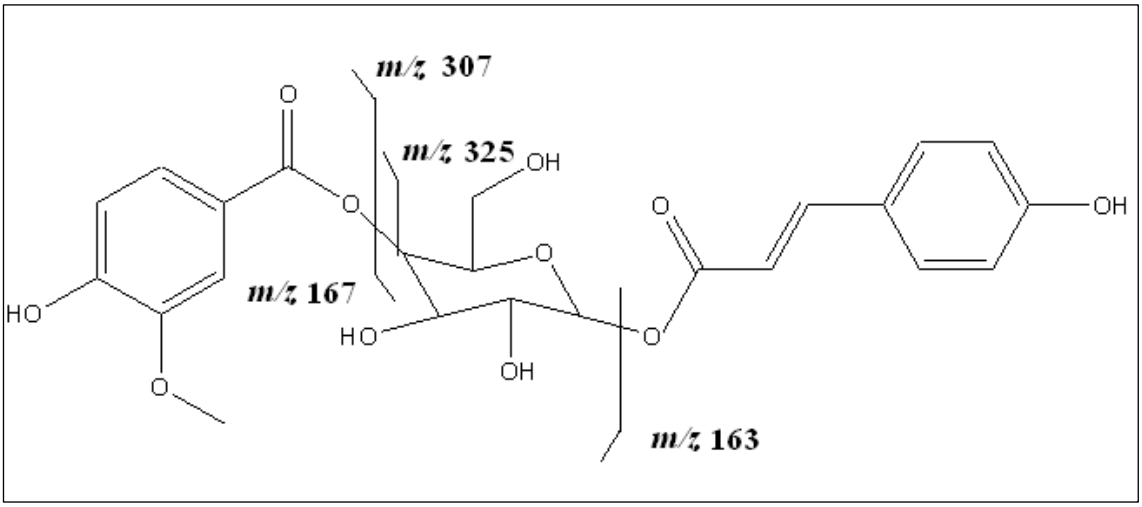


Figura 3.73. Estrutura hipotética para composto correspondente ao ião *m/z* 475

Estas estruturas hipotéticas devem ser encaradas apenas como exemplos plausíveis e a sua inclusão nesta discussão de resultados deverá ser encarada como uma tentativa de utilizar a informação disponível para obter pistas para trabalho futuro.

As diferenças de fragmentação observadas para estes compostos com a mesma massa molecular podem significar que estamos a lidar com compostos de diferentes estruturas mas que apareceram aqui agrupados devido ao facto de terem a mesma massa molecular e tempos de retenção próximos.

Serão necessários ensaios complementares para conseguir as estruturas destes compostos. Por exemplo, separando os compostos em escala preparativa e utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear deveria ser possível confirmar ou excluir algumas das estruturas hipotéticas apresentadas.

3.3. Estudo de Vinhos Moscatel Portugueses

Os vinhos Moscatel produzidos na região DOC de Setúbal e região DOC do Douro estão sujeitos a regras impostas pela legislação em vigor para estas regiões[170,172,173] nomeadamente no que se refere ao seu processo de fabrico. Neste trabalho, foram analisadas amostras provenientes de 13 produtores da região de Setúbal bem como algumas amostras de vinho Moscatel Douro obtidas comercialmente que, por serem em número muito pequeno, não podem ser consideradas amostras representativas desta região mas foram incluídas no estudo para comparação (*ver apêndice A*). Pretendeu-se também estudar a variação da composição química ao longo do processo de vinificação do vinho Moscatel de um produtor da região de Setúbal, embora na realidade se tivessem seguido os processos de vinificação de três produtores, com o objectivo de verificar quais as diferenças ou semelhanças existentes entre os vinhos dos vários produtores em algumas fases do processo de vinificação.

Nesta parte do trabalho utilizou-se o equipamento de cromatografia líquida associado à detecção por díodos, fluorescência e electroquímica. Como a identificação de compostos tinha sido feita previamente no extracto da amostra C_4 (obtido a partir da técnica de extracção líquido-líquido com acetato de etilo) analisada por espectrometria de massa (*ver apêndice B e C*), houve necessidade de comparar os resultados obtidos nos dois sistemas cromatográficos, para a análise da mesma amostra, de modo a poder concluir-se sobre a identificação dos picos. A coluna usada não era a mesma mas era do mesmo tipo (RP18). No que se refere aos eluentes utilizados também não eram os mesmos, dado que nos ensaios por espectrometria de massa se utilizou o ácido fórmico, em vez de ácido fosfórico. No entanto os compostos apresentavam tempos de retenção semelhantes nos dois sistemas cromatográficos. Os perfis cromatográficos foram comparados e notavam-se algumas diferenças no que se refere à resolução entre picos, mas foi possível identificar de forma inequívoca os compostos mais importantes nos dois cromatogramas. Dado que se tinham disponíveis no laboratório alguns padrões, a identificação foi confirmada por sobrecarga da amostra, nomeadamente com o ácido gálhico (14), 5-HMF (21), ácido protocatechuico (25), procianidina B_1 (39), catequina (42), ácido cafeico (47), procianidina B2 (51), epicatequina (56), galhato de etilo (59), *t*-piceid (75), quercetina-*3*-*O*-glucósido (82), *c*-piceid (91), *t*-resveratrol (105), o cafeato de etilo (109) e a quercetina (111). Compararam-se também os

espectros de absorção dos picos detectados e em situações de dúvida considerou-se o quociente dos tempos de retenção dado pela seguinte equação:

$$\frac{t_r' - t_{r_1}}{t_{r_2} - t_{r1}}$$

em que t_{r1} e t_{r2} correspondem aos tempos de retenção dos picos identificados e t'_r ao tempo de retenção do pico que se pretende identificar. O cálculo deste quociente foi efectuado para os picos nos cromatogramas obtidos com os dois equipamentos utilizados e os valores obtidos foram comparados sendo identificados os compostos que apresentavam o mesmo valor de quociente. Na tabela CII (*ver apêndice C)*, apresenta-se a identificação dos picos detectados no vinho Moscatel de Setúbal quando se utilizaram os dois sistemas cromatográficos.

Nos cromatogramas a c.d.o. 280 nm da figura 3.74 estão identificados alguns dos picos detectados na amostra C_4 correspondente ao ensaio de vinificação, o respectivo extracto, e uma amostra de vinho comercial, HS353.

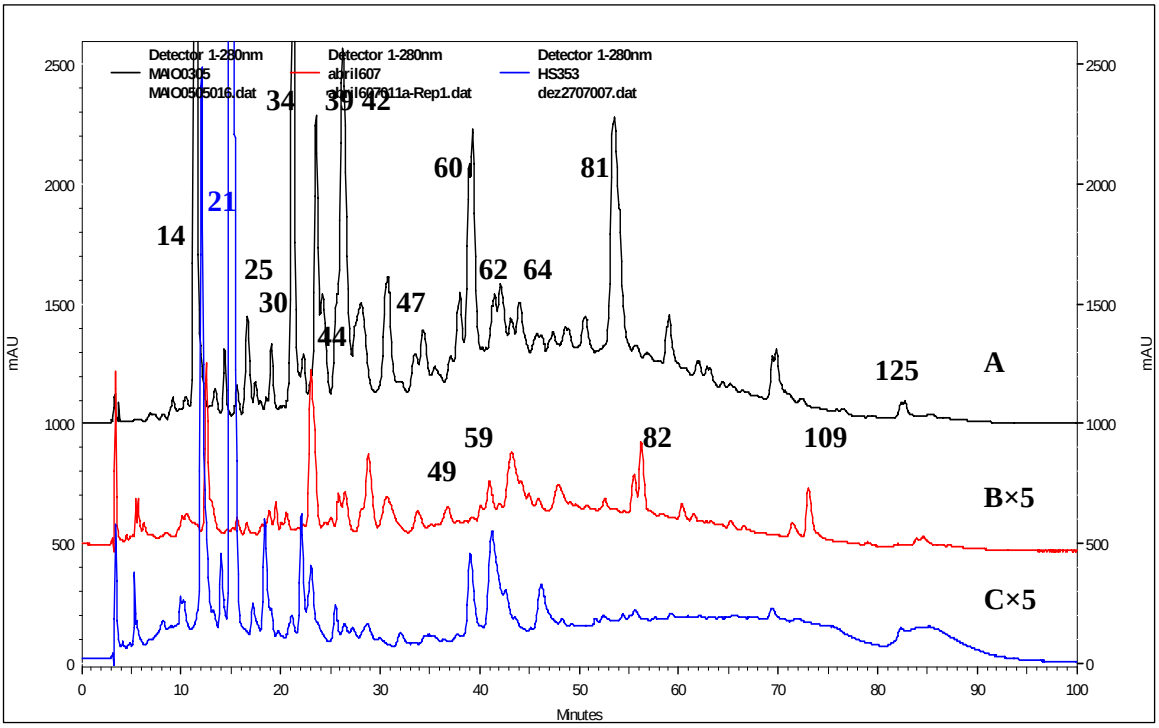


Figura 3.74. Cromatogramas a c.d.o. 280 nm de: (**A**) extracto da amostra $C_{4;}$ (**B**) amostra C_4, (**C**) amostra comercial (HS353). **Identificação:** ver tabela CI e CII apêndice C

Os perfis cromatográficos da amostra comercial e da amostra correspondente à fase de vinificação foram multiplicados por um factor de 5 para serem mais facilmente comparáveis com o cromatograma do extracto. Embora as condições analíticas fossem

iguais, a análise destas amostras foi realizada em dias diferentes e por isso justifica-se que fossem observadas pequenas variações nos tempos de retenção. Como as análises efectuadas com as amostras decorreram num período longo, houve necessidade de serem controladas as condições do equipamento, de modo a ser possível comparar áreas de picos cromatográficos obtidos em tempos diferentes. Assim o controlo do sistema cromatográfico utilizado foi efectuado através da análise, paralela às amostras, de uma mistura de padrões (mistura teste) constituída por ácido gálhico (5 mgL^{-1}), 5-HMF (3.75 mgL^{-1}), ácido protocatechuico (2.5 mgL^{-1}), furfural (1.5 mgL^{-1}), ácido *p*-hidroxibenzóico (10 mgL^{-1}), catequina (30 mgL^{-1}), ácido cafeico (10 mgL^{-1}), vanilina (5 mgL^{-1}), siringaldeido (10 mgL^{-1}), ácido ferúlico (5 mgL^{-1}), ácido salicílico (50 mgL^{-1}) e ácido 3,3,5-trimetoxicinâmico (7.5 mgL^{-1}), e fez-se o registo do t_r e da área associada a cada pico detectado por LC-DAD.

Na figura 3.75 comparam-se os cromatogramas do extracto da amostra de vinho Moscatel de Setúbal B_4, obtidos com os detectores de díodos (DAD), fluorescência (FD) e electroquímico (ED) montados em série. Os perfis cromatográficos mostram que para a detecção no c.d.o. de 280 nm, normalmente utilizado para estudar os compostos fenólicos, os cromatogramas são complexos e como já foi referido, apresentam linhas de base irregulares que podem dificultar a integração e consequente quantificação dos compostos associados aos picos nos cromatogramas. Um grande número de compostos é facilmente detectado por fluorescência nas condições apresentadas na figura (λ_{exc}=280 nm e λ_{em}=320 nm), no entanto outros valores de λ_{exc} e de λ_{em} mais selectivos deverão ser utilizados quando se pretender uma análise de um composto específico como foram os casos do galhato de etilo (272/374 nm); *t*-resveratrol (300/390 nm) e cafeato de etilo (324/442 nm) para os quais se pretendeu obter maior selectividade e/ou sensibilidade na resposta do detector (*ver 3.3.4 e 3.3.5*).

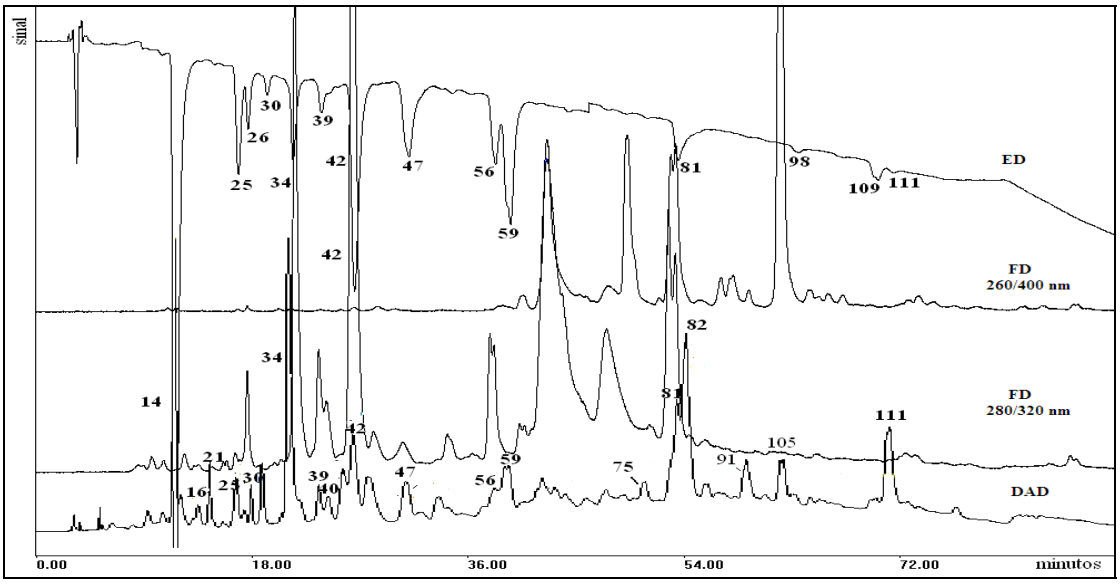


Figura 3.75. Cromatogramas do extracto da amostra de Moscatel de Setúbal, B_4, (DAD) c.d.o. 280 nm; FD; ED. **Identificação:** consultar tabela CI e CII apêndice C

O detector electroquímico permite a obtenção de cromatogramas bastante mais simples e pode ser útil na detecção e/ou quantificação de compostos como o ácido gálhico (**14**), o ácido protocatechuico (**25**), o ácido *t*-caftárico (**34**) a catequina (**42**), o ácido cafeico (**47**), o galhato de etilo (**59**) e o cafeato de etilo (**109**) e quercetina (**111**) que originam um sinal neste modo de detecção. Por outro lado sendo um detector bastante selectivo, pode permitir analisar um composto mesmo que esteja a co-eluir com outros componentes da amostra, desde que estes não apresentem actividade electroquímica nas condições do ensaio. É de salientar o facto deste detector ser instável e por isso para efeitos de quantificação há que ter o cuidado de efectuar curvas de calibração com alguma proximidade no tempo em que foram analisadas as amostras e, no caso de sequências de análise longas, deverá ser feito um controle do sistema com a mistura de controlo já referida.

Para ilustrar o interesse na utilização deste detector, comparam-se na figura 3.76. os cromatogramas de extractos em acetato de etilo de amostras resultantes dos ensaios de vinificação nos vários produtores estudados (A_4, B_4 e C_4). Os cromatogramas são relativamente simples e permitem facilmente detectar diferenças entre as amostras estudadas.

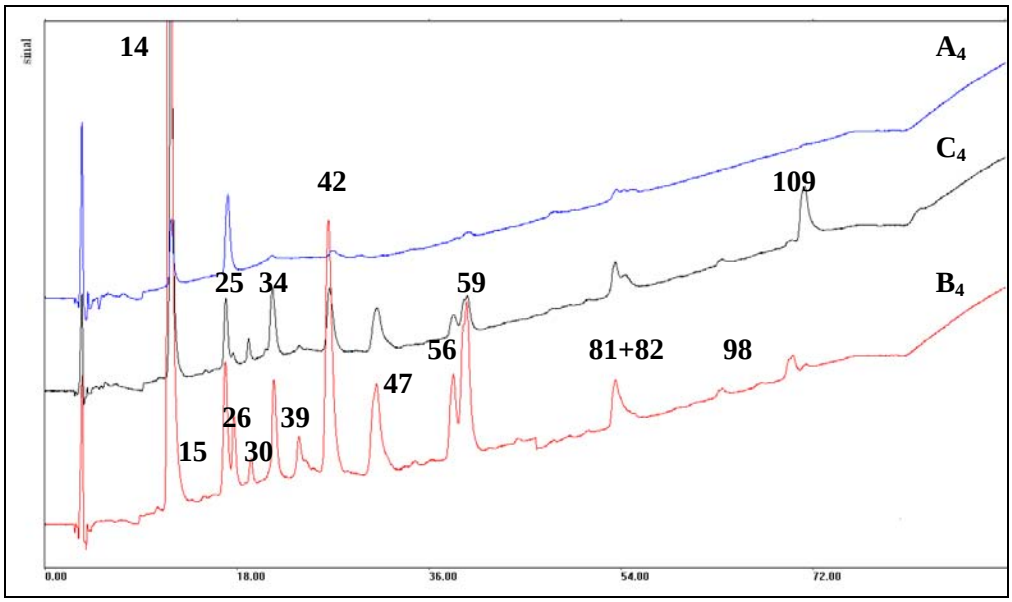


Figura 3.76. Cromatogramas dos extractos em acetato de etilo de vinho Moscatel de Setúbal (A_4, B_4 e C_4) obtidos com ED. **Identificação:** consultar tabela CI e CII apêndice C

Desta forma tentou-se justificar o procedimento analítico que foi utilizado para comparar as amostras em estudo, nomeadamente no que se refere às metodologias instrumentais usadas.

Nesta parte do trabalho pretendia-se comparar amostras. Como tal houve necessidade de se escolher as variáveis a comparar. O mesmo tipo de tratamento foi efectuado para as amostras resultantes do ensaio de vinificação de um produtor (C).

Posteriormente seleccionaram-se só as variáveis que teriam alguma relação com actividade biológica, por exemplo DPPH, FRAP e ORAC e são discutidos os resultados para as amostras comerciais. Neste estudo considerou-se preferencialmente as amostras dos 3 produtores seleccionados para este trabalho e que correspondem a empresas de características diferentes: dois são grandes produtores (A e B) e outro é um pequeno produtor (C) de uma empresa de características familiares.

Neste capítulo apresentam-se ainda resultados referentes à quantificação de alguns compostos presentes nas amostras, como os ésteres etílicos de ácidos benzóicos e cinâmicos e também o resveratrol.

A variabilidade dos resultados associada às matérias primas, as uvas, como já foi referido na introdução, pode ser devida a muitos factores e por isso na discussão dos resultados só será dada ênfase aos compostos que são mais influenciados pelas condições de processamento.

Para facilitar a comparação dos resultados obtidos para as diferentes amostras em estudo foi utilizada a análise multivariável por componentes principais (PCA). Esta análise é um dos métodos estatísticos mais usados quando se pretendem analisar muitos dados correspondentes a diferentes variáveis e a diferentes amostras. O objectivo mais imediato da análise por PCA é verificar se existe um pequeno número de componentes principais que possa explicar uma proporção elevada da variação total obtida para os resultados, permitindo, avaliar de uma forma rápida, se existem diferenças entre as amostras, de que forma elas se relacionam/discriminam e determinar as variáveis que contribuem para essa discriminação.

Foram utilizados os valores correspondentes a 57 parâmetros (variáveis) obtidos na análise das amostras (tabela 3.13). As variáveis correspondem à área de compostos detectados pelo detector de díodos (280 nm) e electroquímico (ED) e também aos resultados correspondentes ao teor de fenóis totais (**Folin)**, teste da actividade antioxidante (**DPPH**, **FRAP**, **ORAC**), área total dos cromatogramas obtidos a 280 nm (**AT1** e **AT2**) e com detecção electroquímica (**Edtotal**), concentração do tirosol (**tir)** e resveratrol (**resv**).

Relativamente à detecção a 280 nm alguns picos não foram considerados neste tratamento estatístico, porque por vezes eram demasiado pequenos para serem integrados. Além disso a existência de picos mal separados implica que a área considerada corresponda a dois ou mais compostos que eluem com tempos de retenção próximos. Por isso apenas se considerou 38 variáveis identificadas pela letra "D" que correspondem às áreas obtidas a c.d.o. 280 nm. As 10 variáveis identificadas pela letra "E" correspondem às áreas dos picos detectados com o detector electroquímico.

Na tabela CII (*ver apêndice C)* apresentam-se as identificações dos picos detectados pelas duas técnicas (LC-MS e LC-DAD-FD-ED) e verifica-se que no pico 34 co-eluem 3 compostos (ácido *t*-caftárico, NI e tirosol). O cumarato de etilo apenas foi detectado por LC-MS quando se utilizou o equipamento Waters Alliance e por isso só aparece na tabela CII (*ver apêndice C*).

Tabela 3.13. Identificação das variáveis utilizadas no tratamento estatístico das amostras de vinho Moscatel (*ver tabela CII*)

Variável[1]		Significado	Variável[1]		Significado
3D		NI	***74D***		NI
5D		NI	***75D***		*t*-piceid+NI
8D		NI	***78D***		Procianidina+isoramnetina-3-O-rutinósido
10D		NI	***81D***	**81E**	Quercetina-3-*O*-glucuronido+NI[3]
14D	**14E**	Ácido gálhico	***86D***		procianidina
15D	**15E**	NI	***91D***		*c*-piceid campferol-3-*O*-glucósido quercetina-3-*O*-ramnósido
16D		NI	***93D***		Isoramnetina-3-*O*-glucósido
21D		5-HMF	***96D***		2,4,6-trihidroxifenantreno-2-O-glucósido + NI
25D	**25E**	Ácido protocatechuico+NI	***98D***	**98E**	NI+procianidina
30D		Ácido *c*-caftárico +NI+furfural	***103D***		NI
31D		NI	***109D***	**109E**	Cafeato de etilo+ NI
34D	**34E**	Ácido *t*-caftárico + NI	***113D***		NI
37D		NI	***125D***		Não identificado+cumarato de etilo
39D	**39E**	Procianidina B1	**Folin**		Teor em fenóis totais
41D		Ácido *c*-cutárico	**DPPH**		Actividade antioxidante pelo método DPPH[4]
42D		Catequina[2] + NI	**FRAP**		Actividade antioxidante pelo método FRAP[5] utilizando o padrão Trolox[6]
43D		Ácido *t*-cutárico	**ORAC**		Actividade antioxidante pelo método ORAC[7]
45D		NI	**AT1**		Soma da área dos picos detectados no cromatograma a 280 nm
47D	**47E**	Ácido cafeico + procianidina	**AT2**		Área total (picos e "bossa") no cromatograma a 280 nm
49D		Ácido *t*-fertárico + NI	**Tir**		Teor em tirosol obtido com o detector de fluorescência
56D		Epicatequina+NI	**Resv**		Teor em resveratrol obtido com o detector de fluorescência
59D	**59E**	Galhato de etilo	**Edtotal**		Soma da área dos picos detectados com o detector electroquímico
60D		Glucósido do ácido indol-láctico			
64D		Procianidina			
68D		Dihidroquercetina-3-*O*-xilósido+procianidina+NI			

[1] ***D***- detector de díodos; **E**- detector electroquímico **NI**- não identificado

[2] variável em que se considera a catequina e o ácido *c*-cutárico

[3] variável em que se considera a quercetina-3-*O*-glucuronido e a quercetina 3-*O*-glucósido (identificado na tabela CI, CII e CV como o pico 82)

[4] **DPPH**-2,2,difenil-1-picrilhidrazilo [5] **FRAP**- poder antioxidante de redução férrica

[6] **Trolox** – ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico
[7]**ORAC** - capacidade antioxidante do radical oxigénio

3.3.1. Estudo dos vinhos Moscatel comerciais

Foram analisados 60 vinhos de 13 produtores da região de Setúbal que foram cedidos pela Comissão Vitivinícola Regional da Península de Setúbal (CVRPS), aos quais se juntaram 10 vinhos adquiridos no supermercado. Dado o elevado número de amostras (70) e de variáveis (42) recorreu-se à análise por componentes principais (PCA) para comparar as amostras em estudo. As variáveis usadas foram as áreas de picos determinados ao c.d.o. de 280 nm **(D)**, **AT1**, **AT2**, **tir** e **resv**.

A matriz de resultados foi sujeita à análise e na figura 3.77 apresenta-se a projecção das 70 amostras de vinho Moscatel no espaço definido pelas três primeiras componentes principais e pode observar-se o aparecimento de um grupo central que engloba a maioria das amostras e mais 4 grupos de amostras, que são assinalados na figura e que se diferenciam nas componentes representadas.

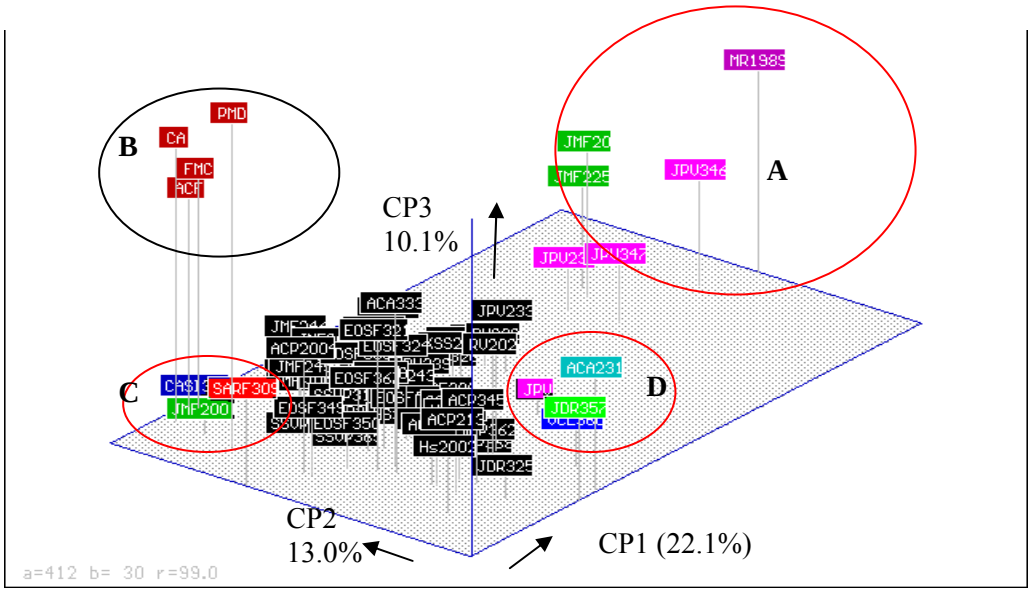


Figura 3.77. Projecção das amostras (n= 70) no espaço tri-dimensional definido pelas três primeiras componentes principais

Quando se efectua a análise por PCA se a variância total acumulada nas 3 primeiras componentes principais exceder o valor de 75% significa que uma parte significativa da variância dos resultados está contida nesse espaço tridimensional, mas para a matriz de dados analisados, a variância acumulada de 78.1 % só é atingida na 10ª componente

principal, como se mostra na tabela 3.14, pelo que numa representação com as 3 primeiras componentes principais se perde informação sobre as amostras.

Tabela 3.14. Tabela da percentagem da variância individual e acumulada nas 10 componentes principais

CP	Valor próprio	% de variância individual	% de variância acumulada
1	9.30	22.1	22.1
2	5.47	13.0	33.2
3	4.23	10.1	45.2
4	3.07	7.3	52.5
5	2.71	6.4	58.9
6	1.79	4.8	63.8
7	1.45	4.2	68.1
8	1.40	3.4	71.5
9	1.11	3.3	74.9
10	0.98	3.2	78.1

No entanto para ter uma ideia das variáveis que poderiam estar a contribuir para a discriminação dos diferentes grupos de amostras, efectuou-se uma projecção das amostras e variáveis no plano definido pelas 2 primeiras componentes principais (figura 3.78).

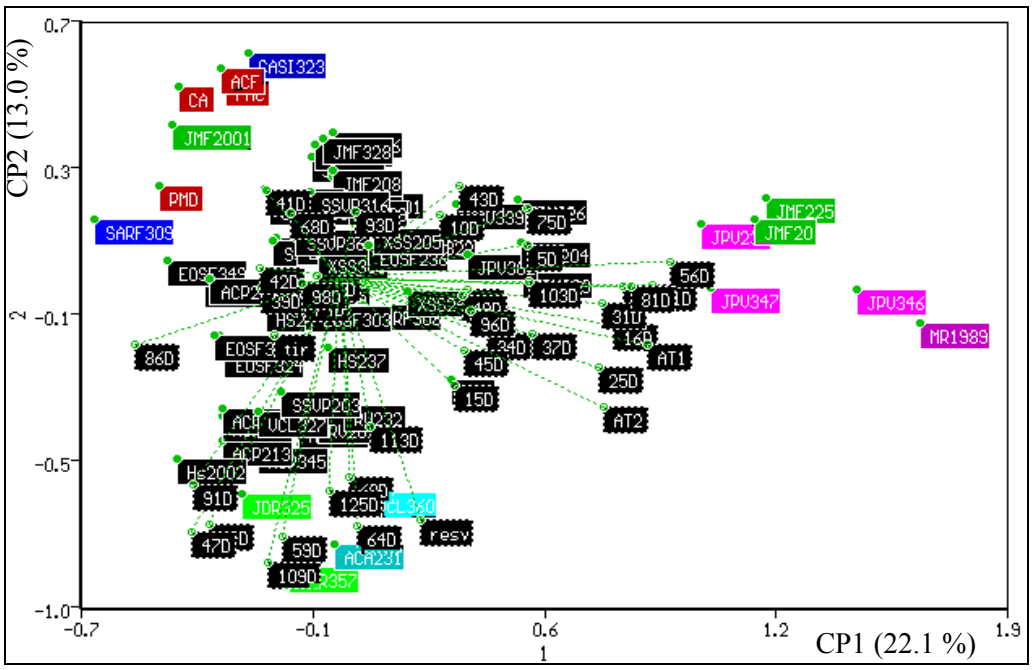


Figura 3.78. Projecção das amostras (n= 70) e variáveis (v= 42) no plano bi-dimensional definido pelas duas primeiras componentes principais

As variáveis **16D** (NI), **21D** (5-HMF), **25D** (ácido protocatechuico e NI), **30D** (ácido *c*-caftárico, furfural e NI), **31D** (NI), **56D** (epicatequina + NI), **81D** (variável em que se considera a quercetina-3-*O*-glucuronido, NI e a quercetina 3-*O*-glucósido), **AT1** e **AT2** contribuem para o afastamento das amostras do grupo A (figura 3.78), sendo os valores correspondentes a estas variáveis mais elevados nestas amostras. Em oposição a estas amostras surge o grupo B (PMD, CA, ACF e FMC) consituído por amostras de vinho Moscatel do Douro e o grupo C (SARF309, JMF2001, CASI323) que apresentam valores mais baixos para estas variáveis. Relativamente às amostras ACA231, JDR325, JPV e VCL360 é possível verificar que a variáveis **59D** (galhato de etilo), **60D** (glucósido do ácido indol-láctico+procianidina), **64D** (procianidina), **109** (cafeato de etilo+NI) **125D** (NI+cumarato de etilo) e **resv** são responsáveis pela sua discriminação.

Para se prosseguir na análise dos resultados e tendo em conta que a maior parte das amostras analisadas se englobavam num grupo central e que a variância total acumulada nas 3 primeiras componentes era muito pequena, decidiu-se aplicar a análise de escalonamento multidimensional não-métrico (NMS). Este tipo de análise utiliza-se para explorar semelhanças ou diferenças entre as amostras. As distâncias entre as amostras na representação gráfica obtida por NMS têm uma relação monotónica com as distâncias existentes no espaço multidimensional original. A análise também foi realizada com o programa NTSYS-pc e as representações tri e bi-dimensional das 70 amostras de vinho Moscatel apresentam-se nas figuras 3.79 e 3.80 respectivamente.

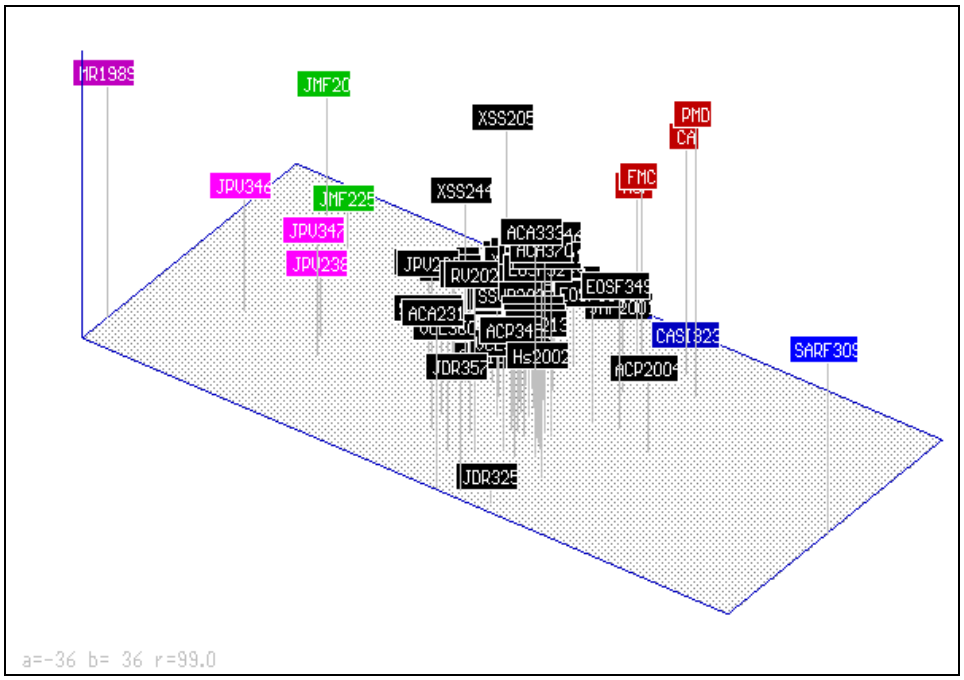


Figura 3.79. Projecção das amostras (n= 70) no espaço tri-dimensional após tratamento dos resultados por NMS

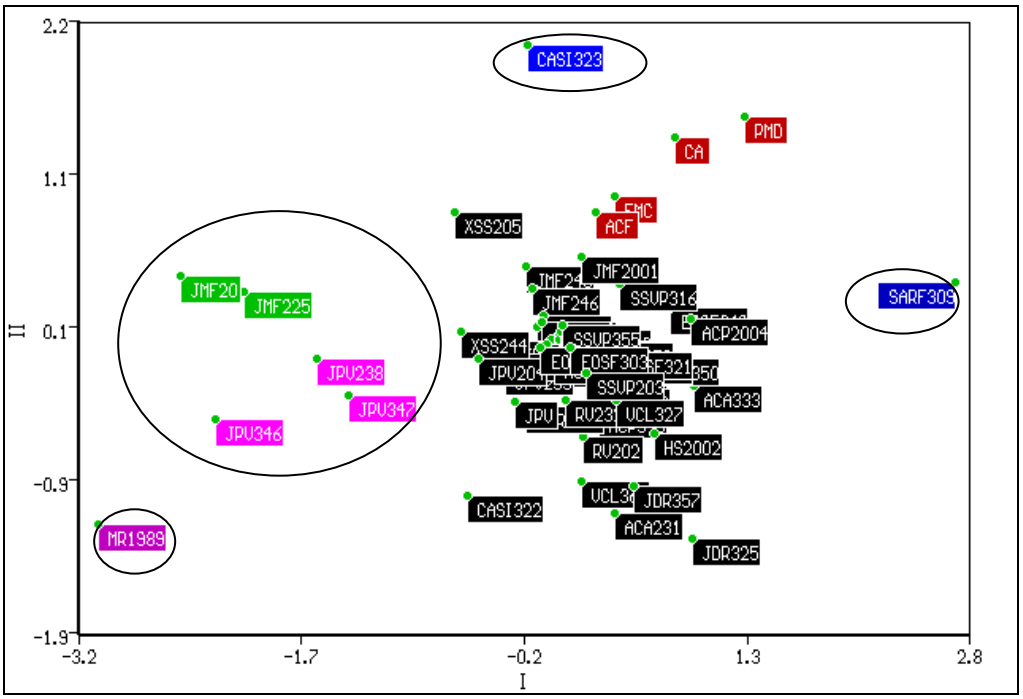


Figura 3.80. Projecção das amostras (n= 70) no espaço bi-dimensional após tratamento dos resultados por NMS

Da comparação dos resultados obtidos pelas duas metodologiasconfirma-se que as amostras pertencentes aos grupos A e B (figura 3.77) são amostras que se distinguem do grupo central na análise por NMS, como se pode ver na figura 3.80. Relativamente ao grupo C a amostra SARF309 pode ser também considerada desviante do grupo central mas as outras 2 (CASI323 e JMF20) aproximaram-se desse grupo, o que permite concluir que para estas amostras era importante a informação associada às restantes componentes para além das 3 primeiras. As amostras do grupo D parecem ter-se aproximado também do grupo central.

A amostra de vinho Moscatel Roxo (MR1989) que é produzida a partir da casta *Moscatel Roxo*, distingue-se das outras amostras analisadas nos dois tipos de tratamento de resultados, tal como seria de esperar, mas outros vinhos Moscatel desviantes aproximam-se desta amostra: JPV346, JPV347, JPV238, JMF225 e JMF20. Para comparação de cromatogramas escolheu-se como referência a amostra (XSS313) que apresenta os valores das variáveis próximos das médias nos resultados originais, o que em termos de variáveis normalizadas significa que tem os valores próximos de zero. Se compararmos os cromatogramas (c.d.o. 280 nm) de todas estas amostras com

o da amostra XSS313 (figura 3.81) que está no centro da representação da análise por PCA, (figura 3.78), verifica-se que os cromatogramas das amostras desviantes são bastante mais complexos, alguns picos estão em concentrações mais elevadas como o **21** (5-HMF), **30** (ácido *c*-caftárico+furfural+NI), **34** (ácido *t*-caftárico+NI), **43** (ácido *t*-cutárico+NI), **59** (galhato de etilo). Estes vinhos já tiveram alguns anos de envelhecimento, nomeadamente 10 anos para a amostra MR1989, 20 anos para as amostras JMF225 e JMF20 e 8 anos para a amostras JPV238, JPV346 e JPV347 o que poderá explicar as diferenças observadas, nomeadamente no que se refere aos teores mínimos e máximos de 5-HMF (2404-2828 mgL^{-1}) e de furfural (14-22 mgL^{-1}) detectados nestas amostras e que são mais elevados comparativamente à amostra XSS313 (5-HMF 1082 mgL^{-1} e furfural 4.5 mgL^{-1}).

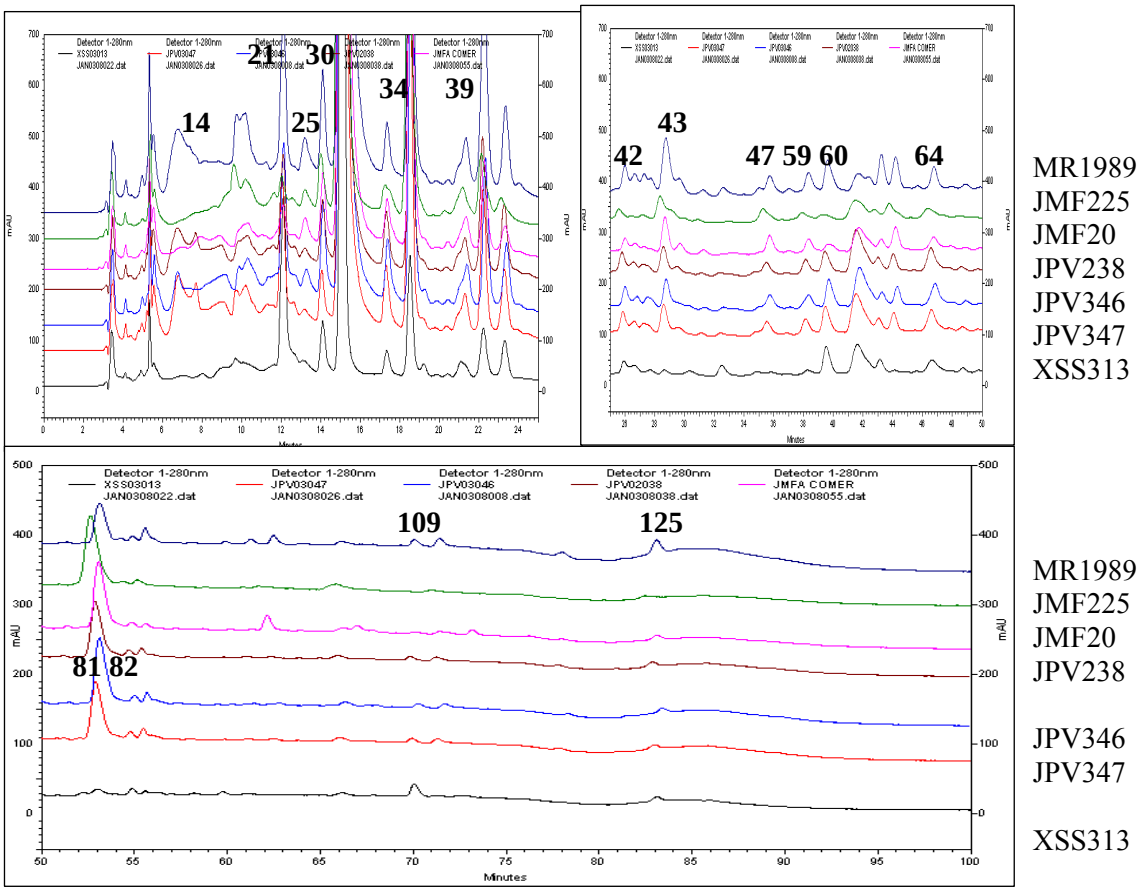


Figura 3.81. Cromatogramas a c.d.o. 280 nm das amostras MR1989, JMF225, JMF20, JPV238, JPV346, JPV347 e XSS313. **Identificação:** consultar tabela CII apêndice C

Também o teor correspondente à quercetina-3-*O*-glucósido e quercetina-3-*O*-glucuronido (81) é menor na amostra XSS313 (0.53 mgL^{-1}) e superior nas amostras desviantes (1.9-4.2 mgL^{-1}). Já relativamente ao ácido protocatechuico, por exemplo, é

detectado na amostra XSS313 com um teor de 4.4 mgL^{-1}, que é inferior ao detectado nas outras amostras (6.6-15.2 mgL^{-1}).

Quanto à amostra SARF309, outra desviante mas que se localiza no extremo oposto ao grupo de amostras referido no parágrafo anterior, comparados os cromatogramas verifica-se que a principal diferença está relacionada com o baixo teor em furfural (5.4 mgL^{-1}) e 5-HMF (466 mgL^{-1}). Para este produtor não houve homogeneidade nas amostras e a amostra SARF308 também do mesmo ano de colheita (1999) foi analisada detectando-se um teor em 5-HMF superior (5-HMF: 1046 mgL^{-1}), enquanto que o do furfural é aproximadamente idêntico (5.3 mgL^{-1}). Como estamos em presença de vinhos que resultam de loteamentos pode haver variabilidade na composição das amostras. O vinho CASI323 apresenta um teor inferior em furfural (2.9 mgL^{-1}) e além deste composto a maioria dos compostos são detectados em pequenas concentrações.

O conjunto de amostras de vinho Moscatel do Douro (CA, FMC, PMD e ACF) também se destaca (figura 3.77) mas na componente 3, o que é devido às variáveis: 41 (ácido *c*-cutárico) *e* 42 (catequina + NI). Da comparação dos perfis cromatográficos verifica-se que estas amostras apresentam teores superior nestes compostos.

Em face dos resultados obtidos optou-se por retirar da matriz de dados as 8 amostras mais desviantes assinaladas na figura 3.78 e que correspondiam aquelas que à partida já sabíamos que deviam apresentar uma composição química diferente por corresponderem a vinhos envelhecidos: MR1989**,** JMF20, JMF225, JPV346, JPV347 e JPV238 e ainda as amostras SARF309 e CASI323. No que se refere às variáveis procedeu-se a algumas alterações nomeadamente subtraíu-se ao valor da área total do cromatograma (AT1 e AT2) a área dos picos associados aos compostos 5-HMF e furfural assim como as variáveis 21D e 30D. A área do pico do ácido *c*-caftárico, que co-elui com o furfural, também não é considerado uma vez que pouco contribui para o valor da área do pico 30. Feita novamente a análise por PCA na figura 3.82 apresenta-se a projecção das 62 amostras de vinho Moscatel no espaço definido pelas três primeiras componentes principais. A variância total acumulada nas três componentes principais é de 40.0 %, contribuindo a componente 1 com 16.5% e a componente 2 com 13.5%, o que significa mais uma vez, que grande parte da variância observada não está representada nestas 3 componentes, perdendo-se por isso informação. Observa-se que as amostras de vinho Moscatel do Douro se afastam das amostras do vinho Moscatel de Setúbal e as variáveis responsáveis são as que já foram atrás referidas.

Além disso as amostras do produtor ACP também se destacam na 3ª componente devido à variável **resv**.

Como a maior parte das amostras pertenciam a um grupo central aplicou-se a análise de escalonamento multidimensional não-métrico (NMS) de forma a explorar mais uma vez as diferenças e semelhanças que existem entre as amostras. Na figura 3.83 apresenta-se a representação tri-dimensional das 62 amostras, que confirma que as amostras do vinho Moscatel do Douro se destacam das restantes amostras. As amostras ACP através desta análise estão englobadas no grupo central, aparecendo outras amostras como desviantes.

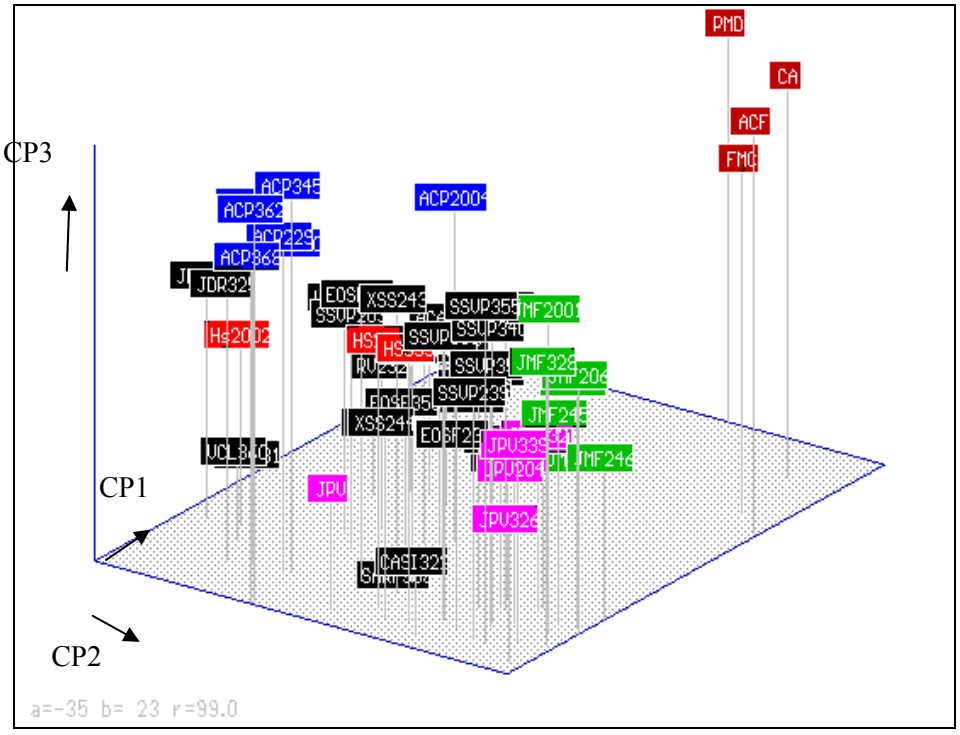


Figura 3.82. Projecção das amostras (n= 62) no espaço tri-dimensional definido pelas três primeiras componentes principais

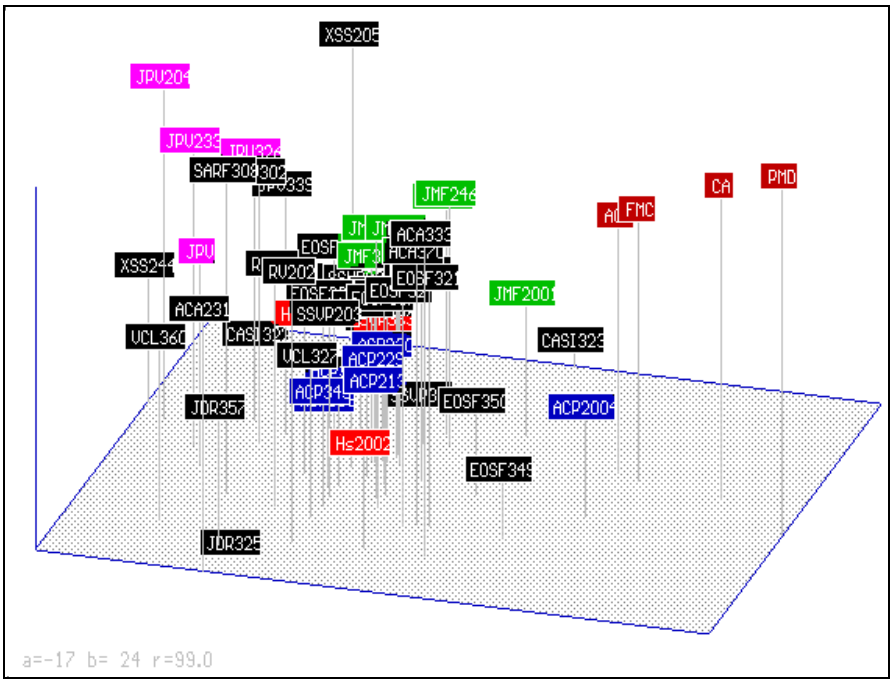


Figura 3.83. Projecção das amostras (n= 62) no espaço tri-dimensional após tratamento dos resultados por NMS

A representação bi-dimensional apresentada na figura 3.84 mostra melhor a dispersão existente entre as várias amostras e observa-se que as amostras XSS205, CASI322 e XSS244 também se destacam.

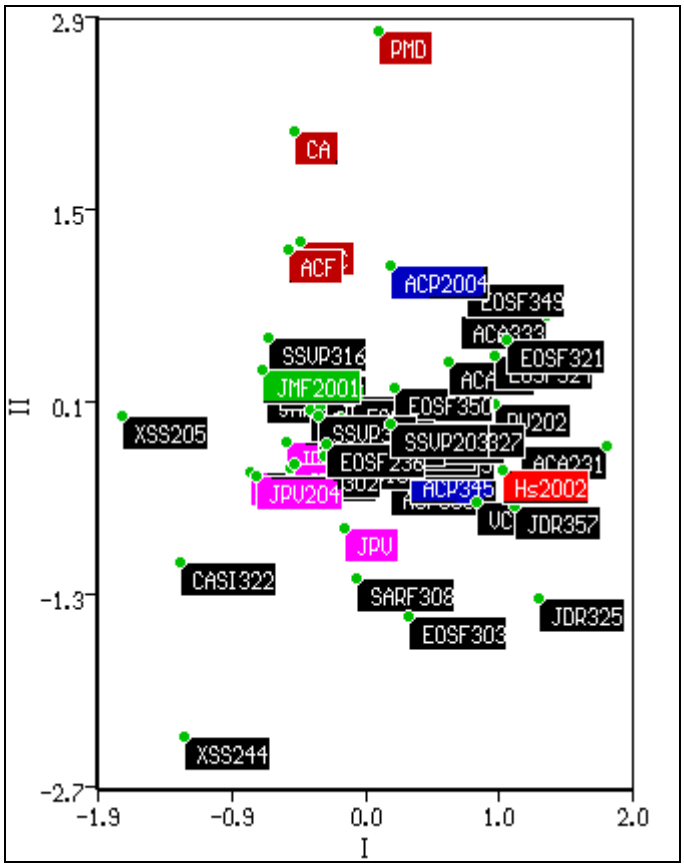


Figura 3.84. Projecção das amostras (n= 62) no espaço bi-dimensional após tratamento dos resultados por NMS

Tendo em conta a projecção das amostras no plano definido pelas 2 primeiras componentes principais (figura 3.85), pode afirmar-se que as amostras de vinho Moscatel do Douro são discriminadas pelas variáveis **31D** (NI), **39D** (procianidina B1), 41D (ácido *c*-cutárico e epigalhocatequina), **42D** (catequina) e ainda **91D** (vários picos) e **10D** (NI), embora a contribuição destas duas últimas seja menos importante. Assim estas amostras são caracterizadas por apresentarem teores elevados destas variáveis. Contrariamente apresentam teores baixos das variáveis **15D** (NI), **43D** (ácido *t*-cutárico e NI), **56D** (epicatequina e NI), **59D** (galhato de etilo), **60D** (glucósido de ácido indol-láctico e procianidina)**, 103D** (NI), **109D** (cafeato de etilo e NI) e **AT1**.

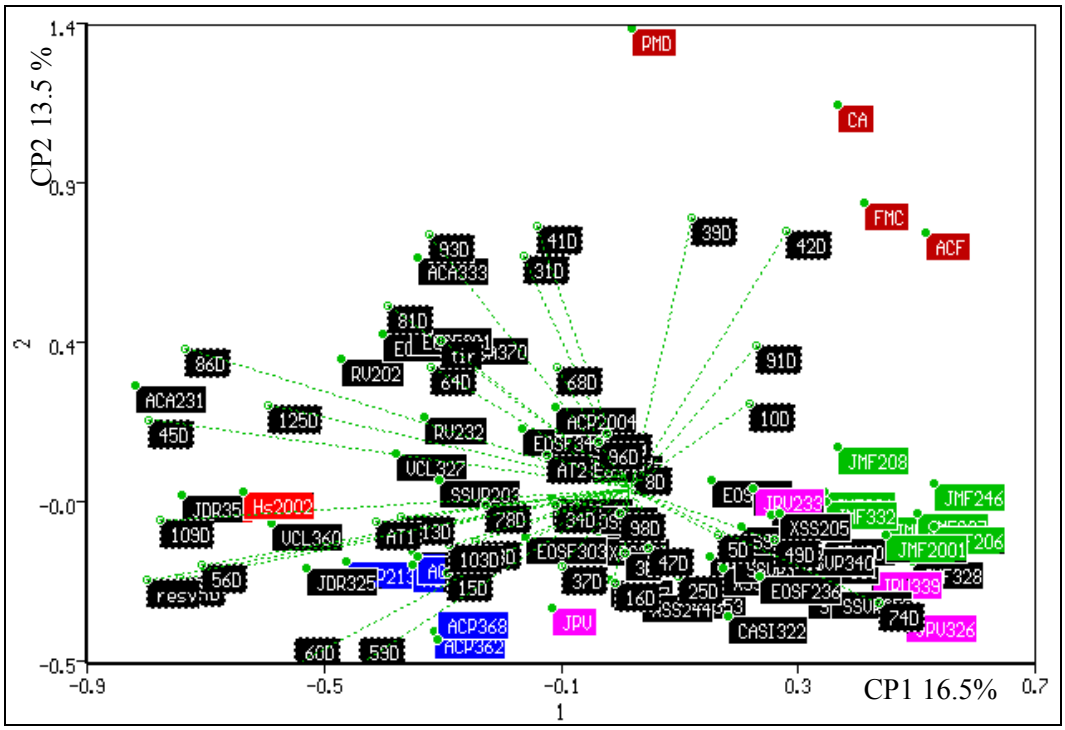


Figura 3.85. Projecção das amostras (n= 62) e variáveis (v= 40) no espaço bi-dimensional definido pelas duas primeiras componentes principais

As amostras do produto ACP aparecem muito próximas umas das outras e são discriminadas pelas variáveis **15D** (NI), **25D** (ácido protocatechuico+NI), **43D** (ácido *t*-cutárico+NI), **103D** (NI), **113D** (NI) e **AT1** nas componentes 1 e 2. Como já se referiu anteriormente na 3ª componente destaca-se a variável **resv**. Relativamente a este resultado não é possível fazer grandes comentários dado a maioria dos compostos não estar identificada, no entanto pode adiantar-se que os espectros de absorção dos compostos **15** ($\lambda_{máx}$=268 nm) e **103** ($\lambda_{máx}$=276 nm) indicam que podem ser compostos da família dos ácidos benzóicos ou do flavan-3-ol (*ver tabela 3.1*). O espectro de absorção do composto **105** apresenta 2 bandas de absorção (banda II-280 nm, banda I-320 nm) o que pode indicar que pertence à família das flavanonas (*ver tabela 3.1*). São compostos que estão presentes em baixa concentração e que não apresentam provável importância biológica por não originar sinal no detector electroquímico, no entanto não nos podemos esquecer da baixa sensibilidade deste detector.

Para o conjunto de amostras estudado verificou-se que uma correlação muito elevada (R=0.9300) entre os valores correspondentes aos teores de catequina e procianidinanas, o mesmo aconteceu com o pico 14D (ácido gálhico e dímero do ácido gálhico) e 59D (galhato de etilo) (R= 0.8796) e o pico 47D (ácido cafeico e procianidina B2) e o 109D (cafeato de etilo e NI) (R=0.8532). Estas correlações elevadas eram expectáveis dado

que nas amostras se vai formar tanto mais galhato quanto maior for o teor de ácido gálhico e o mesmo vai acontecer com o cafeato de etilo que também se forma em maior quantidade se na amostra estiver presente maior quantidade de ácido cafeico.

Relativamente às amostras discriminadas na análise por NMS (XSS205, CASI322 e XSS244) compararam-se os cromatogramas a c.d.o. 280 nm destas amostras com o da amostra HS209 (figura 3.86) que está no centro da representação da análise por PCA (figura 3.85). Compararam-se também duas amostras representativas do grupo de vinho Moscatel do Douro: PMD e CA.

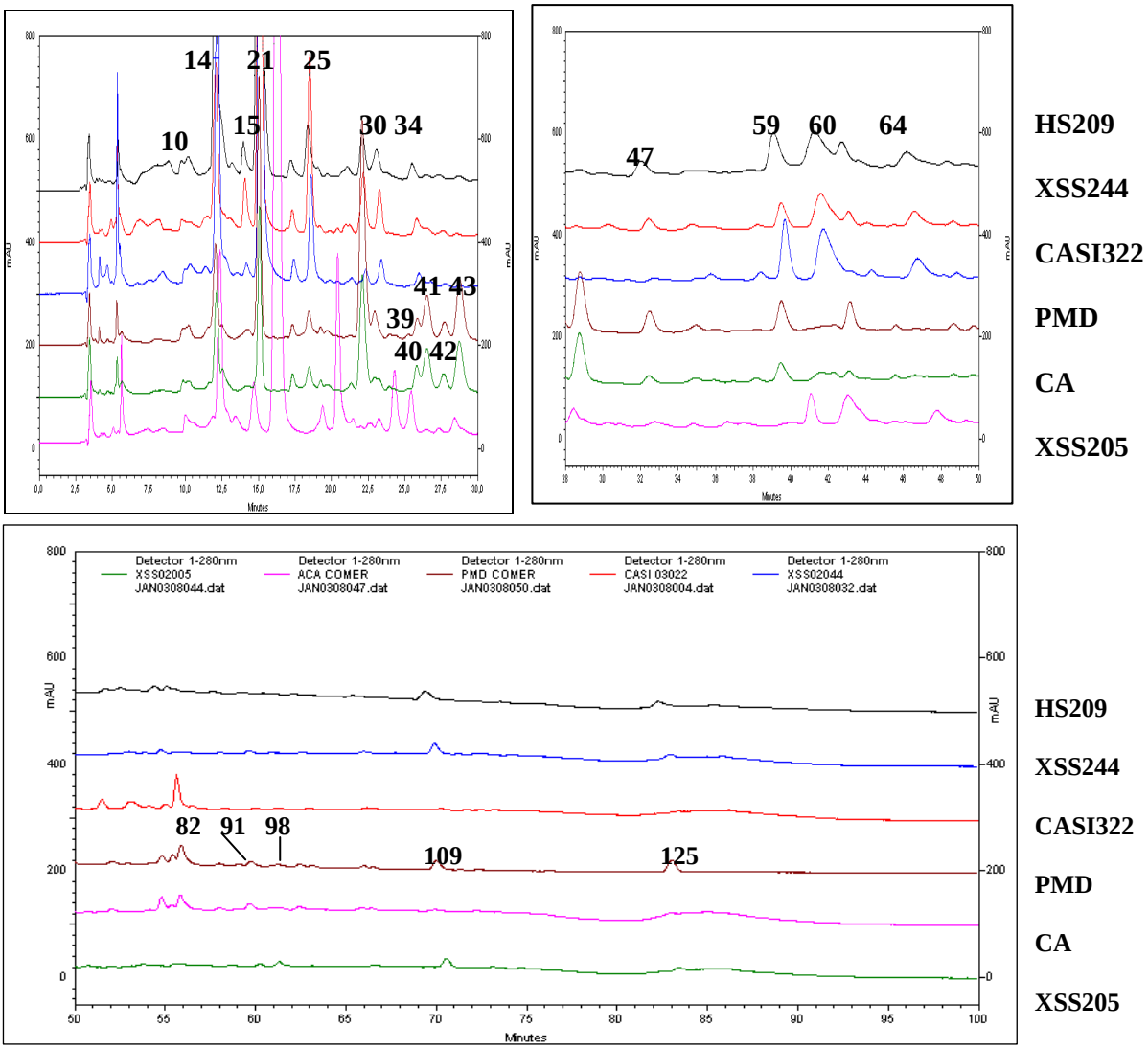


Figura 3.86. Cromatogramas a c.d.o. 280 nm das amostras HS209, XSS244, CASI322, PMD, CA e XSS205. **Identificação:** consultar tabela CI e CII apêndice C

Em face dos resultados obtidos optou-se por retirar da matriz de dados as 4 amostras de vinho Moscatel do Douro e efectuou-se novamente a análise por PCA para tentar perceber de que forma as amostras de vinho Moscatel dos restantes produtores se

distribuem. Na figura 3.87 apresenta-se a projecção das 58 amostras no espaço a três dimensões definido pelas três primeiras componentes principais.

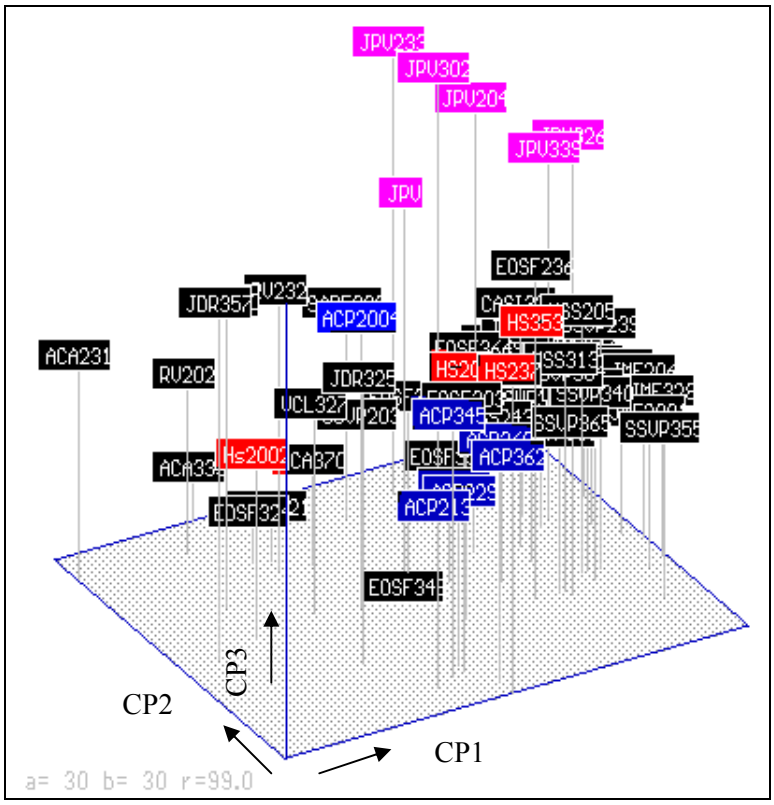


Figura 3.87. Projecção das amostras (n= 58) no espaço a tri-dimensional definido pelas três primeiras componentes principais

Para a matriz de dados analisados a variância acumulada até à 3ª componente principal foi de 40.0 %, sendo atingida na 10ª componente principal 76.7%. Observa-se que as amostras JPV se destacam na 3ª componente principal pelas variáveis **16D** (NI), **42D** (catequina+NI), **49D** (ácido *t*-fertárico+procianidina), **74D** (NI) e **98D** (procianidina+NI). A amostra ACA231 destaca-se na 2ª componente principal pelas variáveis **31D** (NI) e **39D** (procianidina). A aplicação da análise por escalonamento multidimensional não-métrico (NMS) ao conjunto de amostras mostra, como se pode observar na figura 3.88, que as amostras do JPV não se distanciam tanto do grupo central e outras como, por exemplo, as amostras CASI322, XSS205, XSS244, SARF308, EOSF23 e JDR325 destacam-se como já tinha sido observado na figura 3.84.

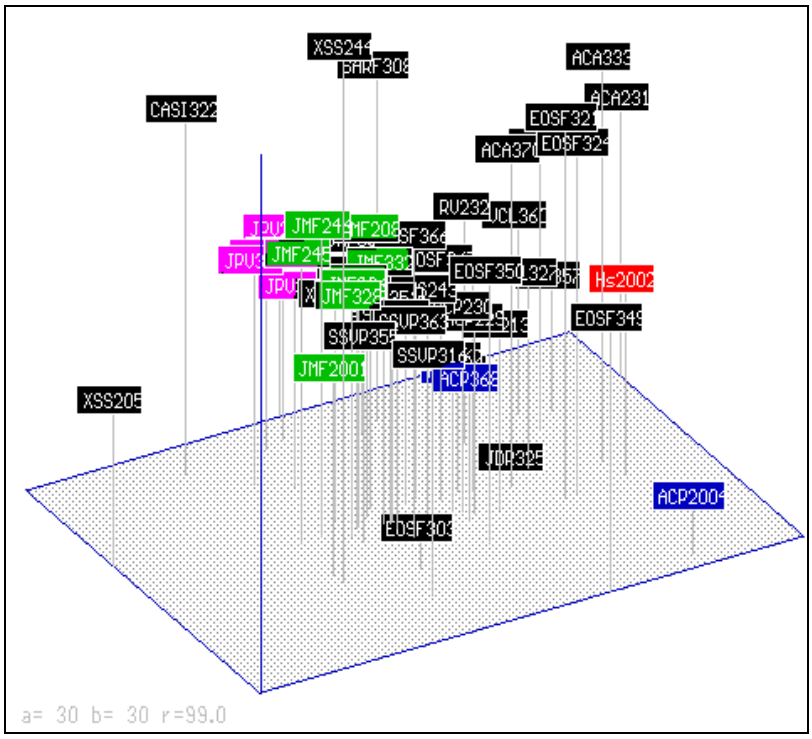


Figura 3.88. Projecção das amostras (n= 58) no espaço tri-dimensional após tratamento dos resultados por NMS

Da análise dos vários resultados pode concluir-se que:

- A amostra de vinho Moscatel Roxo aproxima-se das amostras de vinho Moscatel de Setúbal envelhecido (JPV346, JPV347, JPV238, JMF225 e JMF20) e a discriminação destas amostras deve-se fundamentalmente às variáveis **16D** (NI), **21D** (5-HMF), **25D** (ácido protocatechuico+NI), **30D** (ácido *c*-caftárico+furfural+NI), **31D** (NI), **56D** (epicatequina+NI) e **81D** (quercetina-3-*O*-glucósido+quercetina-3-*O*-glucuronido + NI), por estarem associadas a compostos que estão presentes em maior concentração;
- As amostras de vinho Moscatel do Douro distinguem-se pelas variáveis 41D (ácido *c*-cutárico e epigalhocatequina) e 43D (ácido *t*-cutárico e NI) corresponderem a compostos que estão presentes em maior quantidade;
- No que se refere às amostras de vinho Moscatel de Setúbal é possível observar que as amostras JPV se aproximam das amostras JMF, o que poderá indicar que os seus processos de vinificação se assemelham e permitem a obtenção de vinhos de composição química semelhante. As amostras ACP destacam-se por apresentarem teores mais elevados nos compostos associados

às variáveis **15D** (NI), **43D** (ácido *t*-cutárico e NI), **56D** (epicatequina e NI), **59D** (galhato de etilo), **60D** (glucósido de ácido indol-láctico e procianidina)**,** **103D** (NI) e **109D** (cafeato de etilo e NI)**;**

- As amostras de vinho Moscatel de Setúbal ACA370, ACA333, ACA231, EOSF324, EOSF321 e RV202 estão próximas umas das outras mas distanciam-se das restantes por apresentarem teores superiores nos compostos correspondentes às variáveis **64D** (procianidina), **81D** (quercetina-3-*O*-glucósido+quercetina-3-*O*-glucuronido + NI) e **93D** (isoramnetina-3-*O*-glucósido+NI). As amostras CASI322, CASI323, SARF309, XSS205 e XSS244 são amostras que se destacam por apresentarem composição química diferente.

Para complementar esta parte do trabalho foram analisados os resultados referentes às amostras em estudo relativamente a algumas das variáveis que mostraram ser mais importantes na discriminação dos diferentes tipos de vinho Moscatel estudados, nomeadamente: 5-HMF (**21D**), furfural (**30D**), catequina (**42D**), ácidos *c*-cutárico (**41D**), *t*-cutárico (**43D**), ácido gálhico (**14D**), ácido protocatechuico (**25D**), tirosol (**Tir**), derivados da quercetina (quercetina-3-*O*-glucósido e quercetina-3-*O*-glucuronido), resveratrol (**Resv**) e ésteres etílicos (galhato de etilo, cafeato de etilo e cumarato de etilo).

*5-HMF (**21**) e furfural (**30**)*

Na figura 3.89 apresenta-se o gráfico que pretende mostrar a variabilidade do teor em 5-HMF em todas as amostras de vinho Moscatel analisadas. Neste gráfico cada produtor está representado por uma cor diferente e as amostras foram agrupadas por produtor e por ordem decrescente de quantidade do composto.

Os resultados obtidos mostram que os teores mais baixos em 5-HMF correspondem às amostras dos produtores ACF, FMC, PMD e CA que correspondem a amostras de vinho Moscatel do Douro e o mais elevado à amostra MR1989 que corresponde ao vinho Moscatel Roxo. Para algumas amostras cuja amostragem foi maior como as JPV (n=9) e as JMF (n=11) os teores de 5-HMF são também mais elevados porque correspondem, algumas delas, a vinhos envelhecidos. De facto, a presença destes compostos pode ser atribuída a degradação de açúcares (hexoses e pentoses) durante o processo de vinificação, envelhecimento e armazenamento, açúcares que estão

presentes em teores elevados neste tipo de vinho. Outra fonte possível será a sua extracção a partir da madeira em que os vinhos são envelhecidos. A composição química da madeira inclui, além de outras substâncias, linhanos e polissacáridos, como a celulose e a hemicelulose. Quando um casco de madeira é construído, a parte interna do casco é sujeita a diferentes níveis de queima e deste tratamento resulta a redução parcial da celulose a 5-HMF e furfural. O vinho ao estagiar nos cascos vai extrair estes compostos, que são normalmente considerados marcadores do envelhecimento de vinhos

Para alguns produtores em que foi analisado um número reduzido de amostras verifica-se que houve uma grande variabilidade de resposta. Essa variabilidade pode ser explicada pelos diferentes anos de colheita dos vinhos analisados (*ver tabela AI*). As amostras do produtor ACA são de anos diferentes (1998 e 1999), enquanto que as amostras do produtor CASI são do mesmo ano (1998). Relativamente ao produtor SARF, e apesar das duas amostras serem do mesmo ano (1999) detectaram-se diferentes teores em 5-HMF: 1046 mgL^{-1} (SARF308) e 466 mgL^{-1} (SARF309). A grande variabilidade apresentada nas amostras do produtor JMF está relacionada com os diferentes anos de colheita das amostras analisadas (1980, 1982, 1999 e 2001), assim como as diferenças observadas entre as amostras do produtor HS (2000, 2001 e 2002).

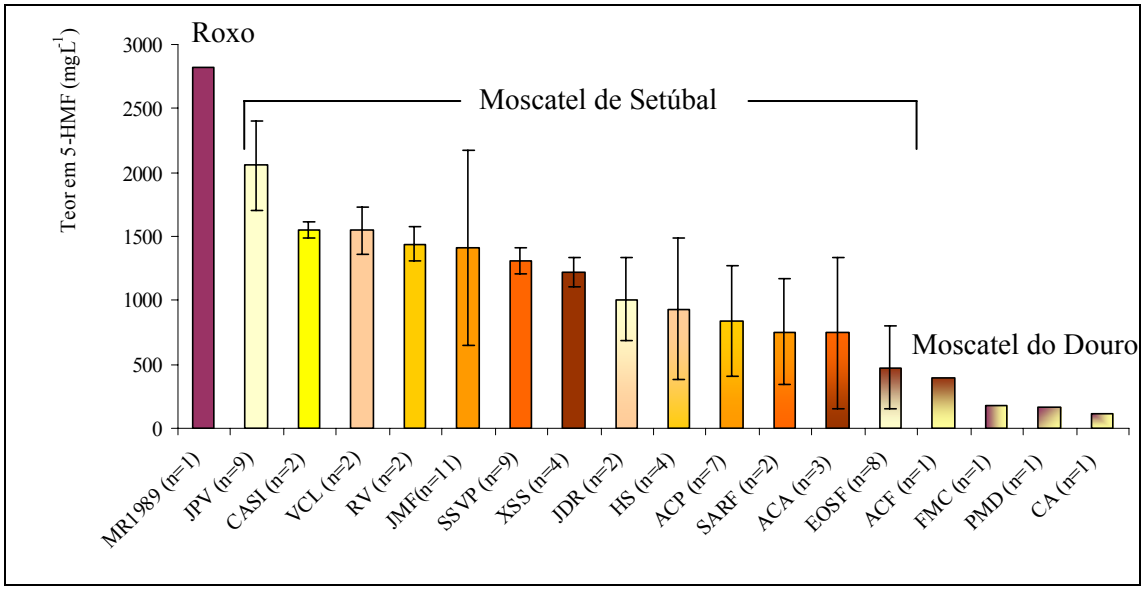


Figura 3.89. Teor em 5-HMF nas amostras de vinho Moscatel analisadas (n=70)

Relativamente ao teor em furfural também se calculou o teor médio para cada produtor e o correspondente desvio padrão e na figura 3.90 apresenta-se o gráfico correspondente. É de salientar que relativamente a este pico há co-eluição com outros (ácido c-caftárico e pico NI).

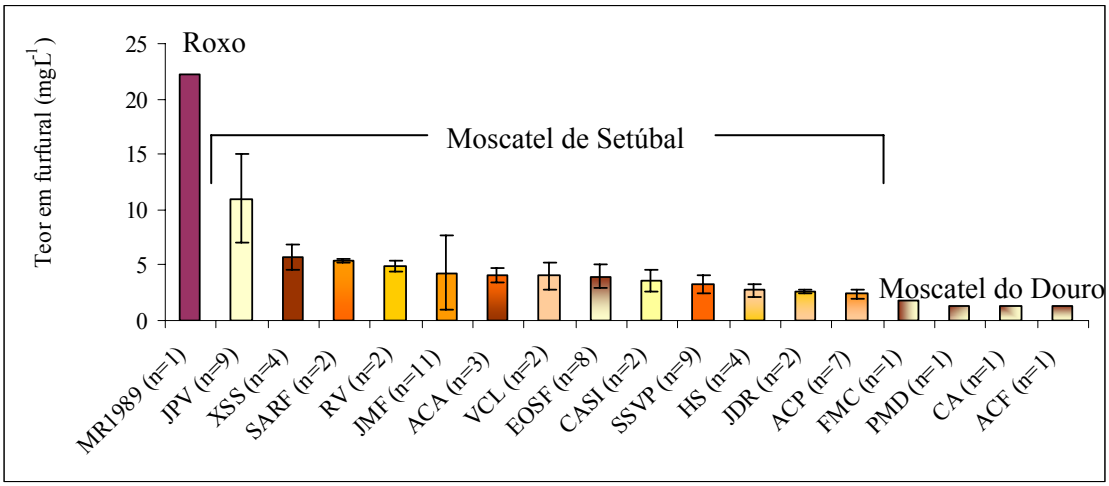


Figura 3.90. Teor em furfural nas amostras de vinho Moscatel analisadas (n=70)

Os teores médios em 5-HMF e furfural são superiores no vinho Moscatel de Setúbal (1176 e 4.5 mgL^{-1}) relativamente ao vinho Moscatel do Douro (215 e 1.5 mgL^{-1}), mas tal facto poderá ser atribuído aos anos de envelhecimento a que as amostras foram sujeitas e além disso é importante relembrar que o número de amostras de vinho do Douro era muito reduzido comparativamente às amostras de Moscatel de Setúbal.

A amostra MR1989 é cerca de 17 vezes mais concentrada do que a amostra ACF e o desvio padrão relativo mais baixo observado foi 2% para as amostras do produtor SARF e 76 % para as amostras do produtor JMF, explicando-se os valores obtidos, tal como para o 5-HMF, pelos diferentes anos de colheita dos vinhos analisados para cada produtor (*ver tabela AI)*. Tempos de envelhecimento diferentes originam amostras com teores diferentes, assim cerca de 10 anos de envelhecimento da amostra MR1989 corresponde a 22.3 mgL^{-1} e 2 anos de envelhecimento da amostra JDR corresponde a 2.7 mgL^{-1}.Na figura 3.91 comparam-se os teores obtidos para o 5-HMF e furfural para vinhos Moscatel de vários anos de colheita.

Da análise do gráfico verifica-se que tempos de envelhecimento diferentes originam amostras com teores diferentes em 5-HMF e furfural: cerca de 10 anos para a amostra MR1989 (2828 e 22.3 mgL^{-1}) e de 2 anos para a amostra HS (287 e 2.0 mgL^{-1}). A amostra JMF225 não apresenta data de colheita mas é uma amostra que estagiou em

cascos de madeira durante um período de 20 anos e assim se justifica a posição que ocupa no gráfico. As outras amostras sem data de colheita são amostras de vinho Moscatel do Douro e também as amostras RV232 e JP (*ver tabela AI, apêndice A)* mas que pela análise dos resultados apresentados no gráfico verificou-se que tiveram um período mais curto de envelhecimento.

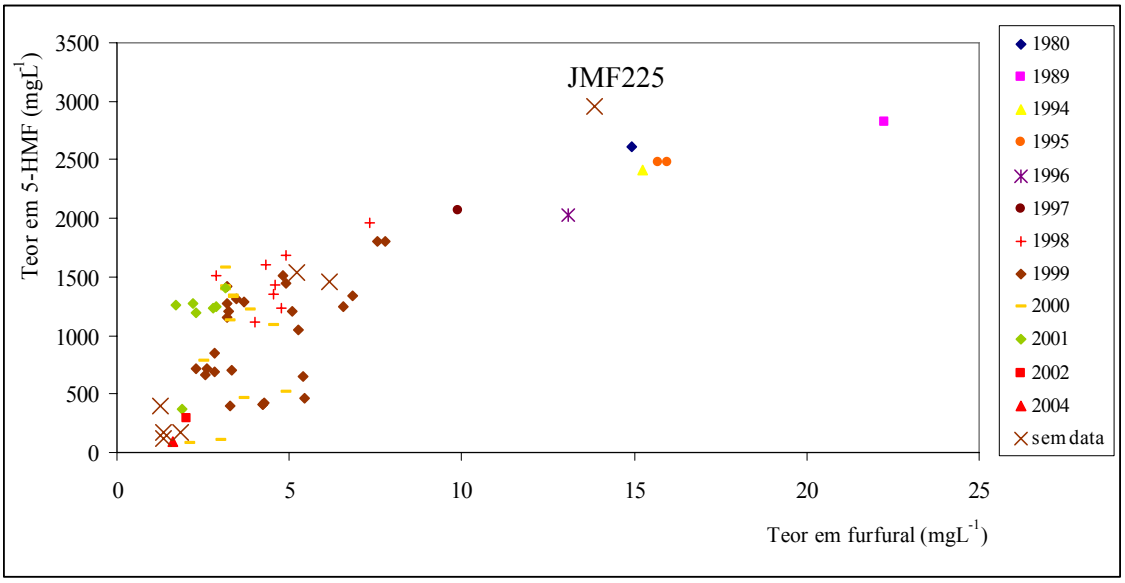


Figura 3.91. Comparação dos teores em 5-HMF e furfural para amostras de vinho Moscatel de diferentes anos de colheita

A análise dos resultados mostra que os vinhos com maior tempo de envelhecimento apresentam teores superiores em 5-HMF e furfural: Moscatel Roxo (1989), JMF20 (1980), JPV346 e 347 (1995), JPV238 (1994). As amostras de vinho Moscatel do Douro são as que apresentam um teor inferior nestes compostos.

*Catequina + NI (**42**)*

Verificou-se, por LC-MS, que a variável 42 corresponde a 2 compostos (*ver tabela CI e CII*), um deles é a catequina e o outro não está identificado mas apresenta MM de 428. O espectro de absorção deste pico apresenta um máximo aos 272 nm e um "ombro" aos 290 nm. Quando se está a quantificar para o c.d.o. de 280 nm, os valores obtidos correspondem assim aos 2 compostos que co-eluem. Na figura 3.92 comparam-se as várias amostras de vinho Moscatel por produtor analisadas considerando que todo o pico corresponde a catequina.

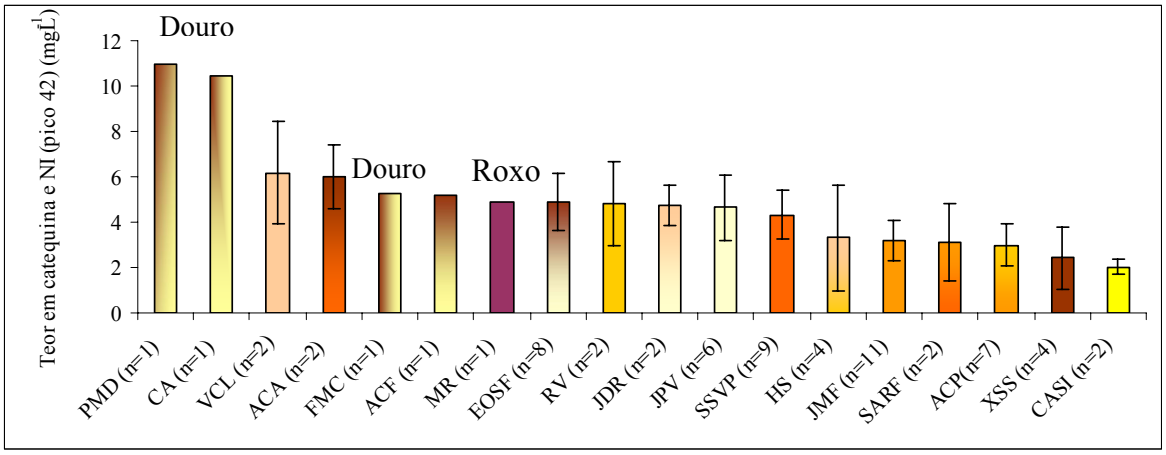


Figura 3.92. Teor em catequina e NI (pico 42) nas amostras de vinho Moscatel analisadas (n=70)

Tendo em conta os diferentes tipos de vinho analisados, as amostras de vinho Moscatel do Douro são as que apresentam teores para este pico mais elevados, PMD (11 mgL^{-1}) e CA (10.4 mgL^{-1}) relativamente aos vinhos da região de Setúbal em que o teor mais baixo foi detectado na a amostra CASI (2.0 mgL^{-1}). O teor médio para as amostras de vinho Moscatel de Setúbal é de 4.1 mgL^{-1}, inferior aos detectados em vinhos tintos (31.01 mgL^{-1}) e em vinhos brancos (17.25-29.53). Os baixos teores detectados para as amostras JPV e JMF podem estar mais uma vez relacionados com o facto de se tratarem de amostras sujeitas a processos de envelhecimento em que podem ocorrer reacções químicas em que este composto esteja envolvido, nomeadamente de oxidação, formando-se outros produtos. Em vinhos brancos também podem ocorrer reacções químicas entre a catequina e o ácido glioxílico (formado por oxidação do ácido tartárico) originando compostos incolores ou de cor amarela que apresentam máximos de absorção entre 440 e 460 nm e diminuindo assim a concentração de catequina nas amostras[26].

*Ácidos c-cutárico (**41**) e t-cutárico (**43**)*

Quando se analisou os perfis cromatográficos das amostras de vinho Moscatel a 280 nm verificou-se que os picos detectados para os t_r de aproximadamente 26.5 min (ácido *c-cutárico* pico **41**) e de 28.7 min (ácido *t*-cutárico pico **43**) apresentavam áreas superiores para algumas amostras, principalmente as amostras de vinho Moscatel do Douro e as duas variáveis eram correlacionáveis (R^2=0.9756), como se pode observar na figura 3.93.

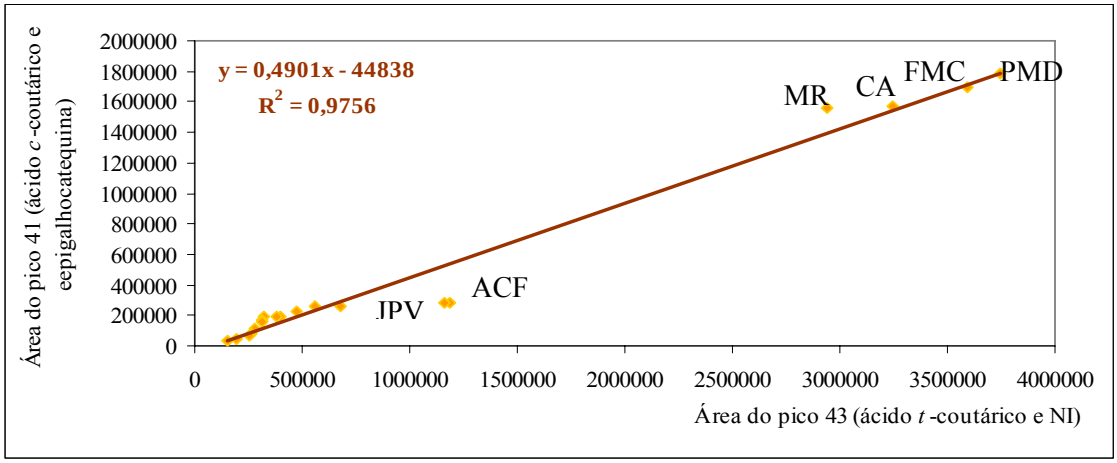


Figura 3.93. Comparação das médias das áreas dos picos 41 (ácido *c*-cutárico) e 43 (ácido *t*-cutárico) para os vinhos analisados dos diferentes produtores (n=70)

As amostras que apresentam maiores teores nos ácidos *t* e *c*-cutárico são algumas amostras do vinho Moscatel do Douro (CA, PMD, FMC) e também a amostra MR (Moscatel Roxo). Das amostras de vinho Moscatel de Setúbal as JPV são as que apresentam teores mais elevados e comparáveis à amostra ACF do Douro. Estes compostos são detectados na pele e na polpa da uva e os seus teores diminuem com o amadurecimento[205]. O processo de vinificação também condiciona o teor destes ácidos no vinho pois precipitações tartáricas que possam ocorrer durante o processo, diminuem o seu teor[205]

É de realçar que a presença destes ácidos é de fundamental importância nos vinhos, pois a sua oxidação química a *o*-quinonas e a sua reacção com a glutationa originam compostos que diminuem a actividade da polifenoloxidase e impedem desta forma que o acastanhamento oxidativo do vinho prossiga, estando estas amostras menos sujeitas ao escurecimento oxidativo[206,207].

*Outros compostos: ácido gálhico (**14**), ácido protocatechuico (**25**), tirosol (**tir**)*

Outros compostos importantes presentes nas 70 amostras comercias foram quantificados nomeadamente o ácido gálhico, o ácido protocatechuico, o tirosol.

A figura 3.94 mostra que os teores médios em ácido gálhico nas amostras estudadas variam entre 3 e 44 mgL^{-1}.

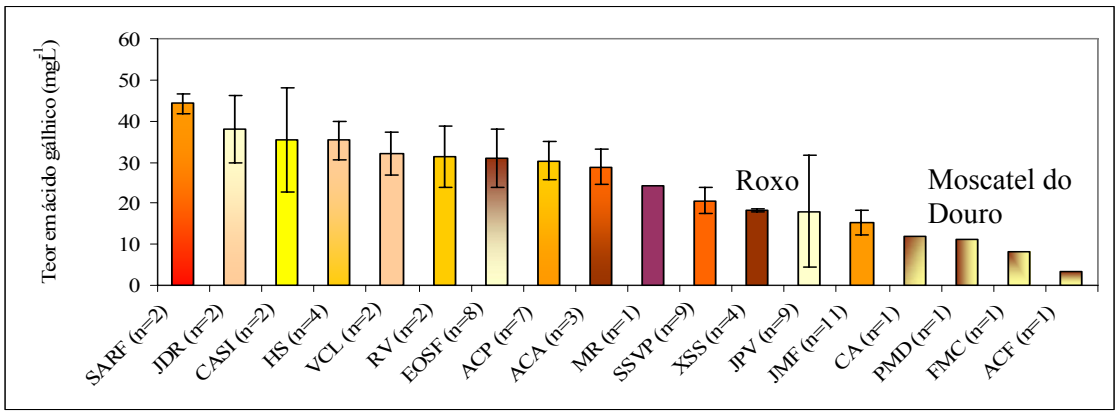


Figura 3.94. Teor de ácido gálhico nas amostras de vinho Moscatel analisadas (n=70)

As amostras do Moscatel do Douro (ACF, CA, FMC e PMD) apresentam um teor médio em ácido gálhico de 8.6 mgL^{-1}, enquanto que nas amostras de vinho Moscatel de Setúbal analisadas é detectado um teor de 29.2 mgL^{-1}. Para alguns produtores as variações observadas nas amostras analisadas são importantes como por exemplo para o produtor JPV com um desvio padrão relativo de 75%, que são explicadas pelos diferentes anos de colheita. Os valores detectados são concordantes com a concentração determinada para vinhos do Porto[66] (12.1-30.5 mgL^{-1}), no entanto os valores são superiores aos detectados no vinho sherry[68,69] (nd-10.7 mgL^{-1}) e ligeiramente superior ao teor encontrado no vinho branco[71] (20.05 mgL^{-1}) (*ver tabela 1.3)*.

O ácido protocatechuico encontra-se no vinho numa concentração inferior à do ácido gálhico e na figura 3.95 apresentam-se os teores médios encontrados para as amostras dos vários produtores, valor que variou entre 3 e 15 mgL^{-1}.

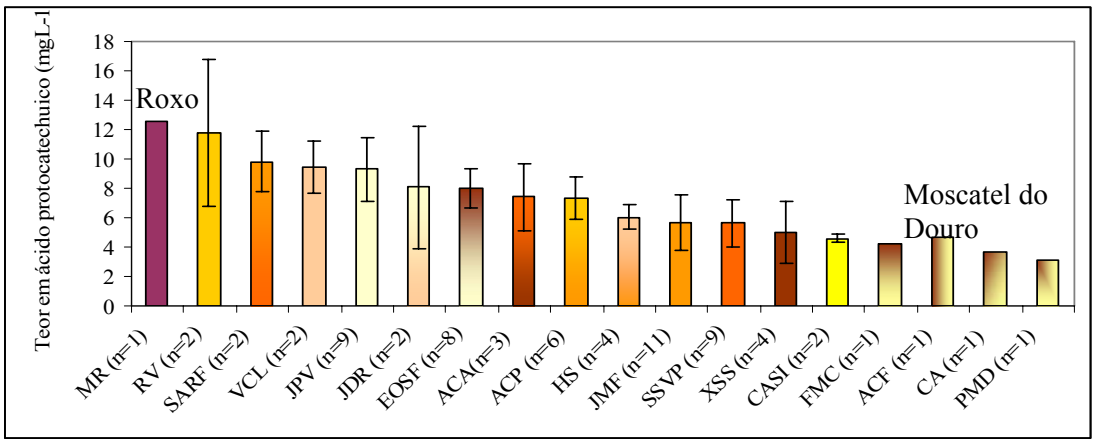


Figura 3.95. Teor de ácido protocatechuico nas amostras de vinho Moscatel analisadas (n=70)

As amostras de vinho Moscatel de Setúbal apresentam um teor médio de 7.2 mgL^{-1} e as amostras de vinho de Moscatel de Douro um teor de 3.9 mgL^{-1} Estes valores são inferiores ao detectado no vinho do Porto[66] (*ver tabela 1.3*), mas superior ao do vinho branco[71] (1.67 mgL^{-1}). A variabilidade (desvio padrão relativo de 51%) nas amostras do produtor JDR é elevada. Esta variação pode ser justificada por serem amostras de diferentes anos de colheita (2000 e 2001) e também de diferentes origens. Este produtor apenas engarrafa o vinho que adquire a várias empresas. Segundo dados da bibliografia[57] os teores de ácido gálhico e ácido protocatechuico nas uvas (grainhas) são semelhantes, no entanto nos vinhos, as concentrações de ácido gálhico são superiores às detectadas em ácido protocatechuico, o que está de acordo com os resultados obtidos nas amostras estudadas. Estes compostos originam sinal no detector electroquímico.

Relativamente ao teor em tirosol (**tir**), figura 3.96, verifica-se que nas amostras dos produtores SARF, ACA e RV são detectados teores superiores em tirosol (4.2-7.0 mgL^{-1}) e as do produtor JDR apresentaram um teor baixo (0.24 mgL^{-1}). A variabilidade detectada nas amostras de vinhos do produtor SSVP, pode ser explicada pelos diferentes anos de colheita das amostras analisadas (1998-2001).

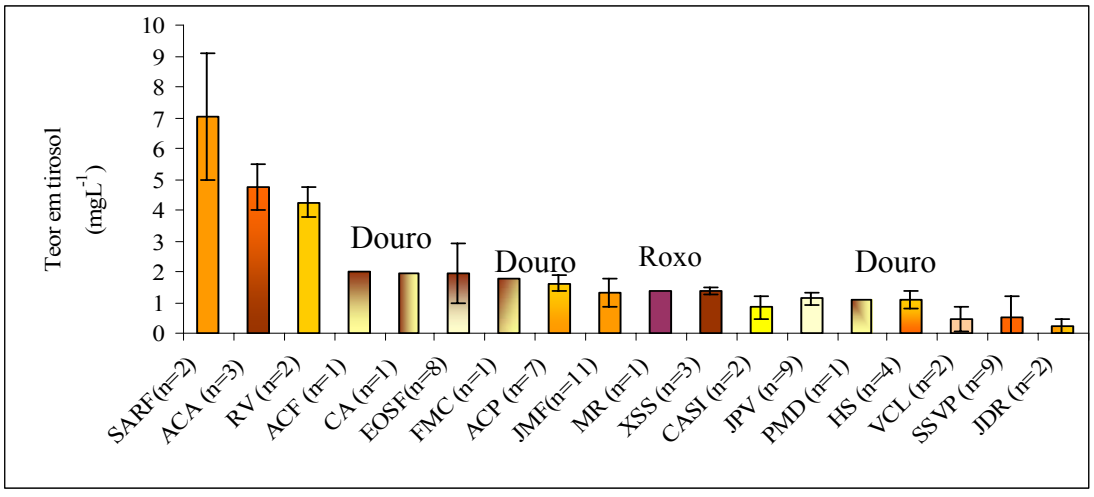


Figura 3.96. Teor de tirosol nas amostras de vinho Moscatel analisadas (n=70)

O teor de tirosol detectado nestas amostras (0.24-7.0 mgL^{-1}) é inferior ao teor descrito para vinhos brancos (20-30 mgL^{-1})[76,77] mas concordante com o detectado em vinhos sherry[68,69] (nd-45.6 mgL^{-1}). Nas amostras de vinho analisadas relativamente a este composto não se diferencia o vinho Moscatel de Setúbal do vinho Moscatel do

Douro. Dados bibiográficos[68,207] referem o tirosol como um composto com actividade biológica, sendo vantajosa a sua presença nas amostras em concentrações elevadas.

Ésteres etílicos dos ácidos

A quantificação de ésteres etilícos apenas foi efectuada em algumas amostras comerciais (JMF, ACP e HS) (*ver 3.3.4. e 3.3.5.)* e verificou-se que as amostras do produtor JMF apresentaram teores inferiores nestes compostos: 1.12-4.13 mgL^{-1} para o galhato de etilo (**59**); 0.17-0.45 mgL^{-1} para o cafeato de etilo (**109**) e 0.29-0.69 mgL^{-1} para o cumarato de etilo.

Relativamente às outras amostras de vinho Moscatel de Setúbal e do Douro calculou-se o valor médio das áreas dos picos **59** e **109** detectados nas amostras para cada produtor e os resultados apresentam-se na figura 3.97.

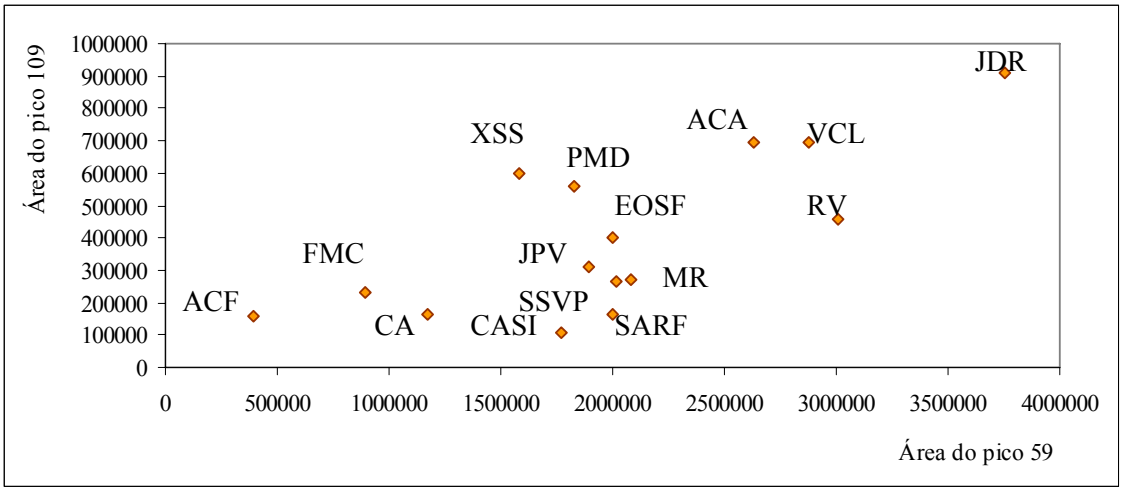


Figura 3.97. Comparação das áreas dos picos (c.d.o. 280 nm) 59 (galhato de etilo) e 109 (cafeato de etilo+NI) nas amostras de vinho Moscatel

Estabeleceu-se a relação entre as áreas dos picos 59 (galhato de etilo) com o 109 (cafeato de etilo+NI), apesar de existir um composto a co-eluir com o cafeato de etilo verifica-se da análise da figura 3.97 que as amostras JDR, VCL, ACA e RV em que são detectados teores elevados em galhato de etilo apresentam também concentrações superiores em cafeato de etilo. Nas amostras de vinho Moscatel do Douro analisadas (ACF, FMC e CA) estes compostos são detectados em quantidades inferiores, o que pelo menos para o galhato de eilo está de acordo com os baixos teores também detectados para o ácido gálhico (figura 3.94). A adição de aguardente (etanol) ao processo de vinificação faz com que o ácido gálhico e cafeico se transformem através de uma reacção de esterificação em galhato e cafeato de etilo. Amostras que

apresentem concentrações elevadas nos ácidos gálhico e cafeico originam maiores quantidades nos ésteres etilícos. As amostras dos produtores ACP (1.14 mgL^{-1}) e HS (1.47 mgL^{-1}) apresentam valores médios em ácido gálhico superiores ao valor detectado para as amostras do produtor JMF (0.87 mgL^{-1}). Quanto maior for o tempo de envelhecimento menor é a concentração em ácido gálhico e as amostras JMF225 e JMF20 apresentam teores de 3.2 e 3.3 mgL^{-1} respectivamente (valores obtidos com o detector electroquímico).

Da análise dos resultados conclui-se que:

- o vinho Moscatel do Douro apresenta os menores teores em galhato e cafeato de etilo;
- o vinho Moscatel Roxo não se distingue das amostras de vinho Moscatel de Setúbal;
- entre as várias amostras de vinho Moscatel de Setúbal analisadas existem diferenças relativamente aos teores destes ésteres: nas amostras do produtor JDR é detectado o teor mais elevada e nas amostras do produtor CASI o valor mais baixo.

3.3.2. Vinhos comerciais: contribuição para o estudo da actividade antioxidante

As mesmas amostras de vinhos Moscatel comerciais (regiões Setúbal e Douro), foram estudadas com o objectivo de comparar a sua composição química com os resultados obtidos em testes de actividade antioxidante. Pretendia-se desta forma tentar avaliar a funcionalidade biológica destas amostras e quais os compostos presentes nas amostras que podiam estar relacionados com essa função.

O conjunto de dados obtidos na análise das amostras por cromatografia líquida foi utilizado, nomeadamente a área dos picos correspondentes a compostos detectados com o detector electroquímico e identificados como **14E**, **15E**, **25E**, **34E**, **39E**, **47E**, **56E**, **59E**, **81E**, **98E** e **109E** (*ver figura 3.76*) e o valor da sua área total (**EDtotal**). Para além da informação obtida com o detector electroquímico, os resultados dos testes da actividade antioxidante obtidos pelos métodos **DPPH**, **ORAC** e **FRAP**, assim como a soma das áreas totais dos picos nos cromatogramas obtidos a 280 nm, (com a "bossa" (**AT1**) e sem a "bossa" (**AT2**) e o teor em fenóis totais (**Folin**), foram também usados (*ver tabela 3.13*). Estas variáveis foram seleccionadas por poderem estar de alguma forma relacionadas com a actividade biológica das amostras em estudo.

Na avaliação da actividade antioxidante utilizaram-se 3 métodos (FRAP, ORAC e DPPH), porque se pretendia avaliar a actividade sequestrante de compostos presentes nas amostras relativamente a diferentes radicais. Normalmente este é o tipo de procedimento a efectuar já que não há propriamente um teste único que permita ter a informação completa sobre os diferentes mecanismos da actividade antioxidante nestas amostras de grande complexidade. A contribuição de cada composto fenólico para a actividade antioxidante depende do método de análise usado (DPPH, ABTS e ORAC)[154], originando actividades antioxidantes diferentes. Na aplicação do método FRAP foram utilizados como padrões o $FeSO_4$ e o Trolox, mas na tentativa de correlacionar a informação obtida para as várias amostras comparou-se apenas com o Trolox, por ser um antioxidante normalmente descrito na literatura cujas propriedades são conhecidas e semelhantes às dos compostos fenólicos. Os valores obtidos para o teor em tirosol e em fenóis totais assim como os resultados da actividade antioxidante pelos métodos DPPH, FRAP e ORAC encontram-se na tabela no *apêndice D*). Relativamente ao resveratrol apenas foi efectuada a sua determinação nas amostras comerciais dos 3 produtores JMF, ACP e HS.

Numa fase inicial do tratamento de resultados utilizaram-se só os dados correspondentes às 18 amostras dos 3 produtores da região de Setúbal mais estudados neste trabalho, sendo as amostras cedidas pela Comissão Vitivinícola. Adquiriram-se no supermercado mais 3 amostras deste tipo de vinho. Os dados obtidos na análise das 21 amostras foram tratados por análise multivariável, PCA.

O tratamento dos resultados mostra que até à 3ª componente principal a variância total acumulada era de 70.8% e até à 4ª componente principal este valor era de 79.0% (tabela 3.15.), o qual já é considerado como representativo da capacidade discriminativa das variáveis para as várias amostras neste tipo de tratamento.

Tabela 3.15. Tabela da percentagem da variância individual e acumulada nas 4 primeiras componentes principais, consideradas n= 21 amostras e v= 19 variáveis

	Valor próprio	% de variância individual	% de variância acumulada
CP1	8.2	43.6	43.6
CP2	3.4	16.2	59.6
CP3	2.4	11.2	70.8
CP4	1.6	8.3	79.0

Na figura 3.98 apresenta-se a projecção das várias amostras no espaço definido pelas três primeiras componentes principais.

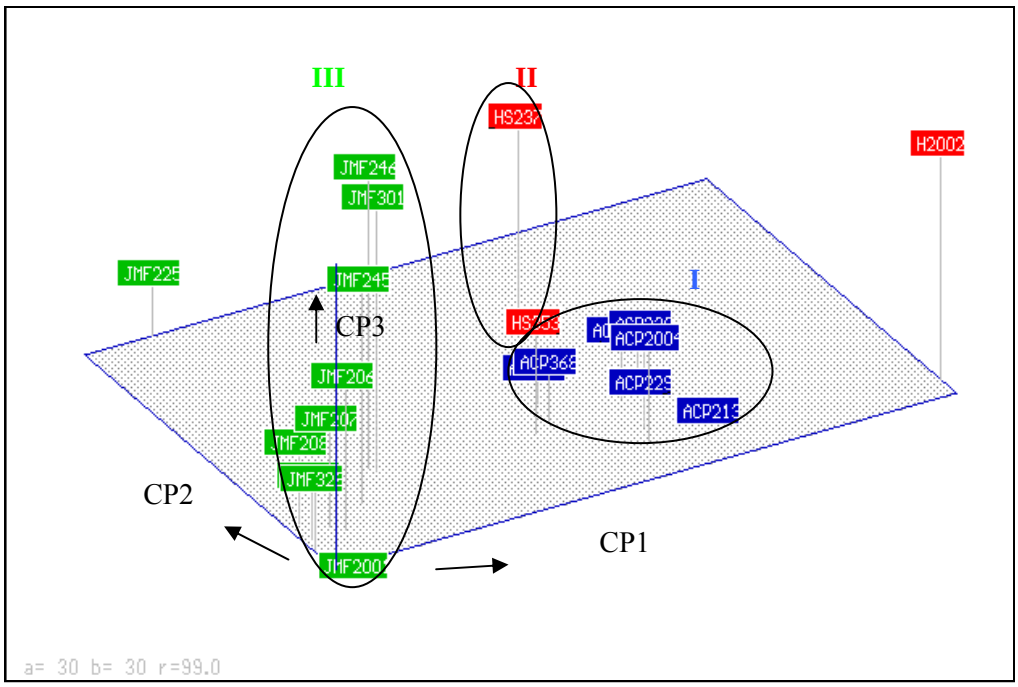


Figura 3.98. Projecção das amostras (n= 21) no espaço tri-dimensional definido pelas 3 primeiras componentes principais

Na figura estão assinalados os grupos correspondentes às amostras dos 3 produtores em estudo. Para as amostras JMF há uma grande variabilidade em termos de grupo, nomeadamente a amostra JMF é desviante na componente 2 e a principal variável responsável por esse desvio é a **15E** (NI) (*ver tabelas 3.14 e 3.16*). No que se refere às restantes amostras deste grupo há uma grande variabilidade na componente 3 e as variáveis responsáveis são fundamentalmente a **25D** (ácido protocatechuico+NI) e **98D (procianidina+NI)**. Relativamente às amostras do produtor HS a variabilidade é também muito grande e nas 3 componentes pelo que é difícil tirar conclusões relativamente às amostras deste produtor. Inclusivamente uma das amostras encaixa perfeitamente no grupo das amostras ACP que são aquelas que apresentam uma maior homogeneidade em termos de resultado e constituem assim um grupo de características semelhantes nas 3 componentes. Estas amostras apresentam teores mais elevados para um grande número dos compostos detectados nos cromatogramas (excluindo as variáveis: tir, 98E, 25E, 15E e AT2) bem como para os testes de actividade antioxidante efectuados.

A contribuição de cada uma das variáveis para a discriminação das amostras no espaço definido pelas três primeiras componentes é apresentada na tabela 3.16..

Tabela 3.16. Contribuição das variáveis para a discriminação das amostras no espaço definido pelas 3 componentes principais

Identificação das variáveis	1ª componente (CP1)	2ª componente (CP2)	3ª componente (CP3)
14E	**0.93944**	0.17627	0.14767
15E	-0.27205	**0.94042**	-0.25964
25E	0.16226	-0.27823	**0.65799**
34E	0.56062	-0.17410	0.23963
39E	0.52025	0.36212	0.01768
47E	**0.91839**	-0.13411	-0.13231
59E	**0.94702**	-0.13016	0.12905
81E	0.33742	0.16932	-0.34163
98E	-0.30845	-0.02135	**0.76742**
109E	0.89255	-0.10422	-0.35940
Edtotal	**0.96693**	-0.06526	0.13765
Folin	0.67731	-0.02350	0.12844
DPPH	0.72858	0.52354	0.10415
FRAP1	0.70262	-0.35913	0.01963
AT1	0.78994	0.51708	-0.02573
AT2	0.07514	0.86192	0.16774
ORAC	0.80995	-0.13272	0.37267
resv	0.46354	0.41843	-0.47382
tir	-0.08529	-0.48946	-0.48879

Estas contribuições reflectem o que é mostrado na figura 3.99 quando se projectam os vectores correspondentes às variáveis. As variáveis correspondentes à actividade antioxidante (**ORAC e FRAP1**), a área total na detecção electroquímica (**EDtotal**), ácido ácido gálhico (**14E**), procianidina B1 (**39**), ácido cafeico + procianidina (**47E**), galhato de etilo (**59E**), cafeato de etilo+NI (**109E**) e **AT1** discriminam as amostras na componente 1 (CP1). Relativamente à componente 2 (CP2) as variáveis que contribuem mais para a discriminação das amostras são o pico não identificado **15E**, e o valor da área total (**AT2**) e para a CP3 a variável procianidina+NI (**98E**).

Alguns picos que poderiam eventualmente ser discriminativos não foram considerados para este tratamento, nomeadamante os picos **42** (catequina + NI) e **56** (epicatequina + NI), porque as suas áreas nos cromatogramas eram pequenas havendo um erro associado na integração que poderia ser considerável e provocaria uma distorção dos resultados.

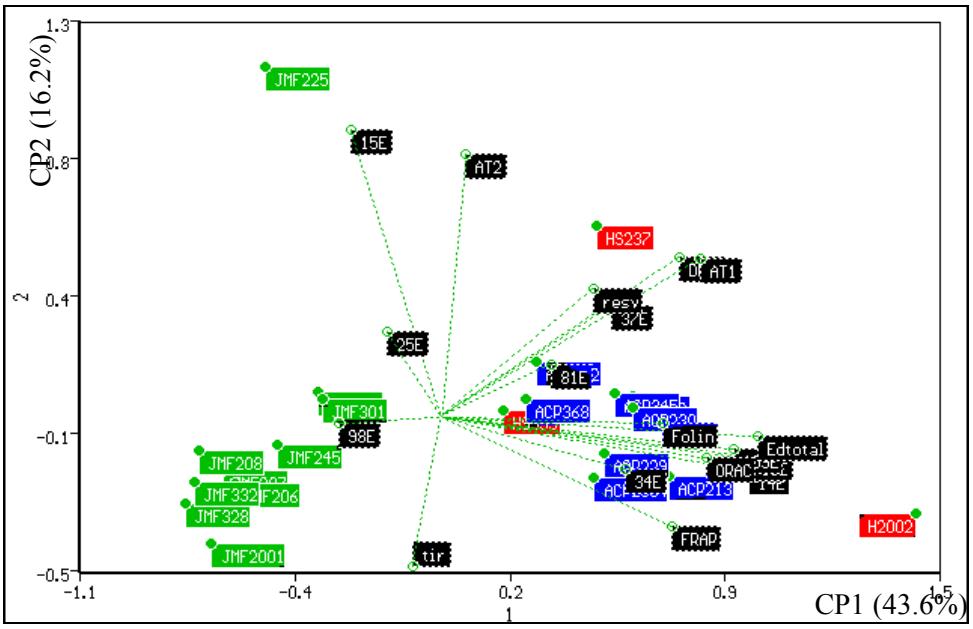


Figura 3.99. Projecção das amostras (n=21) e variáveis (v=20) no espaço bi-dimensional definido pelas duas primeiras componentes principais

As amostras que constituem os grupos I e II são dos produtores ACP e HS e além de apresentarem maior actividade antioxidante também apresentam maior quantidade nos compostos detectados com o detector electroquímico e maior valor para **AT1**.

A amostra JMF225 é discriminada pelas variáveis 15E (NI) e AT2, em que os valores obtidos são superiores aos das outras amostras analisadas (HS, ACP e JMF). Se compararmos os perfis cromatográficos obtidos com o detector electroquímico de algumas amostras dos produtores JMF, ACP e HS, observa-se que a amostra JMF225 apresenta uma área superior para o pico 15E, como se pode observar na figura 3.100. Este composto (**15E**) absorve aproximadamente aos 280 nm e verificou-se que não apresentava correlação com nenhuma das variáveis responsáveis pela actividade antioxidante.

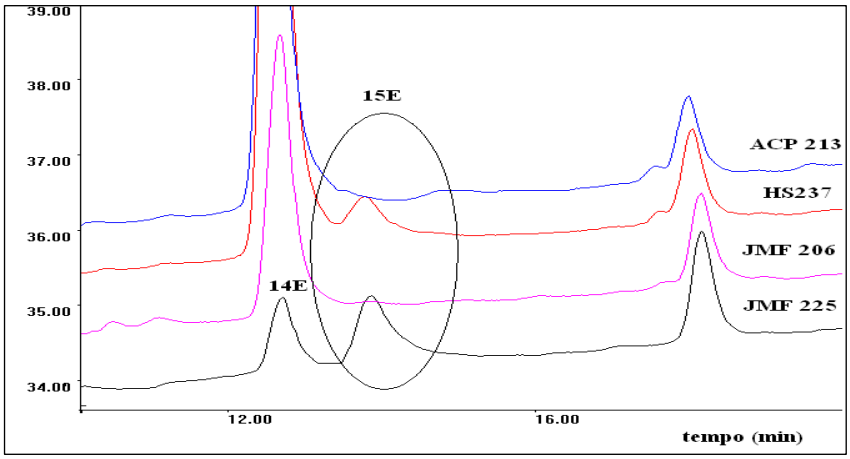


Figura 3.100. Cromatogramas obtidos por ED das amostras JMF225, JMF206, HS237 e ACP213**. Identificação:** 14E**.** ácido gálhico e 15E**.** +NI

Excluídas da matriz de dados as variáveis **15E** e **AT2**, as amostras JMF225 e HS237, aproximaram-se das amostras do mesmo produtor (figura 3.101). A representação mostra ainda que as amostras ACP e HS se aproximam formando um grupo, enquanto que as amostras JMF se incluem num grupo que se localiza em oposição a este no plano, mas apresentando alguma dispersão.

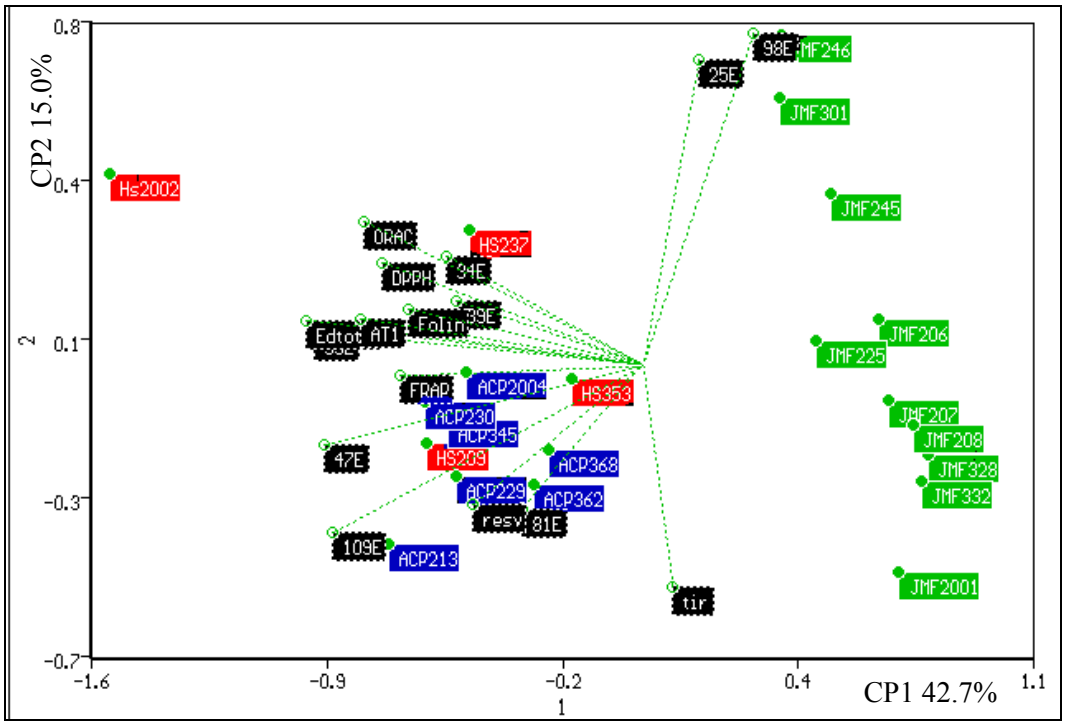


Figura 3.101. Projecção das amostras (n=21) e variáveis (v=18) no plano bi-dimensional definido pelas duas primeiras componentes principais

É possível destacar as amostras HS2002 e HS237 por apresentarem um teor mais elevado em fenóis totais, maior actividade antioxidante determinada pelo método FRAP e os picos correspondentes a: ácido gálhico+dímero do ácido gálhico (**14E**), o ácido protocatechuico+NI (**25E**), o ácido *t*-caftárico+tirosol+NI (**34E**), a catequina+NI (**42E**), o galhato de etilo (**59E**) e o cafeato de etilo+NI (**109E**) também são mais elevados. Em oposição às amostras HS e ACP tal como já se tinha observado nas representações anteriores surgem as amostras JMF.

O ácido protocatechuico+NI (**25E**), a procianidina+NI (**98E**) e o tirosol (**tir**) não contribuem para diferenciar os grupos de produtores mas são responsáveis por variabilidade nas amostras JMF principalmente. De salientar que as amostras JMF246 e JMF 301 apresentam teores mais elevados destes compostos, enquanto que a amostra JMF2001 apresenta um teor mais elevado de tirosol (1.4 mgL^{-1}). O teor médio

detectado nas amostras do produtor ACP (1.6 mgL^{-1}) é superior ao detectado mas amostras do produtor JMF (1.2 mgL^{-1}) e HS (1.1 mgL^{-1}).

Correlacionou-se os resultados dos testes de actividade antioxidante com os valores das áreas de pico obtidos para as outras variáveis, de modo a tentar concluir quais os compostos que podiam estar a contribuir para o potencial antioxidante das amostras. É importante voltar a referir que nem todos os compostos têm a mesma capacidade antioxidante e além disso a actividade antioxidante em qualquer matriz, não está necessariamente correlacionada com os compostos que existem em maior quantidade, mas com a estrutura dos compostos presentes nas amostras. O facto de a um composto isolado ser atribuída determinada actividade (quantitativa) não significa que o mesmo composto na mesma concentração na amostra tenha a mesma actividade. Dados bibliográficos[41] referem que o ácido gálhico apresenta maior actividade antioxidante do que o ácido cafeico**,** que por sua vez tem uma actividade antioxidante semelhante ao do ácido ascórbico e Trolox mas na matriz do alimento os compostos podem ter efeitos de sinergias ou por outro lado inibição da actividade.

Na tabela 3.17 apresentam-se os coeficientes de correlação obtidos quando se comparam para as amostras em estudo os dados correspondentes às variáveis fenóis totais (**Folin**), **DPPH**, **EDTotal, ORAC** e **FRAP**. Observam-se valores de correlação superiores entre a variável EDTotal e os testes de actividade antioxidante, comparativamente aos resultados do teor em fenóis totais. Este resultado vem reforçar a importância deste tipo de detector electroquímico na avaliação de amostras no que se refere à pesquisa de compostos com actividade antioxidante.

Tabela 3.17. Correlação entre algumas variáveis

	Folin	EdTotal
FRAP	0.2014	0.6954
DPPH	0.5176	0.6339
ORAC	**0.6274**	**0.7724**

Na tabela 3.18 sumariza-se os resultados da correlação entre os compostos detectados nas amostras com modo de detecção electroquímico e os testes de actividade antioxidante: o ácido gálhico, ácido cafeico/procianidina, galhato de etilo e cafeato de etilo são os que melhor contribuem para os resultados obtidos nos testes de actividade antioxidante usados. O galhato de etilo apresenta uma correlação elevada com o teste de ORAC (R=0.7730) e um valor mais baixo para o teste de FRAP (R=0.5703).

Uma observação rápida da tabela 3.18. mostra que as variáveis **47E**, **59E** e **109** são importantes na maioria dos testes de actividade antioxidante efectuados neste trabalho,

Tabela 3.18. Correlação entre as áreas dos picos detectados no detector electroquímico compostos e os testes de actividade antioxidante

Compostos	**DPPH**	**ORAC**	**FRAP**
Ácido gálhico+dímero do ácido gálhico (14E)	0.5646	**0.7710**	**0.7294**
Ácido protocatechuico +NI (25E)	0.0639	0.0216	-0.1542
Ácido *t*-caftárico +NI+tirosol (34E)	0.2228	0.5178	0.6095
Procianidina B1 (39E)	0.4772	0.2546	0.3182
Ácido cafeico e procianidina (47E)	**0.6207**	**0.7074**	**0.5703**
Galhato de etilo (59E)	**0.5787**	**0.7730**	**0.6944**
Quercetina-3-glucuronido+quercetima-3-O-glucósido (81E)	0.3198	0.0756	0.1359
Procianidina (98E)	-0.0064	0.0838	-0.2020
Cafeato de etilo + NI (109E)	**0.5761**	0.6057	**0.5166**

Os compostos que melhor se correlacionam com o teste de DPPH, ORAC e FRAP são os que correspondem à mistura dos compostos ácido cafeico/procianidina (47E) (0.6207), galhato de etilo (59E), cafeato de etilo+NI (109E) e ácido gálhico +dímero (14E).. Os compostos associados à variável 34E apresentam uma correlação média com os testes de actividade antioxidante ORAC (0.5178) e FRAP (0.6095).

Dados bibliográficos[68] descrevem que a actividade antioxidante média determinada pelo método ORAC em 13 amostras de vinhos brancos (1114 μM expresso Trolox) é inferior à actividade antioxidante avaliada em 9 amostras de vinho "sherry" (1297 μM expresso em Trolox) também pelo mesmo método. Estes valores são inferiores aos obtidos nas amostras de vinho Moscatel analisadas (1710 μM), que apresentam valores semelhantes aos observados por Fernandez-Pachon[68] *et al*., (2006) para os vinhos brancos mas inferiores aos valores obtidos para as 15 amostras de vinhos tintos (7180 μM).

Quando se trataram por PCA os dados correspondentes às mesmas variáveis (v=19) para o conjunto das 70 amostras do vinho Moscatel, das quais n=66 da região de Setúbal e n=4 da região do Douro, obteve-se uma variância total acumulada nas 3 primeiras componentes de 62.9%. As variáveis Edtotal, 14E, 47E e 59E) são as que mais contribuem para a discriminação das amostras na componente 1, como se pode observar na tabela 3.19.

.

Tabela 3.19 Contribuição das variáveis para a discriminação das amostras no espaço definido pelas 3 componentes principais

Identificação das variáveis	1ª componente (CP1)	2ª componente (CP2)	3ª componente (CP3)
14E	**0.8513**	-0.1122	0.1421
15E	0.0129	**0.8931**	-0.2531
25E	0.2560	**0.8083**	0.4715
34E	0.1460	**0.8232**	0.1149
39E	0.3804	0.0181	0.3371
47E	**0.8099**	-0.3035	-0.1262
59E	**0.8307**	-0.2155	0.0945
81E	0.2984	-0.1007	0.1428
98E	-0.1788	-0.1990	0.6424
109E	0.7275	-0.2572	-0.5430
Edtotal	**0.9113**	0.1254	0.1745
Folin	0.6384	-0.3020	0.0050
DPPH	0.6501	0.0860	-0.0856
FRAP	0.7047	-0.2768	0.1637
AT1	0.6535	0.6247	-0.1307
AT2	0.5247	0.5271	0.1400
ORAC	0.6696	-0.3993	0.2480
resv	0.5266	0.2251	-0.6486
tir	0.2944	0.1224	0.2446

Relativamente à componente 2 as variáveis 15E (NI), 25E (ácido protocatechuico +NI) e 34 (ácido *t*-caftárico +NI+tirosol) são as que contribuem mais para a discriminação das amostras nesta componente, enquanto para a componente 3 só a variável 98E e o teor de resveratrol parecem contribuir para a discriminação nesta componente. No entanto é de salientar que o teor de resveratrol não foi determinado para todas as amostras em estudo.

A projecção das amostras no plano definido pelas componentes 1 e 2 é apresentada na figura 3.102. Uma das conclusões a retirar dos resultados obtidos será então que se distinguem fundamentalmente 2 grupos de amostras e que as amostras de vinho Moscatel Douro são mais parecidas com as amostras da JMF, SSVP e CASI dos produtores da região de Setúbal.

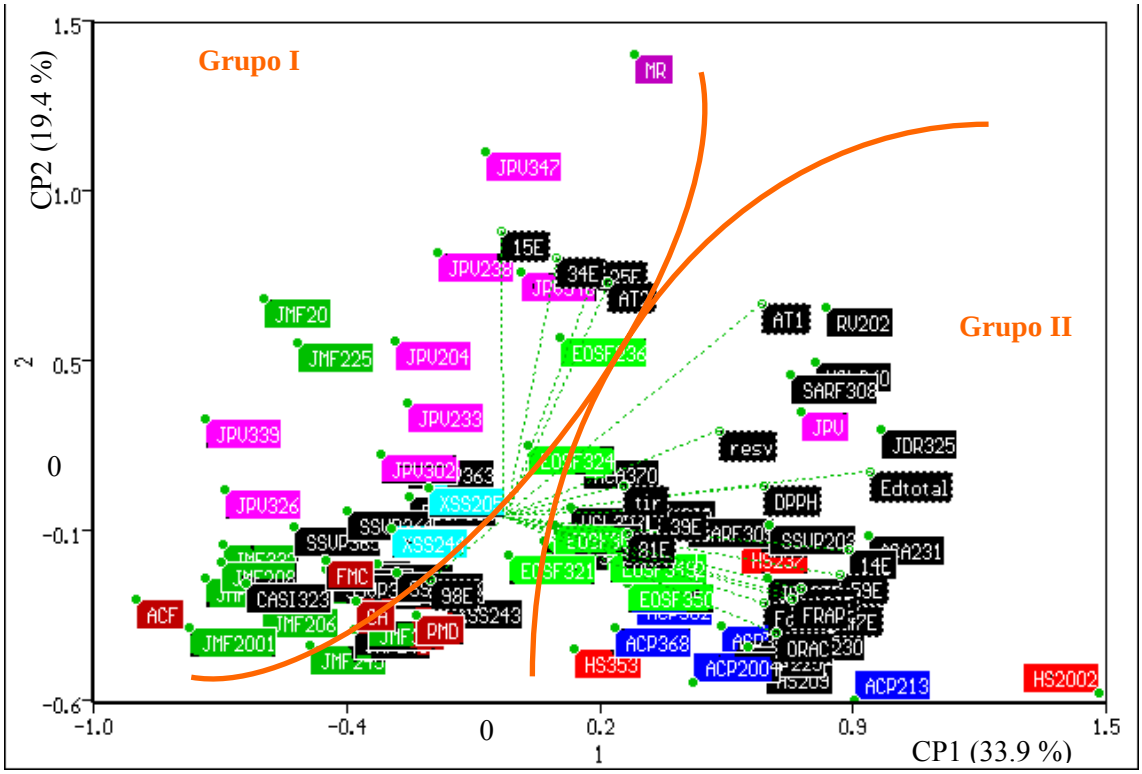


Figura 3.102. Projecção das amostras (n= 70) e variáveis (v= 19) no plano bi-dimensional definido pelas duas primeiras componentes principais,

No Grupo I verifica-se que para as amostras JPV há alguma dispersão e as variáveis 15E (NI), 25E (ácido protocatechuico e NI), 34E (ácido t-caftárico, NI e tirosol), AT1 e AT2 permitem a discriminação da maioria das amostras JMF.

No grupo II formado preferencialmente pelas amostras dos produtores HS e ACP, bem como as amostras dos restantes produtores de vinho Moscatel de Setúbal, verifica-se que a amostra ACP213 apresenta um valor superior na actividade antioxidante avaliado pelo método ORAC, o que faz com que se afaste das outras amostras.

Por apresentar nas 3 primeiras componentes principais uma variância de 62.9 % este conjunto de amostras foi tratado por NMS e na figura 3.103 apresenta-se a representação tri-dimensional das 70 amostras e das 19 variáveis utilizadas no tratamento anterior. Da análise da figura observa-se que muitas das amostras que se afastam já foram referidas anteriormente, nomeadamente a amostra MR, JPV347 e HS2002. A amostra HS2002 apresenta uma actividade antioxidante elevada avaliada pelo ensaio de FRAP (1762 ±342), enquanto que a CASI322 também apresenta actividade levada mas no ensaio DPPH (24±5.71 %). No ensaio ORAC o valor mais elevado foi de 22931 ±428 µM expresso Trolox avaliado na amostra HS2002 (*ver tabela DII, anexo D*)

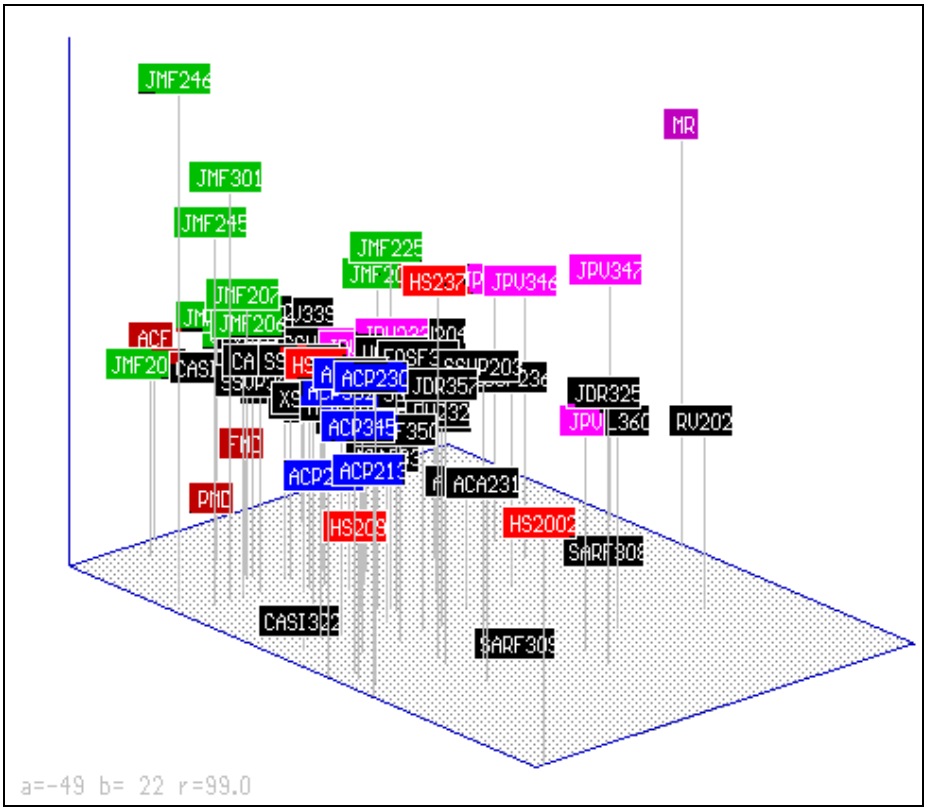


Figura 3.103. Projecção das amostras (n= 70) no espaço tri-dimensional após tratamento dos resultados por NMS

Da análise de todos os resultados pode concluir-se que as amostras são discriminadas em dois grupos: grupo I constituído por amostras (JPV e JMF) que apresentam menor actividade antioxidante e o grupo II em que a actividade antioxidante das amostras (ACP, HS) é superior.

A comparação dos resultados da composição química das amostras mostra que os compostos mais importantes e correlacionáveis com os testes de actividade antioxidante efectuados são: o galhato de etilo para o ensaio de ORAC, o ácido gálhico para o FRAP e o ácido cafeico para o DPPH, mas não são os únicos.

3.3.3. Estudo de amostras de vinho Moscatel de Setúbal: ensaios de vinificação

Embora tenham sido seguidos 3 ensaios de vinificação em 3 produtores diferentes, só vão ser apresentados os dados referentes a um deles. Como se pode observar na figura 3.104 em que se comparam nos cromatogramas ao c.d.o. de 280 nm os vinhos Moscatel após 5 meses de maceração (A5, B5 e C5), o vinho do produtor C é o que apresenta compostos em maiores concentrações e foi por isso escolhido como modelo

para esta fase do estudo. Os cromatogramas mostram que há diferenças importantes entre amostras para determinadas zonas do cromatograma (t_r curtos) mas para outras (t_r longos), as diferenças estão mais atenuadas.

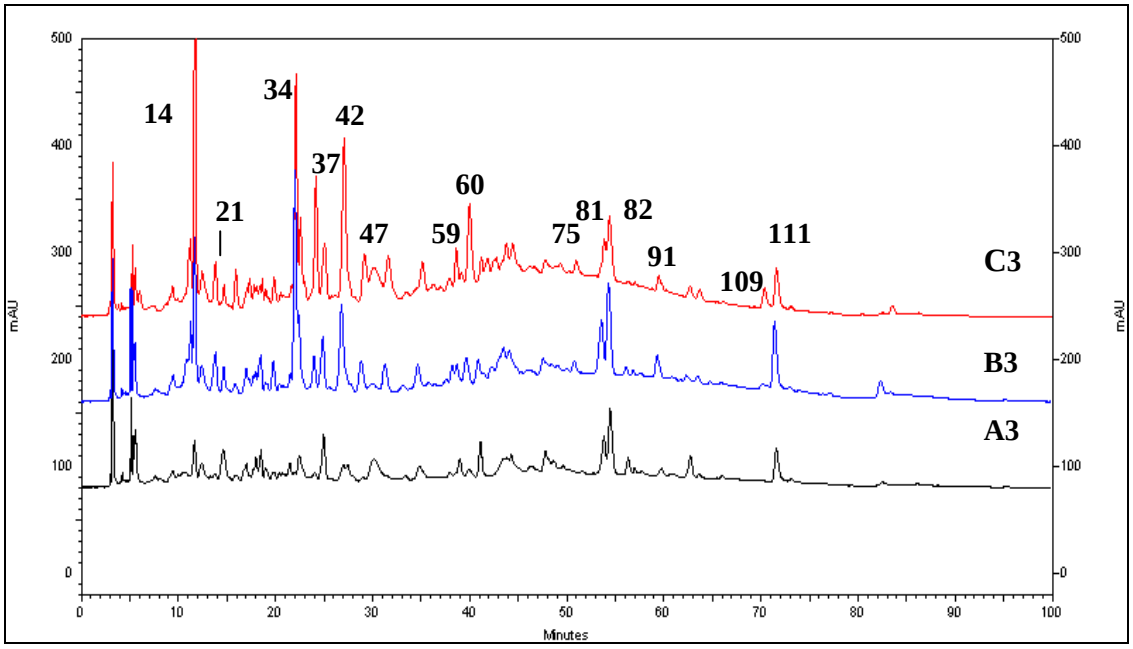


Figura 3.104. Cromatogramas a c.d.o. 280 nm do vinho Moscatel de Setúbal após 5 meses de maceração. **Identificação:** consultar tabela CI e CII apêndice C

Para o vinho Moscatel do produtor A (A_5) há uma baixa concentração na maioria dos compostos detectados, nomeadamente picos 14 (ácido gálhico), 34 (ácido *t*-caftárico, tirosol e NI), 42 (catequina e NI) e 47 (ácido cafeico e procianidina). No entanto alguns picos nem por isso diferem muito na concentração relativamente às outras amostras. Relativamente à linha de base característica deste tipo de amostras já se afasta do zero para as amostras mais concentradas dos produtores B e C.

Uma vez mais utilizou-se a análise multivariável por componentes principais (PCA**)** para facilitar o tratamento do elevado número de resultados (37 variáveis) referentes às amostras (22) do processo de vinificação provenientes do produtor C. As variáveis são as apresentadas na tabela 3.20 e, em comparação com as amostras comerciais, algumas variáveis não foram consideradas porque por vezes os picos correspondentes eram demasiado pequenos o que punha alguma dificuldade na integração e o erro associado podia ser importante. Outras variáveis que se apresentam na tabela 3.20 foram utilizadas devido a uma melhor resolução dos picos e foi possível a sua integração.

Tabela 3.20. Identificação das variáveis utilizadas no tratamento estatístico das amostras de vinho Moscatel dos ensaios de vinificação

Variável[1]	Significado	Variável[1]	Significado
14D	Ácido gálhico	***63D***	NI
16D	NI	***64D***	Procianidina
21D	5-HMF	***69D***	NI
25D	Ácido protocatechuico+NI	***71D***	NI
30D	Ácido *c*-caftárico +NI+furfural	***72D***	NI
34D	Ácido *t*-caftárico + NI	***73D***	NI
37D	NI+procianidina	***75D***	*t*-piceid+NI
39D	Procianidina B1	***80D***	Dihidroquercetina-3-*O*-ramnósido
40D	procianidina	***81D***	Quercetina-3-*O*-glucuronido[3]+NI
42D	Catequina[2] + NI	***91D***	*c*-piceid campferol-3-*O*-glucósido quercetina-3-*O*-ramnósido campferol-3-*O*-glucuronido
43D	Ácido *t*-cutárico+NI	***93D***	isoramnetina-3-*O*-glucósido+NI
44D	Procianidina	***94D***	Procianidina+NI
45D	NI	***96D***	NI+procianidina
47D	Ácido cafeico + procianidina	***109D***	Cafeato de etilo+ NI
56D	Epicatequina+NI	***111D***	Quercetina+NI
59D	Galhato de etilo	***125D***	NI+cumarato de etilo
60D	Glucósido do ácido indol-láctico+procianidina	**AT1**	Soma da área dos picos detectados no cromatograma a 280 nm
61D	Procianidina+NI	**AT2**	Área total (picos e "bossa") no cromatograma a 280 nm
62D	NI		

[1] ***D***- detector de díodos; **NI**- não identificado
[2] variável em que se considera a catequina e o ácido *c*-cutárico
[3] variável em que se considera a quercetina-3-*O*-glucuronido e a quercetina 3-*O*-glucósido (identificado na tabela CI e CII como o pico 82)

As amostras de diferentes cubas (cuba 1 e 2) foram recolhidas mensalmente no produtor C e na identificação das amostras foi utilizada a nomenclatura apresentada na secção *2.3*.

Na figura 3.105 apresenta-se a projecção das amostras no espaço definido pelas 3 primeiras componentes principais. Na aplicação da análise multivariável ao conjunto de resultados verificou-se que nas 3 primeiras componentes principais havia 63.7% de variância total acumulada contribuindo a componente 1 com 27.1% e a componente 2 com 25.0%. A variância acumulada nas 5 primeiras componentes principais é de 79.8%, valor considerado como representativo da capacidade discriminativa das

variáveis nas várias amostras analisadas. A representação mostra que é possível agrupar as amostras de acordo com a fase do processo de vinificação (maceração e maturação). É também visível que as amostras que no processo de maceração estavam separadas nas duas cubas apresentavam uma composição química diferente e as amostras da maturação resultam da mistura das duas cubas.

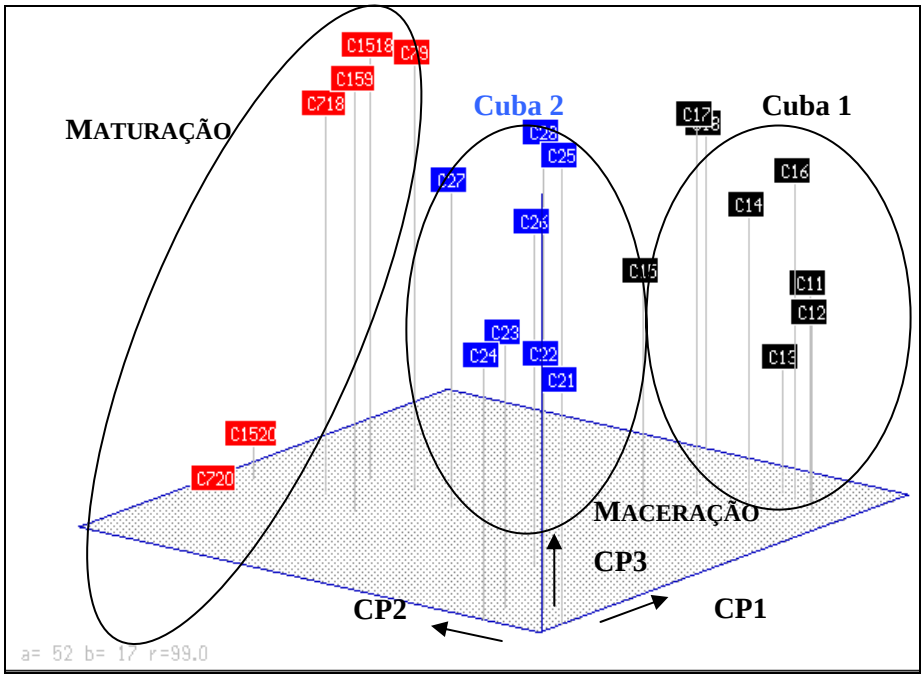


Figura 3.105 Projecção das amostras do ensaio de vinificação (n= 22) no espaço tri-dimensional definido pelas 3 primeiras componentes principais

Para comparar as posições relativas das amostras e a contribuição das variáveis, é mais fácil utilizar uma representação gráfica a 2 dimensões correspondente às 2 primeiras componentes principais (figura 3.106). Foi possível agrupar as amostras recolhidas durante a maceração em 2 grupos, que correspondem às cubas 1 e 2 utilizadas na vinificação. O facto de conhecermos a identificação das amostras facilita a delimitação dos respectivos grupos. Observa-se que no caso da cuba 2 houve uma maior variabilidade nas amostragens que se traduzem numa maior dispersão das amostras no gráfico. As variáveis **69D** (NI), **72D** (NI), **81D** (quercetina3-*O*-glucuronido+NI), **111D** (quercetina+NI) e **AT2** contribuem para a discriminação das amostras provenientes da cuba 1, enquanto que as variáveis, nomeadamente **34D** (ácido *t*-caftárico+NI), **39D** (procianidina B1), **42D** (catequina+NI) e **56D** (epicatequina+NI) destacam as amostras da cuba 2. Na 3ª componente é a variável **25D** (ácido protocatechuico+NI) que diferencia as amostras da cuba 1, enquanto que as

amostras da cuba 2 são destacadas pelo elevado teor no composto correspondente à variável **61D** (procianidina+NI). Para a discriminação das amostras da maturação contribuem as variáveis **62D** (NI) e **72D** (NI), no entanto na 3ª componente é a variável **91D** (*c*-piceid, campferol-3-*O*-glucósido, quercetina-3-*O*-ramnósido e campferol-3-*O*-glucuronido) que principalmente diferencia estas amostras.

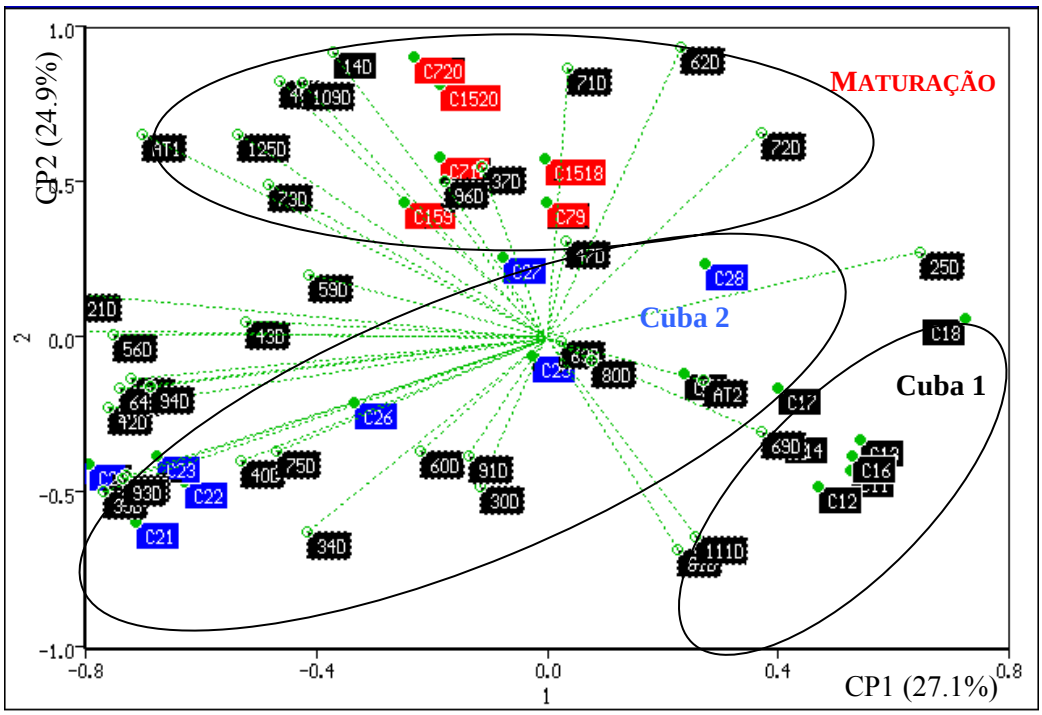


Figura 3.106 Projecção das amostras (n=22) e variáveis (n=37) no espaço bi-dimensional definido pelas duas primeiras componentes principais

A análise da figura 3.107 obtida após tratamento da matriz de dados por NMS mostra que existe uma grande dispersão entre as amostras analisadas das várias fases de vinificação.

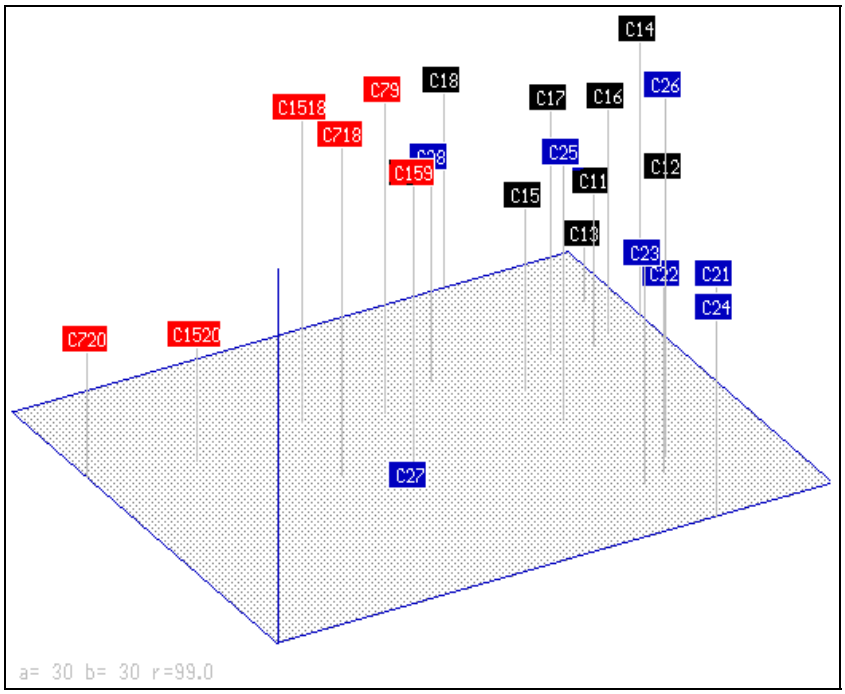


Figura 3.107. Projecção das amostras (n= 22) no espaço tri-dimensional após tratamento dos resultados por NMS

Com a amostra C27 pode ter ocorrido um erro de amostragem e esta amostra aparece como diferente por apresentar valores inferiores relativamente ao ácido gálhico, galhato de etilo, quercetina e cumarato de etilo quando se compara com a amostra C25 que se localiza próximo do centro da representação da figura 3.93. A separação destas amostras em antes e depois da maceração é devida essencialmente às variáveis **14D** (ácido gálhico) 2**5D** (ácido protocatechuico+NI), **47D** (ácido cafeico+procianidina) **109D** (cafeato de etilo+NI). Ao longo do processo de vinificação aumentam as concentrações dos compostos associados a estas variáveis, por isso é importante o estudo destes compostos presentes nas amostras recolhidas nas cuba 1 e 2 (fase de maceração) e na fase de maturação, nomeadamente o ácido gálhico (**14D**), galhato de etilo (**59D**), ácido cafeico+procianidina (**47D**) e cafeato de etilo+NI (**109D**).

Na figura 3.108 apresenta-se uma comparação entre as áreas dos picos associados ao ácido gálhico e galhato de etilo e observa-se a partir do gráfico que o teor em ácido gálhico aumenta ao longo da maceração, o que pode ser devido a uma maior extracção formando-se em simultâneo galhato de etilo, que é detectado ao fim de 1 mês após a adição da aguardente (C11 ou C12). A variabilidade que se verifica nos valores das áreas ao longo do processo pode ser justificada pela heterogeneidade das amostras recolhidas durante o estudo.

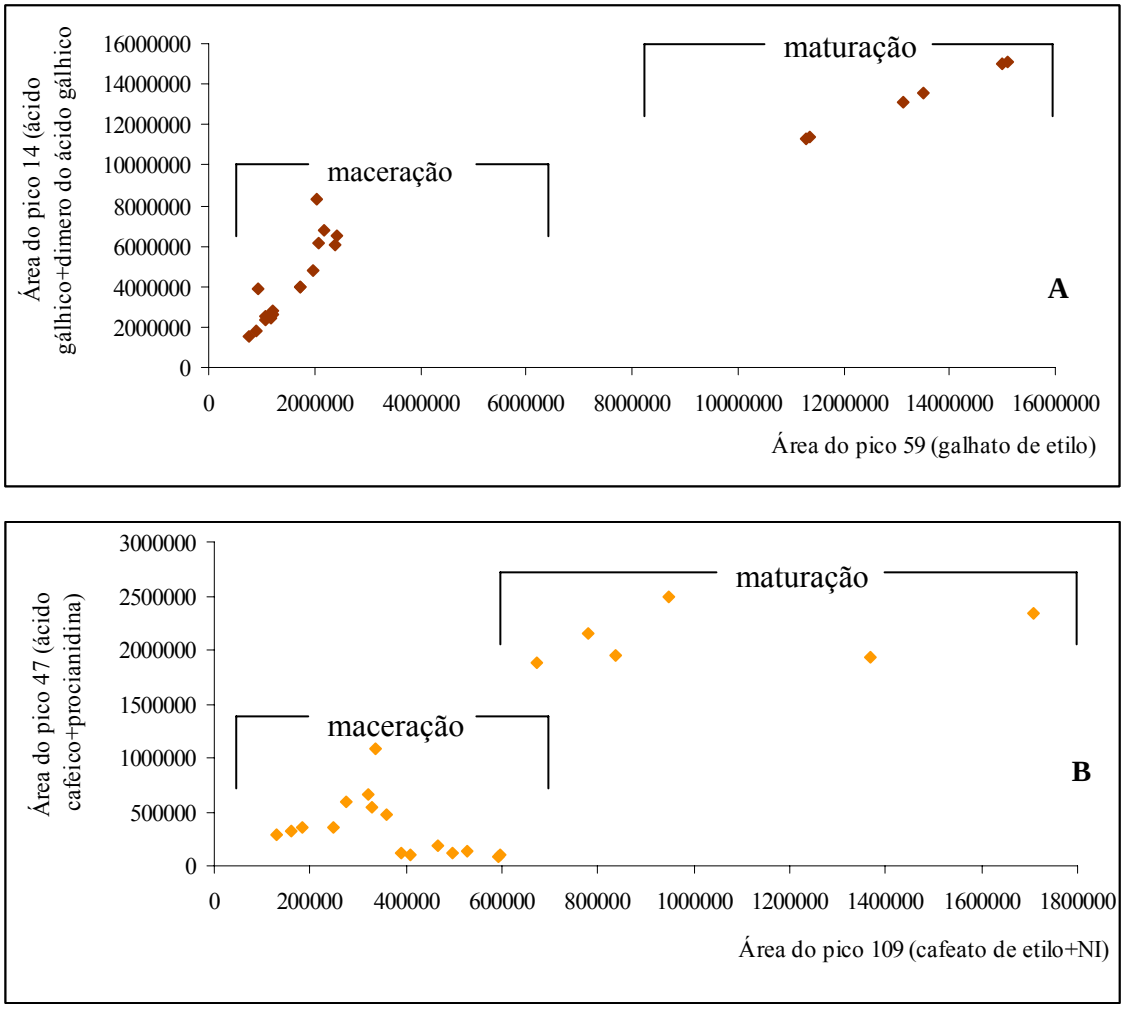


Figura 3.108. Comparação das áreas dos picos (**A**) ácido gálhico e galhato de etilo (**B**) ácido cafeico e cafeato de etilo em amostras do ensaio de vinificação

Da análise da figura anterior também se observa:

- a existência de variabilidade entre as amostras analisadas na fase de maceração e de maturação;
- que os teores em ácido cafeico e cafeato de etilo são inferiores aos detectados para o ácido gálhico e galhato de etilo;
- que ao longo do processo de vinificação o teor em ácidos assim como nos respectivos ésteres aumenta, o que era de esperar dado que estes compostos são extraídos das películas ou formados durante o processo de vinificação.

Também se verifica que a razão das áreas entre o ácido gálhico e o galhato de etilo aumenta ao longo do processo de vinificação, enquanto que relativamente ao ácido cafeico e cafeato de etilo se mantém aproximadamente constante.

As amostras recolhidas na fase da maturação (C159, C1518 e C1520), afastam-se das amostras recolhidas durante o período do contacto pelicular (fase de maceração, (C11-C18) e o cafeato de etilo (109) e o cumarato de etilo (125) contribuem para essa diferença. Na fase de maturação detectam-se valores superiores, como se pode ver na figura 3.109, em que se pretende mostrar a variação de área do pico do cumarato ao longo do processo de vinificação.

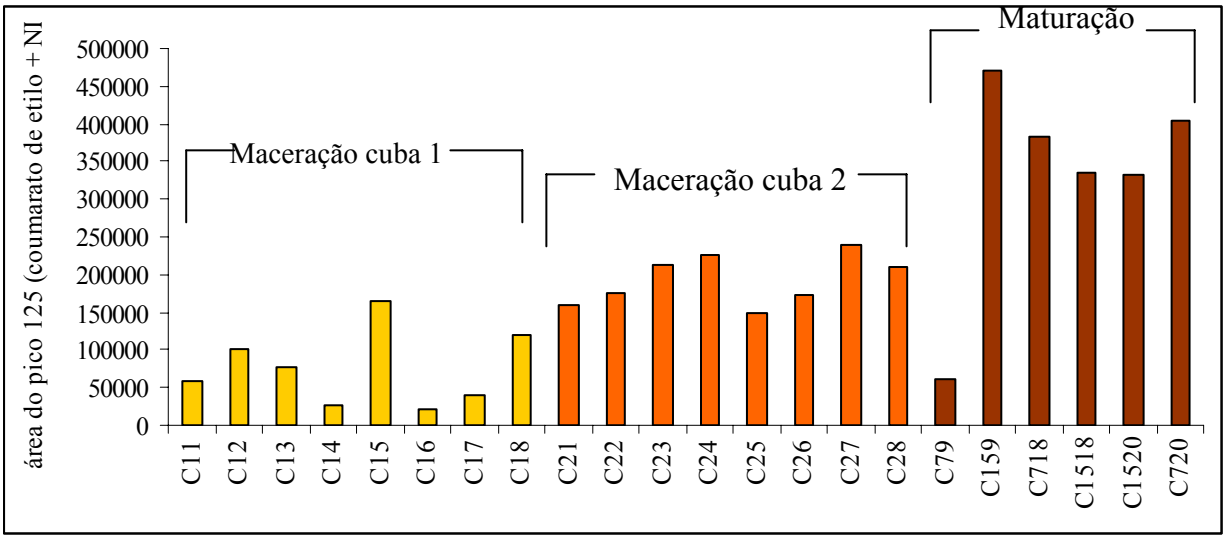


Figura 3.109. Variação da área do pico do cumarato de etilo em amostras do ensaio de vinificação

Embora seja importante o doseamento individualizado dos compostos fenólicos nos vinhos, a determinação do teor total em compostos fenólicos é um parâmetro global geralmente usado na caracterização das amostras e que permite ter uma ideia sobre a riqueza dos vinhos neste tipo de compostos. Tentou-se relacionar o teor de fenóis totais e a área do cromatograma detectado ao c.d.o. de 280 nm. Os cromatogramas destas amostras normalmente apresentam uma linha de base que não é estável. Esta variação da linha de base, como já foi referido, pode ser devida à presença de compostos poliméricos, que não foram separados nas condições de análise e que eluem entre 25 a 75 min. Todos estes compostos contribuem para o teor em fenóis totais e na figura 3.110 apresenta-se a relação existente entre o teor em fenóis totais e a soma das áreas dos picos nos cromatogramas para o c.d.o. de 280 nm incluindo essa variação da linha de base. O valor de R (0.9144) que se obtém quando se relacionam estas duas variáveis vem confirmar a existência de uma relação linear entre elas, embora nas amostras do produtor C se observe uma dispersão nos resultados obtidos. Quando se relaciona o

teor em fenóis totais com a área total dos picos, sem considerar a variação da linha de base (não se considera os compostos poliméricos), obtém-se um valor de R superior (0.938). A dispersão dos resultados observada na figura 3.110 e que originou o valor de correlação menor, pode ser explicada pelo facto destes compostos poliméricos poderem reagir de uma maneira diferente com o reagente de Folin-Ciocalteau.

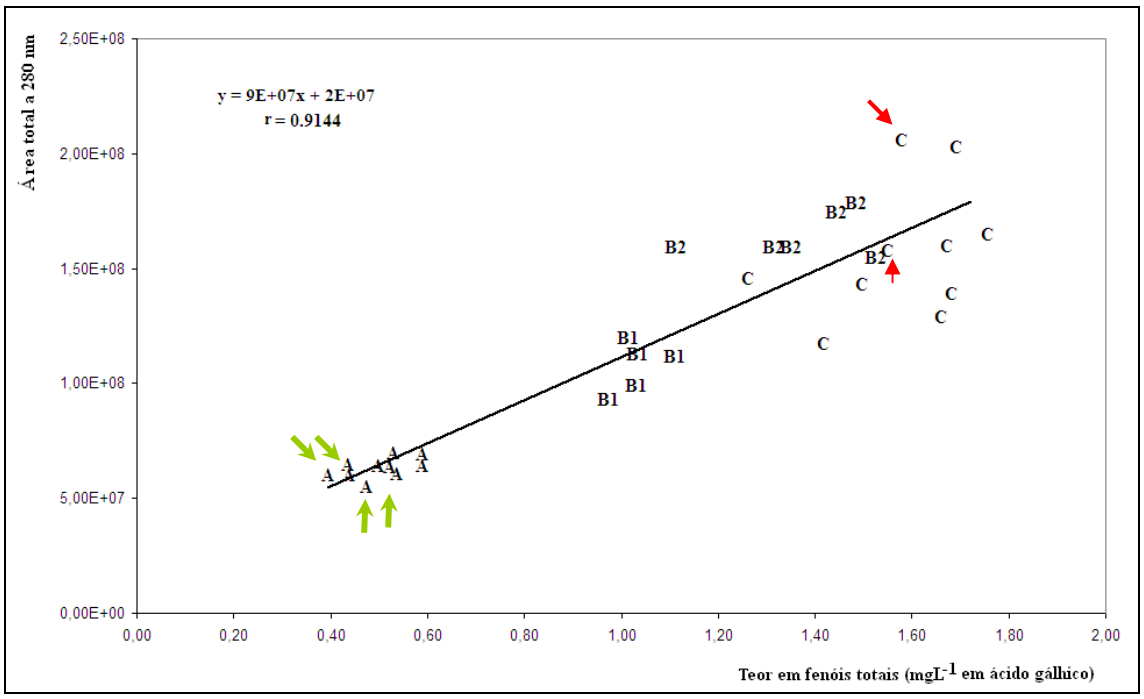


Figura 3.110. Relação entre o teor em fenóis totais e a área total no cromatograma dos vinhos Moscatel dos produtores A, B e C durante a vinificação

As amostras assinaladas com setas na figura 3.110 (**a verde para o produtor A** e a **vermelho para o produtor C**), correspondem às amostras recolhidas após a adição do líquido de prensagem e observa-se que o teor em fenóis totais destas amostras não é influenciado pela adição do líquido de prensagem, porque não se afastam das outras amostras. Pelo contrário, nas amostras do produtor B antes (amostras B1) e após (amostras B2) a adição do líquido de prensagem ocorreram diferenças a nível do cromatograma e que são proporcionais às diferenças observadas para os teores em fenóis totais. Para o produtor C verifica-se que o teor em fenóis totais das amostras é semelhante ao teor das amostras B2 obtidas após a adição do líquido de prensagem e quando nestas amostras C se adicionou o líquido de prensagem não se notou discriminação destas amostras.

Os resultados mostram que há diferenças importantes nos teores de compostos fenólicos presentes nas amostras dos 3 produtos em estudo. A amostra A, como já se

tinha verificado quando se compararam os cromatogramas, apresenta um teor inferior de compostos o que muito provavelmente estará relacionado com o facto das condições de maceração serem conduzidas em condições de temperatura diferentes das outras amostras. De facto os outros dois produtos apresentam teores em compostos fenólicos que são semelhantes mas que podem variar em termos dos compostos predominantes na amostra, por isso foi importante para além da determinação deste parâmetro global, analisar-se as amostras por técnicas cromatográficas que nos permitiram obter a proporção relativa dos diferentes componentes das amostras.

Da análise dos vários resultados pode concluir-se que:

- as amostras agrupam-se em função da fase da vinificação (maceração e maturação) e na fase de maceração observam-se 2 grupos correspondentes às amostras das 2 cubas analisadas o que mostra que há variação na composição química das amostras;
- o teor dos compostos detectados nas amostras provenientes da cuba 1 é ligeiramente inferior ao das amostras recolhidas da cuba 2;
- As amostras da cuba 2 destacam-se por apresentarem teores mais elevados nos compostos associados às variáveis 61D (procianidina + NI), 62D (ácido ferúlico) e 72D (NI). No entanto as amostras da cuba 1 apresentam teores mais elevados nos compostos que se relacionam com as variáveis 25D (ácido protocatechuico + NI), 81D (quercetina-3-*O*-glucósido +quercetina-3-*O*-glucuronido+NI);
- As variáveis 14D (ácido gálhico), 47D (ácido cafeico+procianidina), 59D (galhato de etilo), 109D (cafeato de etilo+NI) e 125D (cumarato de etilo+NI) são importantes na discriminação das amostras da fase de maturação;
- Os ácidos gálhico e cafeico assim como os respectivos ésteres aumentam ao longo do processo de vinificação;

No que se refere à determinação do teor total em compostos fenólicos nas amostras do 3 produtores (A, B e C) conclui-se que as amostras dos produtores B e C apresentam um teor superior ao das amostras dos produtores A.

3.3.4. Quantificação de ésteres etílicos em amostras de vinho Moscatel de Setúbal

Uma exposição exaustiva sobre a composição química dos vinhos Moscatel não caberia neste trabalho porque ficaria com certeza incompleta dada a complexidade destas amostras. No entanto, alguns compostos com especial interesse por serem conhecidos pelas suas propriedades benéficas para a saúde do ser humano e outros compostos que podem de alguma forma contribuir para a sua diferenciação vão ser abordados nesta secção nomeadamentente o galhato de etilo, o cafeato de etilo e o cumarato de etilo.

3.3.4.1. Optimização das condições de análise por LC- MS

Foram optimizadas as condições de detecção por espectrometria de massa de forma a obter os melhores resultados para os padrões de cafeato e de galhato de etilo.

O espectro de massa da solução padrão de cafeato de etilo (60 mgL^{-1}) obtido por infusão directa no espectrómetro de massa e com um fluxo de 10 $\mu Lmin^{-1}$ apresenta o ião molecular do cafeato de etilo, $[M-H]^-$ *m/z* 207 e ainda os fragmentos característicos *m/z* 179, 161 e 135. Na figura 3.32D (*ver 3.2*) apresenta-se o esquema de fragmentação do cafeato de etilo. O fragmento *m/z* 161 corresponde à perda de uma molécula de H_2O (18 Da) pelo ião molecular do ácido cafeico $[M-H-H_2O]^-$. Para o galhato de etilo nas mesmas condições de análise por infusão directa, o espectro de massa apresenta o ião $[M-H]^-$ *m/z* 197 e ainda os fragmentos *m/z* 169 e 125, cujo esquema de fragmentação se apresenta na figura 3.111..

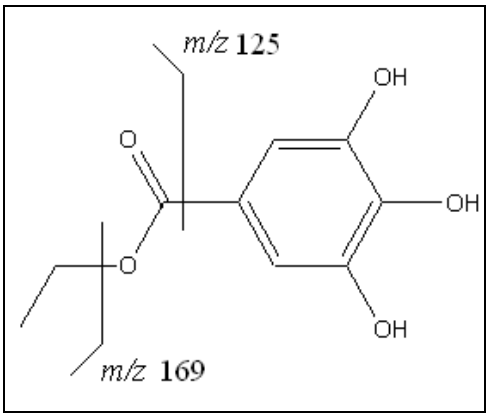


Figura 3.111. Esquema de fragmentação do ião $[M-H]^-$ *m/z* 197

Ainda por infusão directa efectuaram-se, para ambos os compostos os espectros de MS/MS dos iões $[M-H]^-$ 207 e 197, respectivamente do cafeato e galhato de etilo, tendo sido aplicada uma energia de colisão de 20 eV. Os resultados obtidos são

concordantes com os apresentados no esquema de fragmentação. Aumentando a energia de colisão as condições de análise eram excessivas e por exemplo para o galhato de etilo só se detectava quase exclusivamente o fragmento *m/z* 125. Após a optimização de condições no espectrómetro de massa as soluções de padrões individuais foram injectadas no cromatógrafo líquido e foram analisadas nas condições descritas em 2.5. Na figura 3.112 apresenta-se o cromatograma e o espectro de massa obtido para uma solução padrão de galhato de etilo que, nas condições de separação utilizadas na cromatografia líquida, elui com o t_r de aproximadamente 8 min.

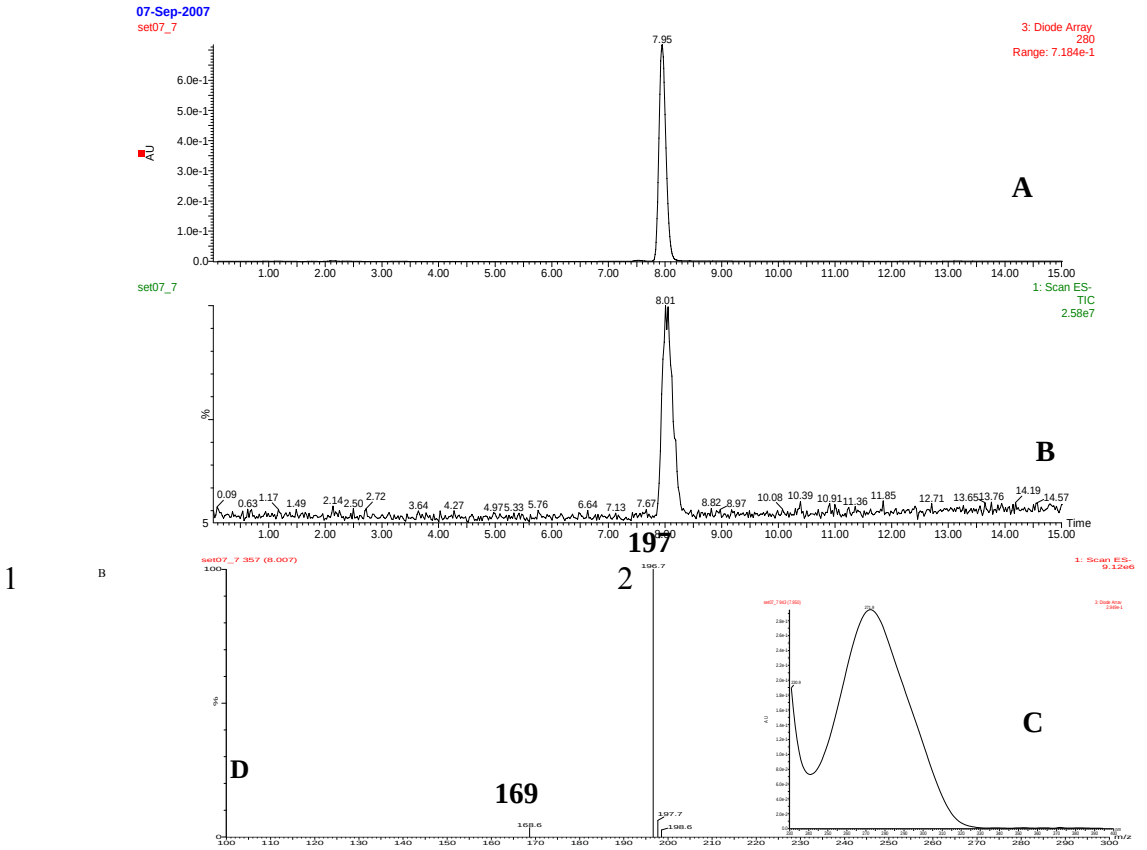


Figura 3.112. Análise de uma solução padrão de galhato de etilo: (**A**) cromatograma a c.d.o. 280 nm; (**B**) cromatograma TIC (m/z 100-400); (**C**) espectro de absorção (c.d.o. 240-400 nm); (**D**) espectro de MS (m/z 100-400)

O espectro de massa do composto mostra que o ião *m/z*=197 é o que aparece preferencialmente, o que indica que ocorre pouca fragmentação na fonte nestas condições de análise mas o fragmento (m/z 169) correspondente ao ácido gálhico já é detectado.

Para a quantificação, a aquisição de resultados da espectrometria de massa em modo SIR (Single Ion Recording) tem vantagem relativamente à utilização do modo ião

extraído, como se pode observar na Figura 3.113. Os valores do S/N (sinal/ruído) foram comparados para os diferentes modos de detecção e utilizando diferentes métodos de determinação: RMS (Root Mean Square) e PtP (peak to peak) e os resultados são apresentados na tabela 3.21. O método RMS baseia-se na determinação do raiz quadrada da média dos quadrados dos desvios obtido a partir de n medidas e o PtP é a diferença entre a amplitude máxima e mínima do sinal.

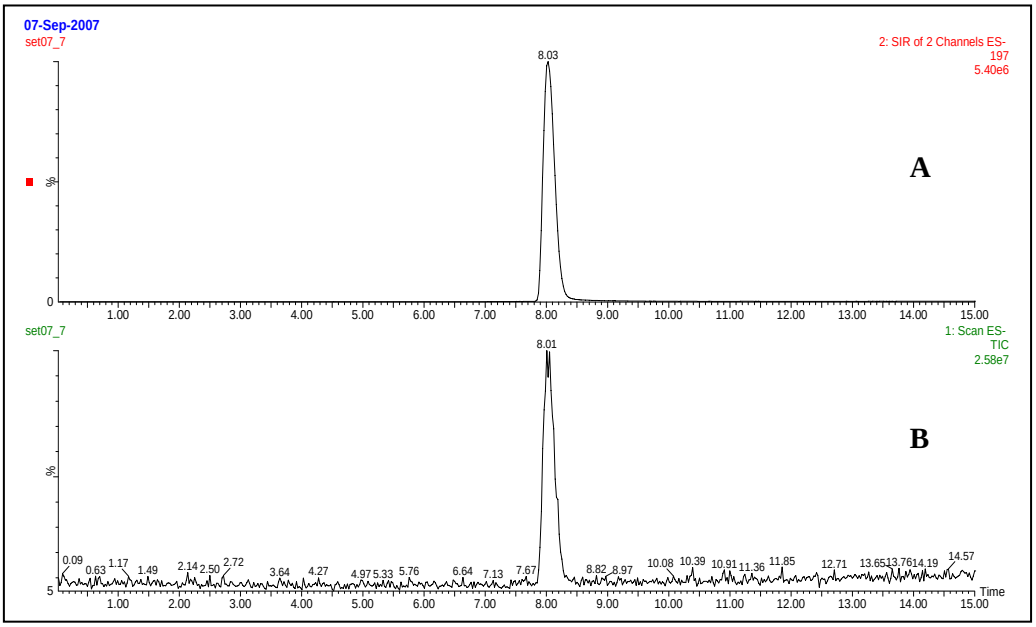


Figura 3.113. Cromatogramas de uma solução padrão de galhato de etilo: (**A**) modo SIR para *m/z* 197; (**B**) *m/z* 197

Tabela 3.21. S/N para os diferentes modos de aquisição do sinal (SIR e ião extraído) e métodos de determinação

Modo	**RMS**	**PtP**
SIR	5589	1937
SCAN (m/z=197)	610	226

O modo SIR como era de esperar permitiu uma relação S/N muito superior à obtida quando se operou no modo SCAN. Quanto aos métodos de determinação da relação S/N os valores obtidos pelo método RMS são muito superiores, o que está de acordo com o que é habitualmente descrito.

No caso de haver interferências de picos com *m/z* iguais, a utilização do modo MRM torna o método de detecção por espectrometria de massa mais específico. Os iões que vão ser detectados correspondem ao fragmento inicial considerado como o "ião pai", e em condições optimizadas nomeadamente no que se refere à aplicação de energia de colisão, origina-se um fragmento que se designa "ião filho". No modo MRM a

contribuição para o pico detectado resulta do "ião pai" e do "ião filho". Esta metodologia permite aumentar a sensibilidade do método. Para confirmar as vantagens de utilização do modo MRM foram considerados os fragmentos *m/z* 197 ("ião pai") e *m/z* 169 ("ião filho") correspondentes ao galhato de etilo e utilizaram-se as condições anteriormente referidas com uma energia de colisão de 25 V, dado que nas condições anteriormente usadas praticamente só se detectava o ião *m/z* 197. Os resultados obtidos apresentam-se na figura 3.114.

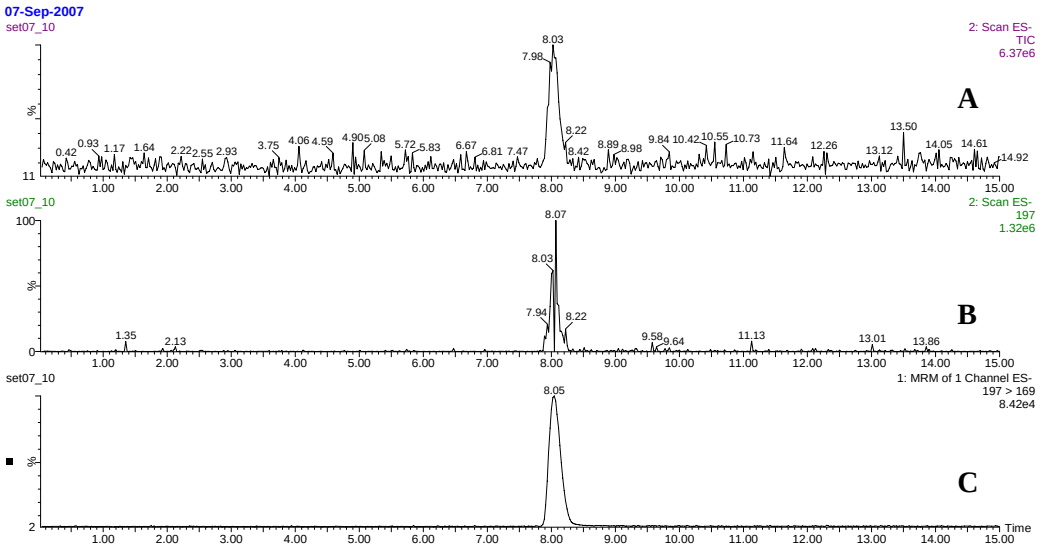


Figura 3.114. Cromatogramas de uma solução padrão de galhato de etilo: (**A**) TIC; (**B**) *m/z*=197; (**C**) MRM (197>169)

Na tabela 3.22 apresentam-se os resultados de S/N do cromatograma de uma solução de galhato de etilo para as várias condições.

Tabela 3.22. S/N do cromatograma de uma solução de galhato de etilo para diferentes modos de aquisição do sinal

Modo	**RMS**	**PtP**
SCAN (TIC)	30.5	7.5
SCAN (*m/z*=197)	2033	388
MRM	675	157

Como já anteriormente referido, os valores obtidos pelo método RMS (método de determinação do S/N) são superiores aos obtidos pelo método PtP. A aquisição de resultados no modo SCAN (*m/z*=197) é vantajosa relativamente ao modo SCAN (TIC) e MRM.

Para confirmar, que o fragmento 169 resultava do ião correspondente ao galhato de etilo (*m/z*=197) foi determinado, utilizando as mesmas condições dos ensaios anteriores, qual o ião que dava origem ao fragmento de *m/z* 169 (modo PS). Na figura 3.115

apresenta-se o resultado obtido e confirma-se que o fragmento *m/z* 169 teve origem no ião *m/z* 197 correspondente ao galhato de etilo. Esta confirmação foi obtida a partir do espectro de massa do fragmento percursor ("Pai") do ião *m/z* 169 (figura 3.115C) em que se detecta o ião *m/z* 197.

Uma das ferramentas disponíveis no software de tratamento de dados, permite fazer a suavização dos cromatogramas ou espectros de modo a reduzir o ruído inerente à própria análise. A redução do ruído pode ser feita através dos métodos Savitzky Golay e "média móvel".

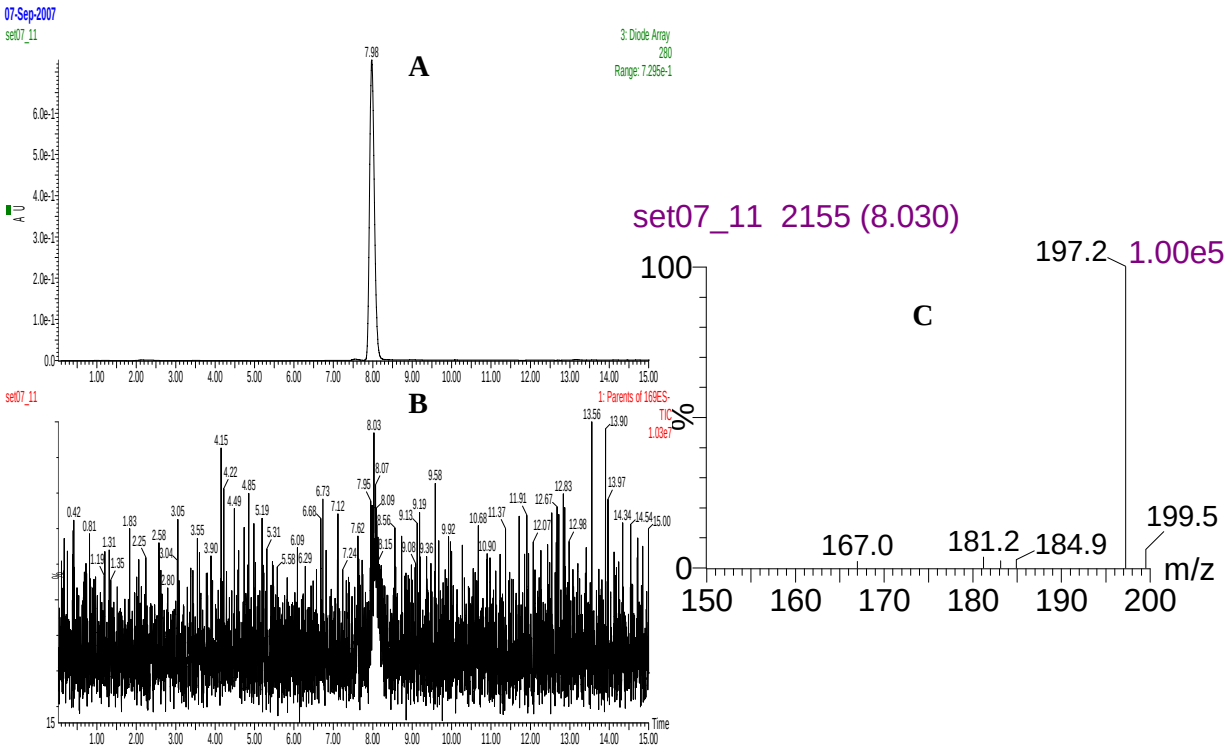


Figura 3.115 Análise de uma solução padrão de galhato de etilo: (**A**) cromatograma TIC; (**B**) modo PS do *m/z* 169; (**C**) espectro do ião "pai" do ião *m/z* 169

Na figura 3.116 pretende-se ilustrar estes efeitos quando se analisou uma solução de cafeato de etilo (t_r= 10.2 min).

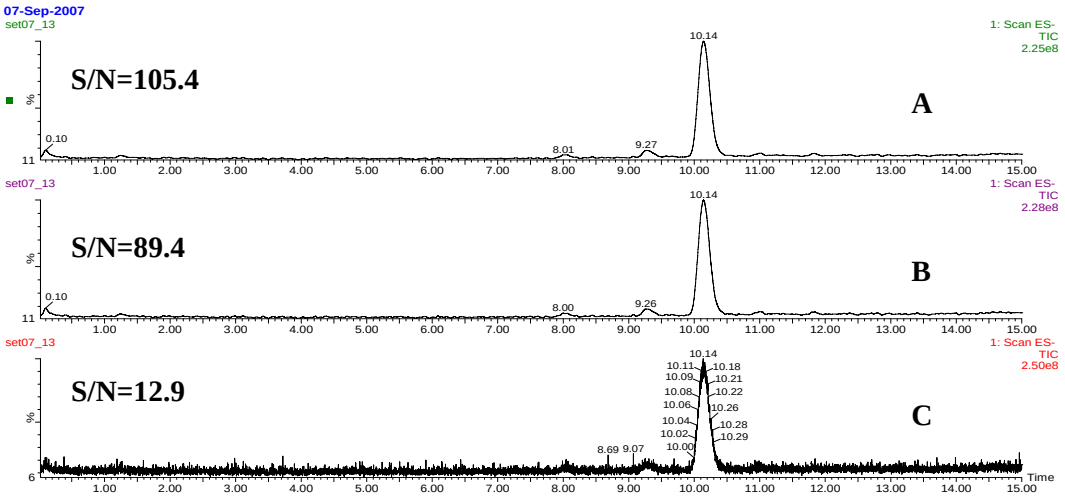


Figura 3.116. Cromatogramas TIC de uma solução de cafeato de etilo (**A**) tratamento pelo método de "média móvel"; (**B**) tratamento pelo método de "Savitzky Golay"; (**C**) sem tratamento

A diferença observada entre os valores de S/N para os cromatogramas "suavizados" pelos dois métodos é pouca, pelo que no tratamento futuro a dar aos dados se utilizará o método de Savitzky Golay. Este método apresenta mais vantagens do que a "média móvel" porque preserva as características dos resultados experimentais e é aplicado a sinais analíticos com picos estreitos[209].

Procedeu-se também à optimização do método para análise de cafeato de etilo. No cromatograma (figura 3.117) adquirido em modo SCAN parece existir uma contaminação do padrão de cafeato de etilo (t_r=10.138 min) com dois compostos de tempos de retenção (t_r=8.045 e 9.254 min). Os espectros de absorção(figura 3.117F e G) (t_r=9.254 e 10.138 min) das 2 impurezas são semelhantes, mas a sua fragmentação é diferente (figura 3.117D e E).

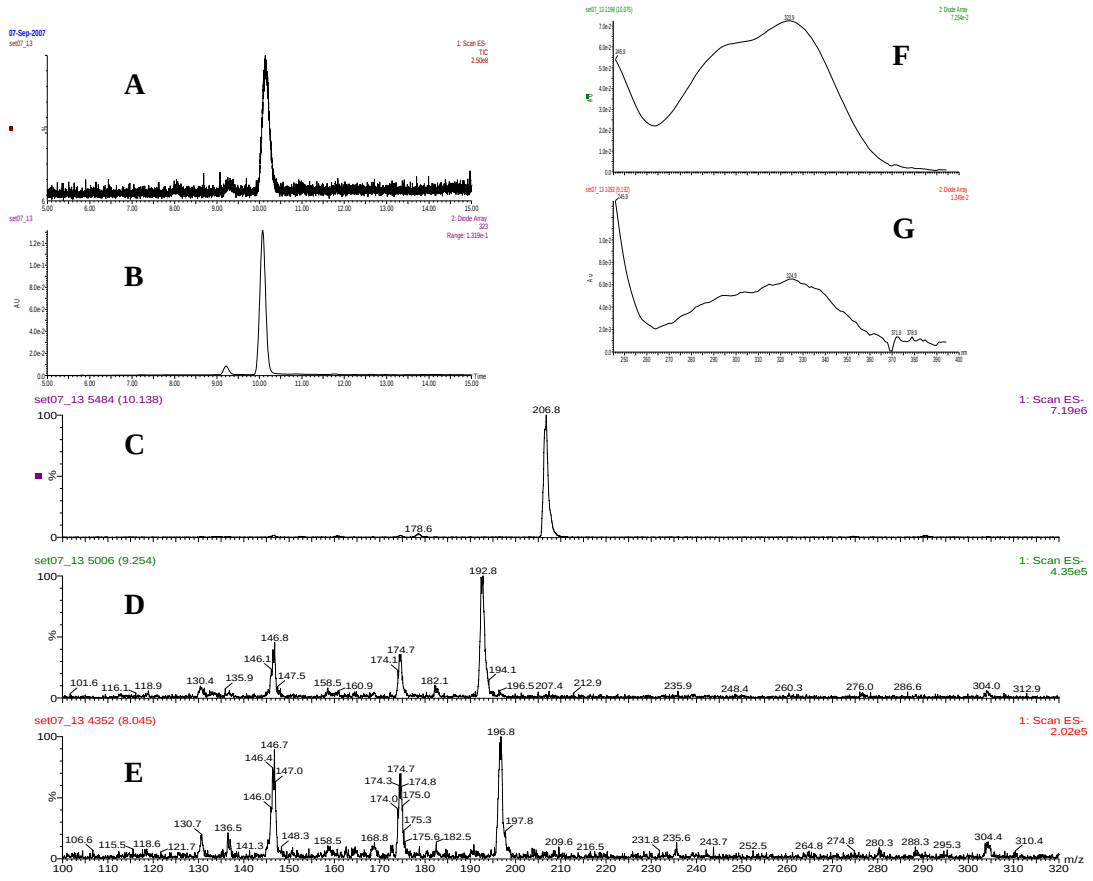


Figura 3.117. Análise de solução padrão de cafeato de etilo: cromatogramas (**A**) TIC (m/z 100-600) (**B**) c.d.o. 323 nm. Espectros de massa: (**C**) pico t_r 10.138 min; (**D**) pico t_r 9.254; (**E**) pico t_r 8.045 min. Espectros de absorção (**F**) pico t_r 10.075 min e (**G**) pico t_r 9.192 min

Nas condições utilizadas a fragmentação do cafeato de etilo está de acordo com o esquema de fragmentação previsto (*ver 3.2)*. Quanto ao composto (não identificado) com t_r 9.254 min os fragmentos maioritários são *m/z* 193, 175 e 147, (figura 3.117D), enquanto que o composto (não identificado) com t_r 8.045 min dá origem aos fragmentos *m/z* 197 $[M-H]^-$, 175 e 147 (figura 3.117E). Os iões *m/z* 193 e *m/z* 197 devem corresponder ao ião $[M-H]^-$ de cada um dos compostos. O ião *m/z* 175 corresponde à perda de uma molécula de H_2O (18 Da) pelo ião *m/z* 193 $[M-H]^-$ e o ião *m/z* 147 pode formar-se a partir do *m/z* 175 por perda de 28 Da, equivalente a um grupo etileno ($-CH_2CH_2$) ou ao grupo CO (figura 3.117D). No entanto para o ião *m/z* 175 não se consegue encontrar uma justificação para a sua formação a partir do fragmento *m/z* 197, correspondente a uma perda de 22Da.

3.3.4.2. Análise de amostras de vinho Moscatel por LC-MS

As amostras de vinho Moscatel cedidas pela Comissão Vitivinícola Regional da Península de Setúbal (CVRPS) dos produtores JMF, HS e ACP, sem qualquer tratamento prévio, foram analisadas por LC-MS em modo SIR para os fragmentos *m/z* 207 (ião molecular $[M-H]^-$ do cafeato de etilo) e 197 (ião molecular $[M-H]^-$ do galhato de etilo) e obtiveram-se os traçados da figura 3.118. Foi possível confirmar que estes compostos estavam presentes na amostra através do tempo de retenção e do espectro de massa do composto, comparados com os padrões respectivos.

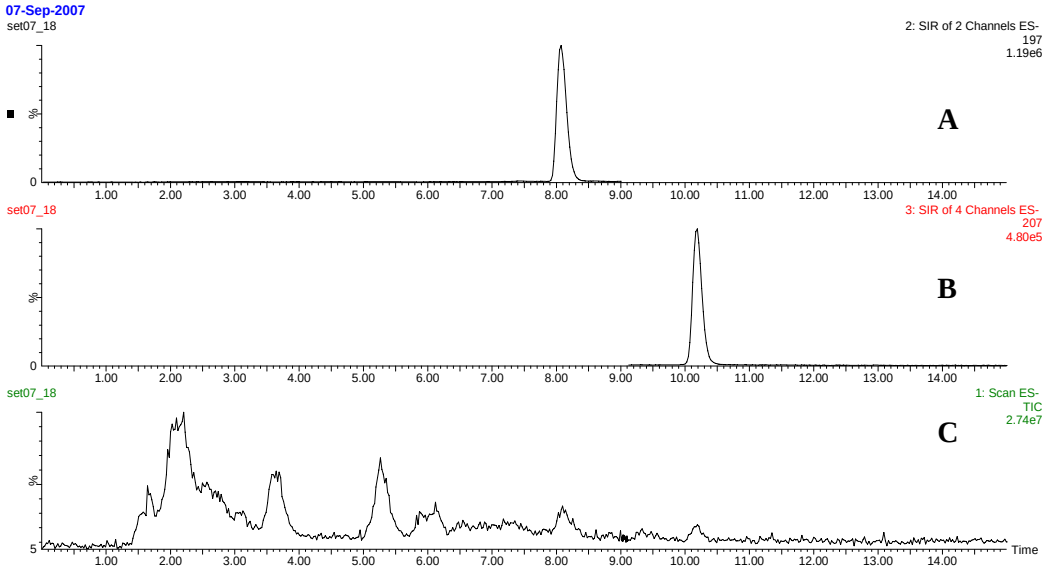


Figura 3.118. Cromatogramas de vinho Moscatel: (**A**) modo SIR para *m/z* 197; (**B**) modo SIR para *m/z* 207; (**C**) TIC

Na aquisição em modo SIR para os iões *m/z* 207, 197, 169 e 179 obtêm-se os cromatogramas apresentados na figura 3.119. O ião *m/z* 169 corresponde ao ião $[M-H]^-$ do ácido gálhico, que elui com um t_r de aproximadamente 3.6 min. No t_r de aproximadamente 10.2 min detecta-se o ião *m/z* 179, equivalente ao ião $[M-H]^-$ do ácido cafeico. Como já foi referido, estes iões *m/z* 169 e 179 também resultam da fragmentação dos iões *m/z* 197 do galhato de etilo e 207 do cafeato de etilo..

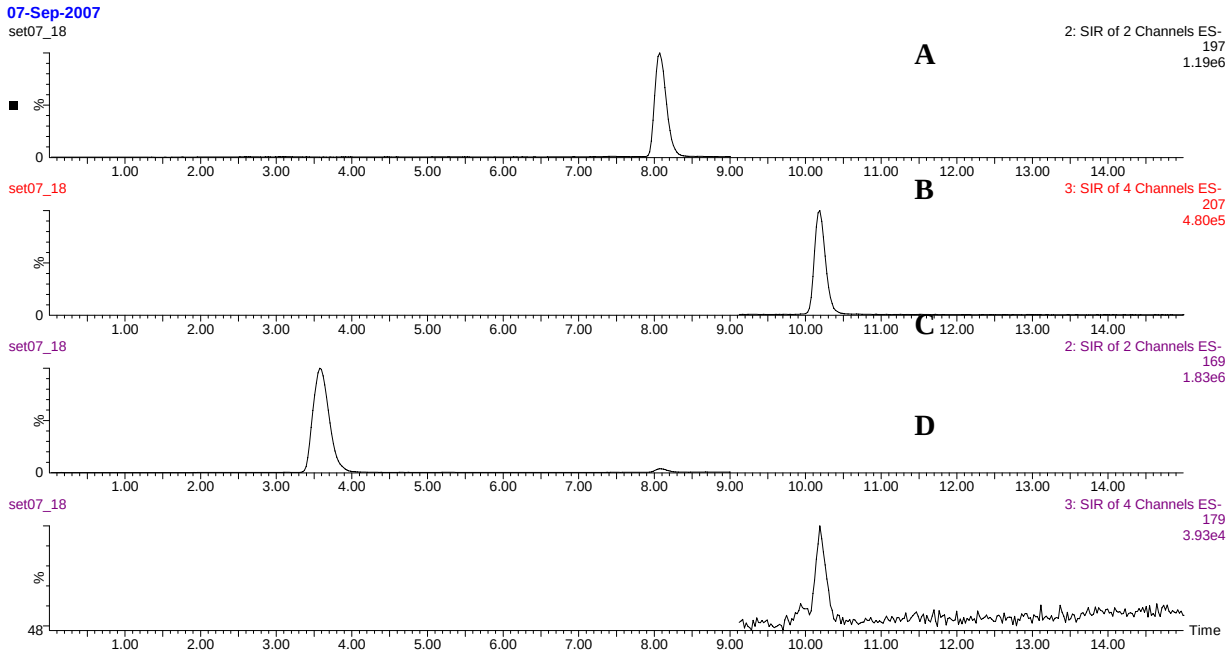


Figura 3.119 Cromatogramas (modo SIR) de um vinho Moscatel para iões: (**A**) *m/z* 197; (**B**) *m/z* 207; (**C**) *m/z* 169; (**D**) *m/z* 179

Para avaliar o efeito da CE no espectro de massa dos compostos efectuaram-se análises em que se variou este parâmetro e obtiveram-se os espectros das figuras 3.119. e 3.120.

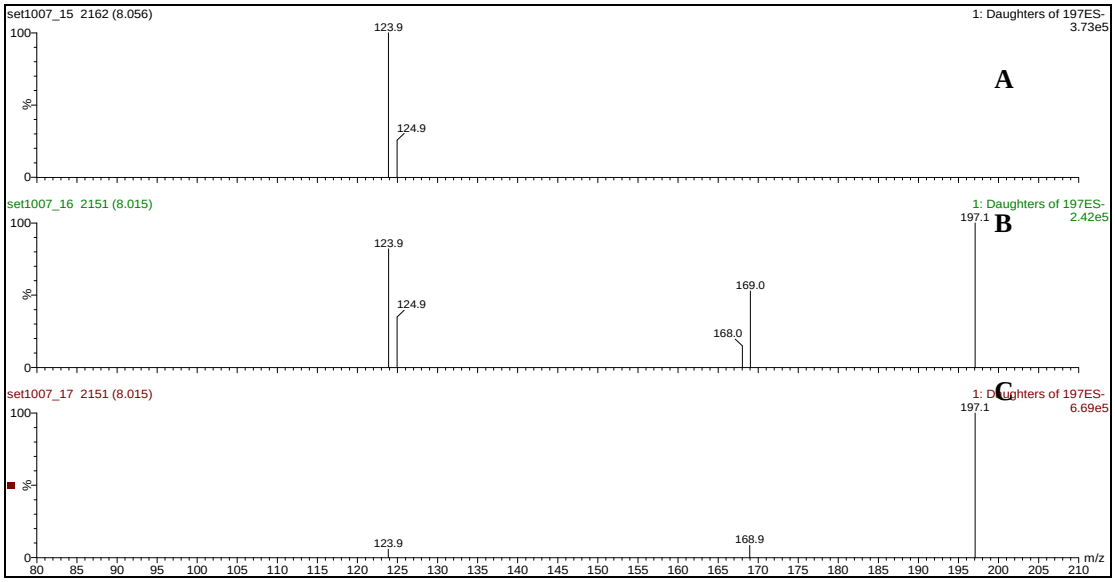


Figura 3.120. Espectro MS/MS do galhato de etilo (*m/z* 197) com diferentes valores de CE: (**A**) 25 V; (**B**) 15 V; (**C**) 10 V

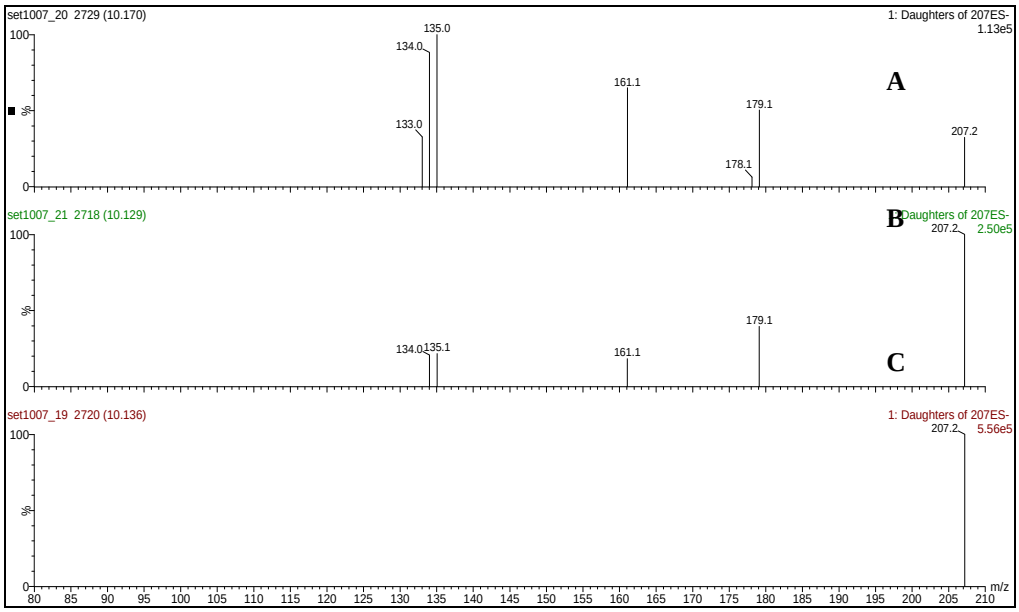


Figura 3.121 Espectro MS/MS do cafeato de etilo (*m/z* 207) com diferentes valores de CE: (**A**) 25 V; (**B**) 15 V; (**C**) 10 V

Quando se aplica uma energia de colisão inferior (10 V) detecta-se só o fragmento correspondente ao ião $[M-H]^-$ do composto. Para o galhato de etilo uma CE de 25 V é muito elevada e só se obtém o ião correspondente à sua fragmentação, enquanto que para o cafeato de etilo com esta mesma CE ainda é visível uma pequena quantidade do ião $[M-H]^-$.

Como não estava disponível no laboratório padrão de cumarato de etilo, pesquisou-se o fragmento correspondente *m/z* 191. Na aquisição em modo SIR para os fragmentos *m/z*= 191+207 e m/z= 197 foram obtidos os cromatogramas apresentados na figura 3.122, na qual são comparados os cromatogramas correspondentes a amostras dos três produtores de vinho Moscatel de Setúbal, tendo em conta os três ésteres etilícos: galhato de etilo (*m/z* 197), cafeato de etilo (*m/z* 207) e cumarato de etilo (*m/z* 191).

Os traçados de corrente iónica total, apresentados na figura anterior, mostram que os teores em galhato de etilo, cafeato de etilo e cumarato de etilo nas amostras são muito diferentes.

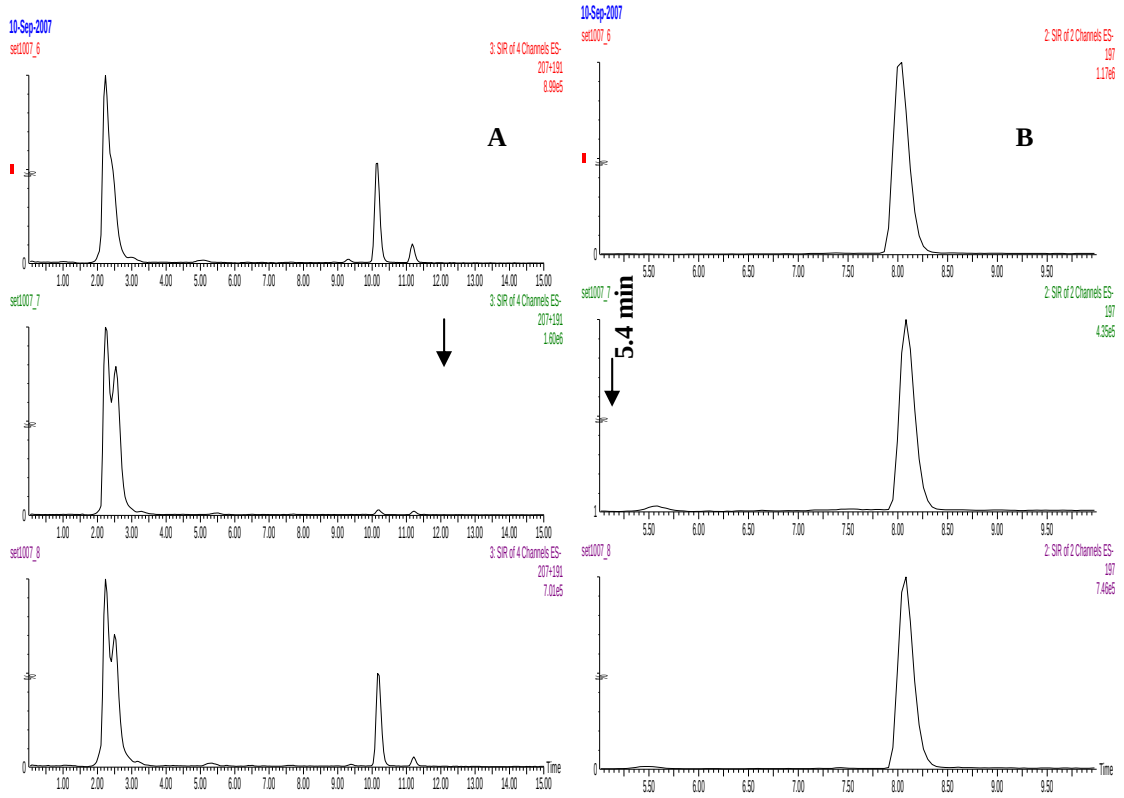


Figura 3.122. Cromatogramas SIR de amostras representativas de três produtores de vinho Moscatel de Setúbal para : (**A**) *m/z* 191+207 (**B**) *m/z* 197

Outro ponto importante a salientar nos resultados obtidos é o facto de no traçado a 197 que corresponde ao galhato de etilo ser detectado um pico com este fragmento com tempo de retenção inferior (t_r 5.4 min). Embora tivesse sido feita paralelamente a aquisição em modo SCAN, como o programa de análise cromatográfica é rápido podem estar a co-eluir vários compostos pelo que não foi possível confirmar qual o espectro de massa correspondente a este composto e o espectro de absorção obtido nestas condições é diferente do espectro tipo dos derivados dos ácidos benzóicos e assemelha-se a um ácido cinâmico, como se pode ver na figura 3.123.

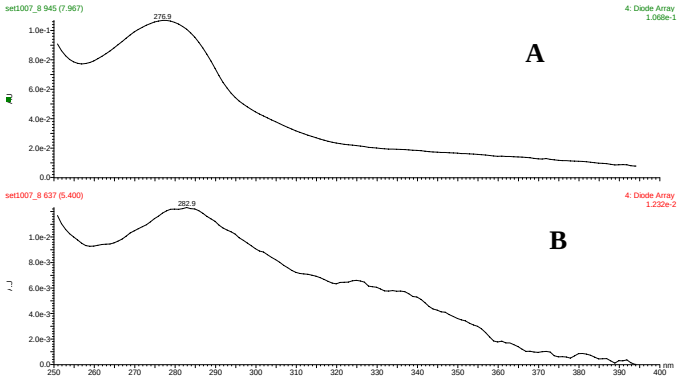


Figura 3.123. Espectros de absorção dos picos (**A**) t_r 7.967 min (galhato de etilo); (**B**) t_r 5.400 min

O mesmo acontece com os resultados adquiridos em modo SIR para *m/z* 191+207, em que o traçado de corrente iónica total apresenta dois picos mal resolvidos com t_r de aproximadamente 2.2 e 2.6 min. Estes picos correspondem à aquisição em modo SIR para o fragmento m/z 191, uma vez que na figura 3.118B (cromatograma em modo SIR para o fragmento *m/z* 207) não são detectados picos neste t_r. Aos 11.2 min é detectado outro composto para *m/z* 191, que deve corresponder ao cumarato de etilo. De acordo com os resultados obtidos, nas condições ensaiadas, este composto elui com um t_r superior ao do cafeato de etilo o que será de esperar em face da sua estrutura e para confirmar a sua presença pesquisou-se o fragmento (*m/z* 163) correspondente ao ácido cumárico. Para a mesma amostra de vinho Moscatel utilizaram-se dois valores diferentes de CE para fragmentação de *m/z* 191 e os resultados obtidos são apresentados na figura 3.124. O espectro de massa obtido com um valor de CE mais baixo apresenta o ião molecular $[M-H]^-$ *m/z* 191 e entre outros são detectados os iões *m/z* 163, 145 e 119 e estão de acordo com o esquema de fragmentação deste composto (figura 3.34) (*ver 3.2).* Assim foi possível confirmar a presença de cumarato de etilo nas amostras de vinho Moscatel com um t_r de 11.2 min. Nas condições usadas na análise por HPLC-DAD-FD-ED este pico elui aproximadamente aos 82.5 min.

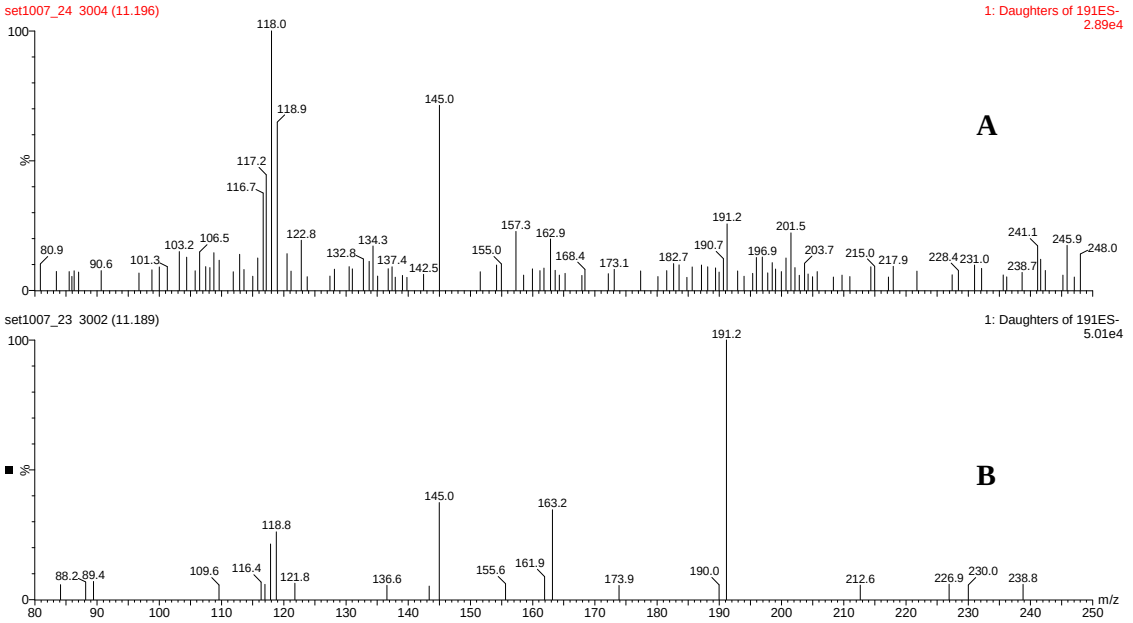
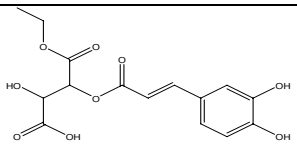
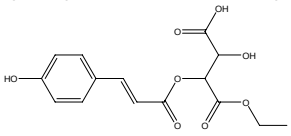
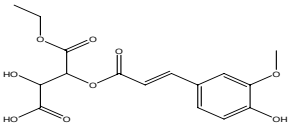
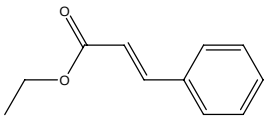
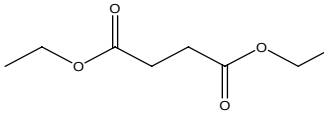


Figura 3.124. Espectro MS/MS cumarato de etilo (*m/z* 191) detectado em amostras de vinho Moscatel com diferentes valores de CE: (**A**) 15 V; (**B**) 25 V

Outros ésteres como **caftarato de etilo**, **cutarato de etilo**, **fertarato de etilo**, **cinamato de etilo** e **succinato de etilo** foram detectados em amostras de Champagne[155]

e na tabela 3.23. apresentam-se os valores de m/z para o ião $[M-H]^-$ respectivo, assim como o seu aducto com ácido fórmico $[M-H+46]^-$e os resultados dos ensaios MS/MS para os iões característicos destes ésteres etílicos.

Tabela 3.23. Estrutura, massa molecular e valores de *m/z* de $[M-H]^-$, aducto e MS/MS de alguns ésteres etilícos detectados em vinhos

Nome do composto	Fórmula	Massa molecular	$[M-H]^-$,	aducto	MS/MS
Caftarato de etilo		340	339	385	311
Cutarato de etilo		324	323	369	295
Fertarato de etilo		354	353	399	325
Cinamato de etilo		176	175	221	147
Succinato de dietilo		174	173	219	116

Tentou-se detectar a sua presença nas amostras a partir dos traçados em modo SIR (figura 3.125) para os iões característicos de alguns deles. Com base nos tempos de retenção previstos avaliou-se quais os picos que poderiam pertencer aos compostos pesquisados. Se correlacionarmos as estruturas e tempos de retenção dos ácidos gálhico, cafeico, cumárico e ferúlico e correspondentes ésteres do ácido tartárico e ésteres etílicos, poderemos prever a ordem de eluição de compostos como o caftarato, cutarato e fertarato de etilo (tabela 3.24.). De notar que os tr apresentados nesta tabela correspondem ao programa de análise mais lento utilizado na análise por LC-DAD-FD-ED.

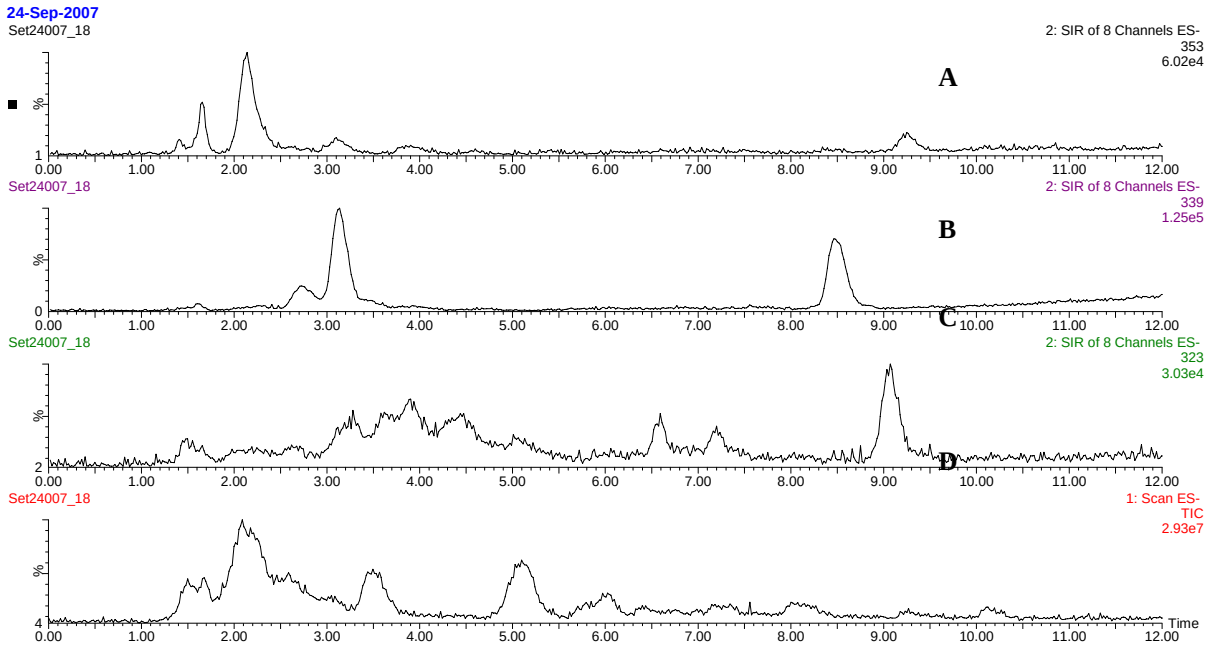


Figura 3.125. Cromatogramas de um vinho Moscatel no modo SIR para os iões: (**A**) *m/z* 353; (**B**), *m/z* 339; (**C**) *m/z* 323, (**D**) TIC

Tabela 3.24. Tempo de retenção, massa molecular (MM) dos ácidos e ésteres de ácido tartárico e de etanol

Composto	**t_r (min)**	**Composto**	**t_r (min)**	**Composto**	**t_r (min)**	**Composto**	**t_r (min)**
Ácido gálhico (MM=170)	10.20			Galhato etilo (MM=198)	39.62		
Ácido cafeico (MM=180)	31.27	Ácido caftárico (MM=312)	19.85	Cafeato etilo (MM=208)	69.53	Caftarato de etilo (MM=340)	< t_r cafeato de etilo
Ácido cumárico (MM=164)	43.35	Ácido coutárico (MM=296)	24.58	Cumarato etilo (MM=192)	82.5	Cutarato de etilo (MM=324)	< t_r cumarato de etilo
Ácido ferúlico (MM=194)	47.28	Ácido fertárico (MM=326)	31.57	Ferulato de etilo (MM=222)	> t_r cumarato de etilo	Fertarato de etilo (MM=354)	< t_r ferulato de etilo

A ordem de eluição está de acordo com o que é esperado, ou seja o caftarato de etilo (t_r= 8.5 min) deverá ter um tempo de retenção inferior ao cafeato de etilo (t_r= 10.1 min), em seguida deverá eluir o cutarato de etilo (t_r= 9.1 min) e finalmente o fertarato de etilo (t_r= 9.3 min). Para os compostos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos a polaridade é aumentada pelos grupos hidroxilo, os grupos metoxi (OCH_3) diminuem a polaridade e

os tempos de retenção aumentam. O caftarato de etilo apresenta no anel benzénico dois grupos OH (tabela 3.3.11), enquanto que o cumarato de etilo apenas apresenta 1 grupo OH e o ferulato de etilo além de 1 grupo OH também apresenta 1 grupo OCH_3.

3.3.4.3.Optimização das condições para análise por LC-DAD-FD

Soluções padrão de galhato de etilo (2 mgL^{-1}) e de cafeato de etilo (1mgL^{-1}) foram utilizadas para traçar o espectro de emissão (ver *2.7*) com vista à optimização das condições de detecção destes compostos por fluorescência. O espectro de absorção do galhato de etilo caracteriza-se por apresentar um máximo aos 272 nm enquanto que o espectro de absorção do cafeato de etilo apresenta dois máximos de absorção: 293 e 324 nm (*ver 3.2)*.

Dado que a fluorescência de um composto pode ser influenciada pelo solvente em que se encontra traçou-se o espectro de emissão do cafeato de etilo em diferentes solventes: (a) metanol; (b) sistema de eluentes H_3PO_4/acetonitrilo, dado que durante a análise cromatográfica e para o tempo de retenção do cafeato de etilo (1mgL^{-1}), a composição da fase móvel é constituída por 30% de uma solução de 0.10% de H_3PO_4 (eluente A) e 70% de uma solução com 40% de acetonitrilo e 0.10% H_3PO_4 (eluente B). Os espectros de emissão para os dois sistemas de solvente, como se pode observar na figura 3.126 mostram um máximo no comprimento de onda de 434 nm. Verifica-se no entanto que o tipo de solvente tem influência na intensidade de fluorescência do composto: a intensidade de fluorescência do cafeato de etilo em metanol é superior à intensidade de fluorescência no sistema de solventes usados (30% eluente A e 70% eluente B). Esta influência pode ser explicada pelo pH do eluente, do qual depende a fluorescência de compostos com substituintes ácidos ou básicos no anel aromático[156]. A fase móvel apresenta um pH 2.47 (pH do sistema de eluentes) e em face dos valores de pK do cafeato de etilo (pk_{a1}=8.69 e pk_{a2} =9.73), ao pH do eluente o composto encontra-se predominantemente na forma não ionizada que é menos fluorescente do que a forma ionizada.

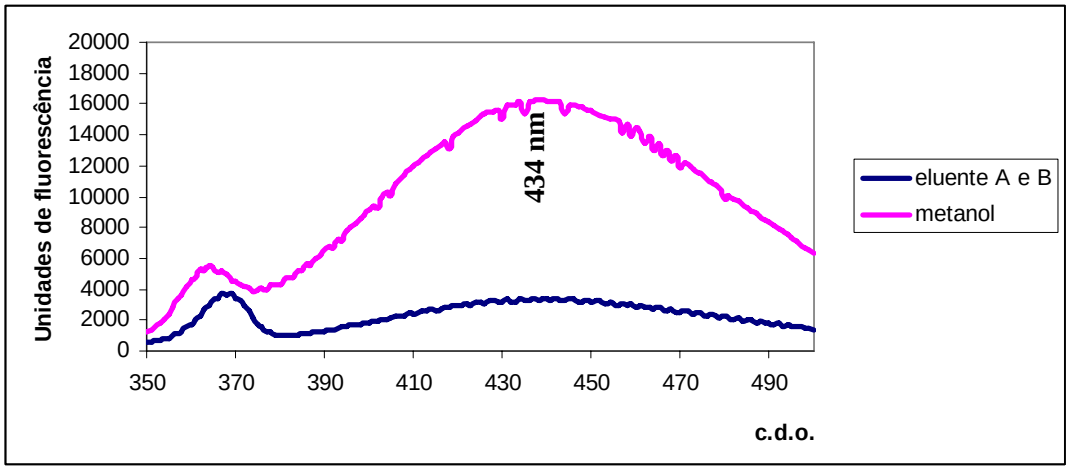


Figura 3.126. Espectro de emissão do cafeato de etilo para λ_{ex} de 324 nm

O espectro de emissão da solução do cafeato de etilo no sistema de eluentes H_3PO_4/acetonitrilo (Figura 3.127) para os dois c.d.o. de excitação: 293 e 324 nm mostra um máximo de emissão a 442 nm (λ_{em}) mais intenso com excitação (λ_{ex}) a 324 nm, o que tornará o método de detecção mais sensível.

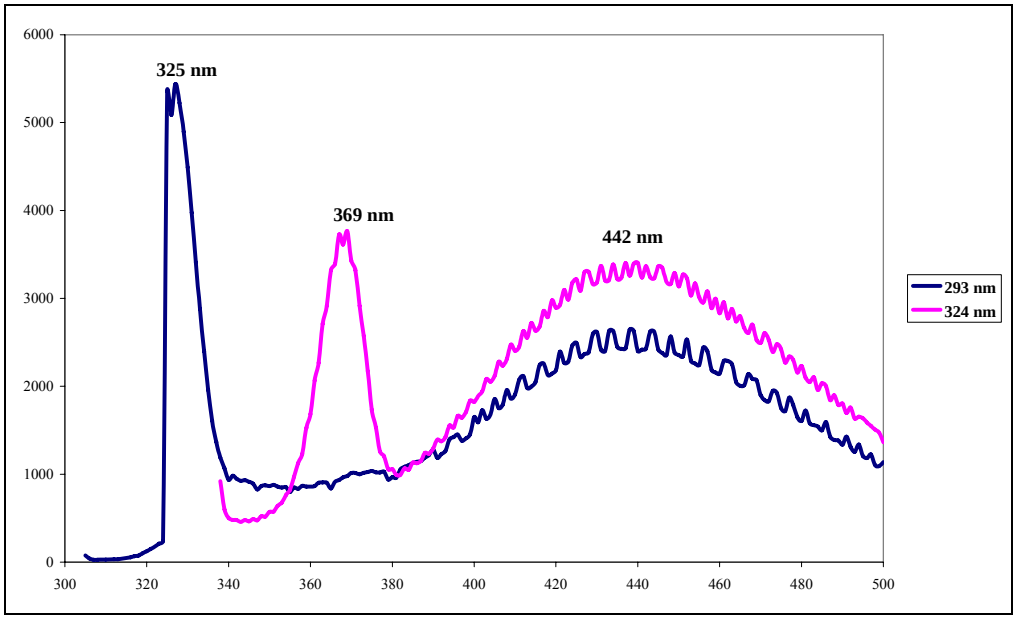


Figura 3.127. Espectro de emissão do cafeato de etilo no sistema de eluentes H_3PO_4/acetonitrilo para λ_{ex} de 293 e 324 nm

Aparece também no espectro outro máximo a λ_{em}: 369 nm que por ser um pico muito estreito não deverá ser usado, como tal as condições de quantificação seleccionadas para o cafeato de etilo foram: λ_{ex} = 324 nm e λ_{em} = 442 nm.

O espectro de emissão do galhato de etilo ($2mgL^{-1}$) foi traçado tal como se fez para o cafeato de etilo, com o solvente correspondente à composição da fase móvel ao t_r deste

composto: 67% de eluente A e 37% de eluente B. Foram seleccionados dois valores de λ_{exc}: 280 nm, (c.d.o. geralmente utilizado na análise dos compostos fenólicos) e 272 nm (corresponde ao seu máximo de absorção) e na figura 3.128 comparam-se os espectros de emissão para os dois c.d.o. de excitação.

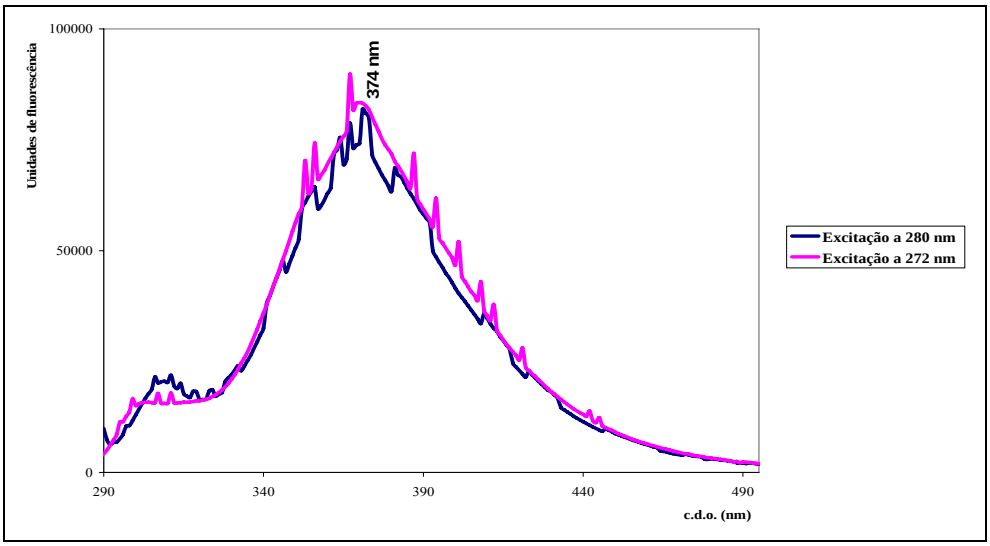


Figura 3.128. Espectro de emissão do galhato de etilo após excitação a 272 e 280nm

O máximo de emissão ocorre para o c.d.o. de 374 nm nos dois espectros de emissão e as diferenças observadas no espectro são muito pequenas, não alterando o comprimento de onda de emissão, pelo que ambos os comprimentos de onda de excitação poderão ser usados na quantificação do galhato de etilo. Para o trabalho a efectuar por LC foram seleccionadas as condições: λ_{ex} de 272 nm, por corresponder ao máximo de absorção, e λ_{em} de 374 nm correspondente ao máximo de emissão.

3.3.4.4. Quantificação dos ésteres etílicos em amostras de vinho Moscatel comercial de diferentes produtores

Após a optimização das condições de análise, as amostras de vinho Moscatel (n= 18) bem como soluções de padrões de diferentes concentrações de galhato de etilo e cafeato de etilo (*ver 2.5 e 2.6*) foram analisadas em duplicado utilizando os dois sistemas cromatográficos, (*ver 2.5 e 2.6)*. De referir que a quantificação por espectrometria de massa foi feita em modo SIR utilizando um gradiente de eluentes mais rápido (tempo de análise 15 min). Os cromatogramas obtidos na análise de uma solução padrão de galhato de etilo (10 mgL^{-1}) e de cafeato de etilo (10 mgL^{-1}) e de uma amostra de vinho Moscatel obtidos com os quatro detectores, por espectrometria de massa (MS), UV-vis (280 nm),

fluorescência (272/374; 324/442) e electroquímico são apresentados, a título ilustrativo na figura 3.129.

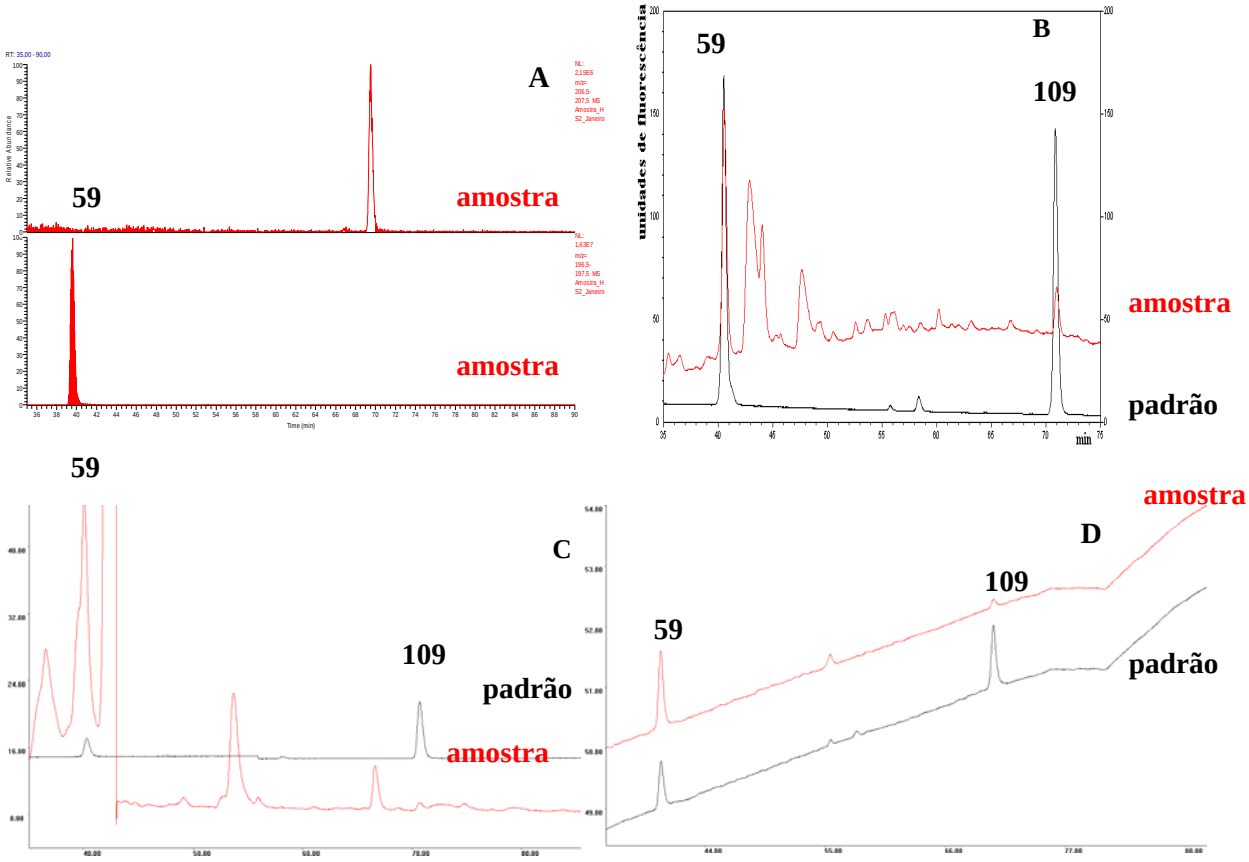


Figura 3.129. Cromatogramas de vinho Moscatel e solução padrão (10 mgL^{-1}) de galhato de etilo (**59**) e cafeato de etilo (**109**): (**A**) m/z 207 e 197, (**B**) c.d.o. 280 nm, (**C**) FD; (**D**) ED

Para a quantificação analisaram-se soluções de padrões de galhato de etilo e de cafeato de etilo em duplicado e os resultados referentes às curvas de calibração apresentam-se na tabela 3.25. A confirmação da presença dos ésteres etílicos nas amostras foi efectuada por sobrecarga com soluções de padrões.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados tendo em conta as concentrações dos padrões que dão origem a uma relação sinal/ruído (S/N) de 3/1 e de 10/1 respectivamente. O ruído foi medido usando-se o método RMS (Root Mean Square) a partir da análise do cromatograma de um branco (água) para todos os detectores. O valor mais baixo de concentração na recta de calibração corresponde ao limite de quantificação. Os valores mais baixos de limite de detecção e de quantificação foram obtidos na análise por LC-MS utilizando a fonte de ESI e efectuando a detecção em modo SIR. A detecção electroquímica para os dois compostos foi o método menos sensível obtendo-se valores superiores para os limites de detecção e de quantificação. O

galhato de etilo não foi quantificado com o detector de fluorescência, porque as condições de análise não permitem que o método seja suficientemente específico e este composto está mal resolvido de outro composto.

Tabela 3.25 Parâmetros para a quantificação do galhato de etilo e cafeato de etilo

		gama de trabalho (mgL^{-1})	equação	R^2	LD (mgL^{-1})	LQ (mgL^{-1})
Galhato de etilo	**LC-MS**	0.05 – 15[1]	y=31010x +7156,6	0.993	0.016	0.05
	LC-DAD	0.25 -15[2]	y = 465623x + 49269[1]	0.999	0.050	0.25
	LC-FD	1-15[3]	y = 10, 861x + 1,477	0.999	0.250	1.00
	LC-ED	1- 15[4]	y = 4,4439x + 1,0507	0.999	0.250	1.00
Cafeato de etilo	**LC-MS**	0.05 – 5[1]	y=54364,3x +902.7	0.996	0.016	0.05
	LC-DAD	0.25-5[2]	y = 1087860x + 23760[2]	0.997	0.050	0.25
	LC-FD	0.25 -5[3]	y = 24,977x + 2,8999	0.996	0.050	0.25
	LC-ED	1 – 10[4]	y = 5,3907x - 0,1228	0.998	0.250	1.00

[1] detecção por espectrometria de massa: galhato de etilo *(m/z*= 197) e cafeato de etilo (*m/z*= 207)

[2] detecção por detector de díodos a 272 nm para o galhato de etilo e 324 nm para o cafeato de etilo

[3] detecção por fluorescência: galhato de etilo λ_{exc}= 272 nm, λ_{em} = 374 nm e cafeato de etilo λ_{exc}= 324 nm, λ_{em} = 442 nm

[4] detecção electroquímica (ver condições em *2.5*)

Para a quantificação do cumarato de etilo por LC-DAD considerou-se a curva de calibração do ácido *p*-cumárico que foi obtida a partir das áreas dos picos detectados a 280 nm. Na análise por LC-MS considerou-se o valor da área do pico detectado ao m/z= 191.

Na tabela 3.26 apresentam-se os teores obtidos nas amostras. O facto de os resultados obtidos por detecção no UV serem normalmente superiores aos valores obtidos com detecção por massa pode ser atribuído a outros componentes das amostras estarem a interferir na determinação já que, como se viu no capítulo anterior ocorre co-eluição a este t_r.

Tabela 3.26. Concentração (valor médio), mgL^{-1}, nas amostras de vinho Moscatel de Setúbal

Amostra	Galhato de etilo (mgL^{-1})			Cafeato de etilo (mgL^{-1})				Cumarato de etilo (mgL^{-1})	
	MS[1]	DAD[2]	ED	MS[1]	DAD[2]	FD[4]	ED[5]	MS[6]	DAD[3]
JMF206	2.89	3.45	2.99	0.45	0.47	0.26	< LD	15689	0.69
JMF207	2.78	3.40	3.45	0.44	0.45	< LD	< LD	10949	0.55
JMF208	3.01	3.33	3,16	0.47	0.47	< LD	< LD	17677	0.69
JMF225	0.73	1.12	0.64	0.1	0.17	< LD	< LD	7015	0.35
JMF245	3.38	4.00	4.15	0.38	0.40	< LD	< LD	9154	0.42
JMF246	3.54	4.13	3.72	0.39	0.42	< LD	< LD	9704	0.44
JMF301	3.14	3.99	3.85	0.41	0.43	< LD	< LD	9969	0.61
JMF328	2.67	3.05	2,92	0.33	0.38	< LD	< LD	6580	0.29
JMF332	2.91	3.10	2.99	0.41	0.45	< LD	< LD	9628	0.38
ACP213	5.97	9.27	9.15	2.6	2.29	1.72	1.93	16916	0.95
ACP229	6.15	8.61	8.37	2.5	2.14	1.59	1.81	18619	1.03
ACP230	6.09	8.76	8.53	2.2	1.95	1.40	1.61	15309	1.00
ACP345	5.58	7.83	7.68	2.6	2.22	1.47	1.77	26243	1.13
ACP362	4.87	7.33	7.57	2.5	1.96	1.51	1.72	15270	0.80
ACP368	5.09	7.45	7.48	2.3	1.82	1.24	1.45	13632	0.67
HS209	6.02	8.53	8.24	1.8	1.53	1.10	1.49	24631	1.18
HS237	5.74	8.49	8.76	1.7	1.37	0.88	0.93	16753	1.04
HS353	6.16	7.59	8.24	1.2	0.94	0.61	< LD	15733	0.71

[1] detecção por espectrometria de massa: galhato de etilo *(m/z*= 197 e cafeato de etilo *m/z*= 207
[2] detecção por detector de díodos a 272 nm para o galhato de etilo e 324 nm para o cafeato de etilo
[3] quantificado a partir da curva de calibração do ácido *p*-cumárico (280 nm)
[4]detecção por fluorescência: galhato de etilo λ_{exc}= 272 nm, λ_{em} = 374 nm e cafeato de etilo λ_{exc}= 324 nm, λ_{em} = 442 nm
[5] detecção electroquímica
[6] valores das áreas dos picos cromatográficos m/z=191

Na figura 3.130 comparam-se as amostras tendo em conta os teores em galhato de etilo e cafeato de etilo obtidos com detecção por espectrometria de massa (MS). Verifica-se que as amostras provenientes do produtor JMF apresentam menores teores nos ésteres estudados. Estes resultados estão de acordo com os teores em ácido gálhico e ácido cafeico determinados para estas amostras que também são menores (*3.3.6).*

Os teores em galhato de etilo nos vinhos variaram entre 0.73 e 6.16 mgL^{-1} e são inferiores aos determinados em vinhos tintos[184] produzidos a partir da cultivar Nero d'Avola (6.27-18.84 mgL^{-1}) e da cultivar Cabernet Syrah e Petit Verdot (5.45-22.25 mgL^{-1}) analisados por LC-MS. No entanto, o teor encontrado nos vinhos Moscatel de Setúbal dos produtores ACP (7.33-9.27 mgL^{-1}) e HS (7.59-8.53 mgL^{-1}) aproxima-se dos teores encontrados em vinhos brancos de origem italiana[73] (7.4 mgL^{-1}) detectados por UV.

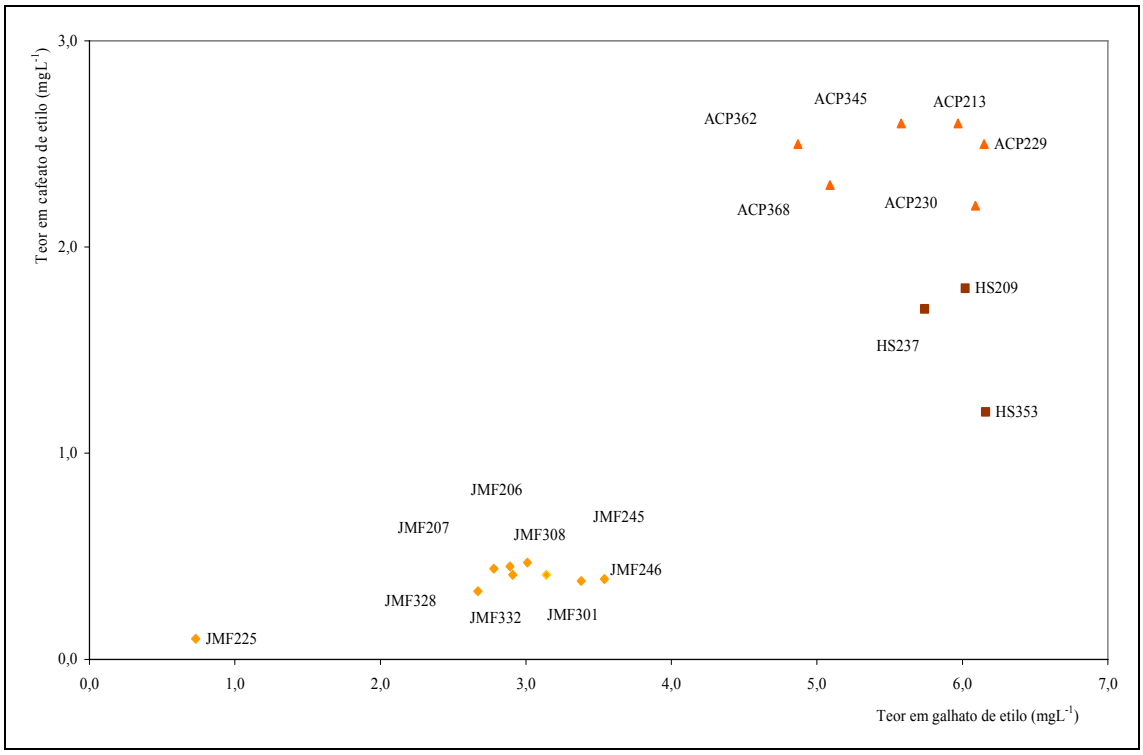


Figura 3.130. Comparação dos teores de galhato de etilo e cafeato de etilo obtidos por LC-MS

Makris [41] *et al.,*(2003) detectaram em vinhos brancos italianos concentrações em cafeato de etilo de 10 a 150 mgL^{-1}, o que é uma gama muito superior à detectada nos vinhos Moscatel (0.38-2.6 mgL^{-1}) com a mesma técnica (LC-MS), no entanto os teores determinados em vinho sherry[68] (n.d. a 3.47 mgL^{-1}) aproximam-se dos teores detectados nos vinhos Moscatel .

Para todas as amostras analisadas as concentrações em galhato de etilo (1.12 -9.27 mgL^{-1}) são superiores às detectadas para os outros ésteres etílicos: cafeato de etilo (0.17-2.29 mgL^{-1}) e cumarato de etilo (0.29 -1.13 mgL^{-1}), o que é explicado pelo facto do ácido gálhico também existir nas amostras de vinho em teores mais elevados (3.23-49.30 mgL^{-1}) do que o ácido cafeico e cumárico.

Relativamente aos métodos de análise utilizados verifica-se que os resultados obtidos por detecção no UV são superiores aos valores obtidos com detecção por massa, o que pode ser atribuído ao facto de outros compostos nas amostras estarem a interferir na determinação já que, sendo as amostras complexas, é difícil obter picos completamente resolvidos e há compostos que co-eluem. No entanto os resultados obtidos com o detector electroquímico são concordantes com os da detecção no UV.

Na detecção por espectrometria de massa observa-se um menor teor em galhato de etilo em comparação com os outros detectores (DAD e ED).

Os resultados obtidos na detecção no UV são concordantes com os obtidos com a detecção por espectrometria de massa (R^2=0.9924). No entanto os valores obtidos para o teor em cafeato de etilo com os detectores de fluorescência (R^2=0.9275) e electroquímico (R^2=0.7551) são inferiores.

3.3.5. Identificação e Quantificação de estilbenos em amostras de vinho Moscatel de Setúbal

A identificação de estilbenos (resveratrol e piceid) nas amostras de vinhos foi efectuada por LC-DAD-MS e posteriormente procedeu-se à quantificação do *t*-resveratrol por LC-DAD-FD-ED em amostras recolhidas durante o processo de vinificação do vinho Moscatel de Setúbal e em amostras obtidas no comércio.

3.3.5.1. Identificação do t-resveratrol em amostras por LC-DAD-MS

A identificação do *t*-resveratrol por espectrometria de massa foi apenas efectuada em algumas amostras de vinho Moscatel em estudo.

Foram comparados os resultados obtidos na análise de *t*-resveratrol quando se usou uma fonte de APCI e ESI em modo positivo sendo o fluxo de fase móvel de 0.700 $mLmin^{-1}$ foram comparados: o limite de detecção (LOD) para a fonte de APCI era inferior (10 mgL^{-1}) relativamente à fonte de ESI (100 mgL^{-1}). A utilização de uma coluna de dimensões mais pequenas (10 cm × 2.1 mm) e a redução do fluxo da fase móvel para 0.250 $mLmin^{-1}$ permitiu que o limite de detecção do método[210] diminuísse para 1 mgL^{-1}. Na figura 3.131 comparam-se os cromatogramas obtidos em modo SIR (*m/z*= 229) a partir de um extracto de vinho Moscatel de Setúbal obtido no produtor C após 1 mês de maceração e uma solução de *t*-resveratrol de concentração 120 mgL^{-1}. Para a solução padrão foi detectado um pico com t_r= 9.54 min e um pico com o mesmo t_r foi detectado na amostra.

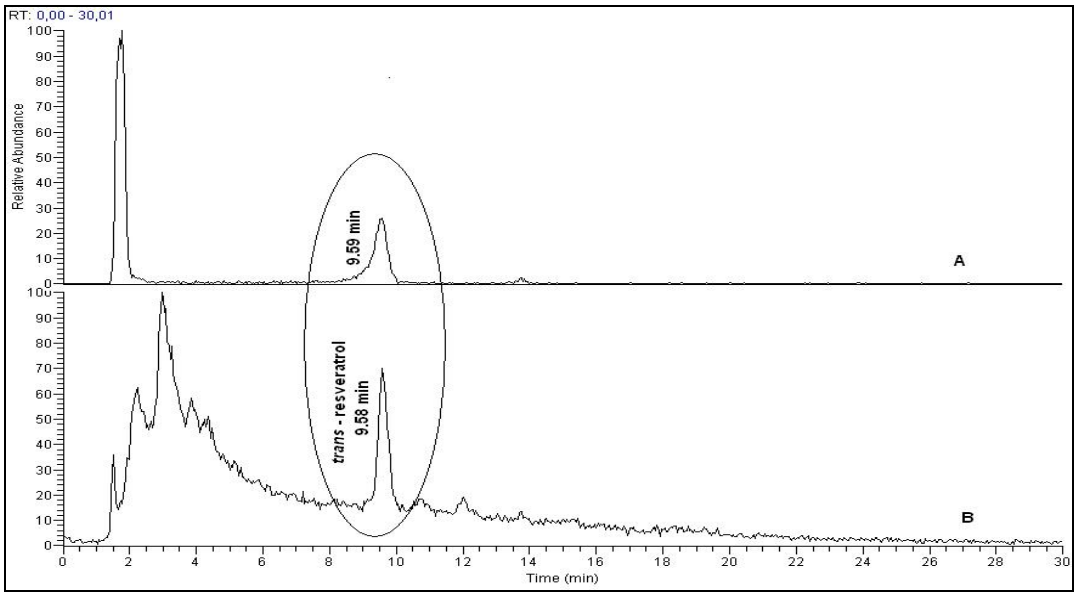


Figura 3.131. SIR ião *m/z* 229: **(A)** solução padrão de *t*-resveratrol 120 mgL^{-1} e **(B)** extracto de vinho Moscatel de Setúbal C_1

Para confirmar a identificação do *t*-resveratrol nas amostras de vinho Moscatel, o espectro de MS/MS obtido pela fragmentação do ião $[M-H]^+$ m/z 229 da solução padrão foi comparado com o espectro obtido na fragmentação do mesmo ião na amostra.(figura 3.132).

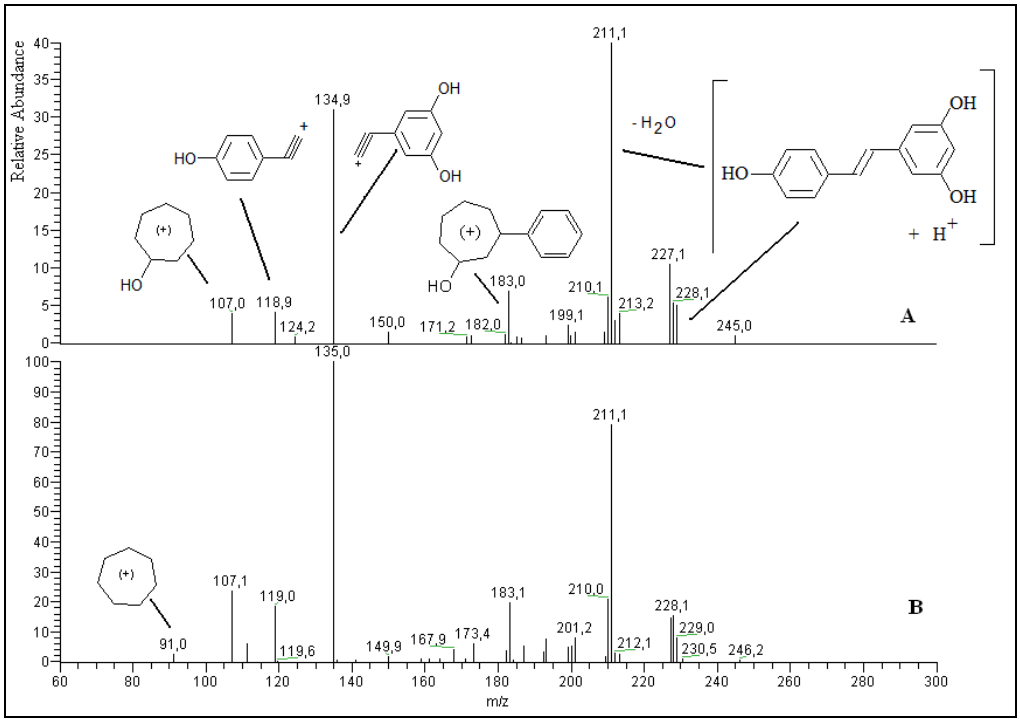


Figura 3.132. Espectro de massa:(**A**) solução padrão de *t*-resveratrol (120 mgL^{-1}); (**B**) extracto de vinho Moscatel de Setúbal C_1 e fragmentos possíveis

No espectro de massa são detectados os fragmentos com *m/z*: 107.0, 118.9, 134.9, e 211.1. Alguns destes iões já foram explicados por outros autores[211], nomeadamente o *m/z* 107.0 e 211.1: o ião *m/z* 211.1 corresponde à perda de uma molécula de água (18 Da) e o fragmento com *m/z* 107.0 é originado através da perda de 122 Da e de rearranjo estrutural (C_7H_7O). O fragmento *m/z* 91, que apenas é detectado no espectro de massa do extracto de vinho Moscatel de Setúbal, corresponde à perda de um fragmento neutro de 16 Da. Relativamente aos fragmentos *m/z* 118.9, 134.9 e 183.0, que se formam pela perda de 110, 94 e 46 Da respectivamente, apresenta-se na figura 3.133 uma proposta de fragmentação e possíveis estruturas para os fragmentos formados.

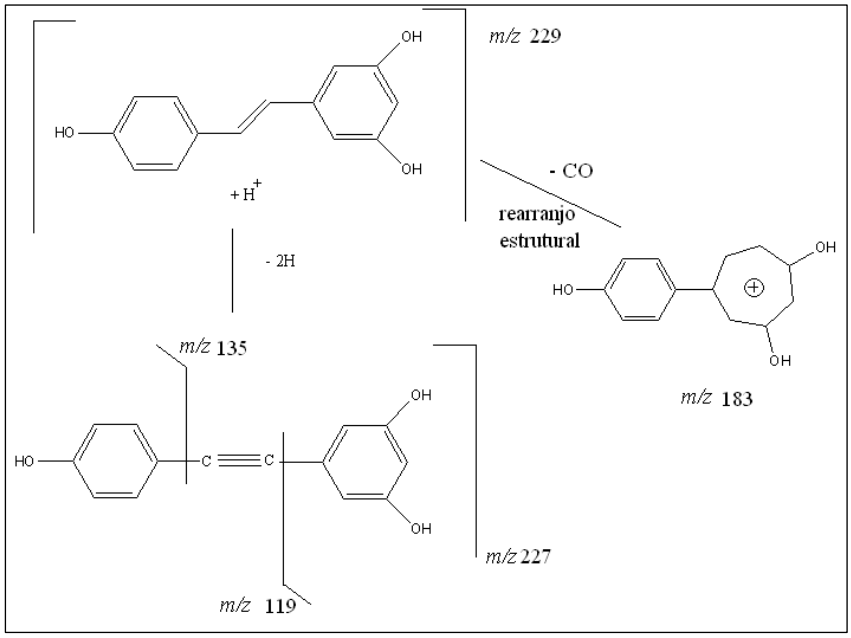


Figura 3.133. Proposta de fragmentação para os iões *m/z* 119, 135 e 183

Na análise da solução de *t*-resveratrol por LC-MS verifica-se o aparecimento de um pico com o tempo de retenção de 13.75 min. O valor de *m/z* obtido em modo SIR é 229 coincidente com o do *t*-resveratrol. Alguns fragmentos do *m/z* 229 obtidos para os dois picos são semelhantes: 119; 135 e 211, indicativos da presença do *c*-resveratrol, que se pode ter formado por fotoisomerização do *t*-resveratrol.

3.3.5.2. Optimização das condições para análise do t-resveratrol por LC-FD

Os espectros de absorção (gama de c.d.o. 200-400 nm) e emissão (gama de c.d.o. 300-500 nm) de uma solução padrão *t*-resveratrol ($1 mgL^{-1}$) foram traçados com o objectivo de optimizar a detecção por fluorescência na análise por LC das amostras de vinho Moscatel. A solução padrão foi preparada em solução constituída por 35% do eluente A

(H_3PO_4 0.10%) e 65% do eluente B (H_3PO_4 0.10%/ acetonitrilo 40%). O espectro obtido apresenta um máximo de absorção no intervalo de 300 a 320 nm, resultado que está de acordo com dados da literatura (Trela[212] *et al* 1996). O valor da absortividade molar obtida para o *t*- resveratrol neste solvente a 306 nm (32000 $mol^{-1}Lcm^{-1}$) é semelhante ao valor obtido por Trela[212] *et al* (1996) (29 452 $mol^{-1}Lcm^{-1}$ em metanol) para o mesmo c.d.o. e também por Lopez[213] *et al*., (2001) a 308 nm (30000 mol^{-1} Lcm^{-1} em etanol.

Na figura 3.134 apresenta-se o espectro de emissão da solução de *t*-resveratrol utilizando dois c.d.o. de excitação 300 e 306 nm e os resultados mostram que o *t*-resveratrol apresenta um máximo de emissão (λ_{em}) entre 370 e 390 nm.

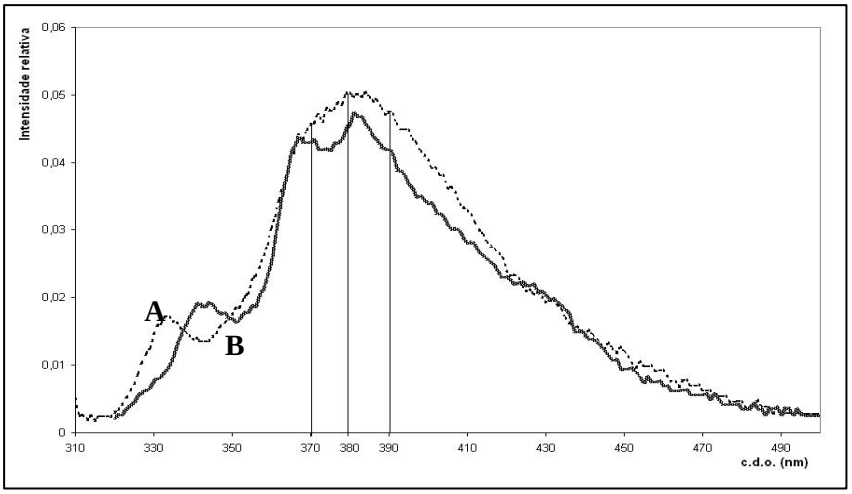


Figura 3.134. Espectro de emissão de uma solução padrão de *t*-resveratrol (1.0 mgL^{-1}) dissolvido em mistura de eluentes após excitação a c.d.o. (**A**) 300 nm e (**B**) 306 nm

A intensidade de emissão após excitação a 300 nm é ligeiramente superior à observada para a excitação a 306 nm. Para proceder à detecção do *t*-resveratrol por LC-FD foram utilizadas as seguintes condições[78,87]: c.d.o. de excitação (λ_{ex}) 300 nm e c.d.o. de emissão (λ_{em}) 390 nm.

3.3.5.3 Quantificação do t-resveratrol em amostras de vinho Moscatel

Para a quantificação do *t*-resveratrol nos vinhos estudados de diferentes produtores, correspondentes a diferentes fases do processo de vinificação e ainda em amostras comerciais, analisou-se, em duplicado, soluções padrão na gama de concentrações de 0.075 a 8.0 mgL^{-1} e foram medidas as áreas dos picos obtidos após detecção por

absorção no UV a 306 nm, fluorescência ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 300/390 nm) e electroquímica. Os resultados destes ensaios de calibração são apresentados na tabela 3.27.

Tabela 3.27. Parâmetros de quantificação do *t*-resveratrol

Detector	Gama de trabalho (mgL^{-1})	Equação	r^2	LD[a] (mgL^{-1})	LQ[b] (mgL^{-1})
Uv-vis (306 nm)	0.075 – 5.0	y=744531x – 92367	0.9920	0.020	0.060
FD	0.075 – 5.0	y=329.77x – 36.149	0.9953	0.010	0.030
ED	1.35 – 8.0	y=3.9928x – 0.6105	0.9973	0.45	1.35

[a] LD, limite de detecção (S/N=3); [b] LQ, limite de quantificação (S/N=10)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados considerando-se a concentração do padrão *t*-resveratrol que dava a razão sinal/ruído (S/N) 3/1 e 10/1 respectivamente. O ruído foi determinado aplicando-se o método Root Mean Square (RMS) ao cromatograma obtido na análise de um branco para o tempo de retenção aproximado do composto em estudo. Os limites de detecção e quantificação mais baixos foram obtidos na detecção por fluorescência. Para a detecção electroquímica os limites obtidos foram os mais elevados (tabela 3.27). As concentrações correspondentes aos limites de detecção e quantificação foram confirmados procedendo-se a injecções repetidas (n=6) das soluções padrão correspondente aos limites de detecção e de quantificação para os três detectores.

A repetibilidade das áreas dos picos foi também testada pela injecção repetida (n=6) da solução padrão *t*-resveratrol 1.75 mgL^{-1}. Os valores de repetibilidade, expressos em desvio padrão relativo (RSD), foram mais baixos para a detecção por fluorescência (0.5%) do que para a detecção no UV e electroquímica (1.5%).

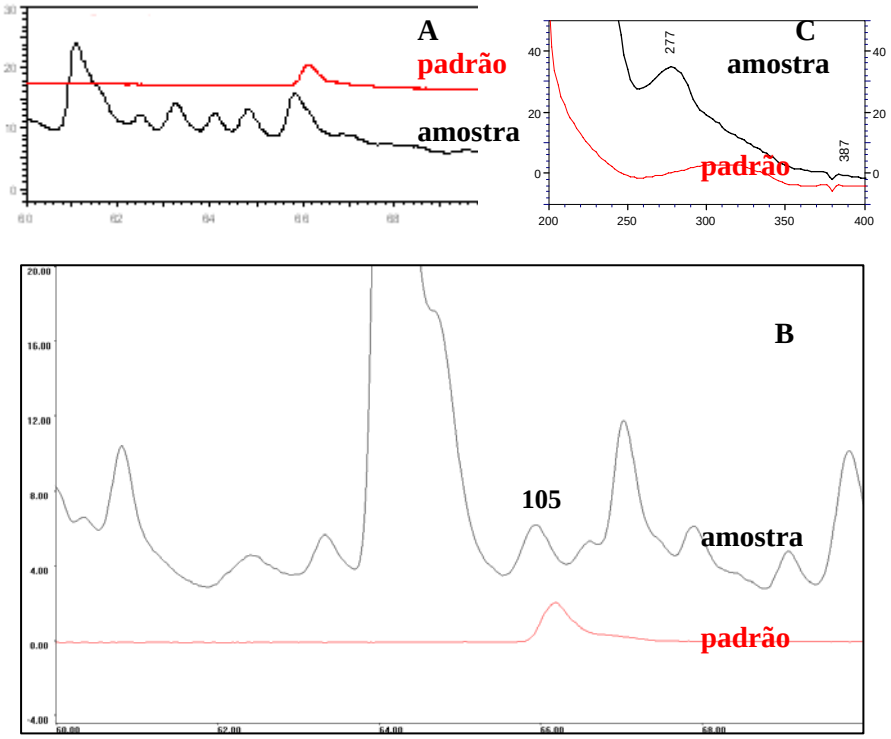


Figura 3.135. Cromatogramas de solução padrão do *t*-resveratrol (0.50 mgL^{-1}) e vinho Moscatel: (**A**) c.d.o. 300 nm, (**B**) FD (300/390 nm); (**C**) Espectros de absorção. **Identificação: 105.** *t*-resveratrol

A confirmação da presença de *t*-resveratrol nas amostras foi efectuada após sobrecarga de uma amostra com padrão e posterior análise. O espectro de absorção do pico presente na amostra ao t_r do resveratrol apresenta um máximo de absorção a 275 nm (figura 3.135C), contudo também absorve entre 300 a 320 nm. Estes resultados podem ser explicados pela co-eluição com outro composto, que interfere na quantificação do *t*-resveratrol quando se utiliza o detector de díodos. Deste modo pode concluir-se que a utilização deste modo de detecção para análise deste tipo de amostras pode ser difícil e conduzir a resultados incorrectos (por excesso).

Na detecção electroquímica o teor de *t-resveratrol* nas amostras analisadas é inferior ao LOD determinado. Para utilizar este modo de detecção na quantificação deste composto seria necessário preparar extractos mais concentrados ou então alterar as condições analíticas do detector. Em face dos resultados obtidos o detector de fluorescência (figura 3.135B) foi o escolhido para proceder à quantificação dos teores em *t*-resveratrol nas amostras de vinhos.

Analisadas as amostras do ensaio de vinificação provenientes do produtor B, apresentam-se na figura 3.136 os resultados correspondentes à evolução do teor deste composto nas amostras recolhidas.

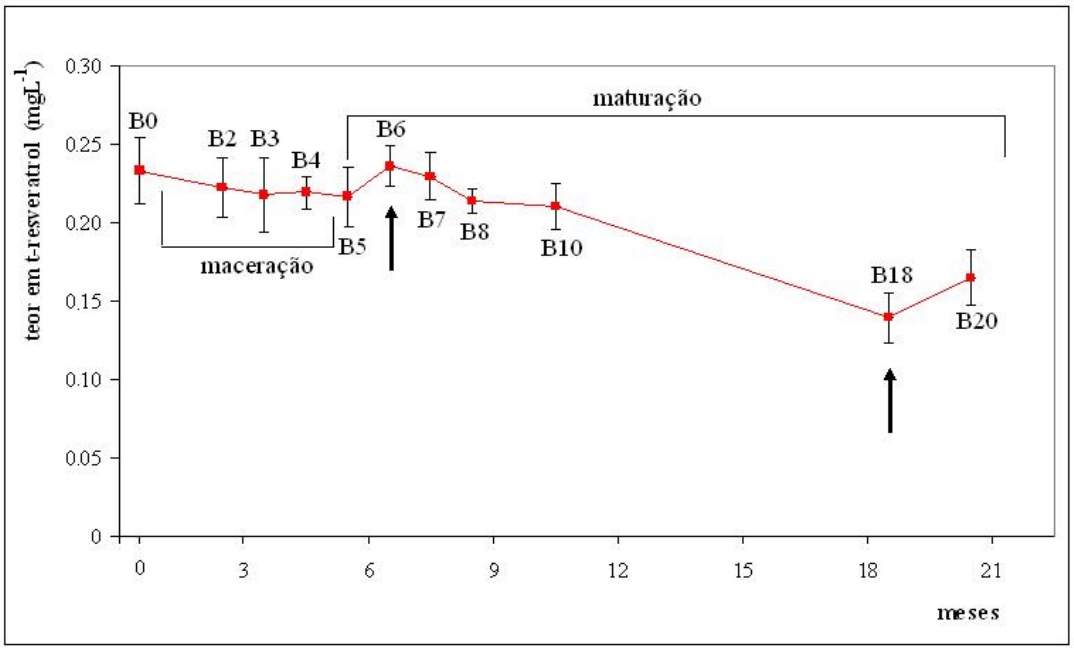


Figura 3.136. Evolução do teor (média ±intervalo de confiança) em *t*-resveratrol durante a vinificação do vinho Moscatel de Setúbal

Durante o processo de maceração (4 meses) a concentração de *t*-resveratrol não apresenta diferenças significativas (valor médio 0.22 mgL^{-1}). Os resultados obtidos estão de acordo com dados publicados que sugerem que, uma maceração prolongada após um processo de fermentação alcoólica, não provoca um aumento no teor deste composto[214]. O teor médio em *t*-resveratrol detectado para estas amostras é inferior ao detectado em amostras vinificadas a partir de uvas das castas Periquita, Roupeiro e Tinta Roriz (2-2.5 mgL^{-1}) e analisadas por LC-DAD sete dias após o final da fermentação[214].

Após a maceração o vinho foi separado das massas e o líquido resultante da prensa foi adicionado ao vinho (B_5). Os resultados obtidos mostram que não existem diferenças entre a amostra B_5 e as amostras recolhidas durante o processo de maceração. Posteriormente o vinho foi transferido para outra cuba e misturado com outros vinhos do mesmo ano de vinificação. Na amostra B_6 observa-se um aumento do teor em *t*-resveratrol (0.24 mgL^{-1}) provavelmente devido a diferenças na composição fenólica dos vinhos misturados. Os resultados mostram que durante o processo de maturação o conteúdo em *t*-resveratrol diminui lentamente alcançando um teor de 0.14 ± 0.02 mgL^{-1} após 18 meses. Como não é adicionado SO_2 a estes vinhos, o decréscimo na concentração pode dever-se a processos oxidativos que tenham ocorrido nas amostras.

Foram analisadas amostras dos outros produtores nas mesmas fases do processo de vinificação e para a amostra do produtor A sujeita a envelhecimento em madeira foi

também recolhida e analisada uma amostra. Os resultados obtidos apresentam-se na tabela 3.28.

Tabela 3.28 Concentração (média±intervalo de confiança) do *t*-resveratrol (mgL^{-1}) em amostras recolhidas nos diferentes produtores para diferentes fases do processo de vinificação

Produtor	Vinificação		
	Maceração	**Maturação**	**Envelhecimento em madeira**
A	0.15 ± 0.01 (A_3)	0.13 ± 0.02 (A_{10})	0.13 ± 0.01 (A_{18})
B	0.22 ± 0.02 (B_3)	0.21 ± 0.01 (B_{10})	--------
		0.17 ± 0.02 (B_{20})	
C	0.35 ± 0.01 (C_3)	0.38 ± 0.03 (C_{10})	--------
		0.28 ± 0.03 (C_{20})	

Os resultados mostram que a concentração do *t*-resveratrol em vinhos do produtor A é menor do que a concentração detectada nos vinhos dos outros produtores. Para a mesma fase de vinificação observa-se que entre amostras dos vários produtores existem diferenças estatisticamente significativas para um grau de significância de 0.05. O valor de pH (4.42) determinado para a amostra do produtor A na fase de maceração é superior aos valores obtidos para os produtores B e C (3.65 e 3.60 respectivamente) e este valor elevado e os baixos teores de *t*-resveratrol poderão estar relacionados[85,215]. Dados fornecidos pelos produtores nesta fase de vinificação confirmam os obtidos experimentalmente: pH= 4.0-4.2 (produtor A), pH=3.7 (produtor B) e pH=3.5 (produtor C).

O teor de *t*-resveratrol foi analisado nas amostras comerciais adquiridas no mercado correspondentes a estes produtores (fez-se apenas um ensaio por amostra). Na figura 3.137 apresentam-se os resultados obtidos para os 3 produtores. Para o produtor JMF (não considerando a amostra cuja concentração está abaixo do limite de detecção do método), a concentração de t-resveratrol foi de 0.15 ± 0.02 mgL^{-1} e para os produtores ACP e HS foram respectivamente: 0.18 ± 0.01 mgL^{-1} e 0.15 ± 0.01 mgL^{-1}

A amostra JMF225 estagiou em casco de madeira durante 20 anos e o seu teor em *t*-resveratrol é superior ao das outras amostras. Dado que não se possui dados sobre a composição química inicial deste vinho, pode supôr-se que as uvas utilizadas na vinificação, poderiam apresentar um teor elevado em *t*-resveratrol e por outro lado o processo de vinificação também poderia favorecer uma maior concentração deste

composto. Verificou-se que os valores mais baixos em fenóis totais das amostras correspondem também a teores mais baixos de resveratrol.

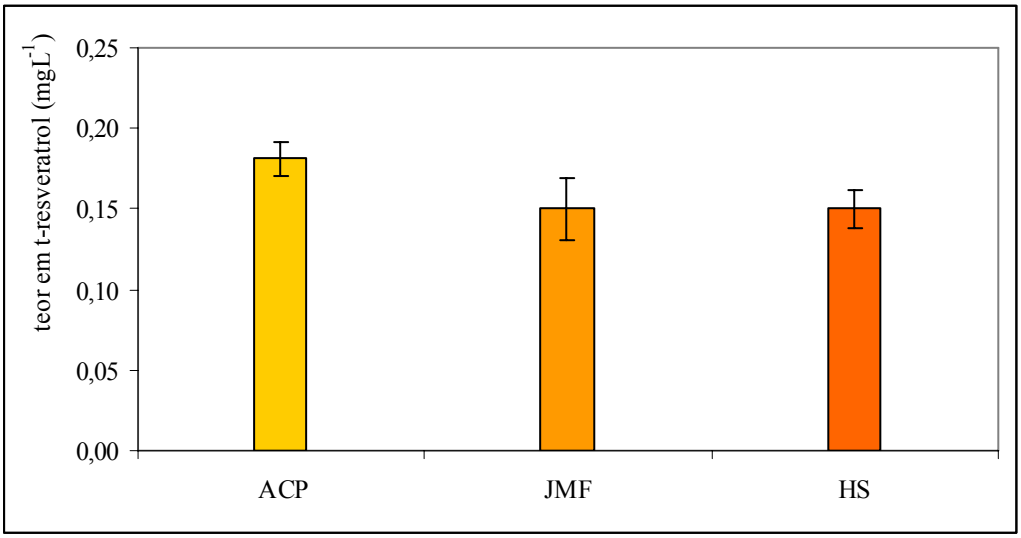


Figura 3.137. Teor em *t*-resveratrol nas amostras dos produtores ACP, JMF e HS

Os teores de *t*-resveratrol detectados em algumas das amostras analisadas são mais elevados do que os teores descritos na literatura para vinhos brancos e rosés (*ver tabela 1.3*), o que pode ser explicado pelo facto do vinho Moscatel incluir no seu processo de vinificação uma fase de contacto pelicular (maceração). Contudo o conteúdo em *t*-resveratrol é menor do que o apresentado em amostras de vinho fortificado dos Açores (0.3-2.1 mgL^{-1}) o qual foi analisado por LC com detecção no UV[47].

Para a pesquisa de outros estilbenos (*t*-piceid e *c*-piceid) nos vinhos Moscatel estudados foi efectuada a hidrólise enzimática com *β*-glucosidase da amostra de vinho Moscatel C3. As condições de hidrólise (tempo e a temperatura) foram escolhidas de acordo com dados descritos na literatura[164]: o composto hidrolisa totalmente ao fim de 9 h de incubação com a enzima *β*-glucosidase a 50ºC. Após hidrólise a amostra de vinho Moscatel C3 foi analisada por LC-DAD-ED e o cromatograma obtido a c.d.o. de 306 nm (máximo de absorção do *t*-piceid) foi comparado com o da amostra inicial (figura 3.138).

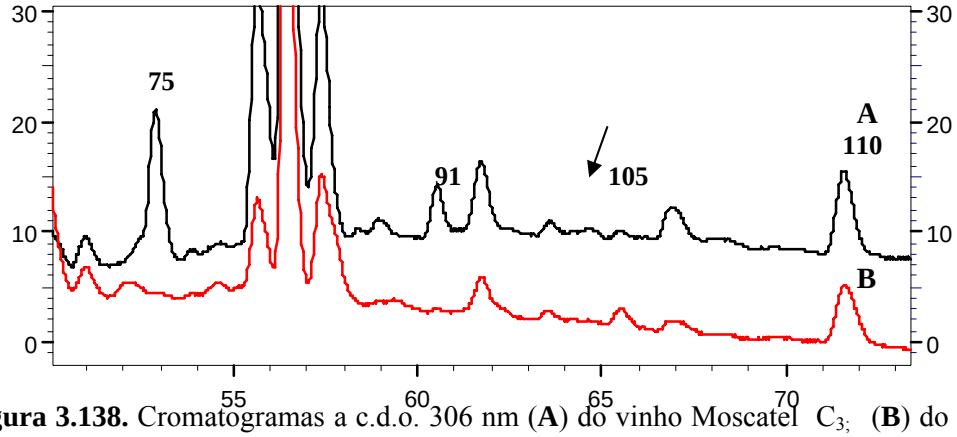


Figura 3.138. Cromatogramas a c.d.o. 306 nm (**A**) do vinho Moscatel C_3; (**B**) do vinho Moscatel C_3 após hidrólise enzimática. **Identificação: 75**. *t*-piceid; **91**. *c*-piceid; **105**. *t*-resveratrol; **110.** *c*-resveratrol

Nos cromatogramas apresentados o *t* (pico **75**) e o *c*-piceid (pico **91**) eluem aproximadamente nos tempos de retenção de 53 e 60 min respectivamente. Após reacção enzimática os picos referentes a estes compostos não são detectados (figura 3.138B). Nesta situação seria de esperar que os picos correspondentes ao *t*-resveratrol (pico **105**) e *c*-resveratrol (pico **110**) apresentassem uma área superior devido à quebra da ligação glucosídica no piceid e formação da respectiva aglícona (resveratrol) mas tal não se verificou.

Nos cromatogramas obtidos com o detector electroquímico, para estas amostras, C_3 antes e após a hidrólise enzimática, não são detectados os picos correspondentes ao piceid (*t* e *c*) e resveratrol (*t* e *c)* o que pode ser justificado pelo teor destes compostos nas amostras ensaiadas ser inferior ao limite de detecção do método, não fornecendo por isso mais informação.

Na figura 3.139 apresenta-se uma estimativa da concentração em *t*-piceid, *c*- piceid e também em *c*-resveratrol, detectada nas amostras dos produtores A, B e C em várias fases do processo de vinificação (maceração, maturação e envelhecimento). Os valores foram estimados com base na recta de calibração do *t*-resveratrol (*ver tabela 3.27*). Os λ_{ex} e de λ_{em} utilizados na quantificação do *c*-resveratrol, *t*-piceid e *c*-piceid nas amostras foram 300/390 nm. O erro associado à quantificação destes compostos (*t*-piceid e *c*-piceid) nas condições aplicadas (300/390 nm) ao *t*-resveratrol não é muito grande, pois estamos a estimar concentrações de compostos da mesma família (estilbenos), que apresentam absorção no c.d.o. utilizado.

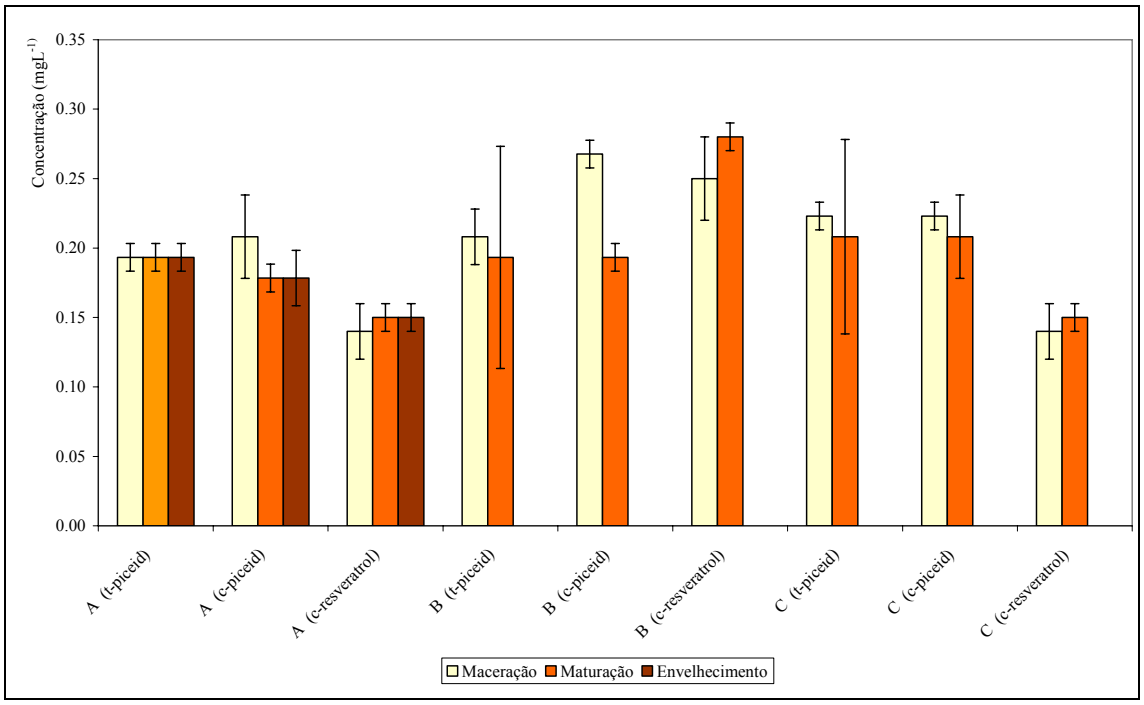


Figura 3.139. Concentração de *c*-resveratrol, *t*-piceid e *c*-piceid em amostras de vinho Moscatel de Setúbal em diferentes fases da vinificação

Da análise da figura anterior pode dizer-se que:

- não existem diferenças estatisticamente significativas entre as amostras dos produtores A e C para as 3 fases do processo de vinificação no que se refere aos teores de *t*- e *c*- piceid e *c*-resveratrol;

- para o produtor B as conclusões são idênticas excepto no que se refere à concentração de *c*- piceid em que o decréscimo da concentração ao longo do processo é significativo. Esta amostra deste produtor apresenta também um teor superior em *c*-resveratrol;

- enquanto que na amostra do produtor A há uma tendência para que a concentração destes compostos se mantenha estável, no caso dos produtores B e C os teores em piceid tendem a diminuir mas a concentração de resveratrol tem tendência para um aumento, mas estas diferenças não são estatisticamente significativas.

Os resultados obtidos mostram que a detecção fluorimétrica apresenta maior sensibilidade pois os limites de detecção e quantificação foram mais baixos. Um vinho Moscatel (0.16 mgL^{-1}) apresenta um teor médio em *t*-resveratrol superior ao de um vinho branco.As amostras analisadas mostram que havia diferenças estatisticamente significativas entre as amostras dos ensaios de vinificação dos vários produtores (A, B e C) mas essas diferenças deixaram de existir quando se analisaram as amostras comerciais desses mesmos produtores.

3.4. Actividade Biológica de Extractos de Vinho e de Uva Moscatel

Os compostos fenólicos presentes em frutas e vegetais são importantes pela sua contribuição para retardar processos de envelhecimento e ainda prevenção de diversas doenças crónicas (cancro, doenças cardiovasculares e doenças neuro-degenerativas), pelo que devem fazer parte de uma dieta alimentar saudável. Estudos epidemiológicos, bem como ensaios *in vitro* e *in vivo*, confirmam estas afirmações e por isso, neste trabalho, era importante dedicar uma parte, ainda que limitada, ao estudo da actividade biológica de extractos de vinhos Moscatel e de peles de uva Moscatel.

3.4.1. Alguns testes para avaliação da actividade biológica de extractos de vinho Moscatel

Para a avaliação da actividade biológica do vinho Moscatel de Setúbal prepararam-se extractos de amostras de vinhos provenientes dos ensaios de vinificação na mesma fase de maceração dos diferentes produtores (A, B e C). Optou-se por selecionar as amostras do início do processo de vinificação, que provavelmente apresentariam maiores actividades biológicas por terem tido menos tempo de contacto com o ar. Os extractos foram preparados utilizando a técnica de extracção em fase sólida (SPE) e recolhendo a fracção B do extracto que corresponde aos compostos mais retidos numa coluna C18 (*ver 2.4.*).

Procedeu-se à caracterização dos extractos obtidos para cada um dos vinhos Moscatel estudados A_3, B_3 e C_3 correspondentes a 3 meses de maceração, determinou-se o seu teor em fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu e os resultados obtidos foram respectivamente $5.0\pm4.7\times10^{-3}$ $11.1\pm1.4\times10^{-2}$ e $16.5\pm1.5\times10^{-2}$ gL^{-1} expressos em ácido gálhico. Para as mesmas amostras foram efectuados ensaios de avaliação da actividade antioxidante pelo método ORAC, (capacidade antioxidante do radical oxigénio) nos quais se utilizou como padrão o Trolox. Os ensaios foram efectuados em duplicado e os valores obtidos foram 2.28×10^{-2}, 4.99×10^{-2} e 5.24×10^{-2}-M TEAC respectivamente para as amostras A_3, B_3 e C_3, o que mostra que os extractos com um teor mais elevado em fenóis totais apresentavam um valor superior de actividade antioxidante avaliada por este método.

Na figura 3.140 apresentam-se os espectros de EPR referentes aos extractos dos vinhos Moscatel de Setúbal e também do controlo, dimetilsulfóxido (DMSO). A intensidade do sinal é proporcional à concentração de radicais livres existentes no meio

e uma maior atenuação no sinal no espectro de EPR é observada no extracto C_3 comparativamente ao obtido para os outros dois extractos sendo a percentagem de inibição do radical $OH^{\cdot}$ de 24%, 12% e 0 % respectivamente para os extractos C_3, B_3 e A_3. Os resultados obtidos mostram mais uma vez que um teor superior em fenóis provoca uma maior atenuação de sinal do espectro e logo o extracto correspondente terá uma maior actividade antioxidante. Os valores obtidos são inferiores aos descritos por Bertelli *et al., (*2004*)* para vinhos tintos, que apresentam um teor em fenóis totais entre 1.1 a 1.9 gL^{-1} e uma percentagem de inibição de 43-84%[216]. Estes autores realçam ainda que os vinhos com maior teor em *t*-resveratrol, são os que apresentam maior actividade antioxidante, concluindo que este composto é importante na inibição de radicais livres, mas não é o único responsável por esta propriedade. O resveratrol pode actuar sinergicamente com outros compostos fenólicos (ácido cafeico e quercetina) presentes no vinho e que também apresentam actividade antioxidante. Nos resultados obtidos com os extractos do vinho Moscatel verifica-se que o vinho do ensaio de vinificação proveniente do produtor C também apresenta uma concentração superior em *t*-resveratrol (0.35 mgL^{-1}), relativamente aos produtores A (0.15 mgL^{-1}) e B (0.22 mgL^{-1}) o que pode contribuir, de acordo com Bertelli[216] *et al., (*2004*)* para explicar uma percentagem de inibição do radical $OH^{\cdot}$ superior (24%). Relativamente aos teores em ácido cafeico e quercetina bservou-se que nas amostras B_3 e C_3 apresentavam picos com valores de áreas semelhantes e portanto, não são estes compostos que explicam as diferentes percentagens de inibição detectadas nos extractos.

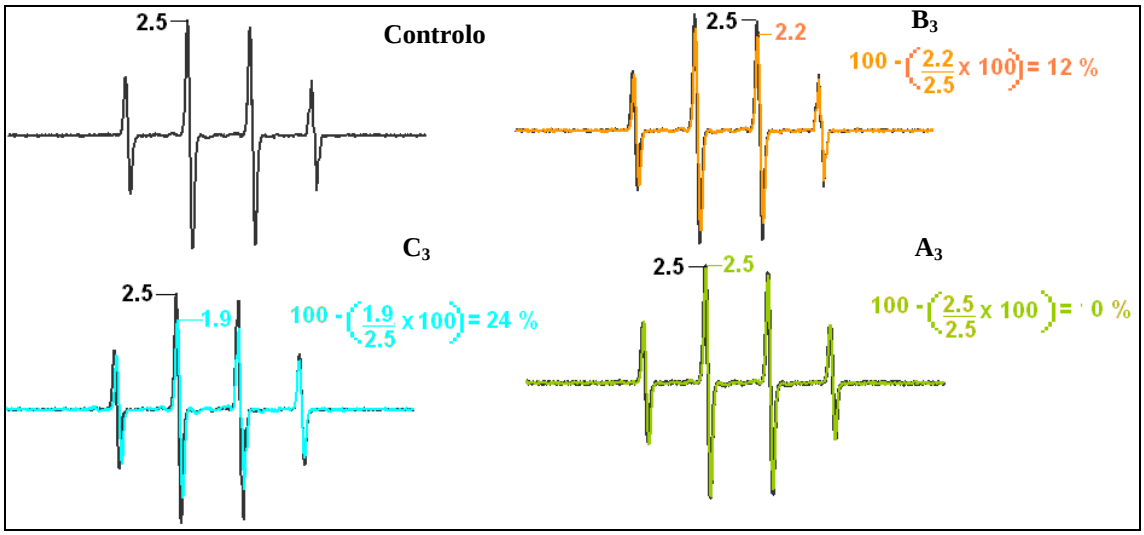


Figura 3.140. Espectros de EPR do controlo (DMSO) e dos extractos de vinho Moscatel de Setúbal A_3, B_3 e C_3

É sabido que uma elevada concentração plasmática de lipoproteína de baixa densidade (LDL), a principal lipoproteína transportadora de colesterol no plasma, é considerado um dos principais factores de risco no desenvolvimento de doença cardiovascular. O LDL no seu estado "nativo" não é prejudicial, mas a sua oxidação é prejudicial e por isso a presença de antioxidantes, nomeadamente alimentares, inibe a sua oxidação. Para se avaliar em que medida os compostos fenólicos presentes nos vinhos podem contribuir para a retardação da oxidação das LDL efectuou-se a incubação dos extractos de vinho Moscatel, diluídos em DMSO, com o indutor de oxidação, AAPH e com a solução tampão de fosfato. A oxidação das LDL é determinada através da formação de dienos conjugados e a medição da absorvância a 234 nm ao longo do tempo permitiu traçar as curvas de cinética da reacção na presença e na ausência (controlo) dos extractos em estudo (figura 3.141). Tendo em conta a sensibilidade do método (espectrofotometria) utilizaram-se extractos com um teor em fenóis totais de 15 mgL^{-1}, que foi considerada uma concentração conveniente para este tipo de ensaios.

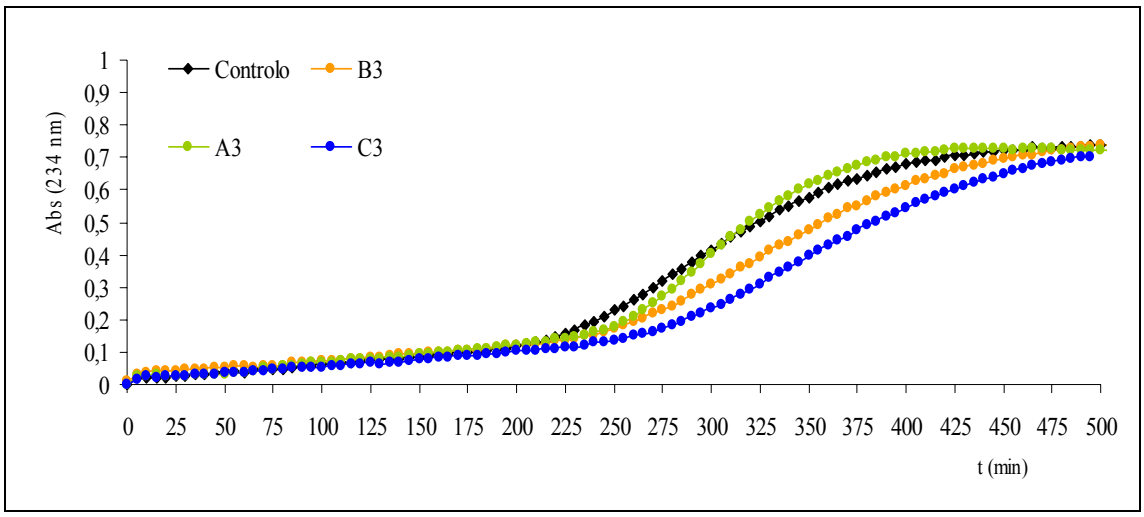


Figura 3.141. Curvas da cinética de oxidação das LDL ao longo do tempo após incubação com os extractos de vinho Moscatel A_3, B_3 e C_3 (15 mgL^{-1} em fenóis totais) e do controlo

No gráfico da figura 3.141, o controlo (lipoproteína LDL) mostra a oxidação máxima das lipoproteínas e, relativamente aos extractos aplicados, verifica-se que o extracto que provoca maior retardação da oxidação da LDL é mais uma vez o correspondente à amostra C_3. A capacidade de retardação da oxidação das LDL é verificada pelo aumento da "fase de retardamento" ("lag phase") da curva correspondente à cinética da reacção, que se calcula através de 2 tangentes à curva: uma tangente à fase inicial e outra quando ocorre a formação "brusca" de dienos conjugados que absorvem a 234 nm e que

corresponde ao momento em que se inicia a oxidação das LDL (*ver apêndice E)*. Para as amostras em estudo verifica-se que a capacidade de retardação da oxidação das LDL em percentagem foi de 11.8 %, 17.6 % e 23.5 % respectivamente para os extractos A_3, B_3 e C_3 e está mais uma vez, directamente relacionado com o teor em fenóis totais.

Dados bibliográficos apresentam para os vinhos e extractos de uvas diferentes valores de percentagem de inibição da oxidação das LDL, consoante o tipo de reacção e o método analítico utilizados no estudo da cinética da oxidação das LDL: fluorimetria, espectrofotometria ou cromatografia gasosa. Frankel *et al.*, (1995), induziram a oxidação das LDL com cobre e aplicando a técnica de cromatografia gasosa obtiveram uma percentagem de inibição de 37-65% e de 27-46%respectivamente para vinhos[217] tintos e brancos diluídos de modo a apresentarem um teor em fenóis totais de 1.7 mgL^{-1} Os valores obtidos nas amostras de extractos de vinho Moscatel também são inferiores aos obtidos para os extractos metanólicos de uvas brancas das cultivares Sauvignon Blanc, Thompson Seedless e Chardonnay (obtido por cromatografia gasosa) com teores de 1.7 mgL^{-1} e de 3.4 mgL^{-1} em fenóis totais e com percentagens de inibição de respectivamente 30-46% e 62-79%[218]. Para além das razões previamente apontadas, estas diferenças também podem ser explicadas, pelo facto de não se ter utilizado todo o extracto de vinho Moscatel. Nestes ensaios foi usada a fracção de compostos mais retidos numa coluna C_{18} (foi rejeitada a fracção eluída com 30 % de etanol) e logo, compostos como o ácido gálhico, ácido protocatechuíco e a catequina que apresentam tempos de retenção curtos e importante actividade antioxidante não estão presentes nestas amostras[68,219]. Dados bibliográficos descrevem que o resveratrol é importante na inibição de radicais livres ($OH^{\bullet}$), como já referido assim como na inibição da oxidação das LDL [220].

Quando se fez a análise destes extractos por cromatografia líquida utilizando o detector electroquímico (figura 3.142), verifica-se que as diferenças observadas entre os cromatogramas estão relacionadas com a concentração em que alguns compostos estão presentes, nomeadamente no extracto C_3 a catequina (**42**), o glucósido do ácido indol láctico e a procianidina (**60**) e a quercetina-3-*O*-glucuronido (**81**) estão presentes em teores mais elevados, já que as áreas dos pico são superiores nestas amostras, enquanto que o ácido cafeíco+procianidina (**47**), o cafeato de etilo+NI (**109**) e o cumarato de etilo+NI (**125**) estão presentes em teores mais elevados no extracto B_3. Curiosamente o

extracto A_3, entre os compostos identificados, apresentam teores mais elevados de quercetina-3-*O*-glucósido (82) e de cafeato de etilo (109).

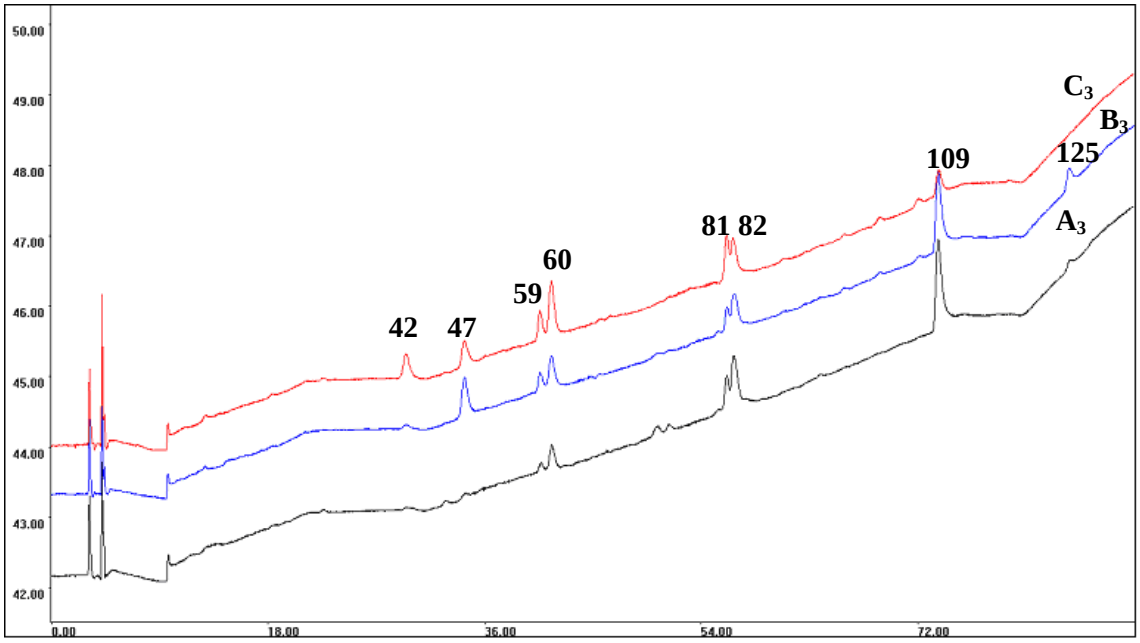


Figura 3.142. Perfis cromatográficos obtidos com ED na análise dos extractos (A_3, B_3 e C_3) de vinho Moscatel de Setúbal. **Identificação**: **42**. catequina, **47.** ácido cafeico e procianidina, **59.** galhato de etilo; **60.** glucósido do ácido indol láctico e procianidina; **81.** quercetina-3-*O*-glucuronido+NI; **82.** quercetina-3-*O*-glucósido; **109.** cafeato de etilo + NI; **125.** cumarato de etilo +NI

Como já foi referido, o conjunto de ensaios efectuados mostra que o extracto C_3 é biologicamente mais activo do que os restantes extractos, o que poderá ser explicado quer pelo facto do teor em fenóis totais ser superior e terem sido detectados e quantificados compostos com actividade reconhecida como inibidores da peroxidação lipídica[116,221,222], nomeadamente a catequina (42) e o ácido cafeico (47) presentes em teores 0.72 mgL^{-1} e 0.18 mgL^{-1}. O facto desses compostos estarem presentes em concentrações inferiores no extracto A_3, pode ser uma possível explicação para o baixo valor obtido para a percentagem de inibição da oxidação das LDL (11.8%) determinada neste extracto. A formação de alguns ésteres etilícos (cafeato de etilo, 0.21 mgL^{-1}) aumenta o carácter lipofílico dos ácidos fenólicos, no entanto o galhato de etilo, assim como o cumarato de etilo são ineficazes na oxidação da LDL[116,223] não sendo por isso estes compostos responsáveis pelas diferenças observadas entre os três extractos testados.

Para se poder tirar mais conclusões relativamente à contribuição de cada um dos compostos detectados nos cromatogramas, estes deveriam ser testados em separado, sob

a forma de compostos puros, de modo a ser possível concluir-se sobre a contribuição de cada um deles para as propriedades do extracto. Por outro lado será sempre de considerar possíveis acções sinergéticas pelo que também devem ser testadas misturas dos mesmos compostos. A sua actividade no ser humano, após a sua ingestão na alimentação, vai estar relacionada com a sua absorção, metabolização e com a forma em que se encontram disponíveis no organismo ser ou não activa. Assim é muito importante o estudo da sua biodisponibilidade. A catequina por exemplo, é absorvida ao nível do intestino delgado e é encontrada no sangue na forma de glucuronido[58] e reacções do mesmo tipo acontecem para outros compostos.

3.4.2. Modelos in vitro para avaliação da actividade associada a extractos

3.4.2.1. Avaliação da actividade antiproliferativa (HT-29) de extractos de vinho Moscatel

O desenvolvimento do cancro de cólon humano é geralmente caracterizado no estágio inicial, pela hiperproliferação do epitélio levando à formação de adenomas, sendo essa a principal consequência da desregulação do ciclo celular e também da supressão da apoptose como é geralmente observado no cancro colorectal humano.

Na continuação dos estudos efectuados com os extractos de vinho Moscatel (fracção B) dos diferentes produtores, avaliou-se a actividade antiproliferativa "*in vitro*" destes extractos em cultura de células tumorais humanas de cólon (HT-29). Incubou-se as linhagens celulares (HT-29) com extractos com diferentes teores em fenóis totais (15, 31, 62, 125 e 250 mgL^{-1} em ácido gálhico) (*ver2.12)* durante 48 h e avaliou-se a viabilidade celular por fluorescência (480/520 nm) (*ver 2.13.2)*. Os resultados da proliferação da linhagem celular HT-29 em presença dos diferentes extractos são apresentados na figura 3.4.4. Todos os extractos de vinho Moscatel testados foram diluídos em DMSO (dimetilsulfóxido) e, para verificar o efeito do DMSO nas células HT-29 foi também ensaiada uma solução controlo de DMSO na concentração de 250 mgL^{-1}. Este valor corresponde à concentração mais elevada de DMSO nos extractos analisados.

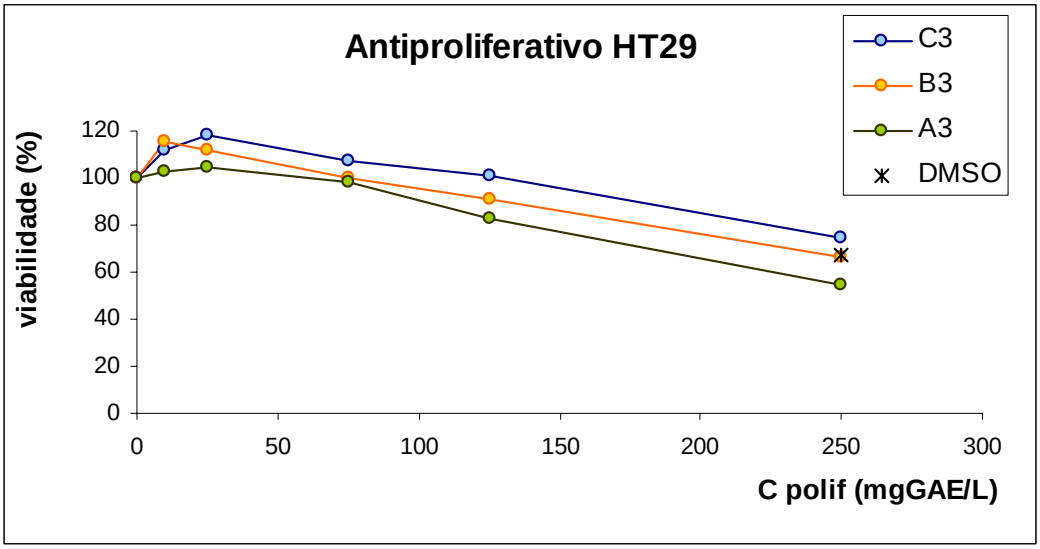


Figura 3.143. Viabilidade (%) das células HT29 na presença de extractos de vinho Moscatel A_3, B_3 e C_3 com diferentes teores de fenóis totais (15, 31, 62, 125 e 250 mgL^{-1}) e controlo

A partir da análise do gráfico verifica-se que à medida que o teor em fenóis totais aumenta a viabilidade celular diminui, no entanto os vários extractos (A_3, B_3 e C_3), não apresentam actividade anti-proliferativa na gama de concentrações testadas (15-250 mgL^{-1}) pois observa-se que o valor obtido com o controlo de DMSO se aproxima dos valores obtidos para os diferentes extractos na concentração de 250 mgL^{-1} e a viabilidade celular é sempre superior a 50% nas condições do ensaio efectuado. Significa que na presença dos extractos analisados um pequeno número de células HT-29 morre (inferior a 50%), concluindo-se que os extractos analisados não apresentam efeito anti-proliferativo nas células HT-29. No entanto para o teor em fenóis totais de 250 mgL^{-1} verifica-se que o extracto A_3 apresenta menor viabilidade celular (maior efeito anti-proliferativo) do que os extracto B_3 e C_3. A proporção em que os compostos estão presentes poderão explicar as pequenas diferenças detectadas entre os vários extractos testados.

3.4.2.2. Avaliação da permeabilidade das células Caco-2

Dos modelos *in vitro* mais utilizados para a avaliação da permeabilidade a fármacos destaca-se a linha celular Caco-2, que é proveniente de células de carcinoma colorectal humano e pode ser usado como modelo para avaliação da probabilidade de absorção de compostos administrados por via oral. Ao utilizar este modelo no estudo de extractos de vinho, pretende-se obter informação sobre a permeabilidade da membrana intestinal aos compostos existentes nesta amostra o que contribui para aprofundar os conhecimentos

acerca da sua absorção e disponibilidade, informação esta relevante para avaliar possíveis propriedades e mecanismos de acção na prevenção de doenças. Nesta parte do trabalho não se considerou o efeito que a digestão pode ter nos compostos presentes no vinho Moscatel de Setúbal, isto porque podem ocorrer interacções entre os compostos fenólicos e os constituintes do suco digestivo (saliva, suco gátrico e suco pancreático) que podem acondicionar a forma em que o composto está presente e logo a sua biodisponibilidade.

O estudo foi iniciado com a preparação de extractos de vinho Moscatel a partir de amostras provenientes dos ensaios de vinificação dos vários produtores A_2 ($3.98\times10^4\pm820$ mgL^{-1}), B_2 ($3.82\times10^4\pm872$) e C_2 ($4.10\times10^4\pm640$ mgL^{-1}) e de uma amostra comercial (B_{com}) com um teor em fenóis totais de $4.00\times10^4\pm790$ mgL^{-1}. Estes extractos foram inicialmente testados quanto à citotoxicidade sobre as células Caco-2, preparando-se soluções diluídas com diferentes teores em fenóis totais (31-2000 mgL^{-1}). No estudo da citotoxicidade utilizou-se o teste MTS (*ver 2.14*), para determinar a concentração do extracto a usar nos testes de permeabilidade. A presença de alguns compostos em concentrações elevadas pode afectar a viabilidade e integridade celular, por isso é importante verificar o efeito citotóxico destes extractos antes de proceder aos estudos de permeabilidade. A viabilidade celular foi estudada ao longo do tempo (30, 60 e 120 min) e os resultados foram comparados com o controlo (sem os extractos) (*ver 2.14*). Os resultados (*ver apêndice E- Tabela EIII*) mostram que ao longo do tempo a viabilidade celular diminui para todos os extractos. Na figura 3.144 apresenta-se o gráfico que relaciona a viabilidade celular expressa em (%) em função da concentração do extracto em fenóis totais para um tempo de aplicação de 120 min. Para a concentração máxima testada 2000 mgL^{-1} a viabilidade celular é de 60% para o extracto C_2, enquanto que nos outros extractos os valores se situam entre 100 e 80%. Os resultados obtidos para os extractos avaliados na gama de concentração de 500 mgL^{-1} e 1000 mgL^{-1} não diferem, excepto para o extracto C_2 em que desde o início se nota que a curva de viabilidade celular se distingue das restantes amostras. De facto ao fim de 120 min 32.3 % das células estão mortas enquanto que para os outros extractos e para as mesmas 2 concentrações (500 e 1000 mgL^{-1}), praticamente o efeito é mais atenuado. Os extractos das amostras B parecem ser os que têm menos efeito na viabilidade celular. De qualquer forma verifica-se que todos os extractos apresentam um valor muito abaixo dos 50%. Para os estudos de permeabilidade foi escolhido o extracto com a

concentração de 1000 mgL^{-1} por ser a concentração que mais se aproxima do teor em fenóis totais detectado nas amostras de vinho Moscatel.

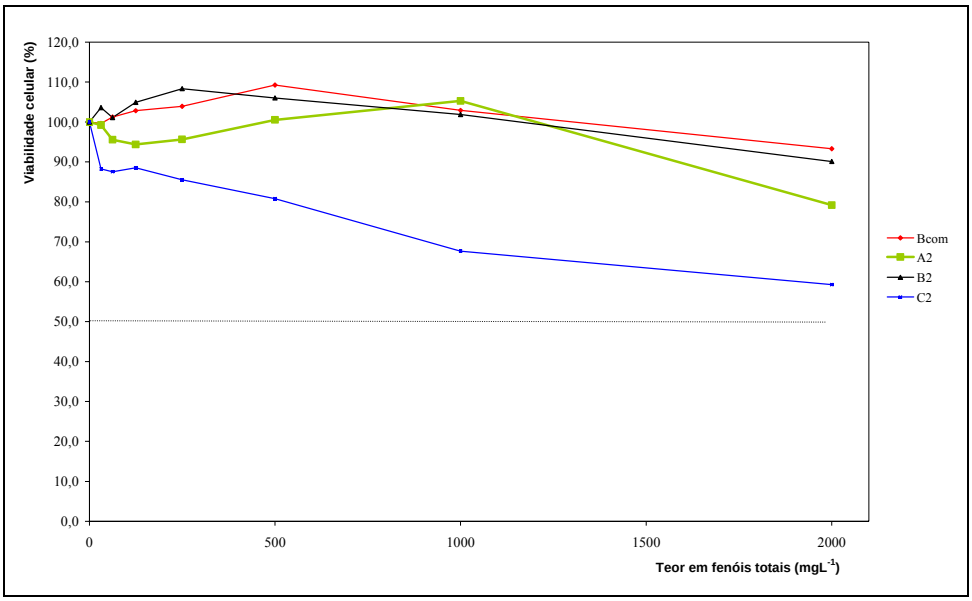


Figura 3.144. Viabilidade das células Caco-2 (%) na presença de extractos de vinho Moscatel de Setúbal (A_2, B_2, C_2 e B_{com}) após 120 min de exposição

O transporte transepitelial dos compostos presentes nos extractos de vinho Moscatel (1000 mgL^{-1} de compostos fenólicos) foi assim testado nas células Caco-2 cultivadas em poços da microplaca com membrana de policarbonato. Os extractos foram colocados nos compartimentos, apical (AP) ou basolateral (BL) do suporte e o transporte estudado nos dois sentidos (AP→BL e BL→AP), para simular os processos de absorção (AP-BL) e de secreção (BL-AP) que ocorrem ao nível do intestino. Fizeram-se recolhas de alíquotas de 200 µL ao longo do tempo do ensaio, no compartimento aceitador que foram analisadas por LC-DAD-FD-ED. Embora se tenham utilizado 3 modos de detecção diferentes os cromatogramas apresentados mostram os resultados obtidos só com os detectores de fluorescência e díodos, por serem os que apresentam um maior número de compostos detectados.

Na figura 3.145 comparam-se os perfis cromatográficos obtidos quando se analisou a solução aceitadora, recolhida no compartimento BL ao fim de 120 min, após aplicação do extracto A_2. Escolheu-se esta amostra porque o pico 78 apresenta uma área superior na detecção por fluorescência (FD). Este modo de detecção permite detectar um grande número de compostos e a sensibilidade é maior, comparativamente aos resultados obtidos com o detector DAD, para os compostos transportados através da monocamada celular. Relativamente à detecção electroquímica não se apresenta o cromatograma

porque nas condições do ensaio não foram detectados picos que se diferenciassem da linha de base. Assim o transporte dos compostos presentes nos extractos do vinho apenas foi avaliado com o detector de fluorescência (280/320 nm). No apêndice E (figuras EIV, EV e EVI) apresentam-se os cromatogramas obtidos com o detector de fluorescência na análise dos vários extractos aplicados e das soluções dadoras correspondentes e pode concluir-se que os perfis cromatográficos apresentam algumas diferenças: os compostos estão presentes nos extractos em diferentes concentrações e o pico 78 apenas é detectado nos extractos A_2 e B_2.

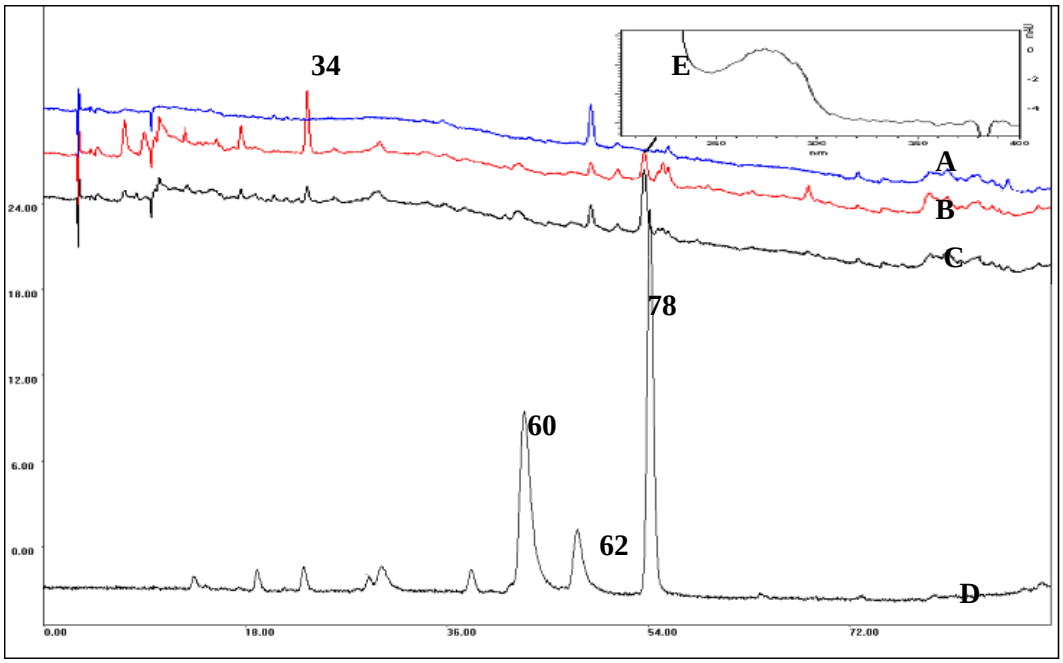


Figura 3.145. Cromatogramas da solução aceitadora do extracto A_2 analisada. (**A**) a c.d.o 320 nm (**B**) a c.d.o 254 nm (**C**) a c.d.o 280 nm; (**D**) FD (280/320 nm). (**E**) Espectro de absorção do pico78 (t_r= 54 min) . **Identificação**: **34**. ácido *t*-caftárico **60.** glucósido do ácido indol láctico e procianidina; **62.** Não identificado; **78.** composto não identificado, procianidina, isoramnetina-3-*O*-rutinósido

Na figura 3.146 comparam-se os cromatogramas obtidos após análise das soluções aceitadoras recolhidas ao fim de 120 min nos sentidos AP-BL e BL-AP para os extractos analisados (A_2, B_2, C_2 e B_{com}).

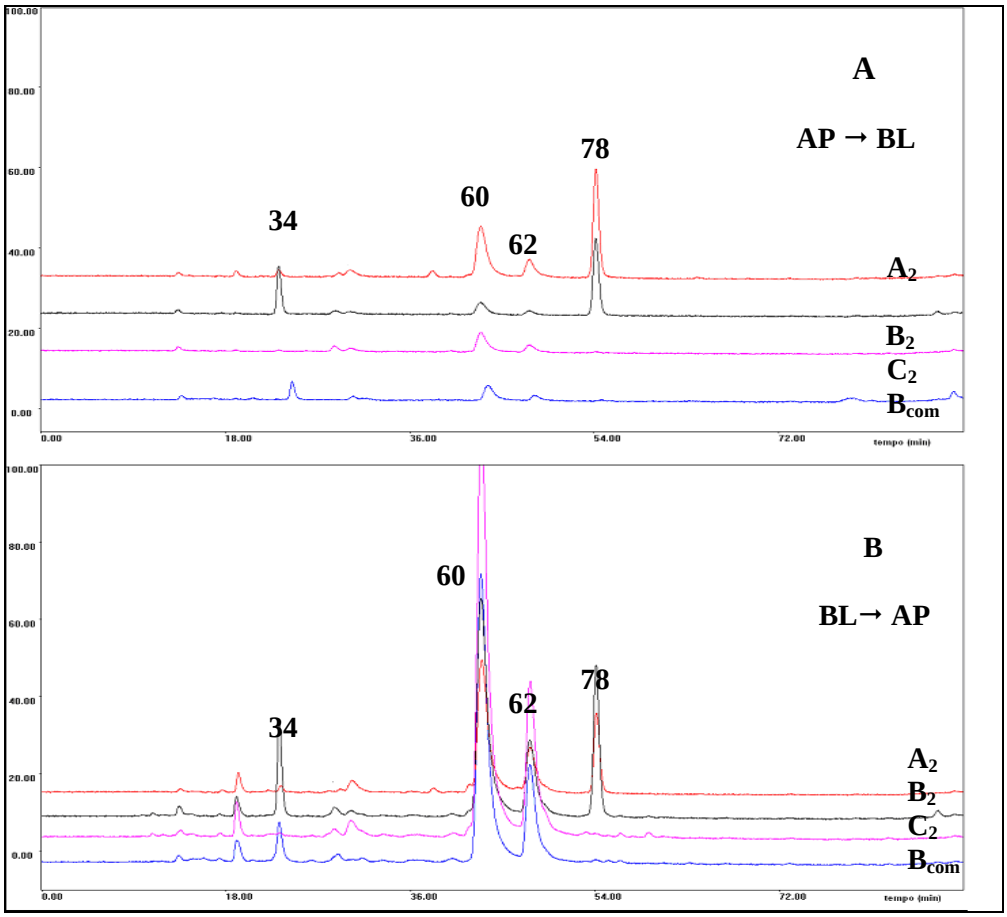


Figura 3.146. Cromatogramas com FD (280/320 nm) na análise das soluções aceitadoras dos extractos A_2, B_2, C_2 e B_{com} recolhidos ao fim de 120 min nos 2 sentidos: (**A**) AP-BL e (**B**) BL-AP. **Identificação**: **34**. ácido *t*-caftárico; **60.** glucósido do ácido indol láctico e procianidina; **62.** Não identificado; **78.** composto não identificado, procianidina, isoramnetina-3-*O*-rutinósido

Para calcular a permeabilidade aparente dos compostos detectados no compartimento aceitador em ambos os sentidos (AP-BL e BL-AP) usaram-se os valores das áreas dos picos devido à impossibilidade de identificação e consequente quantificação dos compostos em causa. Determinou-se a percentagem dos compostos inicialmente presente no compartimento dador que foi transportada ao longo do tempo para o compartimento aceitador. Neste estudo escolheram-se os compostos identificados no cromatograma como **34**, **60**, **62** e **78**, que apresentavam áreas mais elevadas. O pico 78 foi detectado apenas nos extractos A_2 e B_2 e neste pico através da técnica de espectrometria de massa detectam-se 3 compostos de diferentes MM a co-eluirem. Para todos os extractos analisados verificou-se que os compostos associados aos picos 60 e 62 eram transportados nos dois sentidos, assim como o composto associado ao pico 34, apenas detectado nos extractos B_2 e B_{com} (*ver apêndice E*). Na figura 3.147 apresentam-se para o extracto (C_2) os resultados da percentagem acumulada dos compostos

correspondentes aos picos 60 e 62 detectados no compartimento aceitador para os ensaios efectuados (AP-BL e BL-AP).

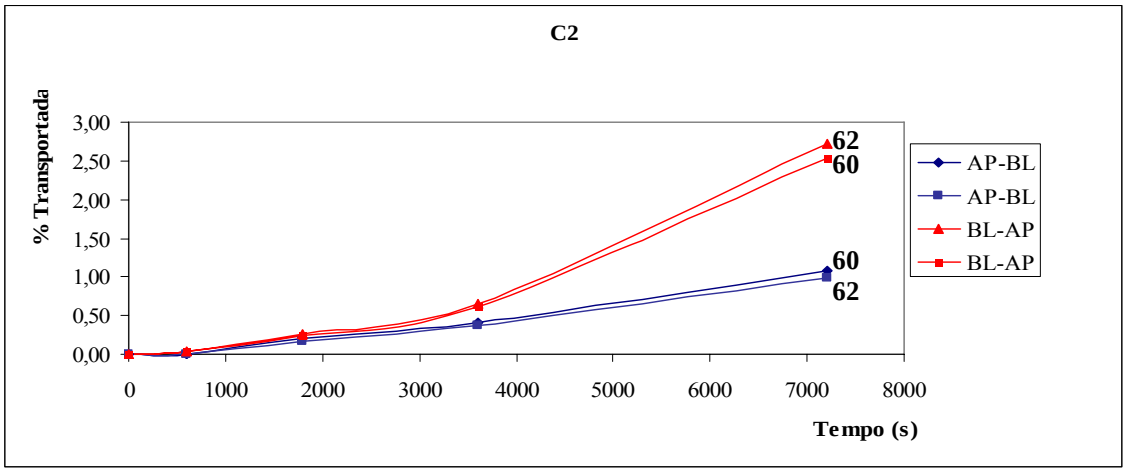


Figura 3.147. Representação da % de transporte dos compostos 60 e 62 nos sentidos AP-BL e BL-AP para o extracto C_2. **Identificação**: **60.** glucósido do ácido indol láctico; **62. pico** não identificado

Esta percentagem foi calculada tendo em conta a diferença de volumes existente entre os compartimentos apical e basolateral (*ver2.14)* as tomas efectuadas e o volume reposto com HBSS. Na tabela 2.9 (*ver Materiais e Métodos*) ilustra-se os cálculos efectuados para determinar a percentagem do composto transferido para o compartimento basolateral (V= 1.5 mL). No extracto C_2 a percentagem transportada para os compostos 60 e 62 é maior no sentido BL-AP (figura 3.147), no entanto nos extractos A_2 e B_2 a percentagem transportada AP-BL para o composto 78 é sempre maior do que no sentido BL-AP e o mesmo se passa para o composto 34 no extracto B_2 (figuras 3.148 e 3.149).

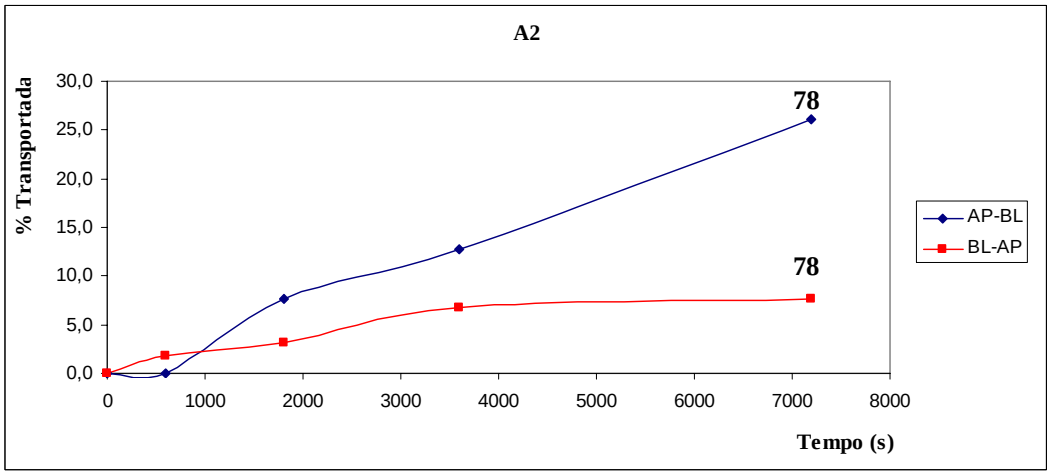


Figura 3.148. Representação da % do transporte do composto 78 nos sentidos AP-BL e BL-AP, para o extracto A_2. **Identificação**: **78.** não identificado, procianidina, isoramnetina-3-rutinósido

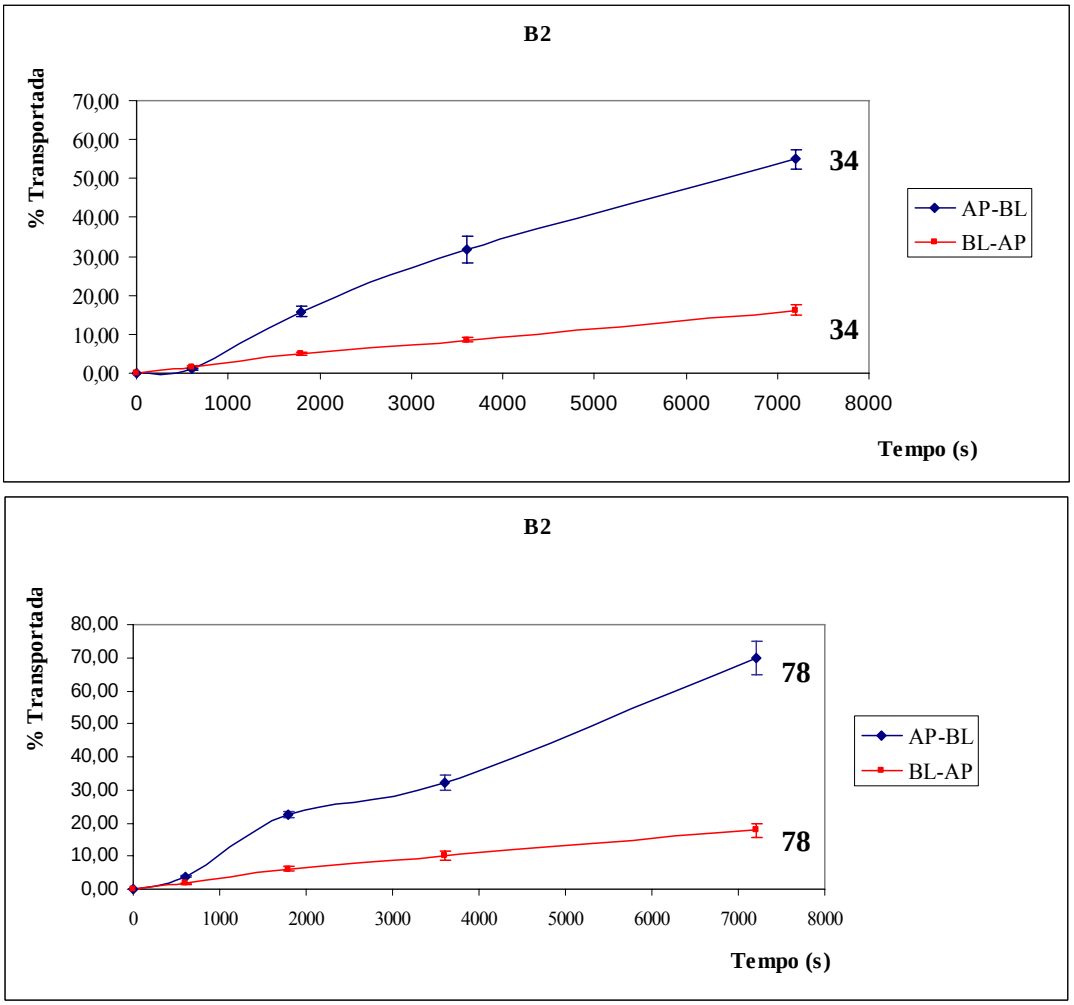


Figura 3.149. Representação da % do transporte do composto 34 e 78 nos sentidos AP-BL e BL-AP, para o extracto B_2. **Identificação: 34**. ácido *t*-caftárico; **78.** não identificado, procianidina, isoramnetina-3-*O*-rutinósido

Da observação das figuras anteriores conclui-se que os valores obtidos da percentagem do transporte para os compostos 60 e 62 são baixos em comparação com os valores dos outros compostos (34 e 78), no entanto, para se ter uma estimativa se estes compostos são ou não absorvidos, determina-se a permeabilidade aparente nos dois sentidos (basolateral-apical e apical-basolateral). Na tabela 3.4.1 apresentam-se esses valores da permeabilidade aparente[224], P_{app}, calculada de acordo com a equação 2.2 para os compostos 34, 60, 62 e 78 nos extractos analisados e considerando os 2 sentidos utilizando. Apenas foram analisados em triplicado as soluções correspondentes ao extracto B_2.

Tabela 3.4.1. Valor da Permeabilidade aparente (P_{app}) obtidas nos dois sentidos (AP-BL e BL-AP) no ensaio com células Caco-2 e $P_{razão}$

Pico	P_{appab} (10^{-7} cm/s) AP-BL				P_{appba} (10^{-7} cm/s) BL-AP				$P_{razão}$ (P_{appba} / P_{appab})			
	A2	B2[b]	C2	Bcom	A2	B2[b]	C2	Bcom	A2	B2[b]	C2	Bcom
34	[a]	420±7.23	[a]	180	[a]	373±21.7	[a]	103	[a]	0.86±0.06	[a]	0.57
60	21.5	12.3±0.21	8.15	5.26	24.7	73.7±20.6	60.4	48.5	1.15	6.00±1.75	7.42	9.21
62	7.86	11.9±0.21	7.48	6.12	24.4	79.3±25.4	56.4	52.9	3.11	6.62±2.03	7.54	8.64
78	198	504±17.9	[a]	[a]	185	402±15.6	[a]	[a]	0.93	0.80±0.06	[a]	[a]

[a] transporte não detectado [b] valor médio±desvio padrão

Da análise da tabela conclui-se que, para os compostos 34 e 78 a permeabilidade aparente, no sentido apical basolateral, P_{appab}, (transporte de absorção), é maior que no sentido inverso (transporte de secreção). Relativamente aos compostos 60 e 62 observa-se precisamente o contrário, ou seja a permeabilidade aparente, no sentido basolateral apical (transporte de secreção) é maior que no sentido inverso (transporte de absorção). Se a permeabilidade aparente é maior no sentido apical basolateral do que no sentido inverso os compostos devem ser absorvidos e no caso de acontecer o inverso não são absorvidos.

Para avaliar a probabilidade de efluxo que está relacionado com o transporte activo dos compostos no sentido basolateral apical em vez de apical basolateral, calculou-se a razão das permeabilidades aparentes[225] ($P_{razão}$), através da equação:

$$P_{razão} = \frac{P_{appba}}{P_{appab}}$$

A obtenção de valores de $P_{razão}$ superiores a 2 indica um provável mecanismo de efluxo, diminuindo deste modo a absorção ao nível do intestino. Um valor de $P_{\text{razão}}$ inferior a 0.5, indica provável transporte activo. Para valores $0.5<P_{\text{razão}}<2$ é provável que se dê exclusivamente transporte passivo[225]. Os valores de $P_{razão}$ apresentados na tabela 3.4.3 mostram que existe transporte passivo para os compostos **34** e **78** e um mecanismo de efluxo para o composto **62**. Relativamente ao outro compostos **60** observa-se, apesar do valor da P_{appba} ser superior ao de P_{appab} para todos os extractos, que apenas existe transporte passivo no extracto A_2 ($0.5<P_{\text{razão}}<2$). Estas diferenças observadas nos resultados entre extractos podem ser explicadas pela presença nos extractos de outros compostos em diferentes concentrações e que podem interferir com a permeabilidade dos compostos (ver figuras EII, EIII e EIV no apêndice E).

Na tabela 3.4.2 apresentam-se os balanços de massa, expressos como percentagem de recuperação (R%) para os compostos 34, 60, 62 e 78 e determinados de acordo com a equação 2.3, nos dois sentidos (AP-BL e BL-AP). Valores baixos para a percentagem de recuperação significam que os compostos podem ter ficado retidos intracelularmente ou podem ter sido metabolizados. Reacções de metabolização não foram detectadas nos ensaios efectuados já que nos cromatogramas obtidos com os vários detectores (DAD, FD e ED) não foram detectados novos picos.

Tabela 3.4.2. Balanços de massa (R %) para os compostos 34, 60, 62 e 78 detectados nos extractos analisados

Pico	Balanço de massas (AP→BL) %				Balanço de massas (BL→AP) %			
	A2	B2[b]	C2	Bcom	A2	B2[b]	C2	Bcom
34	[a]	91,5±16.2	[a]	103.7	[a]	70.1±29.1	[a]	56.2
60	40.9	68.2±15.3	46.6	85.5	85.2	51.1±32.6	38.5	55.7
62	29.0	67.2±17.9	44.5	84.3	86.2	74.3±21.8	37.6	58.9
78	38.8	96.4±7.66	[a]	[b]	55.7	69.9±27.4	[a]	[a]

[a] transporte não detectado [b] valor médio±desvio padrão

Os resultados apresentados na tabela mostram que o composto 34 apresentou valores de balanço de massa (R%) que se podem considerar elevados. Os outros compostos apresentam uma certa variabilidade consoante o extracto, por exemplo o pico 78 apresenta um valor superior no extracto B_2 relativamente ao extracto A_2.

O composto 78 suscitou a atenção por ter apresentado transporte passivo, por não ter sido detectado em dois extractos (C_2 e B_{com}). Por outro lado a sua identificação suscitou algumas dúvidas por serem detectados vários compostos a co-eluir quando se analisou o extracto inicial. No entanto tal como se pode observar na figura 3.150B o espectro de absorção do composto detectado na solução aceitadora está de acordo com o perfil característico dos flavanóis (ver tabela 3.1), por apresentar um máximo de absorção aos 280 nm. Os resultados obtidos com os outros detectores (FD e ED) mostram que o composto apresenta fluorescência quando se utilizam os c.d.o. de excitação e de emissão 280/320 nm, mas nas concentrações em que está presente na solução aceitadora não origina sinal na detecção electroquímica.

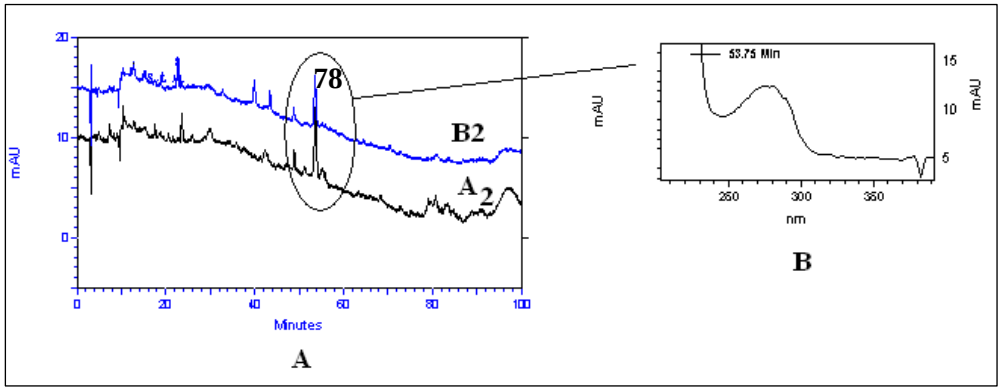


Figura 3.150. (A) Cromatograma a 280 nm dos extractos de vinho moscatel A_2 e B_2; (**B**) Espectro de absorção do UV-vis do pico **78**. **Identificação**: não identificado, procianidina, isoramnetina-3-*O*-rutinósido

Os ensaios de MS efectuados com os extractos de amostras de vinho Moscatel mostram que para o tempo de retenção de 51.41 min, que corresponde ao mesmo composto detectado aos 53.75 min por fluorescência (ver figura 3.4.14), são detectados vários valores de *m/z* realçando-se o 405 (composto não identificado), o 577 (procianidina) e o 623 (isoramnetina-3-rutinósido), como se pode observar na tabela CI apresentada no apêndice C. Este último composto faz parte da família dos flavanóis e logo o espectro de absorção do UV-vis apresenta um perfil diferente (*ver tabela 3.1)* do detectado no pico 78. Assim há duas possibilidades de identificação para este composto: composto não identificado de MM=406 e procianidina (MM=578). Como as procianidinas são pouco absorvidos a nível do intestino (*ver 1.2.1)*, o pico 78 poderá corresponder ao composto com a MM=406.

Dada a importância destes compostos, por terem sido transportados através da parede celular das células Caco-2, tentou-se avaliar a sua evolução em amostras de vinhos durante o processo de vinificação e em amostras comerciais. Os resultados obtidos para o pico **78** e que se apresentam na figura 3.151, mostram que este composto está presente no início do processo de vinificação, em quantidades pequenas, mas o seu teor parece tender a diminuir e nas amostras comerciais praticamente não é detectável, o que implica que deixa de ser importante porque quando o consumidor vai beber o vinho comercial o composto provavelmente ou já não está lá ou está presente em baixas concentrações mas, eventualmente, pode tentar-se alterar algum passo do processo de vinificação de forma a não diminuir tanto a sua concentração.

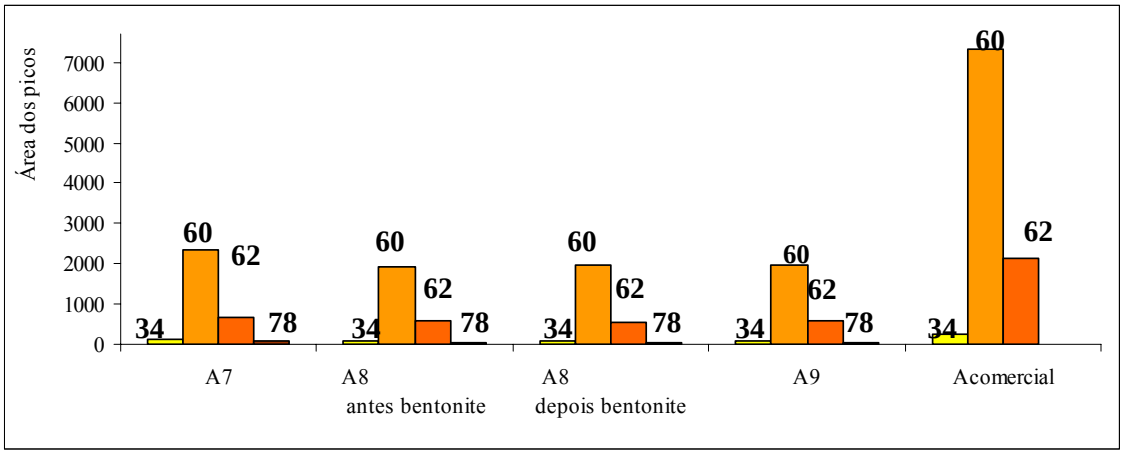


Figura 3.151. Comparação das áreas dos picos detectados FD para obtidas durante a vinificação e amostra comercial do produtor A. **Identificação: 60.** glucósido do ácido indol láctico; **62.** Não identificado; **78.** não identificado, procianidina, isoramnetina-3-rutinósido

Quando se trataram os resultados referentes às amostras comerciais de vinho Moscatel (*ver 3.3*) e considerando o pico correspondente ao composto 78, verificou-se que esta variável pouco contribui para a distinção das amostras como se pode observar na figura 3.152 quando se projectaram as amostras e variáveis no plano definido pelas 2 primeiras componentes principais. Na figura 3.152 as amostras estão assinaladas a pontos verdes e apenas se identificaram algumas, devido ao seu número ser muito elevado (n=70).

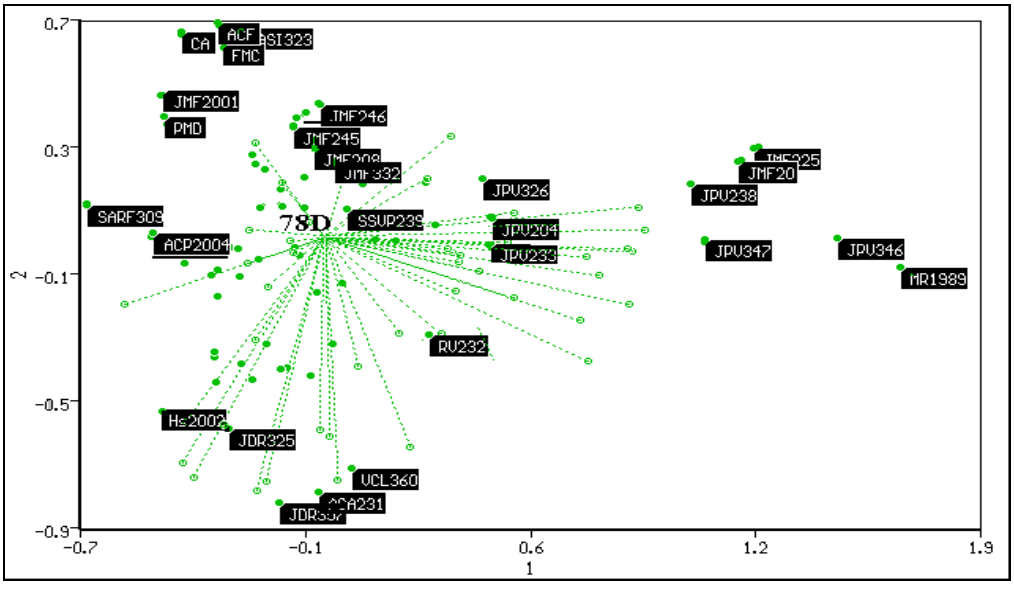


Figura 3.152. Projecção das amostras (n= 70) no plano bi-dimensional definido pelas duas primeiras componentes principais

Se tivermos em conta os resultados obtidos com o detector de fluorescência ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 280/320 nm) na análise destas mesmas amostras comerciais (figura 3.153) o pico 78

aparece com um área relativamente pequena e parece haver co-eluição (ver cromatograma da amostra SARF 309 na figura 3.153). Os cromatogramas apresentados foram obtidos com um detector de fluorescência diferente (*ver 2.6.1.)* e a relação S/N (sinal/ruído) neste caso era aproximadamente 5 vezes superior (maior sensibilidade) à observada para o detector de fluorescência utilizado quando se analisaram as amostras apresentadas na figura 3.153. A co-eluição já tinha sido verificada quando se efectuaram algumas tentativas para a identificação do pico 78 por espectrometria de massa. De facto há co-eluição nas amostras de vinhos e nos extractos de vinhos, mas nas amostras correspondentes às soluções aceitadoras nos ensaios com as células Caco-2, quando se estudaram extractos de peles de uvas, só se detecta a presença de um dos picos (o menos retido).

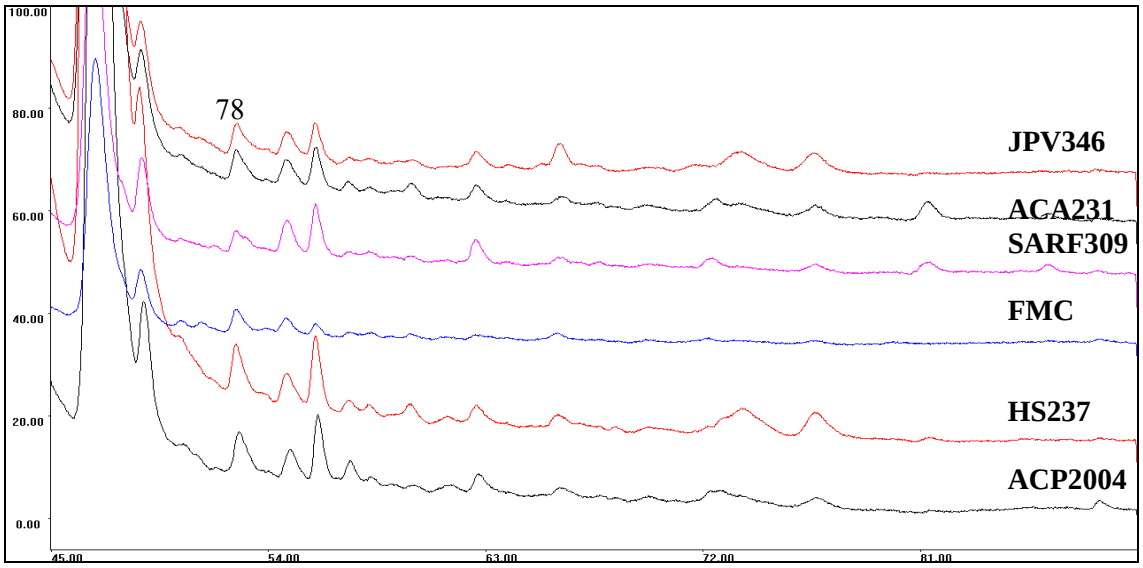


Figura 3.153. Cromatogramas obtidos por FD ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 280/320 nm) para algumas amostras comerciais

O conjunto de ensaios efectuados permitiu avaliar não só a actividade biológica (*in vitro* e *in vivo*) dos extractos de vinho e peles de uvas preparados, mas também efectuar uma análise preliminar relativamente à capacidade dos componentes destes extractos serem absorvidos pelo organismo.

Na continuidade destes trabalhos o mesmo tipo de ensaio deveria ser efectuado com as amostras naturais, os vinhos, de forma a concluir se os resultados obtidos são coincidentes.

3.4.3. Extracto de peles de uva: ensaios in vivo

3.4.3.1 Caracterização do extracto de peles de uva

O vinho Moscatel, relativamente a outros vinhos brancos e como já foi referido, apresenta a particularidade de ser obtido após um período de maceração com as peles das uvas pelo que, componentes habitualmente não presentes em vinhos brancos, podem ser detectados neste tipo de vinho como resultado da sua extracção das peles.

Nesta parte do trabalho mostram-se os resultados obtidos quando se pretendeu avaliar o efeito de um extracto de peles de uva Moscatel num ensaio *in vivo*, como primeiro passo para a previsão do efeito biológico a obter com o vinho Moscatel.

Para a realização deste ensaio prepararam-se diferentes extractos de peles de uva Moscatel (*ver 2.4*) utilizando diferentes soluções extractantes com diferentes percentagens de etanol (25, 50, 75 e 100 %) e determinou-se o teor em fenóis totais de cada um dos extractos. O estudo comparativo do teor em fenóis totais (figura 3.154) mostrou que a solução com 50% de etanol apresenta um teor superior em fenóis totais e por isso esta foi a solução extractante utilizada em estudos posteriores.

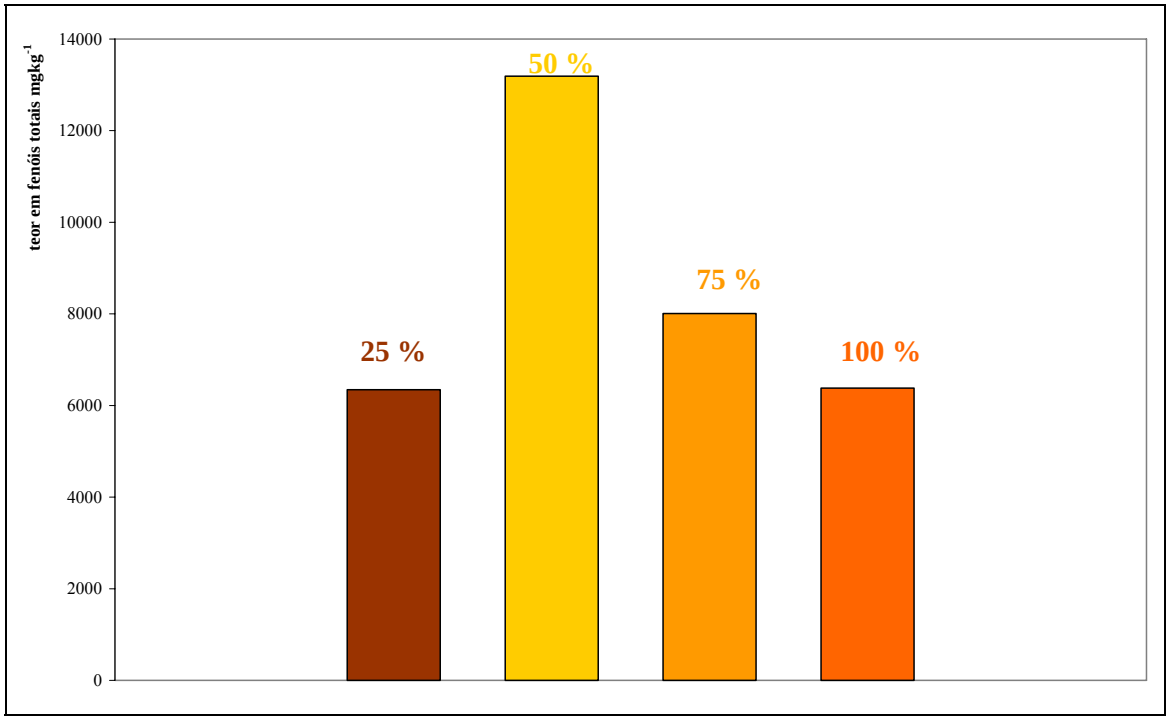


Figura 3.154. Teor em fenóis totais expresso em mg de ácido gálhico por kg^{-} de peles de uvas obtidos com várias soluções extractantes: 25%; 50%; 75 % e 100 % etanol

Os cromatogramas obtidos na análise por cromatografia líquida com detecção por díodos (280 nm) confirmaram estes resultados, dado que a área correspondente a alguns picos era mais elevada no extracto a 50% de etanol (*ver figura EV no apêndice E*). Na figura 3.155 apresenta-se os cromatogramas do extracto de peles de uvas para os c.d.o. 360 e 280 nm e observa-se que o perfil é maioritariamente constituído por flavonóides, como por exemplo a quercetina-3-*O*-glucósido, o campferol-3-*O*-glucósido e a quercetina-3-*O*-ramnósido, o que faz com que a maioria dos compostos eluídos depois dos 40 min apresente absorção superior a 360 nm, comparativamente ao cromatograma traçado a 280 nm. Para cada um dos picos principais (**81**, **82**, **91**, **93** e **111**) detectados no cromatograma foi ainda traçado o espectro no UV-vis e obteve-se um perfil de absorção semelhante, com duas bandas de absorção máxima em torno de 250 e 350 nm característico dos flavonóis. Os compostos 81 e 82 eluem com t_r muito próximos ocorrendo uma má separação entre eles e, em algumas amostras, o mesmo pico está associado aos 2 compostos (quercetina-3-*O*-glucuronido e a quercetina-3-*O*-glucósido).

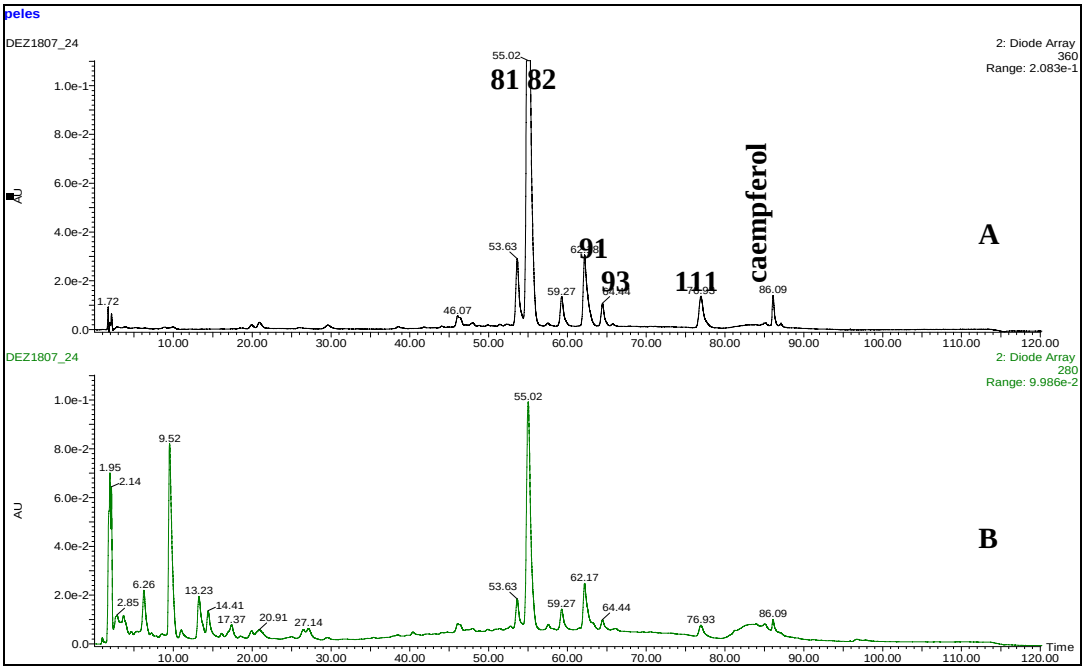


Figura 3.155. Cromatograma do extracto de peles de uvas aos c.d.o.: **(A)** 360 e **(B)** 280 nm. Identificação: **81.** quercetina-3-*O*-glucuronido; **82.** quercetina-3-*O*-glucósido; **91**. *c*-piceid; campferol-3-*O*-glucósido; quercetina-3-*O*-ramnósido e campferol-3-*O*-glucuronido; **93**. Isoramnetina-3-*O*-glucósido; **111.** quercetina

Para caracterizar quimicamente o extracto procedeu-se à sua análise por LC-DAD-MS e na figura 3.156D apresenta-se o cromatograma de corrente iónica total (TIC). Foram

também traçados os cromatogramas dos iões extraídos *m/z* 285, 301 e 315 correspondentes respectivamente às aglíconas do campferol, quercetina e miricetina, flavonóis descritos como mais importantes neste tipo de matriz.

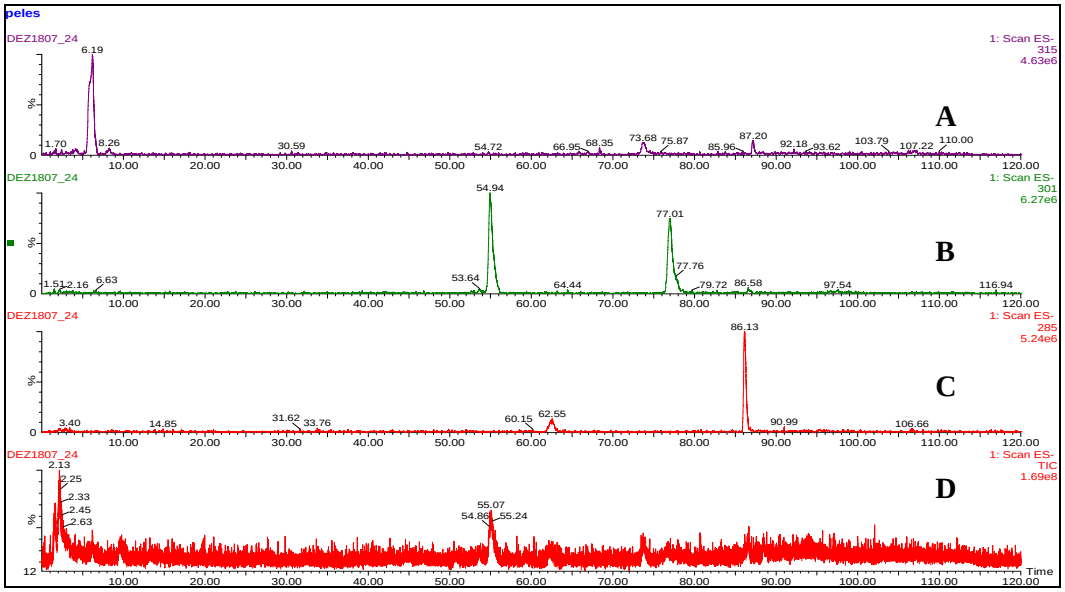


Figura 3.156 Cromatogramas dos iões extraídos *m/z* (**A**) 315, (**B**) 301, (**C**) 285 e de (**D**) TIC obtidos na análise do extracto de peles de uva

.

Para cada aglícona foram pesquisados os iões correspondentes aos glicósidos descritos neste tipo de amostra, os iões *m/z* 477 da quercetina-3-*O*-glucuronido e 463 da quercetina-3-*O*-glucósido detectados respectivamente ao t_r 54.88 min e 55.25 min. Os espectros de massa apresentados na figura 3.157B confirmaram a sua identificação e é também detectado o fragmento correspondente à aglícona de quercetina (*m/z* 301), que se forma por perda de 162 Da do glucósido e 177 Da do glucuronido.

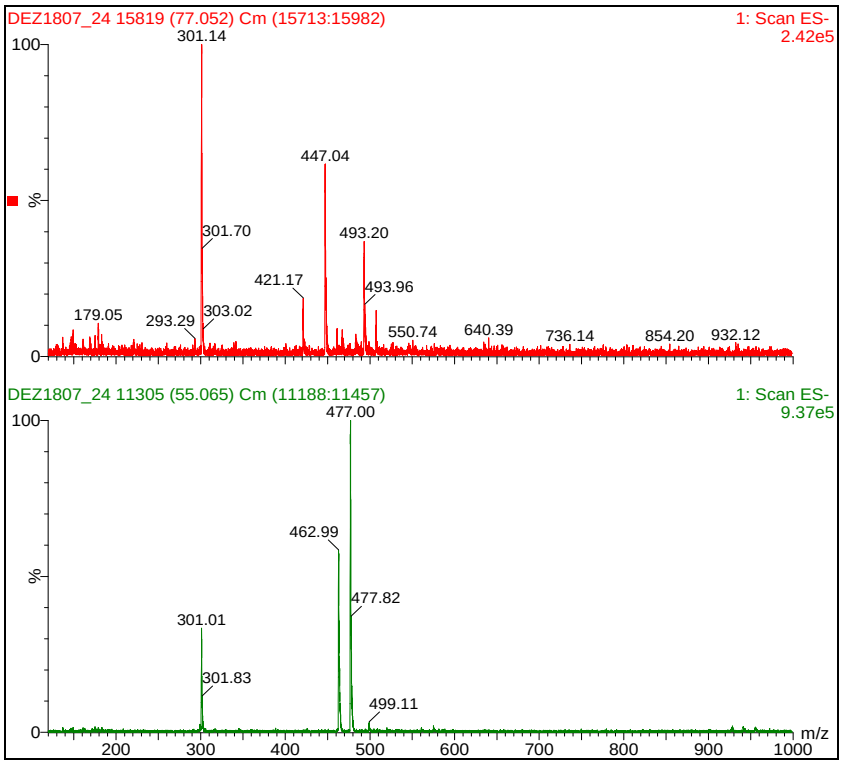


Figura 3.157 Espectro de massa dos picos que eluem aos (**A**) 77.05 min e (**B**) 55.06 min

Na figura 3.157A também se apresenta o espectro de massa para o pico detectado aos 77 min (figura 3.157B) em que são detectados os iões *m/z* 301, 421, 447 e 493. O ião *m/z* 301 corresponde ao ião molecular da quercetina, $[M-H]^-$, e o valor de *m/z* 493 ao aducto do ião *m/z* 447 que faz parte de um conjunto de compostos não identificados e discutidos em 3.2. O ião *m/z* 421 e o seu aducto *m/z* 467, corresponde a um composto que não foi detectado nos extractos de vinho Moscatel. Este ião *m/z* 421 também aparece no pico com t_r 74 min.

Os cromatogramas dos iões extraídos m/z 285 (figura 3.158B), 447 (figura 3.158A) e o de corrente iónica total (TIC) permitem a detecção de compostos para vários tempos de retenção: para o ião *m/z* 447 os picos detectados apresentam t_r de 59.24, 62.14, 73.72 e 76.44 min e para o ião *m/z* 285 detectam-se os picos ao t_r 62.36 e 86.11 min.

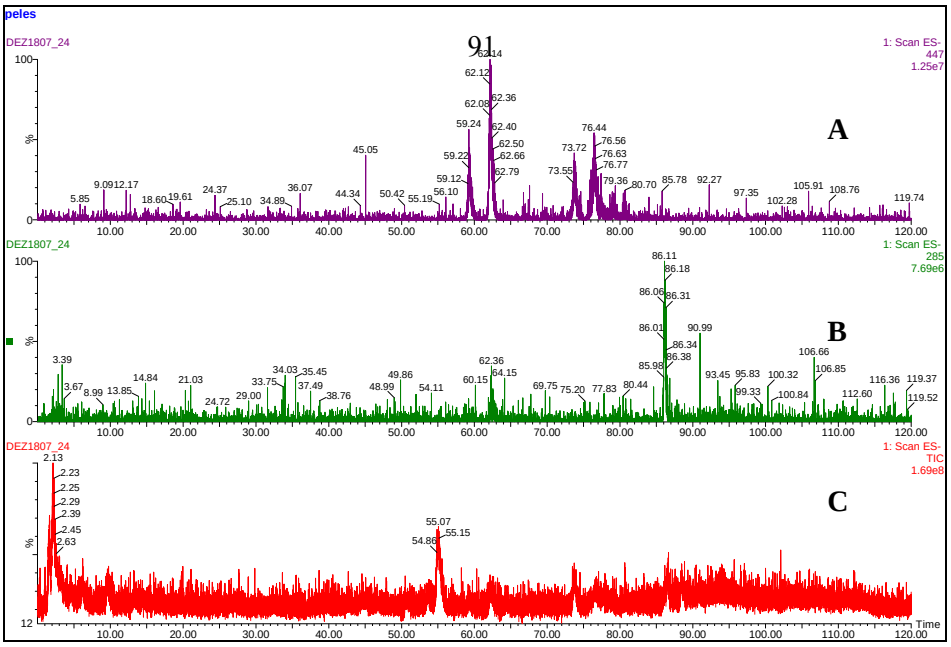


Figura 3.158. Cromatogramas dos iões extraídos *m/z* (**A**) 447; (**B**) 285 e (**C**) TIC, obtidos na análise de um extracto de peles de uva . **Identificação: 91**. *c*-piceid; campferol-3-*O*-glucósido; quercetina-3-*O*-ramnósido e campferol-3-*O*-glucuronido

Os espectros de massa (figura 3.159) dos picos detectados aos 62.14 (figura 3.4.20A) e aos 86.65 min (figura 3.159B) apresentam o fragmento *m/z* 285 correspondente ao campferol. No espectro de massa, apresentado na figura 3.159A, também são detectados os iões *m/z* 447 e 461. O ião *m/z* 447 deverá corresponder ao ião molecular na forma $[M-H]^-$ de um composto de massa molecular 448. A fragmentação do ião *m/z* 447 efectuada origina o fragmento correspondente à aglicona de caempferol (*m/z* 285) por perda de 162 Da equivalente a um glucósido (*ver tabela CIV*). Neste tempo de retenção também se observa a presença do ião *m/z* 461 que pode corresponder ao caempferol-*3*-glucuronido (MM=462) o qual, por perda de 177 Da equivalente ao grupo glucuronido, forma a aglícona respectiva de *m/z* 285. O campferol por sua vez está presente na amostra do extracto de peles de uva e vai eluir aos 86.11 min (figura 3.159B). O espectro de massa obtido permite também detectar um ião de *m/z* 327, que corresponde ao pico 138 que elui aos 86.6 min e que não foi identificado (*ver figura BVI e tabelas CI e CII)*. Foi confirmado que este composto não apresenta absorção aos comprimentos de onda normalmente utilizados para detectar compostos fenólicos (280, 320 e 360 nm), apresentando um espectro de absorção com dois máximos de absorção (246 e 276 nm).

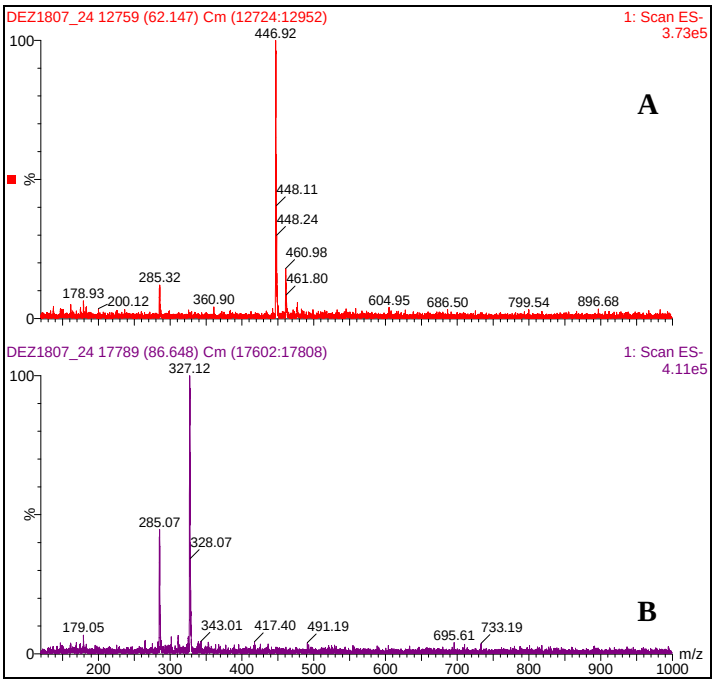


Figura 3.159. Espectro de massa dos picos que eluem aos (**A**) 62.15 min e (**B**) 86.65 min

Com vista à identificação dos compostos *t*-piceid, *c*-piceid, *t*-resveratrol e *c*-resveratrol no extracto de peles de uvas, procedeu-se à sua análise por cromatografia, utilizando o detector de fluorescência, para os $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 300/390 (*t*-piceid); 260/400 (*c*-piceid e *c*-resveratrol) e 290/390 (*t*-resveratrol) e na figura 3.160 apresentam-se os cromatograma obtidos.

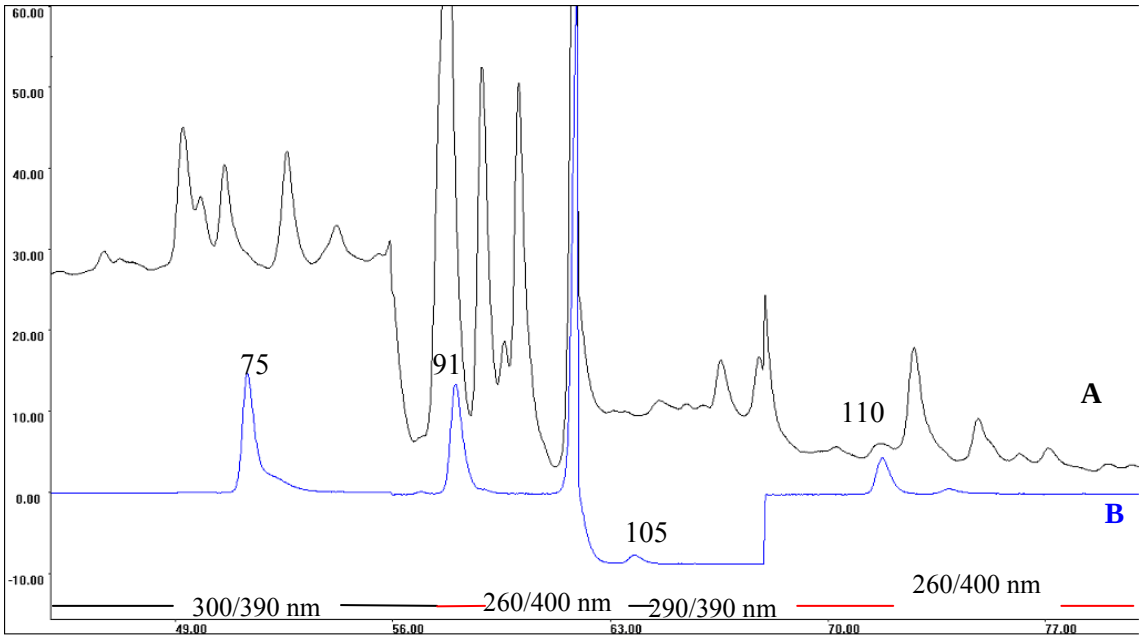


Figura 3.160. Cromatogramas obtidos FD na análise de (**A**) extracto etanólico de peles de uvas; **(B)** solução padrão de *t*-piceid e *t*-resveratrol. Identificação: **75**. *t*-piceid (300/390 nm); **91**. *c*-piceid (260/400 nm); **105**. *t*-resveratrol (290/390 nm); **110**. *c*-resveratrol (260/400 nm)

A confirmação da presença destes compostos no extracto foi efectuada após sobrecarga da amostra com solução de cada um dos padrões e os valores estimados para o *t* e *c*-resveratrol, com base na recta de calibração obtida para o *t*-resveratrol (*ver tabela 3.3.7*), foram 0.70 $mgkg^{-1}$ e 1.15 $mgkg^{-1}$ de peles de uvas respectivamente. Este valor é inferior ao detectado em peles de uvas tintas mas superior ao valor encontrado nas peles das uvas brancas (*ver* tabela *1.3*).

A análise destes extractos para os $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de 280/320 nm por fluorescência mostra 2 picos intensos aproximadamente aos 19 e 28 min (*ver figura EVI apêndice E*), e que apresentam máximos de absorção aos 276 nm e poderão corresponder aos compostos de tirosol e catequina respectivamente.

Das análises efectuadas foi possível concluir que os extractos apresentavam maioritariamentre na sua composição flavonóis (quercetina-3-*O*-glucuronido, quercetina-3-*O*-glucósido, campferol-3-*O*-glucósido, quercetina-3-*O*-ramnósido, campferol-3-*O*-glucuronido, isoramnetina-3-*O*-glucósido e quercetina) e estilbenos (*c* e *t* –piceid; *c* e *t*-resveratrol).

3.4.3.2 Ensaios in vivo

Após os ensaios de caracterização, foram preparados, usando a mesma metodologia, três extractos de peles de uvas Moscatel, que foram administrados na ração de ratos wistar na dose de 0.6 mL/rato/dia, durante um período de 21 dias (*ver 2.7*). Os ensaios foram delineados para tentar detectar algum efeito, mesmo utilizando uma dose excessiva, relativamente ao que se considera poder ser o consumo humano diário para este tipo de bebida. De acordo com o procedimento descrito na parte experimental foi utilizado um grupo controlo e um grupo teste. O teor em fenóis totais foi determinado nos três extractos, obtendo-se os valores de 1284±77, 962±29 e 857±18 mgL^{-1} de fenóis em peles de uva expresso em ácido gálhico. Após os 21 dias, foram recolhidas amostras de sangue que foram analisadas e os valores obtidos para os parâmetros bioquímicos, apresentam-se na tabela 3.4.3.

Tabela 3.4.3. Teores em colesterol, triglicéridos, HDL e avaliação da acção anti-inflamatória aguda após a ingestão do extracto de peles de uvas Moscatel de Setúbal

	Parâmetros bioquímicos			Acção anti-inflamatória	
	Colesterol[b] ($mgdL^{-1}$)	Triglicéridos[a,b] ($mgdL^{-1}$)	HDL[b] ($mgdL^{-1}$)	$V_3 - V_0$[a,c] (mL)	$V_6 - V_0$[a,c] (mL)
Grupo controlo	57.6±5.3	61.6±8,8	48.0±4,6	0.26±0,03	0.26±0,03
Grupo teste	67.0±7.4	26.8±2,2	55.5±5,6	0.19±0,03	0.17±0,03

[a] resultados estatisticamente significativos ($P<0.05$) [b] resultados obtidos para n=5
[c] resultados obtidos para n=6
V_0 – volume medido às 0 h V_3 – volume medido às 3h V_6 – volume medido às 6h

Da análise dos resultados verificou-se uma redução estatisticamente significativa da concentração sanguínea de triglicéridos. O estudo destes parâmetros bioquímicos efectuado tem um valor meramente indicativo ou tendencial. Para caracterizar rigorosamente as alterações metabólicas induzidas pelo extracto, os mesmos parâmetros e outros considerados relevantes, deverão ser determinados num período de tempo mais longo (alargar o prazo de administração do extracto).

Considerando que o valor médio de fenóis totais nos 3 extractos foi de 1034 mgL^{-1} (valor médio obtido a partir do teor em fenóis totais de cada um dos extractos e próximo do valor detectado no vinho Moscatel), calcula-se que os ratos ingeriram diariamente 0.62 mg de fenóis totais/rato/dia. Se considerarmos que:

- o valor médio em fenóis totais do vinho Moscatel de Setúbal é de 1141±510 mgL^{-1}, determinado com base nos teores encontrados nas amostras de vinho Moscatel de Setúbal analisadas neste trabalho (apêndice D),

- um adulto apresenta um peso médio de 65 Kg podendo ingerir diariamente 1 copo de vinho Moscatel (30 mL),

a dose diária correspondente a um copo de vinho é de 34.2 mg/homem/dia em fenóis totais. Considerado que o peso médio dos ratos é 200 g, a dose ingerida correspondente a um copo de vinho deveria ser de 0.105 mg/rato/dia em fenóis totais. Como na realidade os ratos ingeriram 0.62 mg, se calcularmos o valor correspondente em vinho Moscatel que teria de ser consumido diariamente pelo ser humano obter-se-ia aproximadamente 180 mL ou seja, 6 copos de vinho diários, o que não é recomendável dado o elevado teor de álcool e açúcar presentes neste tipo de vinho. No entanto, não se pode excluir a hipótese de serem utilizados extractos de peles de uvas para

suplementação de alimentos, mas deverão ser efectuados testes que permitam comprovar que os teores ingeridos não têm efeitos tóxicos no organismo humano.

O estudo da acção anti-inflamatória do extracto, foi estudado ao fim de 3 e 6 horas, após ter sido induzida a inflamação na pata do rato utilizando carragenina. O extracto utilizado neste estudo apresentava um teor em fenóis totais de 2639±132 mgL^{-1}, e os ratos ingeriram um volume de 1 mL de extracto antes da indução da inflamação com carragenina, o que corresponde a um teor de 2.6 mg em fenóis /mL de extracto. O edema manifestou-se por um aumento do volume da pata onde foi administrada a carragenina e os resultados obtidos também se apresentam na tabela 3.4.1. Os ratos do grupo teste revelaram uma diminuição estatisticamente significativa ($P<0.05$) do volume da pata comparativamente aos animais do grupo de controlo.

Estes resultados sugerem que a administração de uma dieta rica no extracto de peles das uvas, e no modelo experimental estudado, previne o aumento do volume da pata associado ao desenvolvimento de edema induzido por um estímulo inflamatório.

Alguns dos compostos identificados nos extractos de peles de uvas, nomeadamente a quercetina-3-*O*-glucuronido, a quercetina-3-*O*-glucósido, o caempferol-3-*O*-glucósido, a quercetina, o resveratrol e o piceid, estão associados com a diminuição do teor em triglicéridos e também com a inibição do processo inflamatório[226]. O efeito destes flavonóides sobre o teor em triglicéridos pode ser explicado pelo aumento da actividade da enzima lipase que hidrolisa os triglicéridos em ácidos gordos e glicerol[226]. Mais testes deverão ser efectuados no sentido de confirmar estes resultados no extracto e em padrões dos compostos identificados, para se poder afirmar que o extracto de peles de uvas é eficaz na prevenção de patologias associadas com o aumento dos triglicéridos e também para uma diminuição dos processos inflamatórios.

4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho estudaram-se amostras de vinho Moscatel de Setúbal e do Douro com o objectivo de proceder à sua caracterização química no que se refere à composição fenólica e fizeram-se alguns testes que permitissem dar pistas sobre funcionalidade susceptíveis de serem atribuídas a este tipo de amostra. Foram assim analisadas amostras de ensaios de vinificação a decorrer em 3 produtores diferentes e ainda amostras comerciais.

Em face do trabalho desenvolvido e dos resultados obtidos foi possível tirar algumas conclusões relativamente à pertinência das metodologias utilizadas, à complexidade na composição química destas amostras e sobre a possível contribuição de alguns compostos para a actividade biológica das amostras.

- as metodologias utilizadas no pré-tratatmento das amostras, extracção líquido-líquido e extracção em fase sólida, mostraram-se adequadas aos objectivos pretendidos neste trabalho. A extracção líquido-líquido, para além de permitir extractos mais concentrados, simplificava a amostra já que aqueles compostos que habitualmente caracterizam o perfil cromatográfico destas amostras a 280nm, a chamada “bossa”, desapareciam tornando as amostras mais simples para análise por exemplo por espectrometria de massa. A extracção em fase sólida permitia, para além do fraccionamento da amostra, fazer uma limpeza retirando os açúcares e ácidos que podem funcionar como interferentes importantes nas análises a efectuar com este tipo de amostras.

- No que se refere às metodologias analíticas usadas, cromatografia líquida associada a diferentes modos de detecção, mostraram-se adequadas, após a optmização das condições de separação e detecção, para a separação, identificação e quantificação de compostos nestas matrizes complexas. No entanto muito trabalho ficou ainda por concluir dado que não foi possível identificar todos os compostos detectados nas amostras e por isso terão que ser adoptadas de futuro outras metodologias que passam pela utilização de técnicas preparativas de modo a permitir a obtenção de maiores quantidades de amostras que possibilitem a utilização de outras metodologias analíticas como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

- As metodologias usadas permitiram a identificação na maior parte das vezes por espectrometria de massa com fonte APCI/ESI e utilizando preferencialmente o modo negativo, de vários compostos já descritos na literatura como os ácidos gálhico, protocatechuíco, *t* e *c*-coutárico, *t* e *c*-caftárico e o *t* e *c*-fertárico, procianidinas B1 e B2, catequina, galhato de etilo, *t*-piceid, quercetina-3-*O*-glucósido, campferol-3-*O*-glucósido, cafeato de etilo, quercetina, ácido quínico, ácido chiquímico, ácido tartárico e o ácido S-glutationil-2-*trans* cafeoiltartárico (GRP). O resveratrol e o piceid foram também identificados por espectrometria de massa mas em modo positivo. Após identificação, alguns compostos foram quantificados (*t*-resveratrol, galhato de etilo, cafeato de etilo e o coumarato de etilo) na maioria dos casos por fluorescência ou por espectrofotometria de absorção. Para os ésteres etílicos, galhato de etilo, cafeato de etilo e coumarato de etilo foram comparados resultados de quantificações obtidos utilizando os diferentes modos de detecção: espectrometria de massa, detecção espectrofotométria a 280 nm, fluorescência para os comprimentos de onda de excitação e emissão característicos destes compostos e modo electroquímico. Verifica-se que a quantificação em modo SIR é mais sensível do que os outros modos usados.

- foi também possível a identificação de um composto que a nosso ver nunca foi descrito nesta amostra e que corresponde ao glucósido do ácido indol-láctico. Foi apreesntado um esquema de fragmentação que justifica os fragmentos obtidos na análise efectuada por espectrometria de massa. O tempo de retenção do composto está de acordo com o previsto relativamente ao padrão do ácido indol-láctico que existe comercializado.

- são apresentadas várias estruturas prováveis para um grupo de compostos detectados por espectrometria de massa e que se caracteriza pela presença dos iões m/z 447, 461 e 475.

- Os compostos quantificados nas amostras apresentam teores que são geralmente mais elevados nas amostras dos produtores B e C e para as amostras comerciais há uma grande variabilidade mas amostras JMF e JPV, juntamente com as amostras de Moscatel do Douro são as que apresentam teores mais baixos. Estes resultados estão de acordo com os obtidos relativamente à avaliação do teor em fenóis totais pelo método de Folin Ciocalteau, em que o teor médio em fenóis totais foi de

1129±484 e de 817±400 mgL^{-1} expresso em ácido gálhico para o vinho Moscatel de Setúbal e Moscatel do Douro respectivamente. A amostra PMD (Moscatel do Douro) apresentava o menor teor (436 mgL^{-1}) e a amostra ACP230 o valor mais elevado (2912 mgL^{-1}).

- Nas amostras comerciais de Moscatel de Setúbal e do Douro analisadas os teores em galhato de etilo eram superiores (1.12 - 9.27 mgL^{-1}) aos determinados para o cafeato de etilo (0.17-2.29 mgL^{-1}) e cumarato de etilo (0.29-1.13 mgL^{-1}).

- O teor em *t*-resveratrol determinado nas amostras comerciais e analisado nos vinhos dos produtores JMF, ACP e HS foi de 0.15± 0.02 mgL^{-1}, 0.18± 0.01 mgL^{-1} e 0.15±0.01 mgL^{-1} respectivamente, existindo apenas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras dos produtores ACP e HS. Nas amostras dos ensaios de vinificação do produtor B observou-se que, durante o período de maceração, a concentração em *t*-resveratrol (valor médio de 0.22 mgL^{-1}) não apresenta diferenças estatisticamente significativas. Durante o processo de maturação o conteúdo em *t*-resveratrol diminui lentamente e ao fim de 18 meses o teor era de 0.14 ± 0.02 mgL^{-1}. Foram analisadas amostras dos outros produtores nas mesmas fases do processo de vinificação e os resultados mostram que a concentração do *t*-resveratrol em vinhos do produtor A é inferior à concentração determinada nos vinhos dos outros produtores (B e C);

- os resultados da avaliação da capacidade antioxidante das amostras comercias efectuada pelos métodos ORAC, FRAP e DPPH mostravam que existia uma boa correlação com o teor em fenóis totais determinado nas mesmas amostras. Os resultados do ensaio de DPPH mostram que o valor médio para o vinho Moscatel de Setúbal (69.9±12.2 %) era superior ao valor obtido para o vinho Moscatel do Douro (67.0 ±16.4 %) e Moscatel Roxo (69.8 %). No método ORAC a actividade antioxidante do vinho Moscatel Roxo (10.7 mM TEAC) era superior à actividade antioxidante média dos vinhos Moscatel de Setúbal (10.78±4.44 mM TEAC) e Moscatel do Douro (7.06±3.34 mM TEAC). Contrariamente o método FRAP mostrava que o vinho Moscatel Roxo apresentava menor actividade antioxidante (1.09 mM TEAC) do que o valor médio para o vinho Moscatel de Setúbal (3.01±1.36 mM TEAC) e Moscatel do Douro (2167±211 µM TEAC). De relembrar que o número de amostras de cada grupo era muito diferente, pelo que

os resultados para o vinho Moscatel Douro e Moscatel Roxo não podem ser considerados representativos mas meramente indicativos.

- Dos compostos analisados o teor em ácido cafeico e procianidina apresentam melhor correlação com os valores obtidos no teste DPPH, enquanto que para os testes ORAC os compostos galhato de etilo e ácido gálhico apresentavam melhor correlação nos resultados obtidos. O ácido gálhico também se correlaciona com o teste de FRAP.

- Quando se tratou por análise por componentes principais os resultados correspondentes às 70 amostras de vinho Moscatel (Setúbal, Douro e Roxo) verificou-se que as amostras sujeitas a processos de envelhecimento por períodos maiores se distinguiam das restantes pelas variáveis: 21D (5-HMF) e 30D (ácido *c*-caftárico e furfural) as amostras de vinho Moscatel do Douro se distinguiam pelas variáveis:41D (ácido *c*-coutárico e epigalhocatequina) e 43D (ácido *t*-coutárico+NI) e por fim era possível agrupar as restantes amostras num grupo que compreendia as amostras JMF, JPV,ACP, HS, e os restantes produtores. Dada a grande variedade de amostras por vezes havia algumas amostras de alguns produtores que se consideravam amostras desviantes. Pode assim afirmar-se que as amostras do vinho Moscatel de Setúbal não se agrupavam por produtor embora as amostras JPV e JMF estivessem próximas sugerindo processos de vinificação semelhantes.

- Quando para as mesmas amostras se consideraram só as variáveis que de alguma forma pudessem ser responsáveis por actividade biológica das amostras, a análise por componentes principais do conjunto de dados obtidos mostrou que era possível discriminar 2 grupos de amostras com maior actividade antioxidante (HS e ACP) e as amostras com menor actividade antioxidante (JPV e JMF). As amostras JPV e JMF distinguiam-se das restantes pelas variáveis: 15E (NI), 25E (ácido protocatechuico+NI), 34E (ácido *t*-caftárico+NI) e AT2.

- os resultados correspondentes à quantificação de alguns compostos mostram que por exemplo o vinho Moscatel Roxo se aproxima das amostras Moscatel de Setúbal envelhecidas, por apresentar alguns compostos nomeadamente o 5-HMF e furfural em maior concentração, enquanto que por exemplo o vinho Moscatel do

Douro se destaca do vinho Moscatel de Setúbal principalmente pelo teor mais elevado nos ácidos *c* e *t*-coutárico;

- No que se refere as resultados obtidos nas amostras da vinificação e após tratamento por análise por componentes principais conclui-se que as amostras da fase de maceração provenientes das duas cubas são diferentes entre si, apresentando uma das cubas uma grande variabilidade de resultados. Ao longo do processo de vinificação observou-se o aumento no teor dos compostos ácido gálhico, galhato de etilo, ácido cafeico, cafeato de etilo e ácido ferúlico.

- No que se refere aos ensaios efectuados para avaliação da actividade biológica verificou-se que tanto nos ensaios de EPR como nos ensaios de oxidação das LDL os resultados não eram muito relevantes, o que em parte poderia estar associado ao facto de estarmos a trabalhar com um extracto que de alguma forma poderia estar modificado e terem-se perdido alguns compostos importantes para a sua contribuição. Nos ensaios da actividade antiproliferativa nas células HT-29 verificou-se que os melhores resultados eram obtidos para o extracto C, mas os resultados continuavam a não ser muito relevantes. Pode dizer-se que em face dos resultados obtidos o extracto proveniente do produto C era biologicamente mais activo do que os restantes extractos, o que poderá ser explicado quer pelo facto do teor em fenóis totais ser superior, como também pela presença de compostos (catequina e galhato de etilo) com actividade biológica em concentrações superiores: a percentagem de inibição do radical $OH^{\cdot}$, determinada pela técnica EPR foi de 24% e a capacidade de retardação da oxidação das LDL de 23.5 %

- Quando se usou o modelo *in vitro* para a avaliação da permeabilidade em células Caco-2 com o objectivo de simular a absorção através do intestino verificou-se a passagem de alguns compostos que estavam presentes na amostra, compostos esses que apresentam um espectro de absorção típico com máximo a 280 nm e fluorescência elevada a 280/320nm. Não foi no entanto possível identificar este composto com a técnica de MS dado os pequenos volumes e baixa concentração na amostra.

- Os ensaios *in vivo* com o extracto de uva Moscatel mostraram que ao fim de um período de suplementação da dieta alimentar (21 dias) com um extracto de uva que foi caracterizado quimicamente, se verificou que houve um abaixamento

eststisticamente significativo do teor de triglicéridos. No que se refere à avaliação da acção anti-inflamatória aguda os resultados também se mostrarm estatisticamente significativos para os ratos que tinham consumido previamente o extracto de uva. Dado que o período dos ensaios foi relativamente curto haverá necessidade de dar continuidade ao trabalho e utilizar tempos de estudo maiores.

O trabalho desenvolvido e apresentado corresponde a uma parte do trabalho desenvolvido no laboratório com estas amostras e representa uma contribuição importante para um maior conhecimento sobre os vinhos e mais propriamente sobre os vinhos Moscatel de Setúbal. O conhecimento da amostra não ficou esgotado com o trabalho dado que, como se mostrou a sua complexidade é elevada e mesmo com os desenvolvimentos observados nas metodologias experimentais, no cuidado na optimização dos métodos, muito trabalho terá que ser desenvolvido não só para corroborar algumas das conclusões apresentadas mas também para colmatar aquelas áreas do trabalho em que não houve disponibilidade temporal para avançar com mais trabalho experimental. Na medida do possível tentou-se apresentar várias abordagens diferentes para a amostra dado que, não será só importante dizer o que está presente em termos de composição química, mas avaliar também que efeitos pode ter e principalmente tentar perceber quais os compostos que podem estar envolvidos nesses mecanismos e para isso os ensaios *in vitro* e *in vitro* revelam-se da maior importância.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Regulamento (CE) nº 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Dezembro de 2006 relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos. *JOL404* de 30.12.06, 9-25.

2. Cao G., Sofic E., Prior R.L., (1997). Antioxidant and Proxidant behavior of flavonoids:structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine,* 22 (5), 749-760.

3. Wang H., Cao G., Prior R.L. (1997). The oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 304-309.

4. Vinson J.A., Proch J., Bose P., (2001). Determination of quantity and quality of polyphenol antioxidants in foods and beverages. *Methods in Enzymology,* 335, 103-114

.

5. Wang H., Cao G.H., Prior, R.L., (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44 (3), 701-705.

6. Kaur C., Kapoor H.C. (2001). Antioxidants in fruit and vegetables-the millenium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 703-725.

7. Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44 (11), 3426-3431.

8. Atoui A. K., Mansouri A., Boskou G., Kefalas P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89, 27–36.

9. Del Caro A., Piga A., Vacca V., Agabbio M., (2004). Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry*, 84, 99–105.

10. Lugasi, A., Hóvári, J., (2003). Antioxidant properties of commercial alcoholic and nonalcoholic beverages. *Nahrung/Food* 47, 2, 79 – 86.

11. Pour Nikfardjam M.S., László M., Avar P., Figler M., Ohmacht R., (2006). Polyphenols, anthocyanins, and trans-resveratrol in red wines from the Hungarian Villány region. *Food Chemistry*, 98, 453-462.

12. Chamkha, M., Cathala, B., Cheynier, V., Douillard, R., (2003). Phenolic composition of champagnes from Chardonnay and Pinot Noir vintages. *Journal of Agriculture and Food Chemistry,* 51, 3179-3184.

13. Cooper, H.J.,Marshall, A.G., (2001). Electrospray ionization fourier transform mass spectrometric analysis of wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 5710-5718.

14. Frankel, E.N., German, J.B., Kinsella, J.E., Parks, E., Kanner, J., (1993).Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet*, 8843, 449-506.

15. Soleas G.J., Grass L., Josephy P.D., Goldberg D.M., Diamandis E.P., (2006). A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical Biochemistry*, 39, 492–497.

16. Stoclet, J.C., Chataigneau, T., Ndiaye, M., Oak, M.H., El Bedoui, J., Chataigneau, M., Schini-Kerth, V.B., (2004). Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology,* 500, 299-313.

17. Rimm, E.B., Giovannucci E.L., Willett, W.C., Colditz, G.A., Ascherio, A., Rosner, B., Stampfer, M.J., (1991). Prospective study of alcohol consumption and the risk of coronary disease in men. *Lancet*, 338, 464-468.

18. Kannel, R.C., Ellison I., (1996). Alcohol and coronary disease: the evidence for protective effect. *Clinical Chimica Acta*, 246, 59-76.

19. Renaud, S., Lorgeril, M., (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet,* 20, 1532-1526.

20. Wollin, S.D., Jones, P.J.H., (2001). Alcohol, red wine and cardiovascular disease. *The Journal of Nutrition*, 131, 1401-1404.

21. Teissedre P., Landrault, N., (2000). Wine phenolics: contribution to dietary intake and bioavailability. *Food Research International*, 33 (6), 461-467.

22. Alonso Borbalán, A.M., Zorro, L., Guillén, D.A., García Barroso, C., (2003). Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography-mass spectrometry and its relationship to antioxidant power. *Journal of Chromatography A,* 1012 , 31-38.

23. Pomar, F., Novo, M., Masa, A., (2005). Varietal differences among the anthocyanin profile of 50 red table grape cultivars studied by hight performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A,* 1094 , 34-41.

24. Pérez-Magarino, S., González-San José, M.L., (2006). Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry*, 96, 197-208.

25. Sarni-Machado, P., Cheynier, V., Moutounet, M., (1999). Interactions of grapes seed tannins with salivary proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 42-47.

26. Monagas, M., Bartolomé, B., Mez-Cordovés, C., (2005). Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 85–118.

27. de Villiers, A., Vanhoenacker, G., Majek, P., Sandra, P., (2004). Determination of anthocyanins in wine by direct injection liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and classification of wines using discriminant analysis. *Journal of chromatography A,* 1054 ,195-204.

28. Haslam, E., (1998). Pratical polyphenolics, from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge:Cambrigge University Press.

29. Croteau, R., Kutchan T.M., Lewis, N.G., (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). Biochemistry & Molecular Biology of Plants, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds.

30. Adams D., (2006). Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology Viticulture*, 57, 249-268.

31. Haddock, E.A., Gupta, R.K., Al-Shafi, S.M.K., Layden, K., Haslam, E., Magnolato, D., (1982). The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in plants: biogenetic and molecular taxonomic considerations. *Phytochemistry*, 21, 1049–1062.

32. Downey, M.O., Dokoozlian N.K., Krstic M.P., (2006). Cultural Practice and Environmental Impacts on the Flavonoid Composition of Grapes and Wine: A Review of Recent Research, *American Journal of Viticulture and Enology*, 57, 257-268.

33. Fuleki, T., Ricardo-da-Silva, J.M., (2003). Effects of Cultivar and Processing Method on the Contents of Catechins and Procyanidins in Grape Juice, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 640-646.

34. Jackson, I., Lombard, P.B., (1993). Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality:a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 409-430.

35. Jones, G.V., Davis, R.E., (2000). Climate Influences on Grapevine Phenology, Grape Composition, and Wine Production and Quality for Bordeaux, France, *American Journal of Viticulture and Enology*, 51, 249-261.

36. International Federation of Organic Agriculture Movements (2005). Normas IFOAM.

37. Asami, D. K.; Hong, Y.-J.; Barrett, D. M.; Mitchell, A. E. (2003). Comparison of the Total Phenolic and Ascorbic Acid Content of Freeze-Dried and Air-Dried Marionberry, Strawberry, and Corn Grown Using Conventional, Organic, and Sustainable Agricultural Practices. *Journal of Agriculture and Food Chemistry,* 51, 1237-1241.

38. Lombardi-Boccia, G., Lucarini, M., Lanzi, S., Aguzzi, A., Cappelloni, M., (2004). Nutrients and Antioxidant Molecules in Yellow Plums (*Prunus domestica* L.) from Conventional and Organic Productions: A Comparative Study. *Journal of Agriculture and Food Chemistry,*
52, 90-94.

39. Rodríguez Montealegre, R., Peces R.R., Chacón Vozmediano, J.L., Martínez Gascuena, J., García Romero, E., (2006). Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 687-693.

40. Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., Schieber, A., (2004).Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 4360-4367.

41. Makris, D.P., Psarra, E., Kallithraka, S., Kefalas, P., (2003). The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines. *Food Research International*, 36 805-814.

42. Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., (2006). Handbook of Enology. The microbiology of wine and vinifications, volume 1. John Wiley & Sons, Ltd.

43. Adrian, M., Jeandet, P., Breuil, A.C., Levite, D., Debord, S., Bessis, R., (2000). Assay of resveratrol and derivative stilbenes in wines by direct injection High Performance Liquid Chromatography, *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 37-41.

44. Adrian, M., Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.C., Tesson, L., Bessis, R., (2000). Stilbenes content of mature Vitis vinifera berries in response to UV-C elicitation , *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48 (12), 6103-6105.

45. Melzoch, K., Hanzlíková, I., Filip, V., Buckiová, D., Smidrkal, J., (2001). Resveratrol in Parts of Vine and Wine Originating from Bohemian and Moravian Vineyard Regions, *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 66, 53-57.

46. Sun, B., Ribes, A.M., Leandro, M.C., Belchior, A.P., Spranger, M.I., (2006). Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation, *Analytica Chimica Acta*, 563, 382-390.

47. Ribeiro de Lima, M.T., Waffo-Téguo, P., Teissedre, P.L., Pujolas, A., Vercauteren, J., Cabanis, J.C., Mérillon, J.M., (1999). Determination of stilbenes (*trans-astringin, cis* and *trans*-piceid, and *cis*- and *trans*-resveratrol) in Portuguese wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 2666-2670.

48. Makris, D.P., Kallithraka, S., Kefalas, P., (2006). Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 396-404.

49. Singleton, V. L., Trousdale, E. K., (1992). Anthocyanin-tannin interactions explaining differences in polymeric phenols between white and red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43, 63-70.

50. Arnold, R. A; Noble, A. C.; Singleton, V. L., (1980). Bitterness and astringency of phenolic factions in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 28, 675-678..

51. Vinson, J. A.; Dabbagh, Y. A.; Serry, M. M.; Jang, J., (1995). Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 2800-2802.

52. Ricardo da Silva, J. M.; Darmon, N.; Fernández, Y.; Mitjavila, S.,(1991). Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 39, 1549-1552.

53. Wu, Q., Wang, M., Simon, J.E., (2003). Determination of Proanthocyanidins in Grape Products by Liquid Chromatography/Mass Spectrometric Detection under Low Collision Energy. *Analytical Chemistry*, 75, 2440-2444.

54. Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O., Ricardo da Silva,J.M.,(2003). Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-ol Composition of Wines and Grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6475 – 6481.

55. Gawel R., (1998). Red wine astringency: A review. *Australian Journal of Grape Wine Research*,4, 74-98.

56. Drewnowski, A., Gomez-Carneros, C., Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review (2000).*American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 1424-1435.

57. Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, A.S., (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 579-590.

58. Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Teissedre. P.L., (1995). Principal Phenolic Phytochemicals in Selected California Wines and Their Antioxidant Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 890-894.

59. Villaño, D., Fernandez-Pachon, M.S., Trancoso, A.M., Garcia-Parrila, M.C. (2004). The antioxidant activity of wines determined by the $ABTS^{+}$ method: influence of sample dilution and time. *Talanta*, 64, 2, 501-509.

60. Sato, M., Ramarathnam, N., Suzuki, Y., Ohkubo, T., Takeuchi, M., Ochi, H., (1996). Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 37-41.

61. Darias-Martin, J., Rodriguez, E., Diaz, E., Lamuela-Raventos, R., (2000). Effect of skin contact on the antioxidant phenolic in white wine. *Food Chemistry*, 71, 483-487.

62. Darias-Martin, J., Diaz-Gonzalez, D., Diaz-Romero, C., (2004). Influence of two pressing processes on the quality of must and white wine production. *Journal of Food Engineering*, 63, 335-340.

63. Falqué, E., Fernández, E., (1996). Effects of different skin contact times on treixadura wine composition. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, 309-312.

64. Gómez-Míguez, M., Heredia, F.J., (2004). Effect of the maceration technique on the relationships between anthocyanin composition and objective color of Syrah wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5117-5123.

65. Gómez-Míguez, M., González-Miret, M.L., Heredia, F.J., (2007). Evolution of colour and anthocyanin composition of Syrah wines elaborated with pre-fermentative cold maceration. *Journal of Food Engineering*, 79, 271-278.

66. Ho, P., Hogg, T.A., Silva, M.C.M. (1999). Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines. Food Chemistry, 64, 115-122.

67. Fuhrman, B., Volkova, N., Aviram, M., (2001). White wine with red wine-like properties: increased extraction of grape skin's-polyphenols improves the antioxidant capacity of the derived white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3164-3168.

68. Fernández-Pachón, M.S., Villãno, D., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C., (2006). Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. *Analytica Chimica Acta,* 563, 101–108.

69. Barón, R., Mérida, J., Mayén, M., Medina, M., (1997) "Changes in phenolic compounds and browning during aging of sherry-type wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45,
1682-1685.

70. Garcia-Viguera, C., Bridle, P., (1995). Analysis of non-coloured phenolic compounds in red wines. A comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis. *Food Chemistry*, 54, 349-352.

71. Kallithraka S., Tsoutsouras E., Tzourou E., Lanaridis P. (2006). Principal phenolic compounds in Greek red wines. *Food Chemistry*, 9, 784–793

72. Castellari, M., Sartini, E., Fabiani, A., Arfelli, G., Amati, A., (2002).Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. *Journal of Chromatography A*, 973, 221-227.

73. Frega, N.G., Boselli, E., Bendia, E., Minardi, M., Benedetti,A., (2006). Ethyl caffeoate: Liquid chromatography–tandem mass spectrometric analysis in Verdicchio wine and effects on hepatic stellate cells and intracellular peroxidation. *Analytica Chimica Acta,* 563, 375–381.

74. Simonetti, P., Pietta, P., Testolin, G., (1997). Antioxidant potential of italian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1152-1155.

75. Moreno-Labanda, J. F., Mallavia, R., Perez-Fons, L., Lizama, V., Saura, D., Micol, V., (2004). Determination of piceid and resveratrol in Spanish wines deriving from Monastrell (*Vitis vinifera L.)* grape variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5396–5403.

76. Pozo-Bayón, M.A., Hernández, M.T., Martín-Álvarez, P.J., Polo, M.C. (2003). Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2089-2095.

77. Gómez-Alonso, S., Garcia-Romero, E., Hermosia-Gutiérrez, I., (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 618–626.

78. Kolouchová-Hanzlíková, I., Melzoch, K., Filip, V., Smidrkal, J., (2004). Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detection in wines. *Food Chemistry*, 87, 151-158.

79. Vinas, P., López-Erroz, C., Marín-Hernández, M., Hernández-Córdoba, M., (2000). Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescente detection. *Journal of chromatography A,* 871, 85-93.

80. Baptista, J.A.B., Tavares, J.F.P., Carvalho R.C.B., (2001). Comparison of polyphenols and aroma in red wines from Portuguese mainland versus Azores Islands. *Food Research International*, 34, 345-355.

81. Gürbüz, O., Göçmen, D., Dağdelen F., Gürsoy, M., Aydin, S., Sahin, I., Büyükuysal, L., Usta, M., (2007). Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*, 100, 518-525.

82. Gerogiannaki-Christopoulou, M., Athanasopoulos, P., Kyriakidis, N., Gerogiannaki, I.A., Spanos, M., (2006). T*rans*-resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties. *Food Control*, 17, 700-706.

83. Abril, M., Neguerela, A.I., Pérez, C., Juan, T., Estopañán, G., (2005). Preliminary study of resveratrol content in Aragón red and rosé wines. *Food Chemistry,* 92, 729-736.

84. Careri, M., Corradini, C., Elviri, L., Nicoletti, I., Zagnoni, I., (2003). Direct HPLC analysis of quercetin and *trans*/resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5226-5231.

85. Gambuti, A., Strollo, D., Ugliano, M., Lecce, L., Moio, L., (2004). *Trans*-resveratrol, quercetin, (+)-catechin, and (-)-epicatechin content in south italian monovarietal wines:relationship with maceration time and marc pressing during winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5747-5751.

86. Rodríguez-Delgado, M.A., González G., Pérez-Trujillo, J.P., García-Montelongo, F.J., (2002). *Trans*-resveratrol in wines from the Canary Islands (Spain). Analysis by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 76, 371-375.

87. Vitrac, X., Monti, J.P., Vercauteren, J., Deffieux, G., Mérillon, J.M., (2002). Direct liquid chromatography analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 458 103-110.

88. Donner, L.W., Becard, G., Irwin, P.L., (1993). Binding of flavonoids by polyvinylpyrrolidone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 753-757.

89. Maury, C., Sarni-Manchado, P., Lefèbvre, S., Cheynier, V., Moutounet, M., (2001).Influence of fining with different molecular weight gelatins on proanthocyanidin composition and perception of wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 140-145.

90. Sims, C.A., Eastridge, J.S., Bates, R.P., (1995). Changes in phenols, color, and sensory characteristics of muscadine wines by pre- and post-fermentation additions of PVPP, casein, and gelatine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 155-158.

91. Sacchi, K.L., Bisson, L.F., Adams, D.O., (2005). A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture,*56, 197-206.

92. Monagas, M., Suárez, R., Gómez-Cordovés, C., BArtolomé, B., (2005). Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS. *American Journal of Enology and Viticulture,*56, 139-147.

93. Revilla, E., Ryan, J.M., (2000). Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection without sample preparation. *Journal of Chromatography A,* 881, 461-469.

94. Garcia Barroso, C., López-Sánchez, L., Otero, J.C., Cela, R., Pérez-Bustamante, J.A. (1989). Studies on the browning of fino sherry and its relation to polyphenolic compounds. *Zeitschritf für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 189, 322-325.

95. Simpson, R.F., (1982). Factors affecting oxidative browning of white wine. *Vitis*, 21, 233-239.

96. Cheynier, V., Rigaud, J., Souquet, J.M., Barillère, J.M., Moutounet, M., (1990). Must browning in relation to the behaviour of phenolic compounds during oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41, 346-349.

97. Singleton, V.L., Timberlake, C.F., Lea, A.G.H., (1978). The phenolic cinnamates of white grapes and wines. *Journal of Science Food Agriculture*, 29, 403-410.

98. Clark, A.C., Prenzler, P.D., Scollary, G.R., (2003). The role of copper (III) in the bridging reactions of (+)-catechin by glyoxylic acid in a model white model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6204-6210.

99. Es-Safi, NE., Le Guernevé, C., Cheynier, V., Moutounet, M., (2000). New phenolic compounds formed by evolution of (+)-catechin and glyoxylic acid in hydroalcoholic solution and their implication in color changes of grape-derived foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4233-4240.

100. Es-Safi, NE., Cheynier, V., Moutounet, M., (2003). Effect of copper on oxidation of (+)-catechin in a model solution system. *International Journal of Food Science & Technology, 38,153-163.*

101. Es-Safi, NE., Le Guernevé, C., Cheynier, V., Fulcrand, H., Moutounet, M., (1999). New polyphenolic compounds with xanthylium skeletons formed through reaction between (+)-catechin and glyoxylic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 5211-5217.

102. Lopez-Toledano, A., Villãno-Valencia, D., Mayen, M., Merida, J., Medina, M., (2004). Interaction of yeast with the products resulting from the condensation reaction between (+)-catechin and acetaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2376-2381.

103. Fulcrand, H., Doco, T., Es-Safi, NE. Cheynier, V., Moutounet, M., (1996). Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 752, 85-91.

104. Ortega, A.F., López-Toledano, A., Mayen, M., Merida, J., Medina, M., (2003). Changes in color and phenolic compounds during oxidative aging of sherry white wine. *Journal Food Science,* 68, 2461-2467.

105. Conte, A., Pellegrini, S., Tagliazucchi, D., (2003). Synergistic protection pf PC12 cells from β-amyloid toxicity by resveratrol and catechin. *Brain Research Bulletin,*62, 29-38.

106. Subbaramaiah, K., Chung, W.J., Michaluart, P., Telang, N., Tanabe, T., Inone, H., Jang, M., Pezutto, J.M., Dannenberg, A.J., (1998). Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 Transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelias cells. *Journal Biological Chemistry*, 273, 21875-21882.

107. Kuroda, Y., Hara, Y., (1999). Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 436, 69-97.

108. Dell'Agli, M., Busciala, A., Bosisio, E., (2004). Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovascular Research,* 63, 593-602.

109. Visioli, F., Borsani, L., Galli, C., (2000). Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovascular Research,* 47, 55-60.

110. Alberto, M.R., Farias, M.E., Manca de Nadra, M., (2001). Effect of gallic acid and catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w growth and metabolism of organic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4359-4363.

111. Cooper, K., Chopra, M., Thurnham, D., (2004). Wine polyphenols and promotion of cardiac health. *Nutrition Research Reviews*, 17, 111-129.

112. Estruch, R., (2000). Wine and cardiovascular disease. *Food Research International,*33, 219-226.

113. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Research Biology and Medicine*, 20, 933-956.

114. Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D., (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113-4117.

115. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products:Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99,191-203.

116. Chalas, J., Claise, C., Edeas, M., Messaoudi, C., Vergnes, L., Abella, A., Lindenbaum, A., (2001). Effect of ethyl esterification of phenolic acids on low-density lipoprotein oxidation. *Biomedical & Pharmacotherapy*, 55, 54-60.

117. Nakayama T. (1994). Suppression of hydroperoxide-induced citotoxicity by poliphenols. *Cancer Research*, 54, 1991-1993.

118. Adrian, M., Jeandet, P., Breuil, A.C., Levite, D., Debord, S., Bessis, R., (2000). Assay of resveratrol and derivative stlbenes in wines by direct injection High Performance Liquid Chromatography. *American Journal of Enology and Viticulture* 51 (1), 37-41.

119. Urpí-Sardà, M., Jáuregui, O., Lamuela-Raventós, R.M., Jaeger, W., Miksits, M., Covas, M.I., Andres-Lacueva, C., (2005). Uptake of diet resveratrol into the human low density lipoprotein. Identification and quantification of resveratrol metabolites by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 77, 3149-3155.

120. Frémont, L. (2000). Biologial effects of resveratrol. *Life Sciences. 66*, 663-673.

121. Fremont, L.; Belguendou, L.; Delpal, S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols realted to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sci.* **1999**, *64*, 2511-2521.

122. Wang, Z. R.; Huang, Y. Z.; Zou, J. G.; Cao, K. J.; Xu, Y. N.; Wu, J. M. (2002). Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *International Journal Molecular Medicin, 9*, 77-79.

123. Sato, M., Bagchi, D., Tosaki, A., Das, D.K., (2001). Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia/reperfusion-induced activation of JNK-1- and C-JUN. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 729-737.

124. Soares de Moura, R., Resende, A.C., Moura, A.S., Maradei, M.F., (2007). Protective action of a hydroalcoholic extract of a vinífera grape skin on experimental preeclampsia in rats. *Hypertension in Pregnancy,* 26, 89–100.

125. Minussi, R., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G.M., Duran, N., (2003). Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry, 82,409–*416.

126. Larrosa, M., Espin, J.C., Tomás-Barberán, F.A., (2003). Antioxidant capacity of tomato juice functionalised with enzymatically synthesised hydroxytyrosol, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 658-666.

127. Osman, H., Maalej, N., Shanmuganayagam, D., Folts, J., (1998). Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibts platelet activity in dogs and monkeys. *Journal Nutrition*, 128, 2307-2312.

128. Ahn, H.S., Jeon, T., Lee, J.Y., Hwang, S.G., Lim, Y., park, D.K., (2002). Antioxidantive activity of persimmon and grape seed extract: *in vitro* and *in vivo*. *Nutrition Research*, 22, 1265-1273.

129. Hertog MG, Hollman PC (1996). Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *European Journal Clinical* Nutrition, 50, 63-71.

130. Kondratyuk,T.P., Pezzuto, J.M., (2004). Natural product polyphenols of relevance to human health. Pharmaceutical Biology, 42, 46-63.

131. Insel, P., Turner, R. E., Ross, D.,(2002). Nutrition. Jones and Bartlett Publishers, ISBN: 0-7637-1985-4.

132. Leenen, R., Roodenburg,A.J.C., Tijburg, L.B.M., Wiseman, S.A. (2000). A single dose tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. *European Journal of Clinical Nutrition,* 54, 87-92.

133. Lotito, B.B., Frei,B., (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? Free Radical Biology and Medicine, 41,1727-1746.

134. Scalert, A., Mannach, C., Morand, C., Rémesy, C., Jiménez, L., (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* 45, 287-306.

135. Bravo, L., Abia, R., Saura-Calixto, F., (1994). Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on *in vivo* and *in vitro* properties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1481-1487.

136. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., (2004). Polyphenols food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition, 79*, 727-747.

137. Hollman, P.C.H., de Vries, J.H.M., Van Leeuwen, S.D., Memgelers, M.J.B., Katon, M.B., (1995) Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in heatlhy ileostomy volunteers, *American Journal Clinical Nutrition*, 62:1276-1282)

138. Hollman, P.C.H., VAn Trijp, J.M.P., Buysman, M.N.C.P., Gaag, M.S.V.d., Mengelers, M.J.B., de Vries, J.H.M., Katan, M.B., (1997). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters* 418, 152-156.

139. Sesink, A.L., O'Leary , K.A., Holmann, P.C., (2001). Quercetin glucuronides but not glycosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside. *Journal of Nutrition* 131 (7), 1938-41.

140. Day, A.J., Cañada, F.J., Diaz, J.C., Icroo, P.A., Mclauchlan, R., Faulds, C.B., Plumb, G.W., Morgan, M.R.A., Williamson, G., (2000). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters*, 468:166-179.

141. Németh, K., Plumb, G.W., Berrin, J.g., Juge, N., Jacob, R., Naim, H.Y., Williamson, G., Swallow, D.M., Kroon, P.A., (2003). Deglycosylation by small intestinal epitheliar cell beta-glucosidades is a critical step in the absorption and metabolism of dietary in the absorption and metabolism of dietary flavonois glycosides in humans. *European Journal of Nutrition,*42, 29-42.

142. Scheline, R.R. (1973). Metabolism of foreign compunds by gastrointestinal microorganisms. *Pharmacology Reviews*, 25,451-523.

143. Hollman, PCH., Bijsman MNCP., van gamereny, Cnossen EPJ, de Vries JHM, katan MB, (1999). The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoids glycosides in man. *Free Radical research*, 31, 6, 569-573.

144. Lee, M.J., Wang, Z., Li, H., Chen, L., Suni, Y., Gobbo, S., BAlentine, DA, Yang, CS, (1995). Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Câncer Epidemology Biomarkers Prevention*, 4, 393-399.

145. Hollman, Peter (2004). Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids**:** Pharmaceutical Biology. *International Journal of Pharmacognosy*, 42, 74-83.

146. Augustin Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., Rémésy, C., (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedecine and Pharmacotherapy* 56, 276-282.

147. Petersson, H.M., Farrugia, L.J., Mullen, W., Crozier, A., Hartley, R.C., (2006). Isotopic labelling of quercetin 3-glucoside. *Tetrahedron*, 62, 7257-7265.

148. Mullen, W., Hartley, R.C., Crozier, A., (2003). Detection and identification of ^{14}C-labelled flavonol metabolites by high-performance liquid chromatography–radiocounting and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1007, 21-29.

149. Caldwell, S.T., Crozier, A., Hartley, R.C., (2000). Isotopic Labelling of Quercetin 4′-*O*-β-D -Glucoside *Tetrahedron*, 56, 4101-4106;

150. Mullen, W., Graf, B.A., Caldwell, S.T., Hartley, R.C., Duthie, G.G., Edwards, C.A., Lean M.E.J., Crozier, A., (2002). Determination of Flavonol Metabolites in Plasma and Tissues of Rats by HPLC-Radiocounting and Tandem Mass Spectrometry Following Oral Ingestion of [2-^{14}C]Quercetin-4'-glucoside**.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6902-6909.

151. Lapornik, B., Prosek, M., Golc Wondra, A., (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, 214-222.

152. Palma, M., Taylor, L.T., (1999). Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. *Journal of Chromatography A*, 849, 117-124.

153. Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nuñez, M.J., Nicoli, M.C., (2005). Optimization of continuos phenol extraction from *Vitis vinifera* by products. *Food Chemistry*, 92,109-117.

154. Murga, R., Sanz, M.T., Beltrán, S., Cabezas, J.L., (2002).Solubility of some phenolic compounds container in grape seeds, in supercritical carbon dioxide. *The Journal of supercritical fluids*, 23, 91-179.

155. Rodriguez-Delgado, M.A., Malovaná, S., Pérez, J.P. Borges, T., García Montelongo, F.J., (2001). Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *Journal of chromatography A*, 912,2, 249-257.

156. Malovaná, S., García Montelongo, F.J., Pérez, J.P., Rodríguez-Delgado, M.A.(2001). Optimisation of sample preparation for the determination of *trans*-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta,* 428,*245-253*.

157. del Álamo, M., Casado, L., Hernández, V., Juan José Jiménez, J.J., (2004). Determination of free molecular phenolics and catechins in wine by solid phase extraction on polymeric cartridges and liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 1049, 97-105

158. Gómez-Alonso, S., Garcia-Romero, E., Hermosia-Gutiérrez, I., (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 618–626.

159. Curvelo-Garcia, A.S.; Spranger-Garcia, M.I. (1988). Methods for determining total polyphenols in red and white wines. *Ciencia e Tecnica Vitivinicola*, 7(1), 11-18.

160. Wilcox, J.K., Ash, S.L., Catignani, G.L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease, C*ritical Reviews in Food Science and Nutrition,* 44, 275-295.

161. Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity of selected red, rose and white wines. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 79, 1301-1304.

162. Katalinic, V., Milos, M., Modum, D., Music, I., Bodan, M., (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin, *Food Chemistry, 86* 593–600.

163. Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytoitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L., (2004). Lipofilix and hidrofilic antioxidant capacities os common foods in the United States. *Journal of Agriculture and Food Chemistry,* 52, 4026-4037.

164. Rivero-Pérez, M.D., Muñiz, P., González-Sanjosé, M.L., (2007). Antioxidant Profile of Red Wines Evaluated by Total Antioxidant Capacity, Scavenger Activity, and Biomarkers of Oxidative Stress Methodologies . *Journal of Agriculture and Food Chemistry,* 55, 5476 -5483.

165. Fujikawa, M., Nakao, K., Shimizu, R., Akamatsu, M., (2007). QSAR study on permeability of hydrophobic compounds with artificial membranes Bioorganic & Medicinal Chemistry 15 (2007) 3756–3767.

166. Serra, H., Mendes, T., Bronze, M.R., Simplício, A.L., (2008). Prediction of intestinal absorption and metabolism of pharmacologically active flavones and flavanones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16, 4009-4018.

167. Portanova, J.P., Zhang, Y., Anderson, G.D., Hauser, S.D., Masferrer, J.L., Seibert, K., Gregory, S.A., Isakson, P.C., (1996). Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. *Journal Experimental Medicine, 184,883-891.*

168. Zhang, L., Li, J., Shi-Chun. Y., jin, Y., Xiong-Wen, L., Zou, Y.H., Li, Y., (2007). Therapeutic effects and mechanisms of total flavonoids of *Turpinia Arguta Seen* on adjuvant arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 116,167-172.

169. Sautebin L, Ialenti, A., Ianaro, A., Di Rosa, M., *et al* Endogenous Nitric Oxide Increases Prostaglandin Biosynthesis In Carrageenin Rat Paw Oedema, *European Journal of Pharmacology*, 286: 219-222 (1995)

170. Decreto-Lei de 429/86 de 29 de Dezembro de 1986. *Diário da República nº 298-I Série.* Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação. Lisboa

171. Acedido em Fevereiro de 2008, no web site da Viniportugal: http://www. Viniportugal.pt/índex.php?option=com_content &task=view&id=15&Itemid=31

172. Decreto-Lei nº 212/2004 de 23 de Agosto de 2004. *Diário da República nº 198-I Série.* Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa

173. Decreto-Lei nº 13/92 de 4 de Fevereiro de 1992. *Diário da República nº 29-I Série-A.* Ministério da Agricultura. Lisboa

174. Fortuna, A.M., Garcia, V.P., Homem-Cardoso, A., (2001). Os vinhos da Península de Setúbal. Enciclopédia dos vinhos de Portugal, Chaves Ferreira – Publicações , S.A.Lisboa.

175. Comissão Vitivinícola Regional da Península de Setúbal (2008). Guia de Vinhos da Península de Setúbal, Setúbal.

176. Santos, J.B., (2001). Moscatel. *Revista de Vinhos*, 137, 85-90.

177. Instituto da Vinha e do Vinho. Vinhos e aguardentes de Portugal. Anuário 2006/2007.Lisboa.

178. Decreto-lei nº254/98 de 11 de Agosto de 1998. *Diário da República nº 184-I Série-A.* Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa

179. Acedido em 20 de Setembro de 2007, no web site da Adega Cooperativa de Favaios: http://www.adegacooperativadefavaios.pt.

180. Decreto-Lei nº 190/2001 de 25 Junho de 2001). *Diário da República nº 145-I Série.* Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa

181. Wang, Y., Catana, F., Yang, Y., Roderick, R., van Breemen, R.B., (2002). An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice and in wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 431-435.

182. Alonso Borbalan, A.M., Zorro, L., Guillén, D.A., Barroso, C.G., (2003). Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography-mass spectrometry and its relationship to antioxidant power. J*ournal Chromatography A*, 1012, 31-38.

183. Ahna, H.S., Jeona, T., Leea, J.Y., Hwangb, S.G., Lima, Y., Parka, D.K., (2002). Antioxidative activity of persimmon and grape seed extract: in vitro and in vivo. *Nutrition Research,* 22, 1265–1273

184. Loredana La Torre G.L., Laganà, G., Bellocco, E., Vilasi, F., Salvo, F., Dugo, G., (2004). Improvement on enzymatic hydrolysis of resveratrol glucosides in wine. *Food Chemistry*, 85 259-266.

185. Katalinic V., Milos M., Kulisic T. e Jukic M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chemistry, 94, 550-557

186. Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Prior, R.L., (2002). High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 4437-4444.

187. Szöllösi, R., Varga I.S., (2002). Total antioxidant power in some species of Labiatae. *Acta Biologica Szegediensis*, 46, 125-127

188. Miranda-Rottmann, S., Aspillaga, A.A., Peärez, D., Vasquez, L., Martinez, A.L., Leighton, F., (2002). Juice and Phenolic Fractions of the Berry *Aristotelia chilensis* Inhibit LDL Oxidation *in Vitro* and Protect Human Endothelial Cells against Oxidative Stress. *Journal of Agriculture and Food Chemistry. 50,* 7542–7547

189. Leonard, S.S., Xia, C., Jiang, B., Stinefelt, B., Klandorf, H., Harris, G.K., Shia, X., (2003). Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309 1017–1026.

190. Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., (1999). Phenolic compounds nad their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry*, 66, 401-436.

191. Sun, J., Liang, F., Bin, Y., Li, P., Duan, C., (2007). Screening Non-colored Phenolics in Red Wines using Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Libraries *Molecules*, 12, 679-693.

192. Sánchez-Rabaneda, F., Jáuregui , O., Casals, I., Andrés-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., Rosa M. Lamuela-Raventós, R., (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa. *Journal of Mass Spectrometry*, 38, 35-42.

193. Rodríguez Montealegre, R., Peces R.R., Chacón Vozmediano, J.L., Martínez Gascuena, J., García Romero, E., (2006). Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 687-693.

194. Chamkha, M., Cathala, B., Cheynier, V., Douillard, R., (2003). Phenolic Composition of Champagnes from Chardonnay and Pinot Noir Vintages. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* , 51, 3179-3184.

195.Vauzour, D., Munier, S., Vercauteren, J., (2005). Extracts preparation from champagne wine from biological studies. Comunicação apresentada em *In vino analytica Scientia 2005*, Montpellier, France.

196. Dubbera, M.J., (2005). The simultaneous determination of selected flavonol glycosides and aglycones in *Ginkgo biloba* oral dosage forms by high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37, 723–73.

197. Hernández, T., Estrella, I., Carlavilla, D., Martín-Álvarez, P.J., Moreno-Arribas, M.V., (2006). Phenolic compounds in red wine subjected to industrial malolactic fermentation and ageing on lees. *Analytica Chimica Acta*, 563 116-125.

198. Silva, S., Matias, A.A., Nunes, A., Duarte, C., Coelho, A.V., Bronze, M.R., (2005). Identification of flavonol glycosides in winemaking by-products by HPLC with different detectors and hyphenated with mass spectrometry. *Ciência e Técniva Vitivinícola,* 20, 17-33.

199. Stoggl W. M., Huck , C. W., Bonn, G.K., (2004). Structural elucidation of catechin and epicatechin in sorrel leaf extracts using liquid-chromatography coupled to diode array-, fluorescence and mass spectrometric detection. *Journal of Separation Science*, 27, 524–528.

200. Bevilacqua, L., Buiarelli, F., Coccioli, F., (2004). Identification of compounds in wine bu HPLC-TANDEM MASS SPECTROMETRY. *Annali di Chimica*, **94**, by Società Chimica Italiana

201.Linsenmeir A., Löhnertz, O., Schubert, S., (2004). Effect of different N fertilization of vine on the tryptophan, free and total indole-3-acetic acid concentrations, *Vitis,* 43, 157–162.

202. Baderschneider, B., Winterhalter, P., (2001). Isolation and Characterization of Novel Benzoates, Cinnamates, Flavonoids, and Lignans from Riesling Wine and Screening for Antioxidant Activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry,* 49, 2788-2798.

203. Justesen, U., (2000). Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs, *Journal of Chromatography A* , 902, 369 – 379.

202. Szostek , B., Orska-Gawrys , J ., Surowiec , I ., Trojanowicz, M ., (2003). Investigation of natural dyes occurring in historical Coptic textiles by high-performance liquid chromatography with UV–Vis and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* , 1012, 179 – 192.

204. Jeffrey, A.M., Knight, M., Evans, W.C., (1972). The bacterial degradation of flavonoids. Hydroxylation of the A-ring of taxifolin by a soil pseudomonad, *Biochemistry Journal*, 130, 373-381.

205. Penna, N.G., Daudt, C-E., Henriques, J.A.P., (2001). Comportamento de ésteres hidroxicinâmicos durante a vinificação de vinhos brancos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 36, 983-989.

206. Cheynier, V., Rigaud, J., Moutounet, M., (1990a). Oxidation kinetics of *trans*-caffeoyltartrate and its glutathione derivatives in grape musts. *Phytochemistry*, 29, 1751-1753.

207. Cheynier, V., Rigaud, J., Souquet, J.M., Duprat, F., Moutounet, M., (1990b). Must browning in relation to the behaviour of phenolic compounds during oxidation. *American Jounal of Enology and Viticulture*, 41, 346-349.

208. Bertelli, A.A.E., (2007). Wine, research and cardiovascular disease: Instructionsfor use . *Atherosclerosis*, 195, 242-247.

209. Guinon, J.L., Ortega, E., Garcia-Anton, J., Perez-Herranz, V., (2007). Moving average and savitzki-golay smoothing filters using mathcad in International conference on engineering education-ICEE, Coimbra, Portugal

210. Silva, S., Gomes, M.L., Vilas Boas, L., Matias, A., Nunes, A., Duarte, C., Coelho, A.V., Bronze, M.R., (2005). Liquid chromatography hyphenated with mass spectrometry in the analysis of phenolic compounds in olive tree products and winemaking by products. Apresentado no Presented 29th Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, Estocolmo, Suécia.

211. Callemien, D., Jerkovic, V., Rozenberg, R., Collin, S., (2005). Hop as an Interesting Source of Resveratrol for Brewers: Optimization of the Extraction and Quantitative Study by Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 424-429.

212. Trela, B.C., Waterhouse, A.L., (1996). Resveratrol: Isomeric Molar Absorptivities and Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1253-1257.

213. López, M., Martínez, F., Del Valle, C., Orte, C., Miró M., (2001). Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 922, 359-363.

214. Sun, B., Ribes, A.M., Leandro, M.C., Belchior, A.P., Spranger, M.I. (2006). Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. Analytica Chimica Acta 563, 382-390.

215. Stervbo, U., Vang, O., Bonnesen, C., (2007). A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. Food Chemistry 101, 449-465.

216. Bertelli A., Falchi M., Lo Scalzo R., Morelli R., (2004). Epr evaluation of the anti-inflamatóriaradical activity of wines containing high concentrations of resveratrol. *Drugs Experimental Clinical Research* 3 111-115.

217. Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Treissdrespt, P.L., (1995). Principal Phenolic Phytochemicals in Selected California Wines and Their Anti-inflamatóriaoxidant Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins . *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 890-894.

218. Meyer, A.S., Ock-Sook, Y., Pearson, D.A..,. Waterhouse, A.L.. Frankel, E.N., (1997). Inhibition of Human Low-Density Lipoprotein Oxidation in Relation to Composition of Phenolic Anti-inflamatóriaoxidants in Grapes (*Vitis vinifera). Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1638-1643.

219. Majo, D.D., La Guardia, M., Giammanco, S., La Neve, L., Giammanco, M., (2008) The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chemistry*, 111, 45-49.

220. Leonard S.L., Xia C., Jiang, B.H.Stinefelt, B., Klandorf, H., Harris, G.K., Shi, X., (2003). Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 309,1017-1026.

221.Cirico, T.L., Ornaye, S.T., (2006). Effect of ethyl esterification of phenolic acids on low-density lipoprotein oxidation. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 510–516;

222. Meyer, A. S., Heinonen, M., Franke, E.N., (1998). Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, ca€eic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*, 61,. 71-75.

223. Neudo-Refer, A., Bonnefont-Rousselot, D., Legrand, A., Fleury, MB., Largeron, M., (2004). 4-Hydroxycinnamic Ethyl Ester Derivatives and Related Dehydrodimers: Relationship between Oxidation Potential and Protective Effects against Oxidation of Low-Density Lipoproteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52,* 2084-2091.

224. Markowska, M.; Oberle, R.; Juzwin, S.; Hsu, C. P.;Gryszkiewicz, M.; Streeter, A.J., (2001). Optimizing Caco-2 cell monolayers o increase throughput in drug intestinal absorption analysis. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 46, 51-55.

225. Faassen, F.; Vogel, G.; Spanings, H.; Vromans,H.,(2003). Caco-2 permeability, P-glicoprotein transport ratios and brain penetration of heterocyclic drugs. *International Journal Pharmaceutics*, 263, 113-122.

226. Lima Paes, L.R., Toledo de Oliveira, T., Almeida Oliveira, M.G., Nagem, T.J., Silva Pinto, A., Gomes, S.M., Seixas Filho, J.T., (1999). Determinação da actividade da lipase na presença de morina, naringenina, naringina e rutina", Ciências agrotécnicas, Lavras, 23, 626-631.

APÊNDICE A

Tabela AI. Identificação da empresa, marca, ano de colheita e código das amostras cedidas pela CVRPS

Empresa/comerciante	Marca	Colheita	Código
Adega Cooperativa de Palmela, CRL		1999	ACP0213
Adega Cooperativa de Palmela, CRL		1999	ACP0230
Adega Cooperativa de Palmela, CRL		1999	ACP0229
Adega Cooperativa de Palmela, CRL		2001	ACP0345
Adega Cooperativa de Palmela, CRL		2001	ACP0362
Adega Cooperativa de Palmela, CRL		2001	ACP0368
Adegas Camillo Alves, S.A.[a]	Caves Velhas (sem ano)	1998	ACA231
Adegas Camillo Alves. S.A.[a]	Caves Velhas	1999	ACA333
Adegas Camillo Alves. S.A.[a]	Caves Velhas (sem ano)	1999	ACA370
Cooperativa Agrí. De Santi Isidro D	Santo Isidro de Pegões	1998	CASI322
Cooperativa Agrí. De Santi Isidro D	Santo Isidro de Pegões	1998	CASI323
Emídio Oliveira e Silva & Filhos, Lda[b]		1998	EOSF236
Emídio Oliveira e Silva & Filhos, Lda[b]		1999	EOSF303
Emídio Oliveira e Silva & Filhos, Lda[b]		1999	EOSF321
Emídio Oliveira e Silva & Filhos, Lda[b]		1999	EOSF324
Emídio Oliveira e Silva & Filhos, Lda[b]		2000	EOSF350
Emídio Oliveira e Silva & Filhos, Lda[b]		2000	EOSF349
Emídio Oliveira e Silva & Filhos, Lda[b]		2000	EOSF366
Emídio Oliveira e Silva & Filhos, Lda[b]		2000	EOSF367
Horácio dos Reis Simões	Casa Agrícola Horácio Simões	1999	HS0209
Horácio dos Reis Simões	Casa Agrícola Horácio Simões	1999	HS0237
Horácio dos Reis Simões	Casa Agrícola Horácio Simões	2000	HS 0353
J.P. Vinhos, S.A.[c]	JP	1996	JPV204
J.P. Vinhos, S.A.[c]	JP	1997	JPV233
J.P. Vinhos, S.A.[c]	JP	1994	JPV238
J.P. Vinhos, S.A.[c]	JP	1998	JPV302
J.P. Vinhos, S.A.[c]	JP	1999	JPV326
J.P. Vinhos, S.A.[c]	JP	1999	JPV339
J.P. Vinhos, S.A.[c]	JP	1995	JPV347
J.P. Vinhos, S.A.[c]	JP	1995	JPV346
José Dias Rosa, Lda[d]	Rosiouro	2000	JDR325
José Dias Rosa, Lda[d]	Rosiouro	2001	JDR357
José Maria da Fonseca Succs Vinho[e]	Alambre	1999	JMF 0208
José Maria da Fonseca Succs Vinho[e]	Alambre	1999	JMF 0207
José Maria da Fonseca Succs Vinho[e]	Alambre	1999	JMF 0206
José Maria da Fonseca Succs Vinho[e]	Alambre 20 Anos		JMF 0225
José Maria da Fonseca Succs Vinho[e]	Alambre	1999	JMF 0246
José Maria da Fonseca Succs Vinho[e]	Alambre	1999	JMF 0245
José Maria da Fonseca Succs Vinho[e]	Alambre	1999	JMF0301
José Maria da Fonseca Succs Vinho[e]	Alambre	1999	JMF0328
José Maria da Fonseca Succs Vinho[e]	Alambre	1999	JMF0332
Rio Vinhos, LDA	Tiama	1998	RV202

Tabela AI. (continuação) Identificação da empresa, marca, ano de colheita e código das amostras cedidas pela CVRPS

Empresa/comerciante	Marca	Colheita	Código
Rio Vinhos, LDA	Tiama		RV232
Sivipa-Sociedade Vinícola de Palmela		1998	SSVP203
Sivipa-Sociedade Vinícola de Palmela		2000	SSVP239
Sivipa-sociedade vinícola de Palmela		2000	SSVP316
Sivipa-sociedade vinícola de Palmela		2000	SSVP340
Sivipa-sociedade vinícola de Palmela		2001	SSVP351
Sivipa-sociedade vinícola de Palmela		2000	SSVP355
Sivipa-sociedade vinícola de Palmela		2001	SSVP365
Sivipa-sociedade vinícola de Palmela		2000	SSVP364
Sivipa-sociedade vinícola de Palmela		1999	SSVP363
Sociedade Agrícola Rio Frio, S.A.	Rio Frio	1999	SARF308
Sociedade Agrícola Rio Frio, S.A.	Rio Frio	1999	SARF309
Venâncio da Costa Lima Succs, LDA		2000	VCL327
Venâncio da Costa Lima Succs, LDA	VCL Escolha	1998	VCL360
Xavier Santana Succs, LDA	Casta Rica	1999	XSS205
Xavier Santana Succs, LDA	Casta Rica	1999	XSS244
Xavier Santana Succs, LDA	Casta Rica	1999	XSS243
Xavier Santana Succs, LDA	Casta Rica	2000	XSS313

[a] Alterou a designação para Enoport-Dom Teodósio Produção de Bebidas, S.A.
[b] Empresa extinta
[c] Alterou a designação para Bacalhôa – Vinhos de Portugal, S.A.
[d] comerciante que comprava vinho aos que produziam e rotulava com o seu nome
[e] Alterou a designação para José Maria da Fonseca Vinhos, S.A.

Tabela AII. Identificação da empresa, ano de colheita e código das amostras adquiridas no supermercado

Empresa	Colheita	Código
Adega Cooperativa de Alijó	s/data	CA[a]
Adega Cooperativa de Favaios	s/data	ACF[a]
Adega Cooperativa de Palmela	2004	ACP2004
Fragas Moscatel	s/data	FMC[a]
Horácio Simões	2002	HS2002
J.P. Vinhos	1989	MR1989[b]
J.P. Vinhos	s/data	JPV
José Maria da Fonseca	2001	JMF2001
José Maria da Fonseca	1980	JMF20
Portal Moscatel Douro	s/data	PMD[a]

[a]Moscatel Douro [b] Moscatel roxo

APÊNDICE B

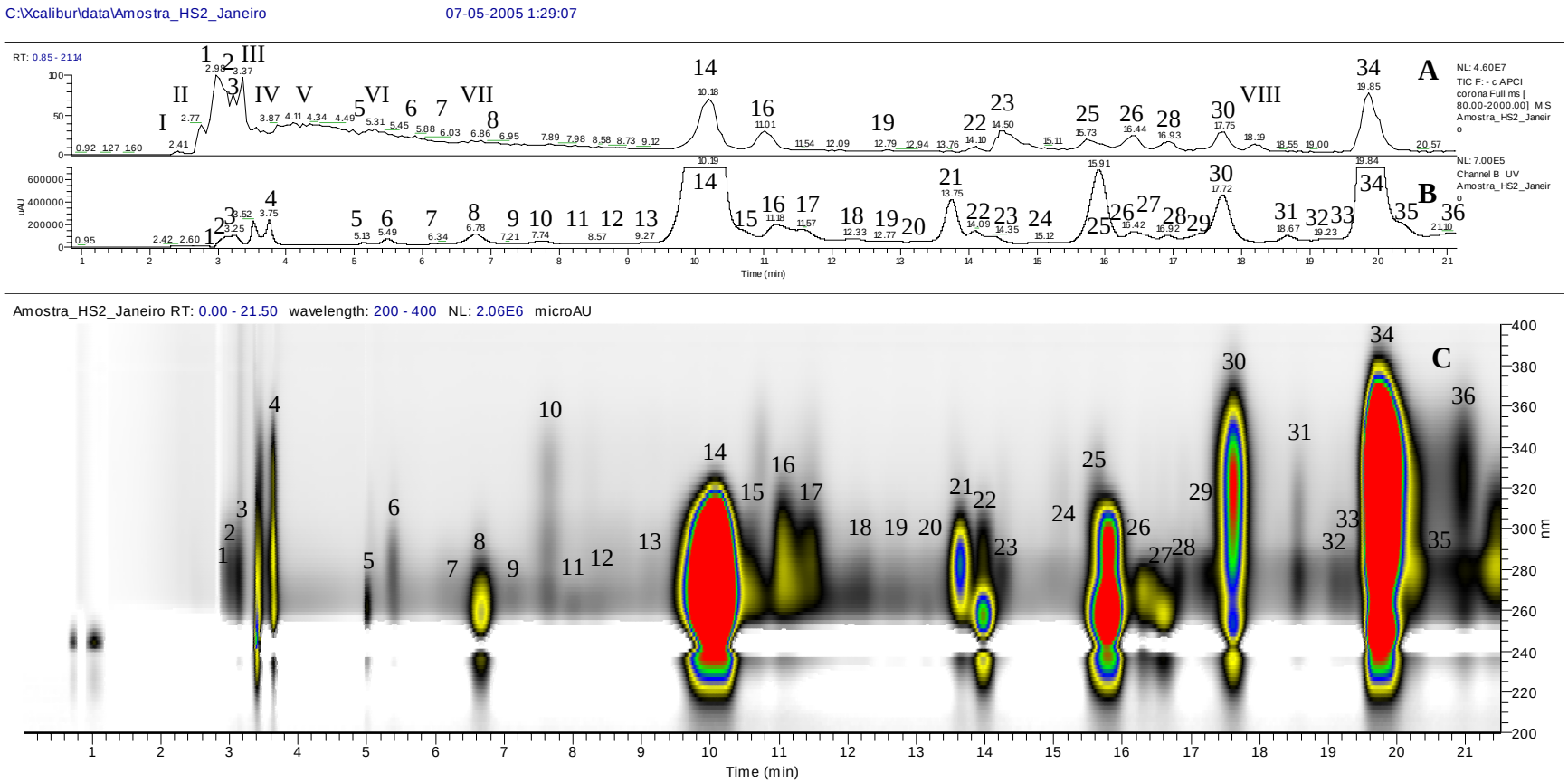


Figura BI. Comparação para um extracto de vinho Moscatel C4 de: (**A**) Cromatograma de corrente iónica total obtido em ensaio de "full MS"; (**B**) Cromatograma de absorção no ultra-violeta para o c.d.o. de 280 nm; (**C**) Mapa de absorção no ultra-violeta (200-400 nm) entre 0-20 min

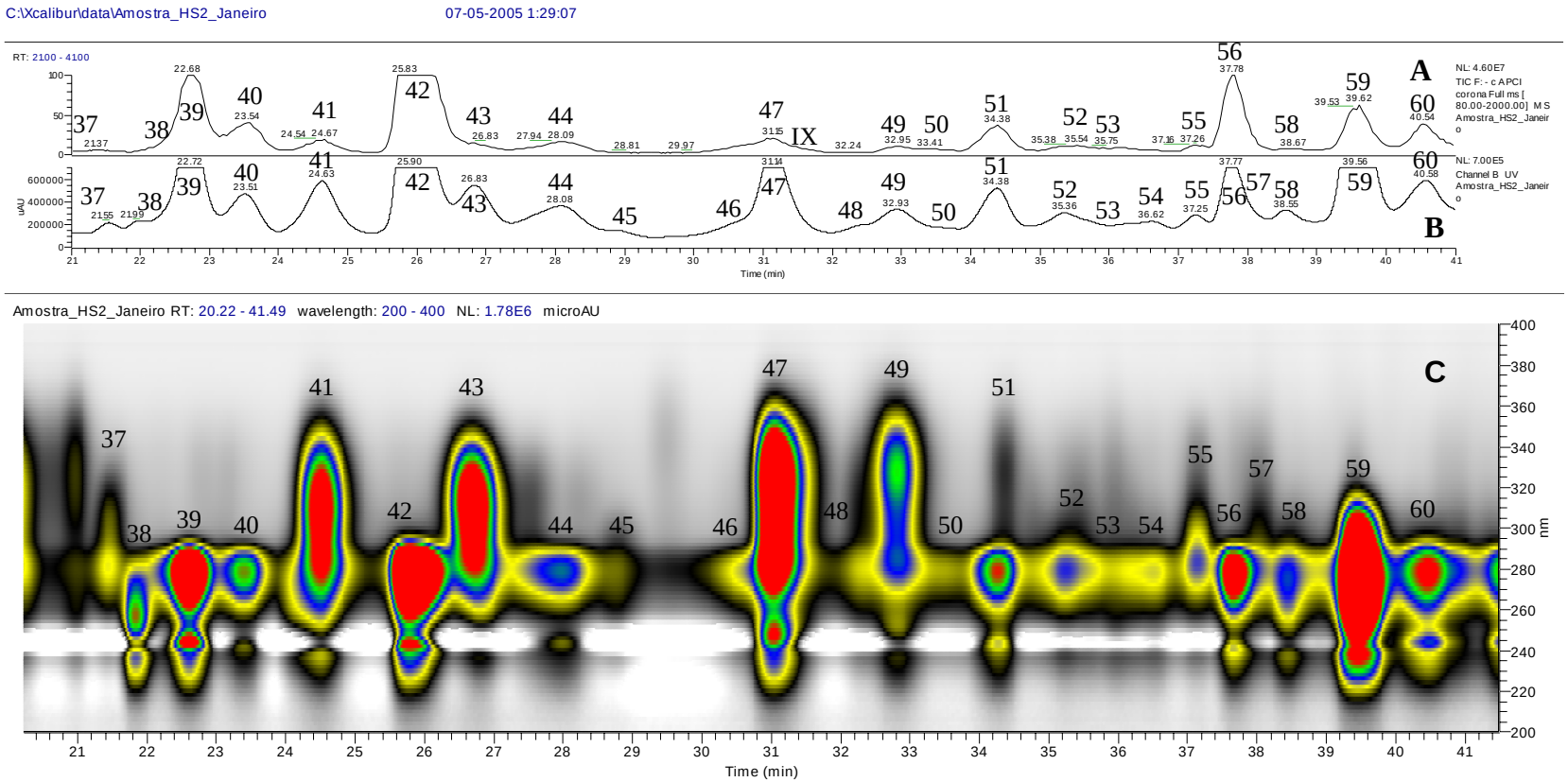


Figura BII. Comparação para um extracto de vinho Moscatel C4 de: (**A**) Cromatograma de corrente iónica total obtido em ensaio de "full MS"; (**B**) Cromatograma de absorção no ultra-violeta para o c.d.o. de 280 nm; (**C**) Mapa de absorção no ultra-violeta (200-400 nm) entre 20-40 min

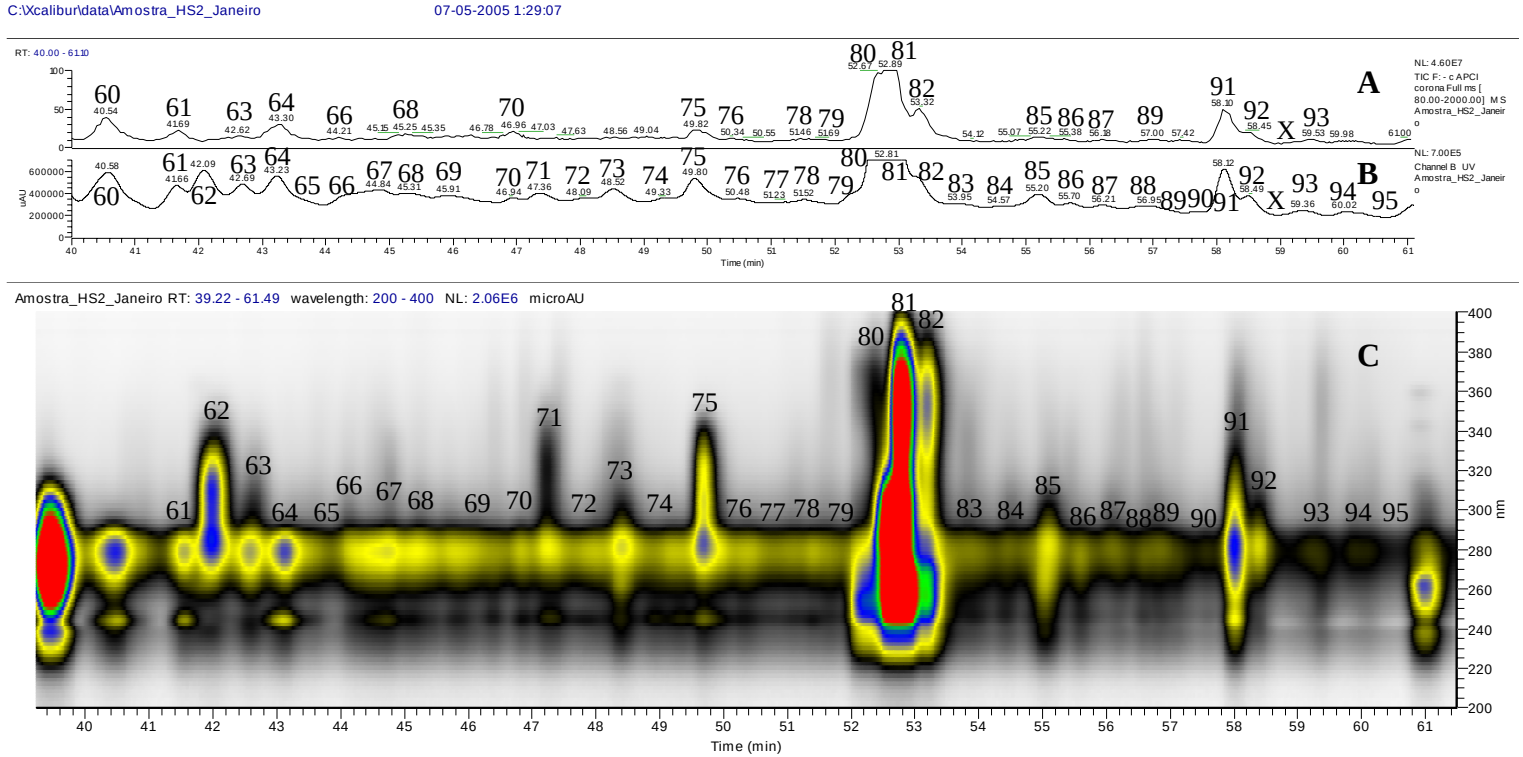


Figura BIII. Comparação para um extracto de vinho Moscatel C4 de: (**A**) Cromatograma de corrente iónica total obtido em ensaio de "full MS"; (**B**) Cromatograma de absorção no ultra-violeta para o c.d.o. de 280 nm; (**C**) Mapa de absorção no ultra-violeta (200-400 nm) entre 40-60 min

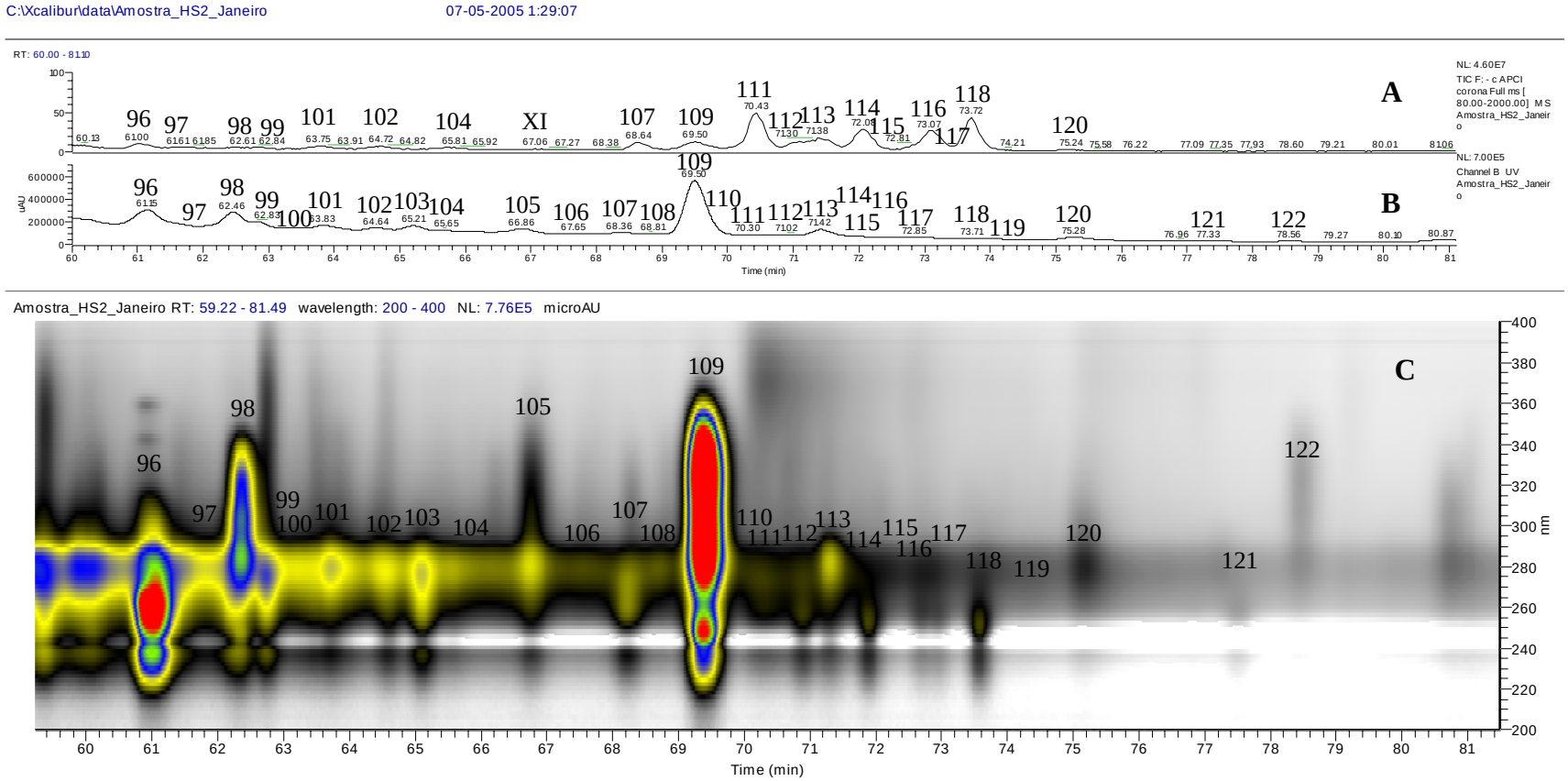


Figura BIV. Comparação para um extracto de vinho Moscatel C4 de: (**A**) Cromatograma de corrente iónica total obtido em ensaio de "full MS"; (**B**) Cromatograma de absorção no ultra-violeta para o c.d.o. de 280 nm; (**C**) Mapa de absorção no ultra-violeta (200-400 nm) entre 60-80 min

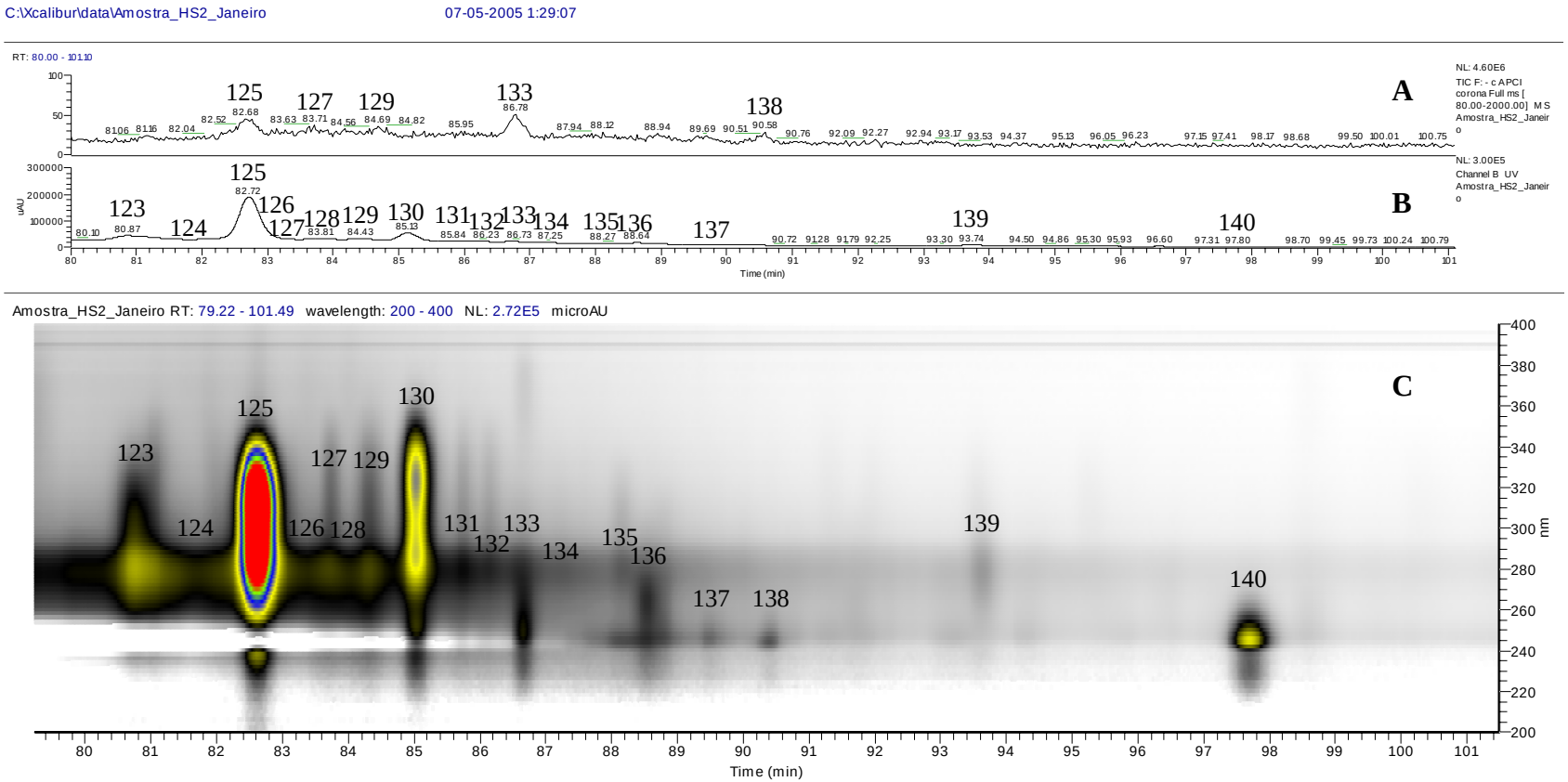


Figura BV. Comparação para um extracto de vinho Moscatel C4 de: (**A**) Cromatograma de corrente iónica total obtido em ensaio de "full MS"; (**B**) Cromatograma de absorção no ultra-violeta para o c.d.o. de 280 nm; (**C**) Mapa de absorção no ultra-violeta (200-400 nm) entre 80-100 min

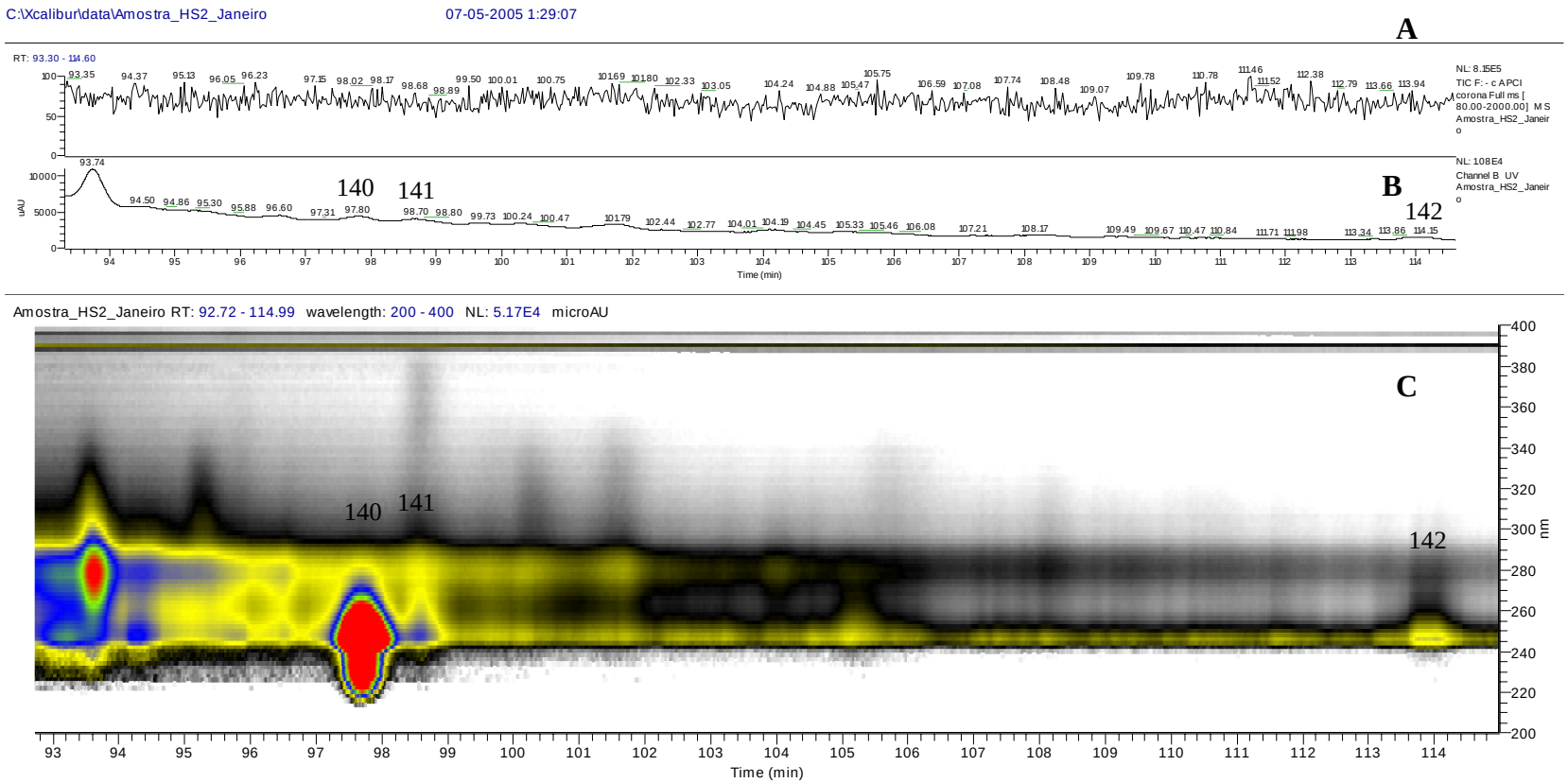


Figura BVI. Comparação para um extracto de vinho Moscatel C4 de: (**A**) Cromatograma de corrente iónica total obtido em ensaio de "full MS"; (**B**) Cromatograma de absorção no ultra-violeta para o c.d.o. de 280 nm; (**C**) Mapa de absorção no ultra-violeta (200-400 nm) entre 100-115 min

APÊNDICE C

CI: Tempos de retenção, c.d.o. máximos, MS e abundância relativa, MS/MS, identificação e MM dos picos detectados por LC-MS

Pico	tr / min	λ máx	MS																																MS/MS	Composto	MM
I	2.41		142.6	95%	176.9	14%	**194.8**	**100%**	222.7 **(177+46)**	30%	292.6	2%																										NI NI	144 195
II	2.77		142.8	30%	159	5%	177	30%	188.7	10%	**194.8**	**100%**	240.5 **(195+46)**	50%	292.7	75%																					**179** (81-10%; 96.9-20%; 114.6-5%; 160.9-100%)	NI NI NI	178 195 294
1	2.98	278	149	10%	178.8	20%	193	75%	224.8 **(179+46)**	85%	277	5%	354.7	40%	**372.7**	**100%**	386.7	30%	404.6	10%	456.5	8%	535	10%	559.1	8%	566.1	4%	618.6	6%								NI NI NI NI NI NI	180 194 355 374 388 406
2	3.03	278	149	80%	193	55%	224.8	45%	310.9	15%	328.7	35%	354.9	15%	**372.7**	**100%**	386.7	20%	456.6	10%	534.7	20%																NI NI NI NI	194 374 458 535
3	3.22	274	**149**	**100%**	192.8	5%	298.7	20%	310.9	15%	328.6	90%	490.7	40%																							**311** (112.8-10%;130.9-5%. 149-100%;160.8-5%; 178.8-25%;190.6-10%;220.8-30%;250.8-25%)	NI NI NI NI NI	150 300 312 330 492
III	3.32		135.2	5%	**149.1**	**100%**	178.9	20%	224.9 **(179+46)**	95%	295.1	10%	328.6	55%	372.9	20%	374.7	25%	384.7	20%	386.8	60%	404.5	80%														ácido tartárico NI NI NI NI NI NI	150 180 296 330 376 387 405
IV	**3.57**		149	10%	191	2%	248.9	20%	**266.8**	**100%**	289	10%	294.8 **(249+46)**	15%	312.6 **(267+46)**	95%																						ácido quínico NI NI NI	192 250 268 290
V	**4.39**		178.9	20%	**224.8 (179+46)**	**100%**																														NI	180
5	5.16	266	147.1	5%	178.9	20%	**224.8 (179+46)**	**100%**																											**179** (88.7-100%; 100.4-30%; 118.4-20%; 149.1-20%)	NI	180
VI	5.31		173	3%	178.9	20%	**191**	**100%**	224.8 **(179+46)**	70%	258.9	5%																										ácido chiquímico NI NI	174 180 192
6	5.51	266	160.9	5%	178.9	20%	**224.8 (179+46)**	**100%**																														NI	180
7	6.36	264	162.7	30%	178.9	15%	206.8	5%	**224.8 (179+46)**	**100%**	296.7	35%																									**179** (130.8-100%; 160.7-45%)	NI NI	180 298
VII	6.47		162.7	50%	178.9	20%	**224.9 (179+46)**	**100%**	296.7	35%																												NI NI NI	164 180 298
8	6.76	264	147	10%	160.9	12%	178.9	15%	207	5%	**224.8 (179+46)**	**100%**	288.8	15%																							**179** (88.6-100)	NI NI	180 290
14	10.18	256; 300	**169.0**	**100%**	214.6 **(169 +46)**	35%	338.7	50%																											**169** (125.0-100%) **339** (125.1- 4%; 169.1 - 100%)	ácido gálhico dímero do ácido gálhico	170 340
16	11.18	278	**176.9**	**100%**	222.6 **(176.9+46)**	65%	356.7	20%																											**177** (58.9-25%; 102.8-100%; 130.8%-40%; 159.0-15%) **357** (177.1 - 100%; 288.7 - 2%)	NI NI	178 358
19	12.79	266	178.8	20%	206.9	10%	**224.8 (179+46)**	**100%**	383	10%	428.9	30%																										NI NI NI NI	180 208 384 430
22	14.10	258; 290	150.9	8%	169	90%	173	13%	178.9	18%	**218.9 (173+46)**	**100%**	224.8 **(179+46)**	80%	246.6	7%																						**169** (125.0-2%; 151.0-100%; 169.0-5%) **219** (111.0-35%; 155.0-10%; 172.9-100%) **224.8** (118.8-6%. 151.8-4%; 178.8-100%; 207.2-4%)	NI NI NI	170 174 180
23	14.5	268	142.9	25%	**160.9**	**100%**	206.6 **(160.9+46)**	75%	224.8 **(179+46)**	10%	276.7	**2%**	322.7 **(276.7+46)**	15%	340.8	13%																						**161** (71.0-10%; 114.9-25%; 133.0-7%. 142.9-100%) **207** (134.0-60%; 144.1-20%; 146.0-100%; 161.9-45%)	NI NI NI NI	162 180 278 342
25	15.73	258; 290	142.9	6%	153.0	11%	160.9	40%	169	25%	198.9 **(153+46)**	6%	206.8 **(161+46)**	30%	224.8 **(179+46)**	50%	289.1	6%	315.1	35%	**330.9**	**100%**	360.7 **(315+46)**	18%	**376.7 (330.9+46)**	**100%**	492.7	15%								**169** (125-100%) **153** (109.1-100%) **224.8** (118.8-6%; 151.8-4%; 178.8-100%; 207.2-4%) **331** (125.1-6%; 169.0-100%) **289** (108.8-3%; 125-3%; 161-6%; 179.2-7%; 204.9-25%; 245.1-100%)	ácido protocatechuico NI NI NI	154 316 332 494
26	16.44	264	137	10%	160.8	7%	178.9	4%	224.9 **(179+46)**	15%	**305**	**100%**	350.6 **(305+46)**	65%	466.8	6%	610.6	6%																				**179** (111.1-50%; 136.9-45%; 150.7-50%; 164.0-100%) **289** (108.8-3%; 125-3%; 161-6%; 179.2-7%; 204.9-25%; 245.1-100%) **305** (125.0-25%; 137.1-15%; 165.0-35%; 179.0-100%; 221.1-90%; 247.1-15%; 261.1-45%)	galhocatequina	306
28	16.93	276	153.1	16%	160.9	15%	173	17%	178.9	7%	206.8 **(160.9+46)**	20%	**219 (173+46)**	**100%**	224.8 **(179+46)**	30%	315	70%	360.6 **(315+46)**	85%																		**219** (111.1-35%; 155.1-10%; 172.9-100%)	NI NI NI NI NI	154 162 174 180 316
30	17.75	256; 322	149	8%	161	7%	172.8	25%	206.6 **(161+46)**	6%	218.9 **(172.8 + 46)**	**100%**	310.9	55%																								**219** (110.9-20%; 172.8-100%) **311** (135.1-5%; 149.0-100%; 179.0-70%)	NI ácido *c*-caftárico	174 312
VIII	18.19		161	6%	172.9	4%	206.8 **(161+46)**	6%	**218.9 (172.9+46)**	**100%**	224.8 **(179+46)**	11%																										**219** (111.1-40%; 172.8-100%)	NI	174
34	19.85	250; 300	149	17%	161	5%	179	17%	224.9 **(179+46)**	4%	**310.8**	**100%**	622.6	55%																								**311** (135.1-6%; 149.0-100%; 179.0-70%)	ácido *t*-caftárico NI	312 624
37	21.37	282; 310	137	10%	160.9	40%	175	90%	206.8 **(161+46)**	40%	190.9	20%	**224.9 (179+46)**	**100%**	328.9	40%	370.6	15%	451	20%	496.6 **(451+46)**	20%	576.9	15%														NI NI NI NI NI NI procianidina	162 176 192 330 372 452 578
38	21.88	258	136.9	8%	160.9	35%	178.9	24%	206.7 **(161+46)**	40%	**224.9 (179 + 46)**	**100%**	285.1	15%	341	15%	576.9	25%																				**577** (245-10%; 289.3-15%; 328.8-5%; 4067.1-80%; 424.9-15%; 559.2-15%)	NI NI NI procianidina	162 180 342 578
39	22.68	276	137.1	6%	243.2	10%	289	45%	334.8 **(289 + 46)**	20%	402	4%	451	4%	**577**	**100%**	714.8	4%	866.8	3%																		**577** (245.1-6%;289.1-30%; 407.1-65%; 425.0-100%; 451.0-45%; 559.1-10%)	procianidina B1 procianidina trimero	578 866
40	23.54	278	164.9	5%	224.8 **(179+46)**	20%	289.1	35%	334.8 **(289+46)**	20%	**577**	**100%**																										**577** (245.1-2%;289.1-25%; 407.2-60%; 425.0-100%; 451.0-30%; 559.1-10%)	procianidina	578
41	24.63	286; 310	137	5%	149	15%	163.1	8%	224.9 **(179+46)**	10%	**294.8**	**100%**	305	10%																								**295** (149.0-100%; 162.9-40%)	ácido *c*-coutárico epigalhocatequina	296 306
42	25.83	272; 290	137	5%	269.2	3%	**289.1**	**100%**	334.7 **(289.1+46)**	50%	426.9	20%	454.6	4%	578.7	15%																						**289** (97.2-1%;109.1-2%; 125.0-3%; 137.0-3%; 165.1-4%; 179-20%; 205.1-35%; 231.1-10%; 245.1-100%) **427** (215.2 - 4.5%; 257.1 - 5%; 289.2 - 80%; 301.1 - 100%; 427.1 - 1%)	catequina NI	290 428

| | | |

| | | |

Tabela CII: Identificação dos compostos obtidos por LC com os vários métodos de detecção (MS, DAD, FD e ED)

Pico	Composto
I	NI
II	NI
1	NI
2	NI
3	NI
III	ácido tartárico NI
4	NI
IV	ácido quínico NI
V	NI
5	NI
VI	ácido chiquímico NI
6	NI
7	NI
VII	NI
8	NI
9	NI
10	NI
11	NI
12	NI
13	NI
14	ácido gálhico
15	NI
16	NI
17	NI
18	NI
19	NI
20	NI
21	5-HMF
22	NI
23	NI
24	NI
25	NI ácido protocatechuico
26	galhocatequina
27	NI
28	NI
29	NI
30	NI ácido *c*-caftárico furfural
VIII	NI
31	NI
32	NI
33	NI
VIII	NI
34	NI ácido *t*-caftárico tirosol
35	NI

Pico	Composto
36	NI
37	NI procianidina
38	NI procianidina
39	procianidina B1
40	procianidina
41	ácido *c*-coutárico epigalhocatequina
42	catequina NI
43	ácido *t*-coutárico NI
44	NI procianidina
45	NI
46	NI
47	ácido cafeico Procianidina
IX	NI ácido c-fertárico procianidina
48	NI
49	ácido *t*-fertárico procianidina
50	NI procianidina
51	Procianidina B2
52	NI
53	NI
54	NI
55	dihidrocampferol dihidrocampferol-3-O-glucósido/astilbin
56	Epicatequina NI
57	NI
58	NI procianidina
59	galhato de etilo
60	glucósido do ácido indol-láctico procianidina
61	NI procianidina
62	ácido ferúlico
63	NI procianidina B2-3-O-galhato
64	procianidina
65	NI
66	NI dihidroquercetina-3-*O*-glucósido/ dihidromiricetina-3-*O*-ramnósido procianidina
67	NI

Pico	Composto
68	dihidroquercetina-3-*O*-xilósido NI procianidina
69	NI
70	NI
71	NI
72	NI
73	NI
74	NI
75	NI *t*-piceid
76	NI
77	NI
78	NI NI procianidina isoramnetina-3-*O*-rutinósido
79	NI quercetina -3-*O*-galactósido procianidina
80	dihidroquercetina -3-*O*-ramnósido
81	NI quercetina-3- *O*-glucuronido
82	quercetina-3-*O*-glucósido
83	NI
84	NI
85	NI Pentósido de quercetina
86	NI procianidina
87	NI campferol-3-O-galactósido procianidina
88	NI
89	procianidina NI
90	NI
91	*c*-piceid campferol-3-O-glucósido quercetina-3-*O*-ramnósido campferol-3-*O*-glucuronido
92	dihidrocampferol-3-O-ramnósido
X	NI miricetina-3-*O*-ramnósido procianidina
93	NI Isoramnetina-3-*O*-glucósido
94	procianidina NI
95	NI
96	Procianidina NI
97	NI procianidina
98	NI procianidina

Pico	Composto
99	NI procianidina
100	NI
101	NI
102	NI
103	NI
104	NI
105	*t*-resveratrol
XI	NI
106	NI
107	NI
108	NI
109	cafeato de etilo NI
110	*c*-resveratrol
111	quercetina NI
112	NI
113	NI
114	NI
115	NI
116	NI
117	NI
118	NI
119	Palidol
120	NI
121	NI
122	NI
123	NI
124	NI
125	NI+coumarato de etilo
126	NI
127	NI
128	NI
129	NI
130	NI
131	NI
132	NI
133	NI
134	NI
135	NI
136	NI
137	NI
138	NI
139	NI
140	NI
141	NI
142	NI

APÊNDICE D

Tabela DI. Valores médios e o desvio padrão obtidos na determinação da actividade antioxidante:FRAP, DPPH Folin e ORAC) amostras de vinho Moscatel

FOLIN (mgL^{-1})		FRAP (mg TEAC L^{-1})		DPPH (%)		ORAC (mg TEAC L^{-1})	
Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
1105	89.2	3709	38.0	77	2.5	11.4	1.0
1917	100.4	5665	103.8	83	9.6	15.4	0.6
897	125.3	3939	87.8	81	1.2	9.1	0.1
748	29.4	1967	288.5	44	0.5	2.8	0.2
1408	100.1	4355	115.5	81	0.3	22.0	0.5
1676	109.9	6356	130.3	77	0.7	20.9	1.7
1791	394.2	2495	52.0	66	3.0	16.4	1.3
2912	75.3	3010	60.7	72	1.1	15.4	1.4
1461	2.5	3788	34.6	65	1.9	15.4	0.6
1485	75.9	1716	30.5	65	5.5	14.1	1.3
1094	119.6	4297	97.8	68	4.5	12.3	0.4
1380	138.4	2145	558.3	77	0.9	10.4	1.0
616	32.2	4062	288.6	88	0.7	6.4	0.1
555	50.8	1051	13.1	54	0.9	4.2	0.3
1002	58.0	2892	107.9	76	0.9	7.6	0.4
968	103.4	2983	107.2	83	1.1	8.2	0.1
1346	55.6	2573	69.9	79	3.0	8.9	0.4
735	15.0	3120	108.9	78	0.7	6.8	0.3
1817	44.4	4513	233.9	61	8.0	11.5	0.4
1746	23.1	3955	58.3	71	4.9	12.0	1.1
854	91.4	3185	61.9	83	0.4	6.4	0.3
1066	24.2	3679	48.6	84	0.9	8.9	0.4
703	10.4	2093	22.7	80	0.9	6.1	0.6
1793	60.6	8260	97.8	71	3.3	22.9	0.4
1166	71.9	4588	115.0	77	1.7	14.2	1.6
1645	114.4	1326	102.9	65	4.8	17.7	0.8
1694	39.8	3758	122.8	60	3.9	14.9	0.6
1607	173.3	5555	21.0	81	1.1	12.8	1.2
1745	11.4	5604	62.7	80	1.3	11.1	1.1
911	111.8	1930	103.3	43	2.1	2.6	0.2
487	21.6	2540	403.5	39	1.9	7.2	0.8
814	62.4	2778	222.2	53	1.6	11.8	0.3
1053	51.8	1353	18.9	58	3.3	11.2	0.3
832	106.8	2733	390.2	57	2.0	4.1	0.1
807	109.1	1428	32.0	77	2.6	8.5	0.5
1313	146.4	1624	35.0	62	0.2	16.6	0.8
1785	39.8	1955	59.5	65	1.5	15.7	0.7
1069	75.9	3673	83.1	67	1.0	14.2	0.9
808	46.0	1849	52.7	40	1.6	7.9	0.8
544	34.9	2334	54.1	47	4.7	8.2	0.0
751	3.7	3545	330.4	82	0.3	10.7	1.0

Tabela DI. (**continuação**) Valores médios e o desvio padrão obtidos na determinação da actividade antioxidante:FRAP, DPPH Folin e ORAC) amostras de vinho Moscatel

FOLIN		FRAP		DPPH		ORAC	
Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
770	93.1	1942	63.0	63	2.0	6.2	0.3
642	65.1	2684	151.0	71	0.3	7.0	0.2
1150	63.2	2547	75.2	67	1.6	6.9	0.5
709	72.6	1967	55.1	64	4.7	5.4	0.4
450	11.4	1537	85.7	42	1.9	7.2	0.2
549	48.4	1367	40.3	46	1.3	5.9	0.5
927	81.9	2464	49.1	70	0.8	8.2	0.5
789	59.1	2331	91.8	72	0.5	9.9	1.1
997	50.6	1093	8.7	70	5.3	10.7	1.1
436	45.8	2464	49.1	68	0.2	8.9	0.3
1615	47.4	2385	1217.7	83	0.5	12.3	0.3
1437	6.8	4189	129.5	80	0.6	12.4	0.9
787	89.4	3998	95.3	84	0.6	9.7	0.4
950	120.0	3346	36.6	73	4.7	9.1	0.8
2215	71.6	3136	21.5	85	1.1	11.4	0.5
494	48.6	2018	25.7	68	0.8	5.1	0.5
1320	122.6	1694	563.5	73	0.6	7.8	0.5
1021	24.0	1981	48.8	59	1.8	7.2	0.7
499	52.7	2497	128.9	68	2.3	6.5	0.4
817	13.7	2234	154.4	70	2.1	5.8	0.4
696	24.1	2581	365.5	68	0.8	6.4	0.3
1003	54.4	2462	107.8	75	3.1	4.5	0.4
749	93.4	1996	40.3	75	1.0	4.4	0.3
1390	37.6	3563	30.1	82	0.1	12.2	1.2
1174	72.2	4495	66.1	84	0.4	9.6	0.4
953	28.9	2615	98.9	74	1.7	8.0	0.4
1326	54.1	2526	62.6	85	1.3	7.4	0.8
1056	63.8	828	11.0	84	1.1	6.3	0.4
634	11.8	2139	17.3	69	1.7	6.9	0.5

APÊNDICE E

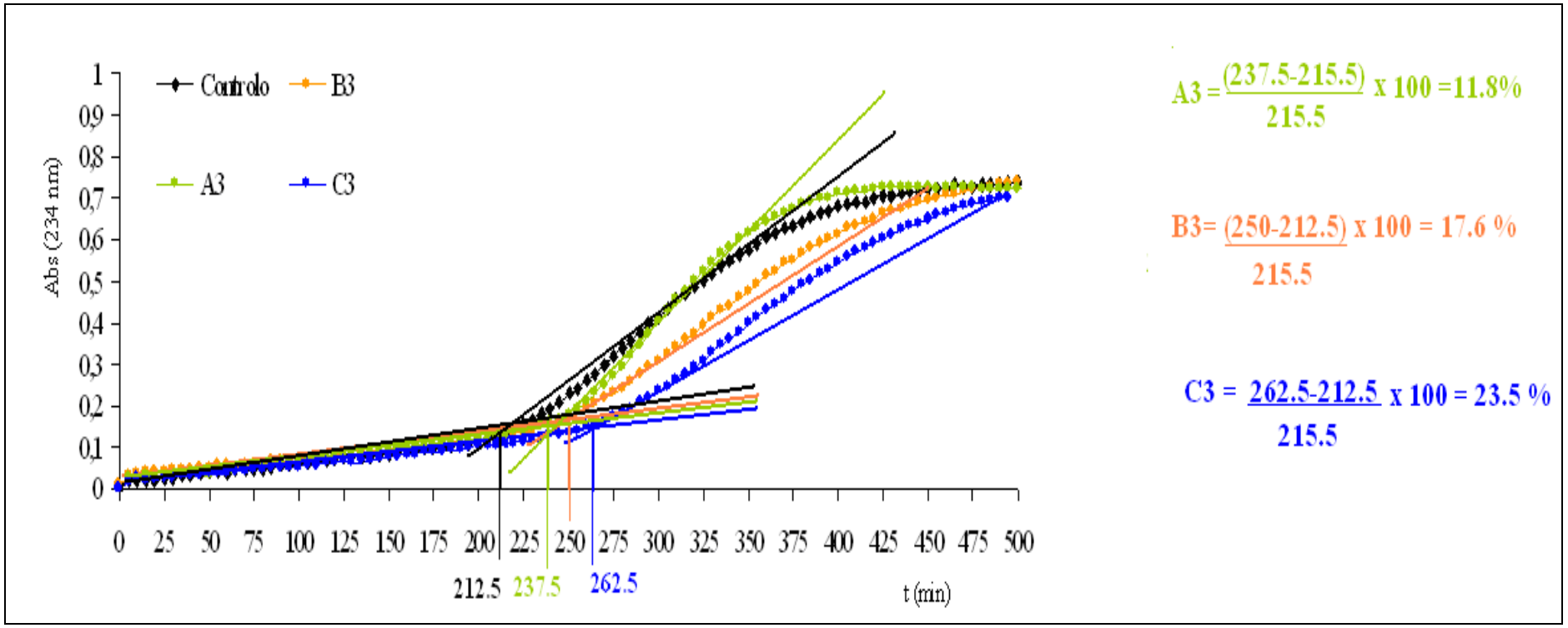


Figura EI. Curva cinética da oxidação das LDL ao longo do tempo (min) para o controlo (DMSO) e nos extractos de vinho moscatel A_3, B_3 e C_3

Tabela EI. Resultados do teste de citoxicidade ao fim de 30 min

Extracto	Conc (mgL^{-1})	Absorvância			Média	Viabilidade celular (%)
Bcom	2000	0.6212	0.7145	0.8108	0.7155	138.8
	1000	0.7371	0.9568	0.7707	0.8215	159.4
	500	0.7736	0.6856	0.7205	0.7266	141.0
	250	0.7326	0.6506	0.7782	0.7205	139.8
	125	0.7061	6.2777	2.7405	0.7061	137.0
	62.5	0.6895	0.7200	0.9692	0.7929	153.8
	31.3	0.6402	0.6672	0.7513	0.6862	133.2
	0	0.4989	Path?	0.5319	0.5154	100.0
A2	2000	0.5736	0.5240	0.5148	0.5374	97.8
	1000	0.6181	0.5906	0.6329	0.6139	111.7
	500	0.4986	0.5653	0.6005	0.5548	101.0
	250	0.5727	0.5774	0.6418	0.5973	108.7
	125	0.5667	0.5606	0.4787	0.5353	97.4
	62.5	0.6399	0.5585	0.4909	0.5631	102.5
	31.3	0.6747	0.6220	0.5839	0.6269	114.1
	0	0.5218	0.4828	0.6441	0.5496	100.0
B2	2000	0.5920	0.5355	0.5986	0.5754	109.1
	1000	0.4463	0.6280	0.6393	0.5712	108.3
	500	0.5881	0.6355	0.5561	0.5932	112.5
	250	0.6355	0.5726	0.5888	0.5990	113.6
	125	0.5751	0.6469	0.5668	0.5962	113.1
	62.5	0.6119	0.5910	0.5279	0.5769	109.4
	31.3	0.5291	0.5801	0.6322	0.5805	110.1
	0	0.4923	0.5409	0.5486	0.5272	100.0
C2	2000	0.5193	0.5037	0.5763	0.5331	68.9
	1000	3.2983	0.5144	0.5306	0.5225	67.5
	500	0.6018	0.5880	0.5068	0.5655	73.0
	250	0.5299	0.5679	0.5599	0.5526	71.4
	125	0.8378	0.5764	0.5694	0.6612	85.4
	62.5	0.6174	0.5402	0.5970	0.5848	75.5
	31.3	0.6850	0.5873	0.5970	0.6231	80.5
	0	0.7924	0.7373	0.7930	0.7742	100.0

Tabela EII. Resultados do teste de citoxicidade ao fim de 60 min

Extracto	Conc (mgL-1)	Absorvância			Média	Viabilidade celular (%)
Bcom	2000	0.8879	1.1081	1.1837	1.0599	108.1
	1000	1.0962	1.2411	1.2250	1.1874	121.1
	500	1.2246	1.1009	1.1837	1.1698	119.3
	250	1.1283	1.0589	1.2725	1.1532	117.6
	125	1.1139	1.1442		1.1291	115.1
	62.5	1.0659	1.0299	1.3810	1.1589	118.2
	31.3	1.0337	1.1012	1.1380	1.0910	111.3
	0	0.9593		1.0018	0.9805	100.0
A2	2000	0.8546	0.7784	0.7884	0.8072	87.1
	1000	1.0108	0.9909	1.0414	1.0143	109.5
	500	0.9045	0.9397	0.9922	0.9454	102.0
	250	0.9432	0.9097	0.9129	0.9219	99.5
	125	0.9137	0.9058	0.8348	0.8848	95.5
	62.5	0.9884	0.9205	0.8433	0.9174	99.0
	31.3	1.0509	0.9648	0.9910	1.0023	108.2
	0	0.9811	0.7476	1.0514	0.9267	100.0
B2	2000	0.9048	0.7731	0.9109	0.8629	106.2
	1000	0.8138	0.9709	0.9705	0.9184	113.0
	500	0.9282	0.9969	0.9230	0.9494	116.8
	250	1.0001	0.9501	0.9693	0.9731	119.7
	125	0.9393	0.9838	0.9309	0.9513	117.0
	62.5	0.9764	0.9269	0.8705	0.9246	113.7
	31.3	0.9719	0.9611	0.9832	0.9721	119.6
	0	0.7534	0.8159	0.8695	0.8129	100.0
C2	2000	0.7122	0.6874	0.7822	0.7273	63.5
	1000	1.5829	0.7693	0.7175	1.0232	89.3
	500	0.9525	0.9420	0.7424	0.8790	76.7
	250	0.9115	0.9404	0.8650	0.9056	79.0
	125	1.1223	0.9291	0.9335	0.9950	86.8
	62.5	0.9965	0.9149	0.9658	0.9591	83.7
	31.3	1.0273	0.9388	0.9258	0.9640	84.1
	0	1.2061	1.1500	1.0819	1.1460	100.0

Tabela EIII. Resultados do teste de citoxicidade ao fim de 120 min

Extracto	Conc mgL^{-1})	Absorvância			Média	Viabilidade celular (%)
Bcom	2000	1.2821	1.5976	1.7269	1.5355	93.3
	1000	1.5922	1.6497	1.8368	1.6929	102.9
	500	1.8661	1.7117	1.8153	1.7977	109.3
	250	1.7405	1.6548	1.7354	1.7102	103.9
	125	1.6892	1.7417	1.6455	1.6921	102.8
	62.5	1.6045	1.6985	1.6947	1.6659	101.3
	31.3	1.5801	1.6505	1.6869	1.6392	99.6
	0	1.5970	1.6705	1.6684	1.6453	100.0
A2	2000	1.2992	1.1658	1.2126	1.2259	79.2
	1000	1.6188	1.5724	1.6979	1.6297	105.3
	500	1.5110	1.5260	1.6317	1.5562	100.5
	250	1.5080	1.4695	1.4648	1.4808	95.7
	125	1.4831	1.4768	1.4221	1.4606	94.4
	62.5	1.5455	1.4809	1.4108	1.4791	95.6
	31.3	1.5753	1.4974	1.5360	1.5362	99.2
	0	1.6014	1.3779	1.6644	1.5479	100.0
B2	2000	1.3657	1.1368	1.3582	1.2869	90.1
	1000	1.3905	1.4977	1.4754	1.4546	101.9
	500	1.4367	1.6136	1.4915	1.5140	106.0
	250	1.5848	1.5163	1.5408	1.5473	108.4
	125	1.4969	1.5049	1.4936	1.4985	104.9
	62.5	1.5368	1.4346	1.3605	1.4440	101.1
	31.3	1.4821	1.4689	1.4872	1.4794	103.6
	0	1.3232	1.3698	1.5907	1.4279	100.0
C2	2000	0.9854	0.9548	1.0552	0.9984	59.3
	1000	1.2246	1.1829	1.0097	1.1391	67.7
	500	1.4952	1.5060	1.0798	1.3603	80.8
	250	1.4910	1.4859	1.3428	1.4399	85.5
	125	1.5919	1.4429	1.4371	1.4906	88.5
	62.5	1.5245	1.4287	1.4686	1.4739	87.5
	31.3	1.5622	1.4742	1.4218	1.4861	88.3
	0	1.7490	1.7215	1.5803	1.6836	100.0

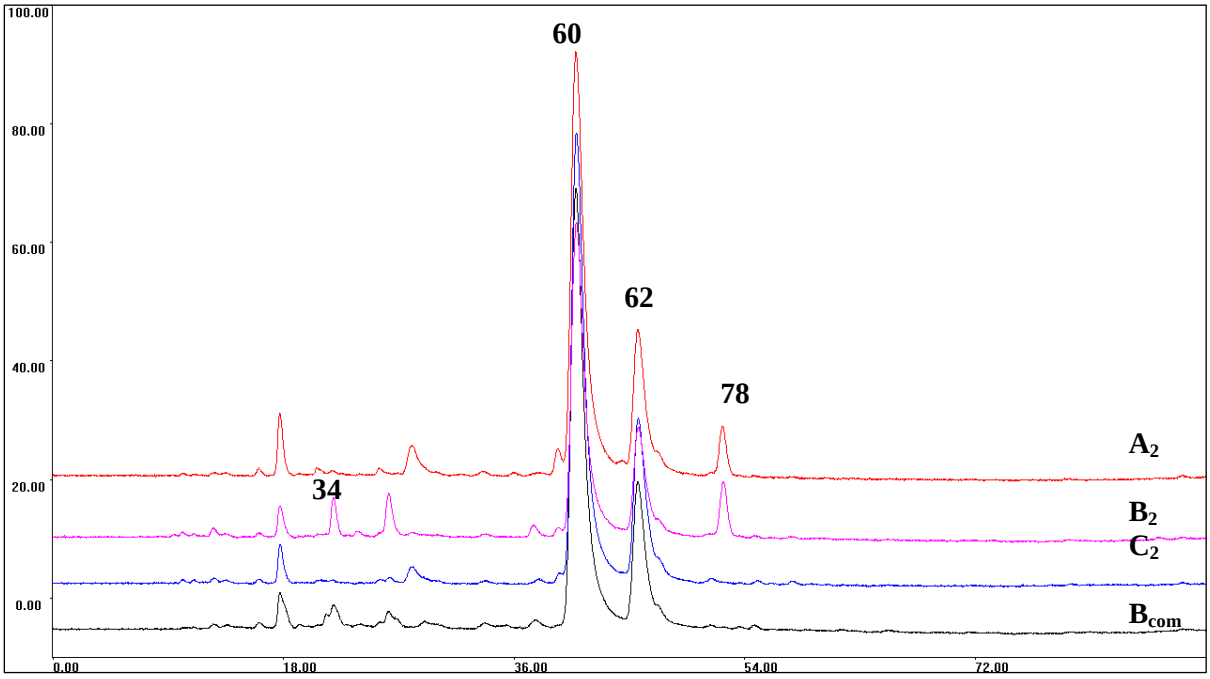


Figura EII. Cromatogramas obtidos com o detector de fluorescência (280/320 nm) para os vários extractos (1:20) de vinho Moscatel aplicados diluídos (1:20) (A_2, B_2, C_2 e B_{com}). **Identificação: 34**. ácido *t*-caftárico; **60.** glucósido do ácido indol láctico; **62.** não identificado; **78.** não identificado, procianidina, isoramnetina-3-*O*-rutinósido

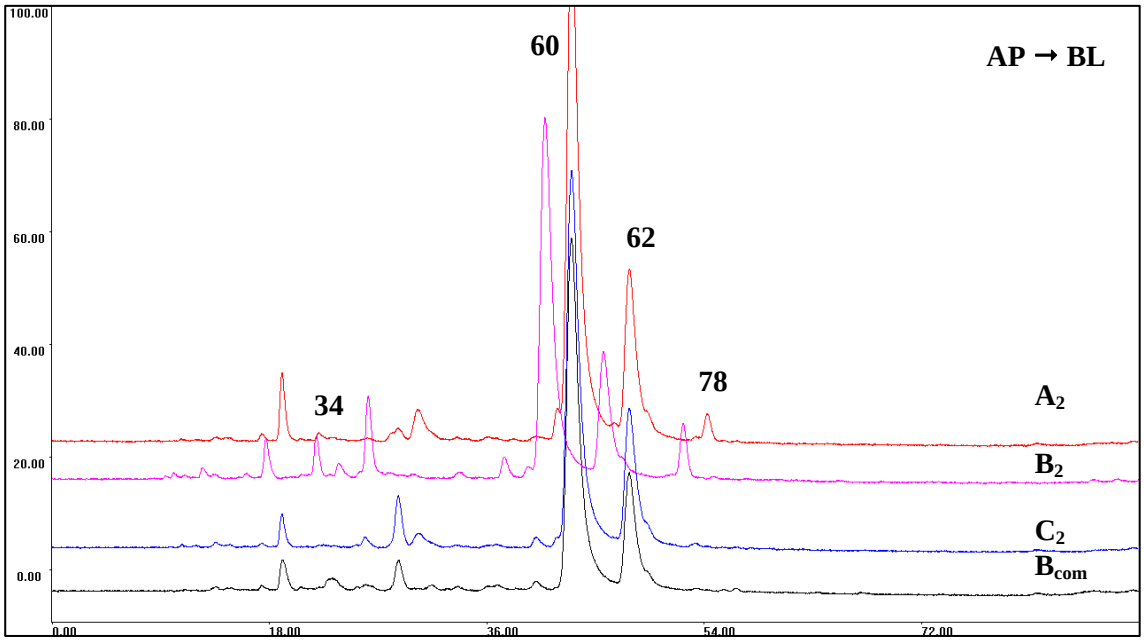


Figura EIII. Cromatogramas obtidos com o detector de fluorescência (280/320 nm) para a solução dadora (1:10) obtida no sentido AP →BL (A_2, B_2, C_2 e B_{com}) ao fim de 120 min. **Identificação: 34**. ácido *t*-caftárico; **60.** glucósido do ácido indol láctico; **62.** não identificado; **78.** não identificado, procianidina, isoramnetina-3-*O*-rutinósido

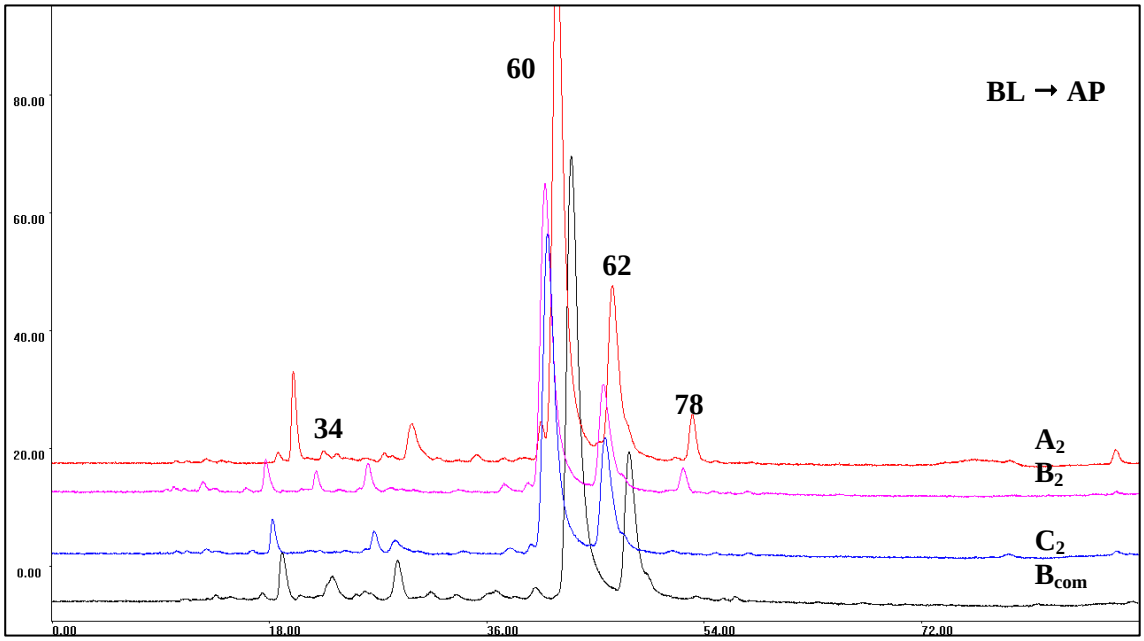


Figura EIV. Cromatogramas obtidos com o detector de fluorescência (280/320 nm) para a solução dadora (1:10) obtida no sentido BL →AP (A_2, B_2, C_2 e B_{com}) ao fim de 120 min **Identificação: 34**. ácido *t*-caftárico; **60.** glucósido do ácido indol láctico; **62.** não identificado; **78.** não identificado, procianidina, isoramnetina-3-*O*-rutinósido

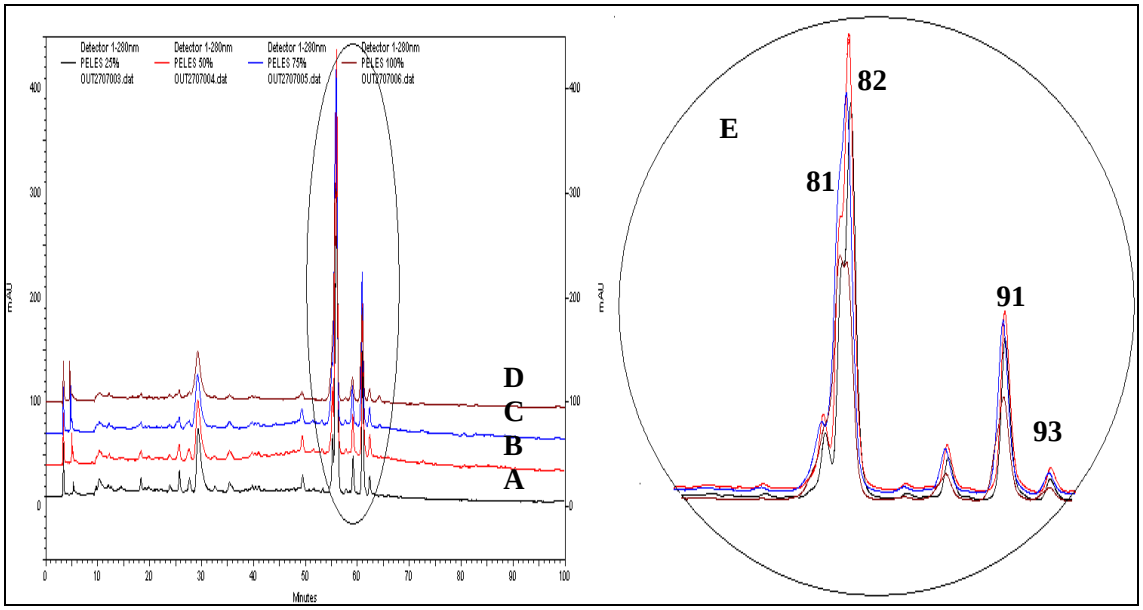


Figura EV. Cromatogramas, a 280 nm, de um extracto de peles de uvas obtido com várias soluções extractantes: (**A**) 25%; (**B**) 50%; (**C**) 75 % e (**D**) 100 % etanol e (**E**) ampliacão dos cromatogramas entre 55 e 65 min. **Identificação: 81.** quercetina-3-glucuronido; **82.** quercetina-3-*O*-glucósido; **91.** *c*-piceid; caempferol-3-*O*-glucósido; quercetina-3-*O*-ramnósido; **93.** Isoramnetina-3-glucósido; **111.** quercetina

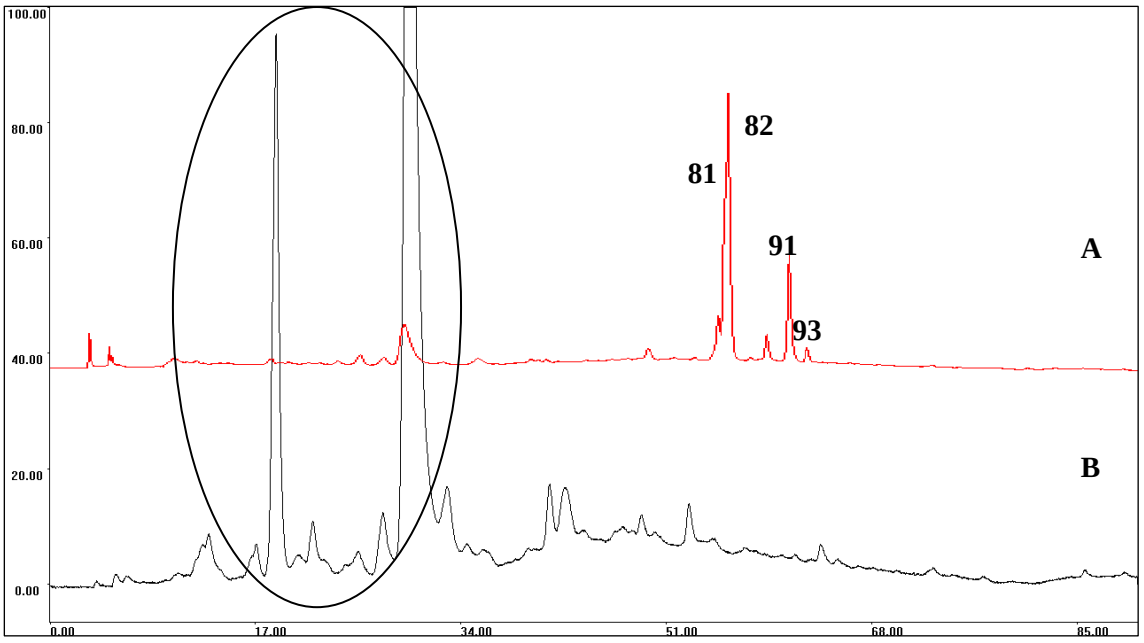


Figura EVI. Cromatogramas de um extracto de peles de uvas obtidos com os detectores de **: (A)** díodos (280 nm) e de **(B)** fluorescência (280/320 nm). **Identificação: 81.** quercetina-3-glucuronido; **82.** quercetina-3-glucósido; **91.** *c*-piceid; caempferol-3-glucósido; quercetina-3-ramnósido; **93.** Isoramnetina-3-glucósido; **111.** quercetina+NI

ANEXO A

- Artigo publicado na revista Analytica Chimica Acta

  M.N. Bravo, S. Silva, A.V. Coelho, L. Vilas Boas, M.R. Bronze (2006). Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. Analytica Chimica Acta, 563 (2006) 84–92.

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT
Analytica Chimica Acta 563 (2006) 84–92
ANALYTICA CHIMICA ACTA
www.elsevier.com/locate/aca

Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal

M.N. Bravo [a,b], S. Silva [b,c], A.V. Coelho [b,e], L. Vilas Boas [b,d], M.R. Bronze [a,b,c,*]

[a] *Faculdade de Farmácia de Lisboa, Av. das Forças Armadas, 1649-019 Lisboa, Portugal*
[b] *Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Apartado 127, 2784-505 Oeiras, Portugal*
[c] *Instituto Biologia Experimental e Tecnológica, Apartado 12, 2781-901 Oeiras, Portugal*
[d] *Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal*
[e] *Universidade de Évora, Departamento de Química, 7000 Évora, Portugal*

Received 19 August 2005; received in revised form 14 November 2005; accepted 21 November 2005
Available online 6 January 2006

Abstract

A liquid chromatography method associated with mass spectrometry and diode array, fluorescence and electrochemical detectors was used in order to study phenolic composition of Muscatel sweet wines from Setúbal region in Portugal. Samples were collected during winemaking production at different representative producers of this region. Total phenolic contents of samples were also determined using the Folin–Ciocalteu method. Mass spectrometry results show that atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) in negative mode presents higher sensitivity for the majority of the compounds studied. Some phenolic acids, stilbenes as resveratrol and piceid, and flavonols as quercetin and quercetin glycosides were identified in these Muscatel wines. For resveratrol, piceid, gallic acid, protocatechuic acid, catechin and quercetin, fluorescence and electrochemical properties were used as complementary or alternative methods of detection. Differences in phenolic composition and total phenolic contents were found among samples collected.
© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Muscatel wine; Phenolic compounds; Fluorescence detector; Electrochemical detector; Mass spectrometry; Folin–Ciocalteu

1. Introduction

Phenolic compounds play an important role in colour and flavour of foods and beverages and its regular consumption on a diet has been associated with beneficial effects for human health [1]. Some phenolic compounds found in wines are antioxidants contributing to a reduction in the risk of cardiovascular diseases, others such as resveratrol, gallic acid and quercetin have been claimed to have activity against allergies, inflammation, hypertension, arthritis and carcinogens [2–6]. White wines, with a lower phenolic content than red wines, have lower antioxidant activity, although some phenolic compounds present in these wines are more effective in the in vitro inhibition of LDL oxidation process [7].

The type and concentration of phenolic compounds in wines is influenced by the chemical composition of the raw materials (grapes) which are influenced by the variety, ripening stage, atmospheric conditions during ripening and type of soil. The techniques used during the winemaking process of the wine and ageing conditions [8–10] are also important. Phenolic aldehydes (e.g. vanillin), benzoic acids (e.g. gallic acid), hydroxycinnamic acids (e.g. caffeic, ferulic and *p*-coumaric acids) and their esters obtained by condensation with tartaric acid (hydroxycinnamoyltartaric acids), flavanols, flavonols (e.g. quercetin) and anthocyanins are extracted from grapes during the winemaking process. Also flavan-3-ols as catechins present in the grape as monomers or polymerized to form proanthocyanidins and hydrolysable tannins [11,12] and stilbenes, as resveratrol or its glycoside form (piceid) occur in wine [13,14].

Some phenolic compounds can be extracted from wood during the ageing stage and oxidation reactions may also occur increasing the stability of the wine and its pleasant sensorial characteristics.

Phenolic compounds have been analysed by liquid chromatography (LC) with diode array (DAD), fluorescence (FD) [10,14,15] and electrochemical (ED) detection [16,17]. Liquid chromatography with mass spectrometry (MS) using atmospheric pressure ionisation (electrospray or chemical ionisation) has also been used [18] in order to identify their chemical structures.

* Corresponding author. Tel.: +351 214469770; fax: +351 214417062.
E-mail address: mbronze@itqb.unl.pt (M.R. Bronze).

0003-2670/$ – see front matter © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.aca.2005.11.054

In Portugal, there are significant productions of dessert Muscatel wines in Setúbal and Douro regions. These wines are produced from white or red grapes of Muscatel vine varieties: the strong and characteristic bouquet of these grapes is usually much appreciated by consumers.

After harvest, Muscatel grapes are fermented and when sugar content of the must is about 90–100 g L^{-1}, spirit is added in order to stop the fermentation process. Flavour and phenolic compounds from grape pulp and skin are extracted in a maceration process lasting for several months. The wine is then separated from the pomace and the liquid from pressing the pomace is added to the wine; afterwards the wine is transferred into wooden barrels where it stays for at least 24 months [19].

The aim of this work was to identify compounds and monitor the changes in the phenolic composition during the winemaking process of Muscatel wines from different producers in the Setúbal region. Some phenolic compounds detected in the samples were identified by LC–MS^n and the analysis were also carried out with a LC-DAD-FD-ED system. Results obtained from chromatographic profiles were compared with the total phenolic content measured by Folin–Ciocalteu method.

2. Experimental

2.1. Reagents

Acetonitrile (LC–MS and gradient grade) and methanol (HPLC grade) used were from Lab-Scan (Dublin, Ireland). The *o*-phosphoric acid 85% and formic acid (analytical reagent grade) were respectively from Riedel-deHaën (Seelze, Germany) and Panreac (Barcelona, Spain).

Deionised water with 0.050 μS cm^{-1} conductivity, prepared with a Mili-Q system (Millipore, Molsheim, France), was used in all experiments.

The standards as gallic acid, 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), protocatechuic acid, furfural, *p*-hydroxybenzoic acid, catechin, caffeic acid, vanillin, ferulic acid, *trans*-piceid, *trans*-resveratrol were obtained from Aldrich (Steinheim, Germany) and epicatechin, quercetin-3-glucoside and quercetin were obtained from Extrasynthése (Genay, France).

Standard stock solutions (at 10.0 g L^{-1}) were prepared by dissolving the compounds in methanol and stored in the darkness at 4 °C. Working solutions were prepared by dilution of the standard stock solutions with deionised water.

Folin–Ciocalteu reagent was obtained from Sigma (Steinheim, Germany) and sodium carbonate from Riedel-de Haën (Seelze, Germany).

2.2. Sampling

Muscatel Setúbal wines from the 2004 vintage were produced in three wineries identified as producers A, B and C. After spirit was added to stop fermentation, samples were collected during the maceration process (M) corresponding to wine in contact with the seeds and the skins: for 7 months ($1M_A$–$7M_A$) for producer A, for 5 months ($1M_B$–$5M_B$) for producer B and for 8 months ($2M_C$–$9M_C$) for producer C. The pomace was than pressed, the liquid obtained (LP) was added to the wine and a maturation stage (ST) was started. Samples were collected monthly: for 4 months ($1ST_A$–$4ST_A$) for producer A, 6 months ($1ST_B$–$6ST_B$) for producer B and 2 months for producer C ($1ST_C$–$2ST_C$).

2.3. Sample preparation

Ten millilitre of wine were extracted four times with 7 mL of ethyl acetate. The ethyl acetate extracts were combined and evaporated to dryness under vacuum. The residue was redissolved in 250 μL of methanol/water (6:4, v/v) [13] and analysed by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry.

Wines were filtered with Acrodisc® Syringe Filter 0.45 (m HT Tuffryn® Membrane from Pall Corporation (Ann Arbor, USA) and analysed by liquid chromatography with diode array, fluorescence and electrochemical detection.

One millilitre of wine was diluted with 4 mL of deionised water for determination of the total phenolic content using the Folin–Ciolcalteu method.

2.4. Equipments and conditions of analysis

2.4.1. Liquid chromatography with mass spectrometry

Analyses by LC were performed with a Surveyor equipment from Thermo Finnigan. The mass spectrometry system was an LCQ ion trap mass spectrometer (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) equipped with an electrospray ionization (ESI) or atmospheric pressure chemical ionization (APCI) sources. The LC–MS system was run by Xcalibur version 1.3 software (Thermo Finnigan—Surveyor, San Jose, USA).

Separations were performed at 35 °C with a LiChrospher C18 (5 μm, 250 mm × 4 mm i.d.) column from Merck with a guard column of the same type. The samples were injected using a 20 μL loop.

The separations were carried out with a flow rate of 700 μL min^{-1} and the mobile phase consisted of a gradient mixture of eluent A (formic acid 0.5%) and eluent B (formic acid–acetonitrile–water 5:400:595, v/v/v). The following gradient of eluents was used: 0–15 min from 0 until 20% eluent B; 10 min with 20% eluent B; 25–70 min, from 20 until 70% eluent B; 70–75 min, with 70% eluent B; 75–85 min from 70 until 100% eluent B; 85–90 min, with 100% eluent B.

The following conditions were used for the mass spectrometer experiments:

- *ESI source*: temperature of the heated capillary 280 °C; electrospray voltage 3.7 kV in positive mode and 3.0 kV in negative mode;
- *APCI source*: vaporizer temperature 465 °C; discharge current 5 μA; temperature of the heated capillary 250 °C.

Nitrogen was used as sheath gas and auxiliary gas in the experiments performed by ESI and APCI. The sheath and auxiliary gas flow rates were 80 and 20 arbitrary units, respectively.

LC–MS was performed in the full scan mode from *m/z* 80 to 2000. The collision energies used in MS^2 fragmentation experiments conducted by LC–MS were established from preliminary MS^2 assays done by direct injection of individual standard solutions of phenolic compounds studied. All the fragmentation experiments were done using 35% collision energy [20].

2.4.2. Liquid chromatography with diode array, fluorescence and electrochemical detection

A Surveyor equipment from Thermo Finnigan with a diode array detector (Thermo Finnigan—Surveyor, San Jose, CA, USA), a fluorescence detector (Shimadzu, RF-535) and an electrochemical detector (Dionex, ED40) with a vitreous carbon electrode were used. Conditions of analysis by LC were the same described in Section 2.4.1 but replacing formic acid (0.5%) by phosphoric acid (0.1%).

Diode array detection (DAD) was performed between 200 and 800 nm. For fluorescence detection several $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ were used: 280/320, 260/400 and 300/390 nm. These wavelengths were chosen as they have been described as adequate for the analysis of phenolic compounds using fluorescence detection [14,15].

Electrochemical detection was programmed for a linear variation −1.0 V at 1.0 V in 1.00 s (detection by integrated voltametry using a cyclic variation of the potential). The measurements were taken with a 50 Hz frequency with an analogic/digital converter.

The data acquisition systems were the Chromquest version 4.0 (Thermo Finnigan—Surveyor, San Jose, CA, USA) for the diode array detector and the software 4880 (Unicam) for the electrochemical and fluorescence detectors.

2.4.3. Analysis by Folin–Ciocalteu method

Total phenolic content was determined according to Curvelo-Garcia [21]. A calibration curve was obtained with gallic acid solutions (concentration range 0.4–5 mg L^{-1}) and the results are expressed as grams of gallic acid per litre of wine. Standard and samples were analysed in triplicate.

Absorbance at $\lambda = 750$ nm using 1 cm glass cells was measured with the spectrophotometer (DU-70, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, USA).

Data analysis in comparisons of total peak areas from LC analysis (absorption at 280 nm) with total phenolic content measured by Folin–Ciocalteu method were performed using Excel (Microsoft), Version 2002: the correlation coefficients and standard errors were determined using regression statistics.

2.4.4. Measurement of pH

When necessary, the pH of wine was measured by the usual method [21] using Crison-micropH 2002 pH meter with a combined electrode Mettler Toledo type U402-S7/120 and a probe of temperature (CRISON).

3. Results and discussion

3.1. Qualitative analysis of phenolic compounds

A qualitative study of the phenolic compounds present in wine samples was performed by LC–MS. In order to optimize the conditions of analysis by MS, results obtained from electrospray ionization (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) in positive and negative modes were compared. For the majority of the compounds, a higher sensitivity was obtained using APCI in negative mode as mentioned in a previous paper

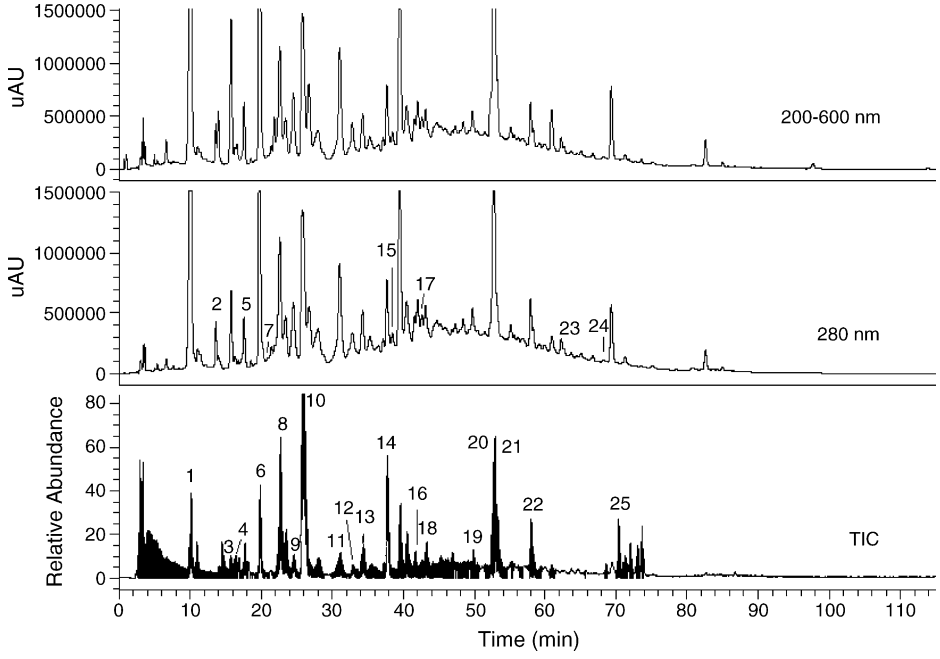


Fig. 1. Chromatograms at λ_{max} (range 200–600 nm), 280 nm and TIC (*m/z* 80–2000) of an extract of Muscatel wine from producer C after 5 months of maceration ($5M_C$).

[20], however detection of resveratrol was only achieved in positive polarity mode. For this compound the analytical conditions used were not the most suitable and more recent experiments [22] showed that lower flows in LC favored the detection of resveratrol using APCI in negative mode.

Chromatograms presented in Fig. 1 were obtained for an extract of Muscatel wine from producer C after 5 months of maceration ($5M_C$) using detection by UV–vis absorption (280 nm and at λ_{max} in the range 200–600 nm) and MS (total ion current).

Chromatograms at 280 nm are widely used to study phenolic compounds because absorption at this wavelength is suitable to detect a large number of such compounds [19].

Mass spectrometry was used to confirm the identifications of gallic acid (peak 1), protocatechuic acid (peak 3), caffeic acid (peak 11), catechin (peak 10), epicatechin (peak 14), *trans*-piceid (peak 19) and quercetin glycosides in Muscatel wines. Compounds were identified comparing *m/z* values obtained by MS and MS^2 with the mass spectra from standards tested in the same conditions of analysis and by comparison with data reported in literature (see Table 1) [2,7,12,18,23–29].

The caftaric (peak 6), *cis*-coutaric (peak 9) and fertaric (peak 12) acids were identified by their $[M-H]^-$ ions at *m/z* 311, 295 and 325, respectively. MS^2 experiments yielded the corresponding $[M-H]^-$ ions of caffeic, coumaric and ferulic acids by neutral loss of tartaric acid moiety (132 mass units) [23].

Full MS spectrum of catechin (peak 10) is illustrated in Fig. 2: ions at *m/z* 289 and 335, correspond to the deprotonated form, $[M-H]^-$, and to the formate adduct, $[M+HCOO]^-$, respectively. The formate adduct is due to the presence of formic acid in the mobile phase. MS^2 of precursor ion at *m/z* 289 originated several fragments: *m/z* 179, 205, 245 and 271 (Fig. 3). The fragment at *m/z* 205 is probably due to a loss of flavonoid A-ring, the ion at *m/z* 245 could result from the loss of a CO_2 group or the loss of a $-CH_2-CHOH-$ group and fragment at *m/z* 271 results from a neutral loss of 18 mass units equivalent to a molecule of water [29]. The fragment at *m/z* 179 may be due to the loss of the B-ring from the flavonoid.

The peaks 8, 13, 16 and 18 in TIC chromatogram (Fig. 1) may correspond to oligomers of catechin and epicatechin (procyanidins). Dimers have a molecular mass of 578 Da and therefore, the ions detected in mass spectrum at *m/z* 577 correspond to the $[M-H]^-$ ions observed in the spectra of the above-mentioned peaks.

Quercetin glycosides as quercetin-3-glucuronide (peak 20) and quercetin-3-glucoside (peak 21) were also identified. Quercetin-3-glucuronide is characterized by the $[M-H]^-$ ion at *m/z* 477; MS^2 yields the fragment at *m/z* 301, by the neutral loss of a glucuronide moiety (176). The ion at *m/z* 463, is a

Table 1
Characterization of phenolic compounds identified in Setúbal Muscatel wines

Peak no.	Compounds	t_r (min)	$[M-H]^-$ *m/z* (MS)	Fragments *m/z* (MS^2)	λ_{max} (nm)	Electrochemical properties	Fluorescence properties
1	Gallic acid	10.23	169	125	256	Yes	Yes[a]
2	5-HMF	13.66	–	–	280	No	No
3	Protocatechuic acid	16.01	153	109	258	Yes	Yes[a]
4	Epigallocatechin	16.77	305	179, 219, 221, 261	258	Yes	Yes[a]
5	Furfural	17.25	–	–	278	No	No
6	Caftaric acid	20.23	311	179	322	Yes	Yes[a]
7	*p*-Hydroxybenzoic acid	20.27	137	93	280	No	Yes[a]
8	Procyanidin dimer	23.27	577	289, 407, 425	278	Yes	Yes[a]
9	*cis*-Coutaric acid	25.29	295	149, 163	310	No	No
10	Catechin	26.48	289	205, 245	276	Yes	Yes[a]
11	Caffeic acid	31.93	179	135	322	Yes	Yes[a]
12	Fertaric acid	33.68	325	193	282	No	No
13	Procyanidin dimer	34.85	577	289, 407, 425	278	Yes	Yes[a]
14	Epicatechin	38.20	289	205, 245	278	Yes	Yes[a]
15	Vanillin	38.45	–	–	274	No	No
16	Procyanidin dimer	42.08	577	289, 407, 425	280	Yes	Yes[b]
17	Ferulic acid	42.58	193	134	278	No	Yes[c]
18	Procyanidin dimer	43.63	577	289, 407, 425	278	Yes	Yes[a]
19	*trans*-Piceid	49.72	389	227	282	Yes	Yes[b]
20	Quercetin-3-glucuronide	52.88	477	301	256	Yes	Yes[a,b,c]
21	Quercetin-3-glucoside	53.32	463	301	256	Yes	Yes[a,b,c]
22	*cis*-Piceid	58.10	389	227	282	Yes	Yes[c]
22	Kaempferol-3-glucoside	58.10	447	285	262	Yes	–
22	Quercetin-3-rutinoside	58.10	447	301	–	Yes	–
23	*trans*-Resveratrol	62.36	229[d]	135	284	Yes	Yes[b]
24	*cis*-Resveratrol	68.23	229[d]	135	284	Yes	Yes[c]
25	Quercetin	70.43	301	151, 179	254	Yes	Yes[c]

[a] 280/320 nm.
[b] 300/390 nm.
[c] 260/400 nm.
[d] $[M+H]^+$ positive mode.

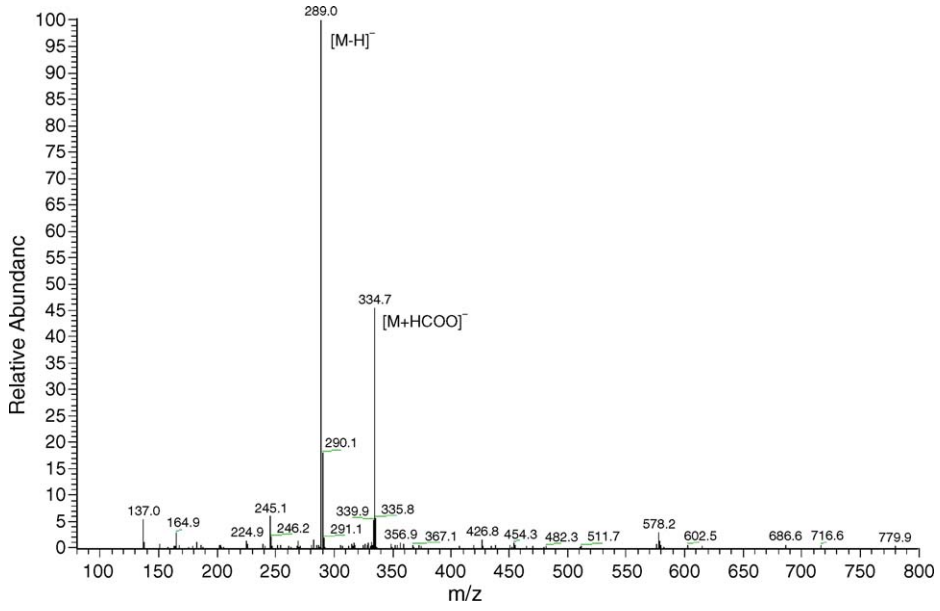


Fig. 2. Full mass spectrum of catechin (peak 10).

deprotonated form, $[M-H]^-$, of quercetin-3-glucoside. Fragmentation of that ion by means of MS^2 results in the aglycon at *m/z* 301. As expected, quercetin (peak 25) was detected at a higher retention time, since the aglycone elutes after the corresponding glycoside. The identification of quercetin was also confirmed by comparison with LC–MS data obtained with a standard solution.

As producer B stopped the maceration stage earlier than producers A and C, samples of Muscatel wines collected after 5 months maceration ($5M_A$, $5M_B$ and $5M_C$) are compared: TIC chromatograms obtained in analyses are presented in Fig. 4. Comparison of chromatographic profiles shows that the same compounds are present in all wines. For wine $5M_A$ the concentrations are much lower for compounds with retention times below 40 min. At about 70–75 min, a group of compounds is detected in the chromatograms of the three wines: peak 25 was identified as quercetin but the other compounds were not identified yet: these peaks are not well resolved and may be divided in two groups characterized by *m/z* values of 447 and 461.

The experimental conditions were not adequate for ionization of some compounds as shown by comparison with chromatograms obtained with the DAD detector used in tandem with the mass spectrometer: various peaks present in the chromatogram obtained by UV absorption were not detected by MS.

The chromatograms presented in Fig. 5 show that the lower content of phenolic compounds in wine from producer A ($5M_A$) is mainly related with a lower content of the gallic acid (peak

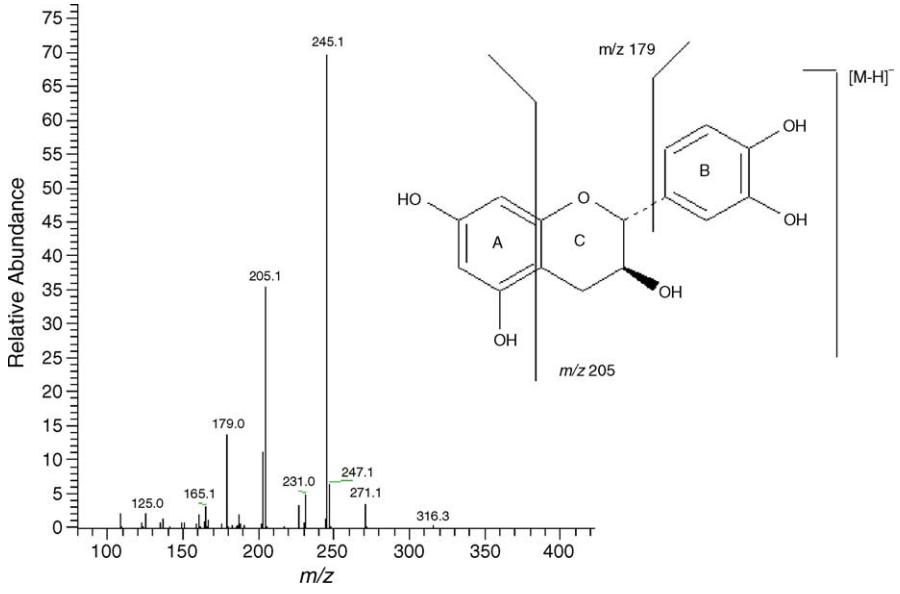


Fig. 3. MS^2 spectrum from the precursor ion *m/z* 289 and the proposed fragmentation scheme.

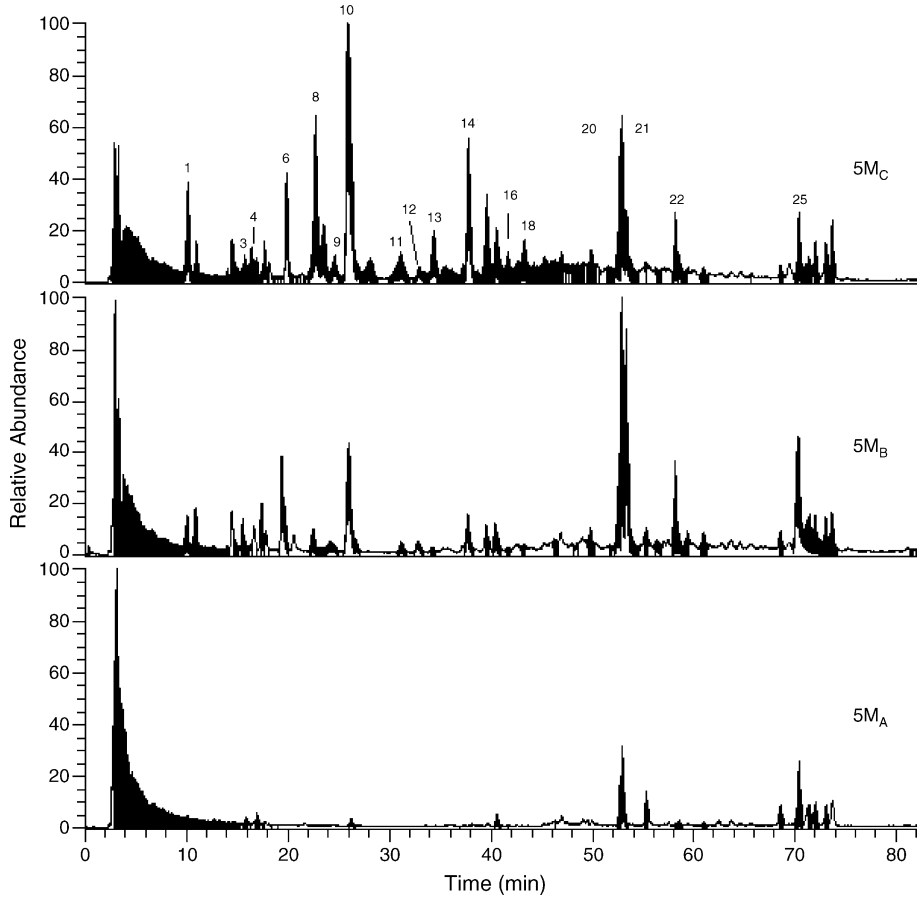


Fig. 4. Chromatogramas of total ionic current of extracts of Muscatel Setúbal wine from producers A (5M$_A$), B (5M$_B$) and C (5M$_C$) after 5 months of maceration.

1), caftaric acid (peak 6), catechin (peak 10) and caffeic acid (peak 11). The main sources of gallic acid (peak 1) and catechin (peak 10) are grape seeds and it is known [30] that higher concentrations of these compounds in wines may be due to some practices that increase seed extraction such as extended macerations, higher temperatures or aggressive pressing. The caftaric acid (peak 6) is an ester of cafeic and tartaric acids found in grape skins and pulp but not in seeds: both the ester and free cafeic acid are found in wine. Caftaric acid is readily oxidized during processing and fermentation [9,30].

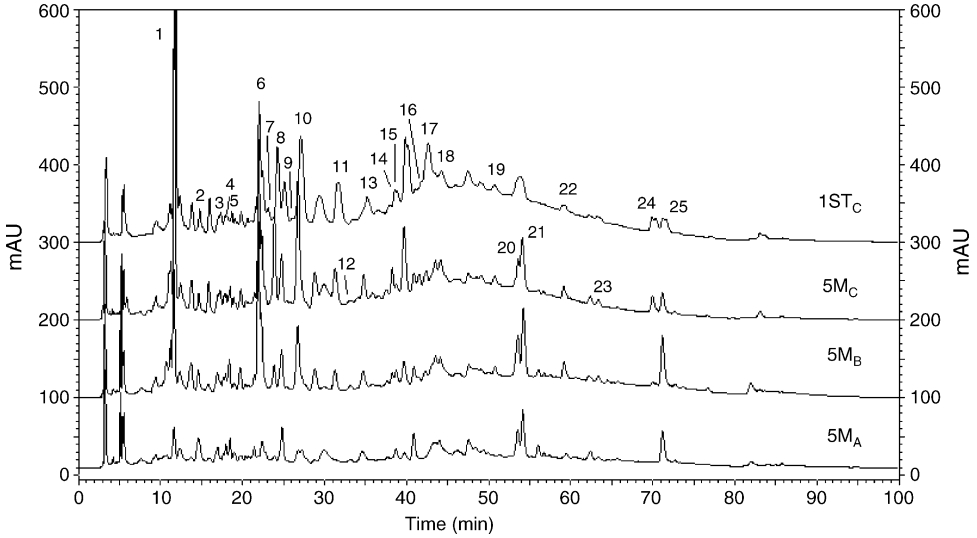


Fig. 5. Chromatograms at 280 nm of Muscatel Setúbal wine from producers A (5M$_A$), B (5M$_B$) and C (5M$_C$) after 5 months of maceration and after adding the liquid from pressing (1ST$_C$).

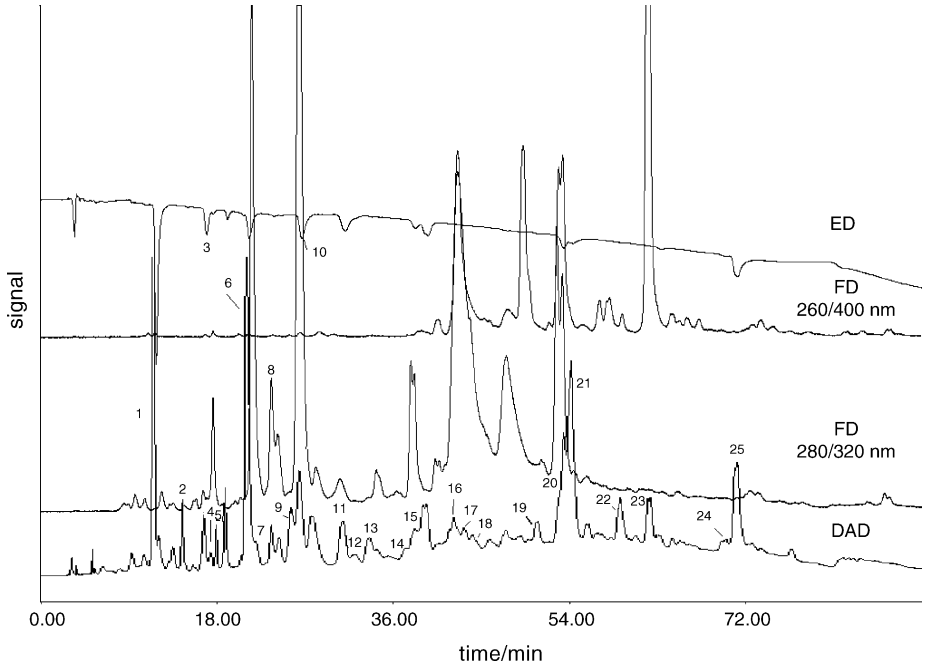


Fig. 6. Chromatograms of Setúbal Muscatel wine from producer B after 5 months of maceration ($5M_B$) using diode array (280 nm), fluorescence ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ = 280/320 and 260/400 nm) and electrochemical (−1 V, +1 V) detectors in tandem.

On pressing the pomace, more phenolic compounds can be extracted and there are changes in phenolic composition after adding liquid from pressing of pomace to the wine as can be seen in Fig. 5 looking at chromatogram of sample $1ST_C$: the content of gallic acid (peak 1), caffeic acid (peak 11), ferulic acid (peak 17) increased, but for quercetin (peak 25) and quercetin glycosides (peaks 20 and 21) reactions may have occurred leading to lower concentrations of these compounds in the wine sample analysed.

Comparison of chromatographic profiles obtained when liquid chromatography with diode array detector was used in tandem with fluorescence and electrochemical detection (Fig. 6) showed that electrochemical detection was useful for identification of compounds such as gallic acid (peak 1), protocatechuic acid (peak 3), caftaric acid (peak 6), catechin (peak 10), caffeic acid (peak 11) and quercetin (peak 25) as these compounds could be easily detected without interference from other compounds eluting at near retention times. Catechin was easily detected with fluorescence detection at λ_{Ex} = 280 nm and λ_{Em} = 320 nm: there were no interfering co-eluting peaks and the signal/noise ratio was much higher than for the peak detected by UV absorption. The same occurred for quercetin-3-glucoronide (peak 20) and quercetin-3-glucoside (peak 21).

Trans-piceid (19) and *trans*-resveratrol (23) were detected by fluorescence at λ_{Ex} = 300 nm and λ_{Em} = 390 nm, and for *cis*-piceid (22), and *cis*-resveratrol (24) the optimal excitation and emission wavelengths were 260 and 400 nm, respectively. These stilbenes are present in low concentrations in wines but they are important compounds due to their antioxidant properties. Production of stilbenes is induced in grapes under stress conditions (attack from pathogens, UV-C light or lesion) [28].

In the chromatogram obtained at 280 nm with DAD, 25 compounds were identified. For 5-HMF (peak 2), furfural (peak 5), *p*-hydroxybenzoic acid (peak 7), vanillin (peak 15), ferulic acid (peak 17), identification was confirmed by analysis of samples spiked with these standards using the LC-DAD-FD-ED system.

In Table 1, are summarized data obtained concerning compounds identified using the several analytical methods discussed in this paper: retention times, *m/z* of $[M-H]^-$, the MS^2 fragments corresponding to each phenolic compound detected by LC–MS with APCI, λ_{max} and information concerning detection with electrochemical and fluorescence detectors.

3.2. Quantitative analysis of phenolic compounds

Chromatograms at 280 nm for all samples have no horizontal straight baselines as illustrated in Fig. 5: these baseline drifts are even larger after adding the liquid from pressing of the pomace to the wine ($1ST_C$). These variations observed in the baseline correspond to the presence of various polymeric compounds not separated in these conditions and eluting between 25 and 75 min. The total content of these unresolved compounds, measured as the sum of peak areas considering a horizontal baseline (total peak areas at 280 nm), can contribute to the total phenolic content measured by the Folin–Ciocalteu method.

The total phenolic contents of wines from the different producers at different times of winemaking process were measured. The standard error for the Folin–Ciocalteu method and for the peak areas was about 5%. An attempt to relate the total peak areas at 280 nm with total phenolic content is presented in Fig. 7. The *r*-value obtained (0.914) confirms that there is a linear relationship although some dispersion of points is observed specially for wines from producer C.

The lower total phenolic contents obtained for the wines from producer A are in accordance with the chromatogram shown in

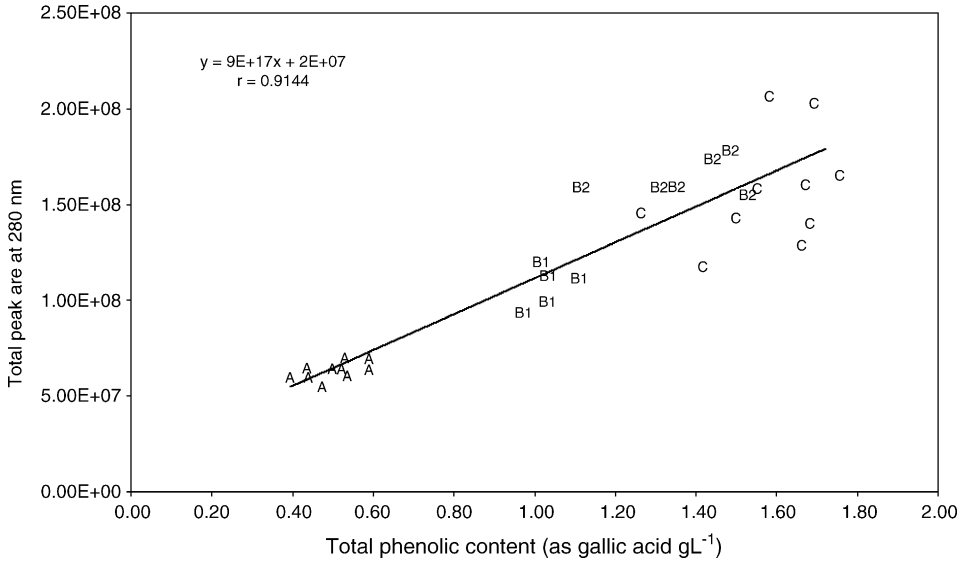


Fig. 7. Total phenolic content vs. LC total areas at 280 nm (peak areas + compounds not separated corresponding to the variation of the baseline) of Setúbal Muscatel wines from producers A, B and C.

Fig. 5. During the maceration, there were no important changes in phenolic composition for this producer.

In wines from producers A and C the total phenolic contents were not strongly influenced by the addition of the liquids from pressing of pomace (LP). On the contrary, an increase in the phenolic content was observed in wine of producer B when this liquid was added: samples identified in Fig. 7 as B1 correspond to wines before the addition of LP and B2 correspond to wines after the addition of LP. The phenolic composition of wines of sub-group B2 became similar to wines from producer C.

When sums of peak areas detected at 280 nm (without imposing a horizontal baseline) were compared with phenolic contents, the *r*-value obtained was 0.938. The lower dispersion observed in Fig. 8 can indicate that the above mentioned polymeric compounds responsible for shifts in the baseline may react in a different way with Folin–Ciocalteu reagent leading to a worse correlation.

One sample ($6M_C$) had peak areas and total phenolic content remarkably lower than samples collected at the same producer (C) in the previous month ($5M_C$) and 1 month later ($7M_C$): sample ($6M_C$) corresponds to the outlier observed in Fig. 8 but we have no explanation for this apparent change in composition.

Differences observed among wines are usually explained by the pH, ethanol content of wines, temperature and time of fermentation, maceration process [9]. The pressing conditions of the pomace are also important because many phenolic compounds are present in the grape (skin and seeds) and the pressing process favours their transfer into the wine.

The pH of samples from producers A, B and C were 4.0, 3.7 and 3.5, respectively, according to their informations: these

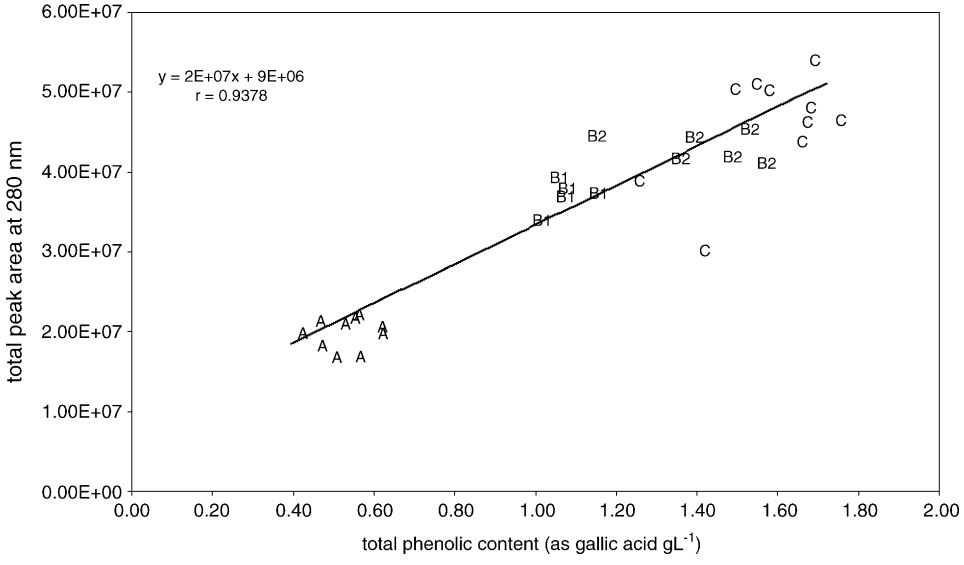


Fig. 8. Total phenolic content vs. LC peak areas at 280 nm of Setúbal Muscatel wines from producers A, B and C.

values were confirmed by measurement in our laboratory. The ethanol content of wines after adding spirit was about 23% for wines from producers A and B and about 20% for the wine of producer C. Therefore major differences in concentration of phenolic compounds could not be attributed to ethanol contents. Other possible explanation for observed differences may be the different times of harvest: the wines of producer C were made with grapes harvested at an earlier time and the strip off the grapes from the stalks was not so complete. Differences observed in wine may also be due to reservoirs used for keeping the wine in contact with pomace at the maceracion stage: stainless steel (producer A) or concrete (producers B and C).

4. Conclusions

This work shows that LC–MS using APCI in negative mode is a valuable tool for qualitative analysis of a large number of phenolic compounds in Muscatel wines. Identification of compounds as phenolic acids (gallic, protocatechuic and caffeic), catechin, epicatechin, piceid and quercetin glycosides was confirmed in these wines by MS. However, these APCI conditions were not adequate for the detection of some phenolic acids like ferulic acid and aldehydes such as vanillin: some complementary work with MS will be necessary in order to optimize the conditions for analysis of these compounds.

The same wine samples were analysed using a tandem of detectors (LC-DAD-FD-ED) to assess the possibility of carrying out analysis of relevant phenolic compounds with simpler LC detectors: compounds such as gallic acid, protocatechuic acid, catechin and quercetin were detected with ED taking advantage of the electrochemically active behaviour of these antioxidant substances. Diode array and fluorescence detectors allow discrimination of fluorescent and non-fluorescent overlapping peaks and they were used to identify the fluorescent compounds present in wine like resveratrol and piceid.

Wines from different producers representative of Setúbal Muscatel wine region were analysed: similar chromatographic patterns were found although significant differences in concentrations of phenolic compounds were observed. Phenolic composition during the maceration processes of wines for each producer had similar evolutions but when the liquid from pressing of pomace was added to the wine an increase in phenolic compounds was observed specially for one producer.

More work will be necessary to identify some compounds already detected in the chromatograms and assess their properties including potential health benefits.

Some further validation work will be set up in order to develop a quantitative method for the analysis of the phenolic compounds in samples.

Acknowledgements

The authors thank to José Maria da Fonseca, Succs., Adega Cooperativa de Palmela and Casa Agrícola Horácio Simões for providing samples of Muscatel wines.

References

[1] E. Haslam, Pratical Polyphenolics: from Structure to Molecular Recognition and Physiological Action, Cambridge University Press, Cambridge, 1998.
[2] Á.M. Alonso Borbalan, L. Zorro, D.A. Guillén, C.G. Barroso, J. Chromatogr. A 1012 (2003) 31.
[3] J. Kanner, E. Frankel, R. Granit, B. German, J.E. Kinsella, J. Agric. Food Chem. 42 (1994) 64.
[4] M. Lopez, F. Martinez, C. Del Valle, C. Orte, M. Miró, J. Chromatogr. A 922 (2001) 359.
[5] C. Domínguez, D.A. Guillén, C.G. Barroso, J. Chromatogr. A 918 (2001) 303.
[6] M.S. Fernández-Pachón, D. Villaño, M.C. Garcia-Parrila, A.M. Troncoso, Anal. Chim. Acta 513 (2004) 113.
[7] B. Baderschneider, P. Winterhalter, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 2788.
[8] N. Vivas de Gaulejac, N. Vivas, M.F. Nonier, C. Absalon, G. Bourgeois, J. Sci. Food Agric. 81 (2001) 1172.
[9] R.S. Jackson, Wine Science: Principals and Applications, Academic Press, Toronto, 1994.
[10] P. Viñas, C. López-Erroz, J.J. Marín-Hernández, M. Hernández-Cordoba, J. Chromatogr. A 871 (2000) 85.
[11] M.R. Bronze, L. Vilas Boas, A. Belchior, J. Chromatogr. A 768 (1997) 143.
[12] M. Monagas, C. Gómez-Cordovés, B. Bartolomé, O. Laureano, J.M. Ricardo da Silva, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 6475.
[13] Y. Wang, F. Catana, Y. Yang, R. Roderick, R.B. Van Breemen, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 431.
[14] X. Vitrac, J.P. Monti, J. Vercauteren, G. Deffieux, J.M. Mérillon, Anal. Chim. Acta 458 (2002) 103.
[15] M.A. Rodriguez-Delgado, S. Malovaná, J.P. Pérez, T. Borges, F.J.G. Montelongo, J. Chromatogr. A 912 (2001) 249.
[16] C. Bocchi, M. Careri, F. Groppi, A. Mangia, P. Manini, G. Mori, J. Chromatogr. A 753 (1996) 157.
[17] I. Kolouchová-Honzlíková, K. Melzoch, V. Filip, J. Šmidrkal, Food Chem. 87 (2004) 151.
[18] F. Riccardo, Mass Spectrom. Rev. 22 (2003) 218.
[19] M.N. Matos, Chemical and Sensory Characterization of Fortified Muscatel Wines, M.Sc.Thesis, Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, 2001.
[20] S. Silva, A.A. Matias, A. Nunes, C. Duarte, A.V. Coelho, M.R. Bronze, Ciência Téc. Vitiv. 20 (2005) 17.
[21] A.S. Curvelo-Garcia, Controlo de Qualidade dos Vinhos: Química Enológica-Métodos Analíticos, Instituto da Vinha e do Vinho, Lisboa, 1988.
[22] S. Silva, M.L. Gomes, L. Vilas Boas, A. Matias, A. Nunes, C. Duarte, A.V. Coelho, M.R. Bronze, Abstract Book of 29th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Stockholm, 2005.
[23] D. Kammerer, A. Claus, R. Carle, A. Schieber, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 4360.
[24] K. Ku, P. Chang, Y. Cheng, C. Lien, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 3877.
[25] W. Andlauer, M.J. Martena, P. Fürst, J. Chromatogr. A 849 (1999) 341.
[26] Q. Wu, M. Wang, J.E. Simon, Anal. Chem. 75 (2003) 2440.
[27] J. Vial, M. Hennion, A. Fernandez-Alba, A. Agüera, J. Chromatogr. A 937 (2001) 21.
[28] E. Cantos, J.C. Espín, F.A. Tomás-Barberán, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 5691.
[29] W.M. Stoggl, C.W. Huck, G.K. Bonn, J. Sep. Sci. 27 (2004) 524.
[30] On-line, The ETS Red Wine Phenolic Report in http://www.etslabs.com/scripts/ets/pagetemplate/blank.asp?pageid=298.

- Artigo aceite para publicação na revista Journal of Food Composition and Analysis

  M.N. Bravo, R. Feliciano, S. Silva, A.V. Coelho, L. Vilas Boas, M.R Bronze *trans*-resveratrol analysis: Comparison of methods and contents in Muscatel fortified wines from Setúbal region in Portugal

Author's Accepted Manuscript



www.elsevier.com/locate/yjfca

trans-Resveratrol analysis: Comparison of methods and contents in Muscatel fortified wines from Setúbal region in Portugal

M.N. Bravo, R. Feliciano, S. Silva, A.V. Coelho, L. Vilas Boas, M.R. Bronze

PII: S0889-1575(08)00064-1
DOI: doi:10.1016/j.jfca.2008.04.007
Reference: YJFCA 1684

To appear in: *Journal of Food Composition and Analysis*

Received date: 14 June 2007
Revised date: 7 April 2008
Accepted date: 18 April 2008

Cite this article as: M.N. Bravo, R. Feliciano, S. Silva, A.V. Coelho, L. Vilas Boas and M.R. Bronze, trans-Resveratrol analysis: Comparison of methods and contents in Muscatel fortified wines from Setúbal region in Portugal, *Journal of Food Composition and Analysis*, doi:10.1016/j.jfca.2008.04.007

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting galley proof before it is published in its final citable form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

ACCEPTED MANUSCRIPT

trans-Resveratrol Analysis: Comparison of Methods and Contents in Muscatel Fortified Wines from Setúbal Region in Portugal

M.N. Bravo[a,b], R. Feliciano[b,c], S. Silva[b,c], A.V. Coelho[b,e], L. Vilas Boas[b,d], M.R Bronze[a,b,c] *

[a] *Faculdade de Farmácia de Lisboa, Av. das Forças Armadas, 1649-019 Lisboa, Portugal*
[b] *Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Apartado 127, 2784-505 Oeiras, Portugal*
[c] *Instituto Biologia Experimental e Tecnológica, Apartado 12, 2781-901 Oeiras, Portugal*
[d] *Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal*
[e] *Universidade de Évora, Departamento de Química, 7000 Évora, Portugal*

Abstract

Liquid chromatography and mass spectrometry conditions were developed in order to identify *trans*-resveratrol in sweet fortified Muscatel wines from Setúbal region (Portugal). Diode array, fluorescence and electrochemical detectors were used for quantitation purposes. The detection and quantitation limits for each detection mode were: 0.02 and 0.06 mgL^{-1} for UV-Vis, 0.01 and 0.03 mgL^{-1} for fluorescence and 0.45 and 1.35 mgL^{-1} for electrochemical. Repeatibility (n=6) expressed as the relative standard deviation of peak areas for a standard solution of *trans*-resveratrol (1.75 mgL^{-1}) was 0.5% for fluorescence and 1.5 % for UV-Vis and electrochemical detection modes. Samples collected at one representative producer, during winemaking process, were injected without pre-treatment and the quantitation of *trans*-resveratrol was carried out using fluorimetric detection. The *trans*-resveratrol content decreased slightly along the winemaking process and the concentrations ranged from 0.22±0.02 to 0.16±0.02 mgL^{-1}.

After maturation stages, *trans*-resveratrol contents in wines collected at different producers were compared: values obtained range from 0.13±0.02 mgL^{-1} to 0.38±0.03 mgL^{-1}. The *trans*-resveratrol contents in commercially available wines from the same producers were lower.

Keywords: Muscatel wine; *trans*-resveratrol; Liquid chromatography; fluorescence detector; mass spectrometry

* Corresponding author. Tel.: +351-214469770; fax: +351-214417062
E-mail address: mbronze@itqb.unl.pt (M.R. Bronze)

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

1. Introduction

Stilbenes belong to the non-flavonoid class of phenolic compounds and resveratrol is the major stilbene component present in white and red grapes and in grape products such as wines. Resveratrol occurs in two isomeric forms (*trans* and *cis*): the *trans*-resveratrol or 3,5,4'-trihydroxystilbene (Fig.1.) is the most abundant form and is mainly located in grape skins (Monagas et al., 2005; Wang et al., 2002). This compound can also be detected as glucosides: *trans* and *cis* piceid.

trans-Resveratrol has an important role in human health as it presents antibacterial, antifungal and antioxidant properties (Kolouchová-Hanzlíkova et al., 2004) and has been reported as responsible, in part, for the lower mortality by cardiovascular diseases observed in moderate and regular wine-consuming populations (Vitrac et al., 2002; Urpí-Sardà et al., 2005; Lamuela-Raventós et al., 1995). This compound has also the capacity to protect against global cerebral ischemic injury and to protect from oxidative damage and inhibits tumour initiation, promotion and progression (Sánchez et al., 2005; Moreno-Labanda et al., 2004).

Resveratrol in grapes is synthesized almost entirely in the grape skin and its maximum concentration occurs just before the grapes reach maturity. The stilbene synthase is the enzyme used in the biosynthesis of resveratrol and the concentration in grapes varies considerably, depending on the grape variety (Threlfall et al., 1999; Gürbüz et al., 2007) and abiotic factors, such as hydric stress (Abril et al., 2005; Moreno-Labanda et al., 2004) or UV irradiation (Sun et al., 2006; Sánchez et al., 2005; Piñeiro et al., 2006). The content of *trans*-resveratrol in red and white grape skins (Kammerer et al., 2004) ranged from 11.1 to 123.0 $mgKg^{-1}$ of dry matter, but a large variation was observed for the same cultivars analysed in different years. The resistance of the plant against fungal diseases as downy mildew and grey mould caused by *Plasmopara viticola* or *Botrytis*

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

cinerea respectively (Adrian et al., 2000; 37-41; Gerogiannaki-Christopoulou et al., 2006) has been related with the occurrence of resveratrol. Jeandet et al. (1995), refer that higher concentrations of resveratrol should be expected in wines made with grapes that suffered a *Botrytis* infestation.

The process used in winemaking can also induce significant changes in the content of *trans*-resveratrol (Castellari et al., 1998, Jeandet et al., 1995; Clare et al., 2004, Stervbo et al., 2007). Wines obtained using traditional winemaking technologies (skin fermentation with or without stems) have higher content of resveratrol than those obtained by carbonic maceration techniques (Sun et al., 2006). The extraction of resveratrol from grape skins seems to be completed before or by the end of alcoholic fermentation and a prolonged maceration after alcoholic fermentation may not affect the total content of resveratrol in finished wines. The use of bentonite treatment can be responsible for a decrease (2-5%) in the amounts of *trans*-resveratrol (Castellari et al., 1998) and the effect of other parameters have also been referred: a decrease in the temperature during maceration, precipitation and adsorption on marc and/or pH increasing (Stervbo et al., 2006; Gambuti et al., 2004).

In table 1 are summarized data on *trans*-resveratrol contents in wines.

The *trans*-resveratrol can be analysed directly (Abril et al., 2005; Vitrac et al., 2002) or after pre-treatment of wine samples in order to increase its content. Liquid-liquid extraction (Wang et al., 2002) and solid-phase extraction (SPE) (Rodríguez-Delgado et al., 2002; Domínguez et al., 2001; Malovaná et al., 2001; Gamoh et al., 1999) have been used in sample preparation for concentration and cleaning purposes.

In order to determine the concentration of *trans*-resveratrol in wine, separative methods have been reported. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), (Jeandet *et al*, 1995; Flamini et al., 2003) requires derivatization to enhance the

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

84 volatility of resveratrol. Liquid chromatography (LC) is the most used technique
85 (Mattivi et al., 1995; 43, Pour Nikfardjam et al., 2006; Dourtoglou et al., 1999; Flamini
86 et al., 2003) but capillary electrophoresis (CE) techniques have also been reported and
87 sensitivity is similar to LC methods (Xuelin et al., 2000). Different detection modes
88 have been used. The chomatograms obtained using UV detection are very complex due
89 the enormous variety of compounds present in wines, making difficult the data
90 treatment. Other detectors, more specific and sensitive, have been used recently, as mass
91 spectrometry (MS) (Wang et al., 2002; Callemien et al., 2005), electrochemical (ED)
92 (Zhu et al., 2000; Kolouchová-Hanzlíková et al., 2004; Bravo et al., 2006) and
93 fluorescence (FD) (Rodríguez-Delgado et al., 2001; Vinas et al., 2000; Vitrac et al.,
94 2002). The excitation and emission wavelengths reported in the literature and some
95 conditions of analysis with fluorescence detection are included in table 1.
96 The aim of the present study was to determine the concentration of *trans*-resveratrol
97 in Muscatel fortified wines from different producers from Setúbal region in Portugal.
98 During the winemaking process the grape seeds and the skins of the white Muscatel
99 grape vine varieties, stay in contact with wine for several months, after the addition of
100 spirit to stop the fermentation process. As far as we know there are no reports about
101 *trans*-resveratrol content in this type of portuguese wines. LC-MS was used to identify
102 the compound in the samples analysed. The performances of other detection modes
103 (UV, FD and ED) were compared in order to assess their possible contributions for the
104 purpose of quantitation or simple comparison of samples. Among these detection modes
105 fluorescence was chosen to monitor the content of *trans*-resveratrol present in samples
106 collected from one producer, during vinification process. The same methodology can be
107 used to analyse resveratrol in other types of wines provided there is attention to eventual
108 matrix effects.

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Acetonitrile and methanol gradient grade were from Lab-Scan (Dublin, Ireland), the acetonitrile (LC-MS) was purchased from Riedel-de-Häen (Seelze, Germany) and the *o*-phosphoric acid 85% *p.a.* was from Panreac (Barcelona, Spain).

Deionised water (0.050 μScm^{-1}) used in all experiments was obtained from Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France).

The *trans*-resveratrol was obtained from Sigma (Steinheim, Germany).

2.2. Sampling

All Muscatel wines were produced during 2004 harvest at three different wineries (identified as A, B and C) located at Setúbal Denomination of Controlled Origin (D.O.C.) region. During the vinification process, spirit (77% alcohol content) was added to the must in order to stop the fermentation. The proportion of spirit added was among 25-30L for 100 Kg of must. After a maceration (M) period (4, 5 and 7 months for producers A, B and C respectively) the wines were separated from the pomace and the liquid resulting from the pressing (LP) was mixed with the wine and a maturation stage (Mt) was started. Producer A transferred the wine into wooden barrels, but the other producers kept the wine in cement tanks with an epoxy coating. After 18 months of maturation, producer B transferred the wine and blended it with wines from others tanks. The wine samples studied in this work are described in table 2. In the text, samples will be identified by the letter corresponding to the producer and a number in subscript corresponding to the month when collection was held.

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

Commercially available samples from producers A, B and C were purchased at a local supermarket: wines were analysed immediately after opening the bottles, using the same analytical conditions.

2.3. Sample preparation

In order to concentrate samples to be analysed by LC-MS, wine sample C_1 (10 mL) was extracted four times with 7 mL of ethyl acetate. The ethyl acetate extracts were combined and evaporated to dryness under vacuum. The residue was redissolved in 250 µL of methanol/water (6:4 v/v) (Wang et al., 2002). For the analysis by LC-DAD-FD-ED the samples were injected without pre-concentration.

The extracts and the wines were filtered through 0.45 µm membranes (Millipore).

2.4. Standards solutions preparation

A standard stock solution of *trans*-resveratrol (1000 mgL^{-1}) was prepared in methanol and stored in darkness at -20ºC. Different standard solutions of *trans*-resveratrol were prepared depending on the detection method sensitivity: 0,075-5.0 mgL^{-1} for the UV-Vis and FD detection and 1.35-8.0 mgL^{-1} for ED.

In order to obtain the absorption and emission spectra of *trans*-resveratrol, a working standard solution was prepared (1.0 mgL^{-1}) by diluting the stock solution with the solvent corresponding to the chemical composition of the mobile phase used to elute the compound during chromatographic separation: 35 % of phosphoric acid solution 0.1 % and 65 % of phosphoric acid:acetonitrile:water (1:400:599). For MS analysis a 120 mgL^{-1} standard working solution of *trans*-resveratrol in methanol was prepared.

2.5. Equipments and conditions of analysis

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

159 *2.5.1. Liquid chromatography with mass spectrometry*

160 Analyses by LC were performed with a Surveyor equipment from Thermo Finnigan.
161 The mass spectrometry system was an LCQ ion trap mass spectrometer (Thermo
162 Finnigan, San Jose C.A., USA) equipped with an ESI (Electrospray ionisation) or APCI
163 (Atmospheric pressure chemical ionization) sources. The LC-MS system was run by
164 Excalibur version 1.3 software (Thermo Finnigan – Surveyor, San Jose, USA). ESI and
165 APCI were tested as ionization sources in negative and positive polarity modes. The
166 analytical column was a RP-18 (100 × 2.1 mm i.d., 5 μm particle size) from Thermo
167 with a guard column of the same type. The samples were injected using a 20 μL loop;
168 the separations were carried out with a flow rate of 250 $\mu L min^{-1}$. The column
169 temperature was 35º C. The mobile phase used for resveratrol identification consisted of
170 a mixture of eluent A (formic acid 0.5%) and eluent B (acetonitrile). The analyses were
171 performed using the following program of eluents: 0-4 min from 0 until 15% eluent B;
172 4-20 min, from 15 until 40% eluent B; 20-30 min, from 40 until 55% eluent B.

173 In the mass spectrometer experiments the following conditions were used for the
174 APCI source in negative and positive modes: vaporizer temperature, 470º C; discharge
175 current, 5 μA; temperature of the heated capillary 175º C. ESI ionization source in
176 positive and negative mode was also tested in this work with the following conditions:
177 temperature of the heated capillary 280º C, source voltage 3.70 kV. Nitrogen was used
178 as sheath gas and auxiliary gas with a gas flow rate of 80 and 20 arbitrary units,
179 respectively.

180 LC-MS was performed in the selected ion monitoring mode (SIM) for *m/z* 229. In the
181 fragmentation experiments, a collision energy of 35% was used with scanning range 80-
182 2000 amu.

183

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

184 *2.5.2 Absorption and emission spectra of trans*-resveratrol

185 In order to evaluate the effect of the mobile phase composition in the absorption and
186 emission spectra of *trans*-resveratrol and to optimize fluorescence detection, the
187 spectrum of a standard solution (1.0 mgL^{-1}) was determined in a mixture of eluents A
188 and B described in section 2.4. The UV spectra of the standard working solution of
189 *trans*-resveratrol (1.0 mgL^{-1}) was recorded with the spectrophotometer (DU-70,
190 Beckman Instruments, Inc., Fullerton, USA) using a 1cm path length quartz cell. The
191 value of absorbance measured at 306 nm (room temperature) was used to calculate the
192 molar absorptivity.

193 The fluorescence emission spectra of *trans*-resveratrol was recorded in a
194 spectrofluorometer (SLM Aminco), equipped with a Xenon lamp (Muller Elektronik
195 Optic). The excitation wavelength was set at 300 and 306 nm. The excitation slits were
196 set to provide 8-nm band passes slit and a 1 cm path length quartz cell was used. Data
197 acquisition was performed with the software Model 8100 Spectrofluorometer version
198 4.20 1998 Spectronic Instruments, Inc.

199

200 *2.5.3. Liquid chromatography with diode array, fluorescence and electrochemical*
201 *detection*

202 Surveyor equipment from Thermo Finnigan with a diode array, fluorescence (Thermo
203 Finnigan FL 3000) and an electrochemical (Dionex, ED40) detectors were used.

204 The analytical column was a RP-18 (250×4 mm i.d, 5 μm particle size) from Merck
205 with a guard column of the same type. The samples were injected using a 20 μL loop;
206 the separations were carried out with a flow rate of 700 $\mu Lmin^{-1}$ and column
207 temperature of 35º C. The conditions of analysis were previously optimized and
208 reported (Bravo et al., 2006).

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

All samples were analysed as duplicates. Mean values and confidence intervals are reported.

3. Results and discussion

3.1. Identification of trans-resveratrol by LC-MS

Analysis of trans–resveratrol at a flow rate of 700 $\mu Lmin^{-1}$, in APCI and ESI positive modes SIM at m/z= 229 were compared: the detection limit (LOD) for APCI was lower (10 mg/L) than for ESI (100 mg/L). Using a flow rate of 250 $\mu Lmin^{-1}$ (Urpí-Sardà et al., 2005, Silva et al., 2005) and the same APCI analytical conditions the LOD was improved to 1.0 mg/L. The chromatograms (SIM m/z= 229) of the Muscatel wine extract from producer C after one month maceration and a standard solution of trans-resveratrol 120 mgL^{-1} are compared in Fig. 2. For *trans*-resveratrol standard a peak was detected at 9.59 min (Fig. 2A.) and a peak eluting at the same retention time as the standard (Fig. 2B) was detected in the analysis of the Muscatel wine extract. For identification purpose, the mass spectra obtained by MS^2 fragmentation of ion m/z 229 $[M+H]^+$ for a standard solution and a wine sample extract are compared in Fig. 3. This fragmentation originated several ions: at m/z 107.0, 118.9, 134.9, 183.0 and 211.1. These fragments are in agreement with published data (Callemien et al., 2005): fragment at m/z 211.1 corresponds to the neutral loss of 18 mass units equivalent to a molecule of water and proposed structures for ions with m/z 107.0, 118.9, 134.9 are also presented in Fig. 3.

These experiments confirmed the presence of trans-resveratrol in the wine samples.

3.2. Absorption and emission spectra of trans-resveratrol

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

233 The UV spectra of a *trans*-resveratrol (1.0 mgL^{-1}) in eluent solution (35% eluent A
234 and 65% eluent B), recorded from 200 to 400 nm presents a maximum ranging from
235 300 to 320 nm and these values are in accordance with data published by Trela et al.
236 (1996). The molar absorptivity for trans-resveratrol at 306 nm in this solvent (32000
237 $mol^{-1}Lcm^{-1}$) is similar to the values reported by the same authors (29452 $mol^{-1}Lcm^{-1}$ in
238 methanol) at the same wavelength and for López et al. (2001) at 308 nm (30000 $mol^{-1}Lcm^{-1}$in ethanol).

240 Fig. 4. shows the emission spectra of *trans*-resveratrol in eluent solution using 300
241 and 306 nm as excitation wavelengths. The intensity of emission with excitation at 300
242 nm was slightly higher and therefore was chosen as excitation wavelength. The
243 following conditions were chosen in order to perform fluorescence detection: excitation
244 wavelength (λ_{Ex}) at 300 nm and the emission wavelength (λ_{Em}) at 390 nm.

245

246 *3.3. Analysis by LC-DAD-FD-ED of trans-resveratrol standard solutions*

247 In order to perform quantitation of *trans*-resveratrol in samples, standard solutions
248 were analysed and peak areas were measured using UV-Vis absorption at 306 nm,
249 fluorescence (λ_{Ex} = 300 nm /λ_{Em} = 390 nm) and electrochemical detection. Results from
250 calibrations performed are shown in table 3. Each point of the calibration curve
251 corresponds to the mean value obtained from two independent area measurements.

252 Limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were determined considering the
253 concentrations of *trans*-resveratrol that gave a signal to noise ratio (S/N) of 3/1 and
254 10/1, respectively. Noise was measured in the chromatogram of a blank run in the range
255 near the retention time of the analyte using the Root Mean Square (RMS) calculation.
256 The lowest detection and quantitation limits were achieved with a fluorescence detector.
257 For electrochemical detector the LOD and LOQ obtained were higher (Table 3). These

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

limits were confirmed through the repeated injections (n=6) of the corresponding standard solutions in the concentrations indicated for the three detectors.

The repeatability of peak areas using this analytical method was tested by the repeated injections (n=6) of a standard solution (1.75 mgL^{-1}) of *trans*-resveratrol. The repeatability of peak area, expressed as relative standard deviation, for fluorescence detector is lower (0.5%) than the results obtained with UV-Vis and electrochemical detectors (1.5%).

3.4. Analysis by LC-DAD-FD-ED of Muscatel fortified wines

In previous work (Bravo et al., 2006) several phenolic compounds were already identified in this type of wine using HPLC-DAD-MS. The chromatographic profiles obtained with DAD are very complex due to the diversity of the phenolic compounds present in wine samples but there is still a good resolution among a high number of peaks.

Wine samples from the three producers collected 3 months after the beginning of the vinification process (A_3, B_3, C_3), during the maceration of seeds and skins in contact with wine, were analysed using the three detection modes.

The chromatogram of the wine sample (B_3) is shown in Fig. 5. The UV spectrum of the peak with the retention time of trans-resveratrol is compared with the spectrum of the trans-resveratrol standard. The observed differences in spectra may be explained by the co-elution of an interfering compound in the sample. Therefore quantitation of trans-resveratrol with UV is a difficult task and can lead to incorrect results.

Chromatographic profiles obtained with electrochemical detection present a lower number of detected peaks since this technique is more selective (Fig. 6.). This detection mode was useful for the detection of phenolic compounds electrochemically active, but

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

283 *trans*-resveratrol content in the samples of Muscatel wines analysed were lower than
284 LOD determined for electrochemical detection. In order to use this detector for
285 quantitation, it would be necessary to prepare concentrated extracts.

286 The fluorimetric detection allowed analysis without sample pre-treatment, even in
287 wines with low trans-resveratrol content. The chromatographic profiles obtained for
288 wine B_3 and a standard solution are compared in Fig. 7. The identification of trans-
289 resveratrol was confirmed by analysis of samples spiked with a standard.

290

291 *3.5. trans-Resveratrol content of Muscatel wines*

292 The content in *trans*-resveratrol was compared in wines obtained from different
293 producers at different vinification stages as well as commercial samples from the same
294 producers and results were estimated from chromatograms obtained with fluorescence
295 detection.

296 Analysis of samples collected along 20 months of the winemaking at producer B are
297 discussed as an example of the evolution of *trans*-resveratrol content. During the
298 maceration process (4 months) the concentration of *trans*-resveratrol had no significant
299 changes (mean value 0.22 mgL^{-1}). The results obtained are in accordance with published
300 data which suggest that prolonged maceration after alcoholic fermentation does not
301 increase the resveratrol content (Sun et al., 2006). After the maceration stage, the wine
302 was separated from the pomace, transferred into a cement tank with an epoxy coating.
303 and the liquid resulting from the pressing of the pomace was added to the wine. There is
304 no significant difference in *trans*-resveratrol content between this sample and the ones
305 previously analysed. The wine was then blended with other wines from the same
306 vinification: the content of *trans*-resveratrol was higher (0.24 mgL^{-1}) probably due to
307 phenolic composition differences in the blended wines. During the maturation process

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

there was a decrease in the *trans*-resveratrol content (0.14±0.02 mgL^{-1} after 18 months). As SO_2 or other antioxidant was not added to wine, *trans*-resveratrol content could decrease due to an oxidation process.

The contents of *trans*-resveratrol in wines at different vinification stages are presented in table 4. For wines collected at equal periods of maceration or maturation, the results show that the concentration of *trans*-resveratrol of wine from the producer A is lower than the concentrations found in wines from other producers. Lower temperatures during maceration can be responsible for lower concentrations in wines from producer A, as the maceration process occurred in inox tanks protected at the top by a metallic roof, while the other producers used cement tanks located inside buildings. The pH value (4.42) found for sample A is higher than the values obtained for samples B and C (3.65 and 3.60 respectively) and this higher value of pH and lower content of trans-resveratrol may be related.

Each producer has brand name wines made by careful blending of wines produced with grapes of the company vineyards. The *trans*-resveratrol contents of wines commercially available from producers B and C (0.16±0.01 and 0.15±0.02 respectively) were similar and for producer A it was lower than LOD.

Comparison of results obtained with those presented in table 1 show that values obtained for Muscatel wines are higher than the concentrations reported for white table wines using fluorescence detection but lower than contents of fortified wines quantified using UV detection. The maceration with grape skins used in Muscatel wine production may contribute to a higher content of *trans*-resveratrol in wines. The use of a UV detector may explain higher values for the contents of this compound if there are co-eluting peaks in the analysis by HPLC.

4. Conclusions

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

HPLC with fluorescence detection is more adequate than DAD for the analysis of *trans*-resveratrol in wine samples because some compounds may co-elute at the same retention time of *trans*-resveratrol. An electrochemical detector could also be used but the concentrations of this compound in the samples of Muscatel wines analysed were lower than LOD.

The use of fluorescence detection (λ_{ex} = 300 nm, λ_{em} = 390 nm) was suitable to quantify low concentrations of *trans*-resveratrol in Muscatel wines, allowing the quantitation of the compound by direct injection of wine samples with LOD = 0.010 mgL^{-1} and LOQ=0.030 mgL^{-1}.

The concentration of *trans*-resveratrol decreased during the winemaking process of the Muscatel wine. Although grapes are grown in the same geographic region and processing conditions are similar, a higher concentration of *trans*-resveratrol was observed for one of the produced wines. The results obtained in commercial wines analyses from the same producers, confirmed the results observed for samples collected at production stages.

Acknowledgements

The authors thank to: José Maria da Fonseca Vinhos SA, Adega Cooperativa de Palmela and Casa Agrícola Horácio Simões for providing samples of Muscatel wines, and also to Rute Marques and Helena Lameiro (Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Micro-heterogeneous Systems Group) for their help to operate with the spectrofluorometer equipment.

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

358 **References**

359 Abril, M., Neguerela, A.I., Pérez, C., Juan, T., Estopañán, G., 2005. Preliminary study
360 of resveratrol content in Aragón red and rosé wines. Food Chemistry 92, 729-736.

361 Adrian, M., Jeandet, P., Bessis, R., Joubert, J.M., 1996. Induction of phytoalexin
362 (Resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminium chloride ($AlCl_3$).
363 Journal of Agricultural and Food Chemistry 44 (8), 1979-1981.

364 Adrian, M., Jeandet, P., Breuil, A.C., Levite, D., Debord, S., Bessis, R., 2000. Assay of
365 resveratrol and derivative stilbenes in wines by direct injection High Performance
366 Liquid Chromatography. American Journal of Enology and Viticulture 51 (1), 37-
367 41.

368 Baptista, J.A.B., Tavares, J.F.P., Carvalho R.C.B., 2001. Comparison of polyphenols
369 and aroma in red wines from Portuguese mainland versus Azores Islands. Food
370 Research International 34, 345-355.

371 Bravo, M.N., Silva, S., Coelho, A.V., Vilas Boas, L., Bronze, M.R., 2006. Analysis of
372 phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. Analytica Chimica
373 Acta 563, 84–92.

374 Callemien, D., Jerkovic, V., Rozenberg, R., Collin, S., 2005. Hop as an Interesting Source of
375 Resveratrol for Brewers: Optimization of the Extraction and Quantitative Study by
376 Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass
377 Spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 424-429.

378 Castellari, M., Spinabelli, U., Riponi, C., Amati, A., 1998. Influence of some
379 technological practices on the quantity of resveratrol in wine. Zeitschrift für
380 Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A 206, 151-155.

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

381 Clare, S.S., Skurray, G., Shalliker, R.A., 2004. Effect of pomace-contacting method on
382 the concentration of *cis*- and *trans*-resveratrol and resveratrol glucoside isomers in
383 wine. American Journal of Enology and Viticulture 55 (4), 401-406.
384 Domínguez, C., Guillén, D.A., Barroso C.G., 2001. Automated solid-phase extraction
385 for sample preparation followed by high-performance liquid chromatography with
386 diode array and mass spectrometric detection for the analysis of resveratrol
387 derivatives in wine. Journal of Chromatography A 918, 303-310.
388 Dourtoglou, V.G., Makris, D.P., Bois-Dounas, F., Zonas, C., 1999. *Trans*-resveratrol
389 concentration in wines produced in Greece. Journal of Food Composition and
390 Analysis 12, 227-233.
391 Flamini, R., 2003. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols.
392 Mass Spectrometry Reviews 22, 218-250.
393 Gambuti, A., Strollo, D., Ugliano, M., Lecce, L., Moio, L., 2004. T*rans*-resveratrol,
394 quercetin, (+)-catechin, and (-)-epicatechin content in south Italian monovarietal
395 wines: Relationship with maceration time and marc pressing during winemaking.
396 Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 5747-5751.
397 Gamoh, K., Nakashina, K., 1999. Liquid chromatography/Mass Spectrometric
398 determination of *trans*-resveratrol in wine using a tandem solid-phase extraction
399 method. Rapid Communications in mass spectrometry 13, 1112-1115.
400 Gerogiannaki-Christopoulou, M., Athanasopoulos, P., Kyriakidis, N., Gerogiannaki,
401 I.A., Spanos, M., 2006. *trans*-resveratrol in wines from the major Greek red and
402 white grape varieties. Food Control 17, 700-706.
403 Gürbüz, O., Göçmen, D., Dağdelen F., Gürsoy, M., Aydin, S., Sahin, I., Büyükuysal, L.,
404 Usta, M., 2007. Determination of *flavan-3-ols* and *trans*-resveratrol in grapes and
405 wine using HPLC with fluorescence detection. Food Chemistry 100, 518-525.

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

406 Jeandet, P., Bessis, R., Maume, B.F., Meunier, P., Peyron, D., Trollat, P., 1995. Effect
407 of enological practices on the resveratrol isomer content of wine. Journal of
408 Agricultural and Food Chemistry 43, 316-319.
409 Kammerer, D., Claus, A., Carle R., Schieber, A., 2004. Polyphenol screening of pomace
410 from red and white grape varieties (V*itis vinifera L.)* by HPLC-DAD-MS/MS.
411 Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 4360-4367.
412 Kolouchová-Hanzlíková, I., Melzoch, K., Filip, V., Šmidrkal, J., 2004. Rapid method
413 for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in
414 wines. Food Chemistry 87, 151-158.
415 Lamuela-Raventós, R.M., Romero-Pérez, A.I., Waterhouse, A.L., Torre-Boronat, M.C.,
416 1995. Direct HPLC analysis of *cis*- and *trans*-resveratrol and Piceid isomers in
417 Spanish red *Vitis vinifera* wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry 43 (2),
418 281-283.
419 López, M., Martínez, F., Del Valle, C., Orte, C., Miró M., 2001. Analysis of phenolic
420 constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid
421 chromatography. Journal of Chromatography A 922, 359-363.
422 Malovaná, S., Montelongo, F.J.G., Pérez, J.P., Rodriguez-Delgado, M.A., 2001.
423 Optimisation of sample preparation for the determination of *trans*-resveratrol and
424 other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid
425 chromatography. Analytica Chimica Acta 428, 245-253.
426 Mattivi, F., Reniero, F., Korhammer S., 1995. Isolation, characterization, and evolution
427 in red wine vinification of resveratrol monomers. Journal of Agricultural and Food
428 Chemistry 43, 1820-1823.

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

429 Monagas, M., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C., 2005. Updated knowledge about the
430 presence of phenolic compounds in wine. Critical Reviews in Food Science and
431 Nutrition 45, 85–118.
432 Moreno-Labanda, J.F., Mallavia, R., Pérez-Fons, L., Lizama, V., Saura, D., Micol, V.,
433 2004. Determination of piceid and resveratrol in spanish wines deriving from
434 *Monastrell (Vitis vinifera* L.) Grape variety. Journal of Agricultural and Food
435 Chemistry 52, 5396-5403.
436 Piñeiro, Z., Palma, M., Barroso, C.G., 2006. Determination of *trans*-resveratrol in
437 grapes by pressurized liquid extraction and fast high-performance liquid
438 chromatography. Journal of Chromatography A 1110, 61-65.
439 Pour Nikfardjam, M.S., Márk, L., Avar, P., Figler M., Ohmacht, R., 2006. Polyphenols,
440 anthocyanins, and *trans*-resveratrol in red wines from the Hungarian Villány region.
441 Food Chemistry 98, 453-462.
442 Ribeiro de Lima, M.T., Waffo-Téguo, P., Teissedre, P.L., Pujolas, A., Vercauteren, J.,
443 Cabanis, J.C., Mérillon, J.M., 1999. Determination of stilbenes (*trans-astringin, cis*-
444 and *trans*-piceid, and *cis*- and *trans*-resveratrol) in Portuguese wines. Journal of
445 Agricultural and Food Chemistry 47, 2666-2670.
446 Rodriguez-Delgado, M.A., Malovaná, S., Pérez, J.P., Borges, T., Montelongo, F.J.G.,
447 2001. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid
448 chromatography with absorbance and fluorimetric detection. Journal of
449 Chromatography A 912, 249-257.
450 Rodríguez-Delgado, M.A., González G., Pérez-Trujillo, J.P., García-Montelongo, F.J.,
451 2002. *Trans*-resveratrol in wines from the Canary Islands (Spain). Analysis by high
452 performance liquid chromatography. Food Chemistry 76, 371-375.

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

453 Sánchez, J.B.J., Corral, E.C., Delgado, M.J.S., Orea, J.M., Ureña A.G., 2005. Analysis
454 of *trans*-resveratrol by laser ionization mass spectrometry and HPLC with
455 fluorescence detection. Comparison between both techniques. Journal of
456 Chromatography A 1074, 133-138.
457 Silva, S., Gomes, M.L., Vilas Boas, L., Matias, A., Nunes, A., Duarte, C., Coelho, A.V.,
458 Bronze, M.R., 2005. Liquid chromatography hyphenated with mass spectrometry in
459 the analysis of phenolic compounds in olive tree products and winemaking by-
460 products. Presented at 29th Symposium on High Performance Liquid Phase
461 Separation and Related Techniques, Stockholm, Sweden, June 2005.
462 Stervbo, U., Vang, O., Bonnesen, C., 2007. A review of the content of the putative
463 chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. Food Chemistry 101, 449-
464 457.
465 Sun, B., Ribes, A.M., Leandro, M.C., Belchior, A.P., Spranger, M.I. 2006. Stilbenes:
466 Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and
467 variation during wine maturation. Analytica Chimica Acta 563, 382-390.
468 Threlfall, R.T., Morris, J.R., Mauromoustakos, A., 1999. Effect of variety, ultraviolet
469 light, exposure, and enological methods on the *trans*-resveratrol level of wine.
470 American Journal of Enology and Viticulture 50 (1), 57-64.
471 Trela, B.C., Waterhouse, A.L., 1996. Resveratrol: Isomeric Molar Absorptivities and
472 Stability. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44, 1253-1257.
473 Urpí-Sardà, M., Jáuregui, O., Lamuela-Raventós, R.M., Jaeger, W., Miksits, M., Covas,
474 M.I., Andres-Lacueva, C., 2005. Uptake of diet resveratrol into the human low-
475 density lipoprotein. Identification and quantification of resveratrol metabolites by
476 liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Analytical
477 Chemistry 77 (10), 3149-3155.

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

Viñas, P., López-Erroz, C., Marín-Hernández, J.J., Hernández-Córdoba, M., 2000. Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. Journal of Chromatography A 871, 85-93.

Vitrac, X., Monti, J.P., Vercauteren, J., Deffieux, G., Mérillon, J.M., 2002. Direct liquid chromatography analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection. Analytica Chimica Acta 458, 103-110.

Wang, Y., Catana, F., Yang, Y., Roderick, R., Van Breemen, R.B., 2002. An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 431-435.

Xuelin, G., Chu, Q., O'Dwyer, M., Zeece M., 2000. Analysis of resveratrol in wine by capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A 881, 471-481.

Zhu, Y., Coury, L.A., Long, H., Duda, C.T., Kissinger, C.B., Kissinger P.T., 2000. Liquid chromatography with multi-channel electrochemical detection for the determination of resveratrol in wine, grape juice, and grape seed capsules with automated solid phase extraction. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 23 (10), 1555-1564.

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

Fig. 1. Structure of the *trans*-resveratrol

Fig. 2. SIM *m/z*= 229 for a (**A**) standard solution of *trans*-resveratrol (120 mgL^{-1}); (**B**) extract of Muscatel wine from Setúbal region (C_1), when analysis was performed at positive mode using APCI source

Fig. 3. MS^2 of ion *m/z*= 229 and the proposed fragments: (**A**) standard solution of *trans*-resveratrol (120 mgL^{-1}); (**B**) extract of Muscatel wine from Setúbal region (C_1)

Fig. 4. Emission spectra of a solution of *trans*-resveratrol (1.0 mgL^{-1}) in eluent solution : (**A**) excitation at 300 nm (**B**) excitation at 306 nm

Fig. 5. Chromatograms at 300 nm and UV spectra of (**A**) *trans*-resveratrol solution (0.45 mgL^{-1}); (**B**) Muscatel wine from Setúbal region (B_3). **Identification: 1.** gallic acid; **2.** 5-HMF; **3.** protocatechuic acid; **4.** furfural; **5.** caftaric acid; **6.** catechin; **7.** caffeic acid; **8.** fertaric acid; **9.** procyanidin dimer; **10.** epicatechin; **11.** ethyl gallate; **12.** ferulic acid; **13.** *trans*-piceid; **14.** quercetin-3-glucuronide; **15.** quercetin-3-glucoside; **16.** *cis*-piceid, kaempferol-3-glucoside; quercetin-3-rutinoside; **17.** *trans*-resveratrol; **18.** *cis*-resveratrol, ethyl caffeate; **19.** quercetin

Fig. 6. Chromatograms using electrochemical detection of Muscatel wines from Setúbal region (producers A_3, B_3 and C_3) and standard solution (3.75 mgL^{-1}) . **Identification: 1.** gallic acid; **3**. protocatechuic acid; **5.** caftaric acid; **6.** catechin; **7.** caffeic acid; **14.** quercetin-3-glucuronide; **15.** quercetin-3-glucoside; **17.** *trans*-resveratrol; **19.** *cis*-resveratrol, ethyl caffeate

Fig. 7. Chromatograms using fluorescence detection (300/390 nm) of Muscatel wine from producer B_3 and standard solution (0.60 mgL^{-1}) . **Identification**: **1**. gallic acid; **5.** caftaric acid; **6.** catechin; **7.** caffeic acid; **13**. *trans*-piceid; **14.** quercetin-3-glucuronide; **15.** quercetin-3-glucoside; **16.** quercetin-3-rutinoside; **17.** *trans*-resveratrol; **19.** *cis*-resveratrol

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

Table 1 Contents of *trans*-resveratrol (mgL^{-1}) in different wines analysed by HPLC and corresponding detection (LOD) and quantitation (LOQ) limits reported in the literature

Table 2 Samples of Muscatel wines from Setúbal region collected during the vinification process

Table 3 Parameters for the quantitation of *trans*-resveratrol

Table 4 Concentrations of *trans*-resveratrol in Muscatel wines from Setúbal region (mean value±confidence interval, mgL^{-1})

Accepted manuscript

Table 1.

Wine origin	Wine content (mgL^{-1})			Detection mode	λ_{abs} (nm)	λ_{Exc} /λ_{Emi} (nm)	LOD (mgL^{-1})	LOQ (mgL^{-1})	Eluents
	Red	White	Rosé						
Portugal mainland [Baptista et al, 2001]	1.56[a]	----------	----------	diode array	306	----------	0.010	----------	• 0.4% (v/v) *o*-phosphoric acid (pH 2.3) • 80% (v/v)acetonitrile and 20% eluent A
Azores Island [Baptista et al, 2001]	3.36[a]	----------	----------						
Greece [Gerogiannaki-Christopoulou et al, 2004]	----------	0.015[b]	----------	diode array	308		---------	0.015	• water: methanol (5:5) • water: acetonitrile (7:3)
	----------	0.009[c]	----------						
Spain [Abril et al , 2005]	0.32 – 4.44	----------	0.12-2.80	diode array	306	----------	---------	--------	• glacial acetic in water (pH 2.4) • glacial acetic in water (pH 2.4) / acetonitrile (20:80)
Azores Island [Ribeiro de Lima et al, 1999]	----------	0.3-2.1------	----------	diode array	306	----------	5[d]	---------	• glacial acetic in water (pH 2.4) • glacial acetic in water (pH 2.4) / acetonitrile (20:80)
Spain [Vinas et al, 2000]	n.d. – 2.35	n.d	----------	diode UV-vis	300	----------	0.06	0.22	• acetonitrile / 5% aqueous acetic acid (9:91)
	n.d. – 2.36	0.06	----------	fluorescence		324/370	0.003	0.01	
French [Vitrac et al, 2002]	2.3[a]	0.06[a]	----------	fluorescence		300/390	0.01	0.03	• H_2O (99%) / trifluoro acetic acid (1%) • acetonitrile (80%) / eluent A (20%)
Spain [Rodriguez-Delgado et al, 2002]	2.89[a]	0.095[a]	----------	fluorescence		360/374	0.003	--------	• methanol (10%)/ acetic acid (2%) / water (88%) • methanol (90%)/acetic acid (2%) /water (8%)
Turkey [Gürbüz et al, 2007]	0.176 – 4.403	0.116-1.931	----------	fluorescence		324/370	---------	---------	• acetonitrile (9%)/ 5% aqueous acetic acid (91%) • acetonitrile (25%) / 5% aqueous acetic acid (75%) • acetonitrile (70%) / 5% aqueous acetic acid (30%)
Czech republic [Kalouchová-Hanzlíkova et al, 2004]	0.7-11	----------	----------	electrochemical		----------	0.003	--------	• acetonitrile (25%)/ 0.1% H_3PO_4 and NaCl ($5mmolL^{-1}$)

[a] Mean value [b] Muscat of Alexandria [c] Muscat of Samos [d] ng calculated according to IUPAC rules (25 µL)

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

ACCEPTED MANUSCRIPT

Table 2.

Producer	Maceration (M) (time in months)	Maturation (Mt) (time in months)	Ageing in wood (time in months)
A	3	10	18
B	0, 2, 3 and 4	5, 6, 7, 8 and 10, 18 and 20	--------
C	1 and 3	10 and 20	--------

Table 3.

Detector	Range (mgL^{-1})	Equation	r^2	LOD[a] (mgL^{-1})	LOQ[b] (mgL^{-1})
Uv-vis (306 nm)	0.075 – 5.0	y=744531x – 92367	0.9920	0.02	0.06
Fluorescence	0.075 – 5.0	y=329.77x – 36.149	0.9953	0.01	0.03
Electrochemical	1.35 – 8.0	y=3.9928x – 0.6105	0.9973	0.45	1.35

[a]; LOD, limit of detection (S/N=3); [b] LOQ, limit of quantitation (S/N=10);

Table 4.

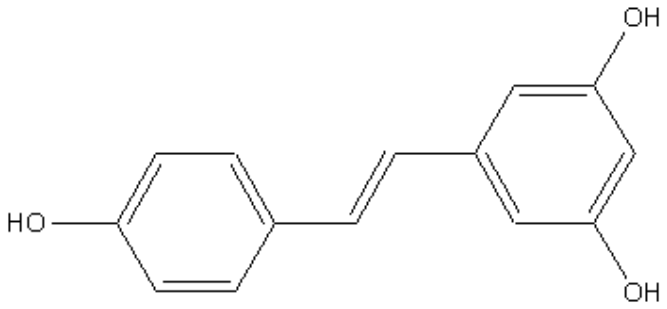
	Vinification		
Producer	Maceration	Maturation	Ageing in wood
A	0.15 ± 0.014 (A_3)	0.13 ± 0.02 (A_{10})	0.13 ± 0.01 (A_{18})
B	0.22 ± 0.023 (B_3)	0.21± 0.01(B_{10}) 0.16 ± 0.01 (B_{20})	--------
C	0.35 ± 0.014 (C_3)	0.38 ± 0.03 (C_{10}) 0.28 ± 0.03 (C_{20})	--------

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

614 Fig. 1

615



616

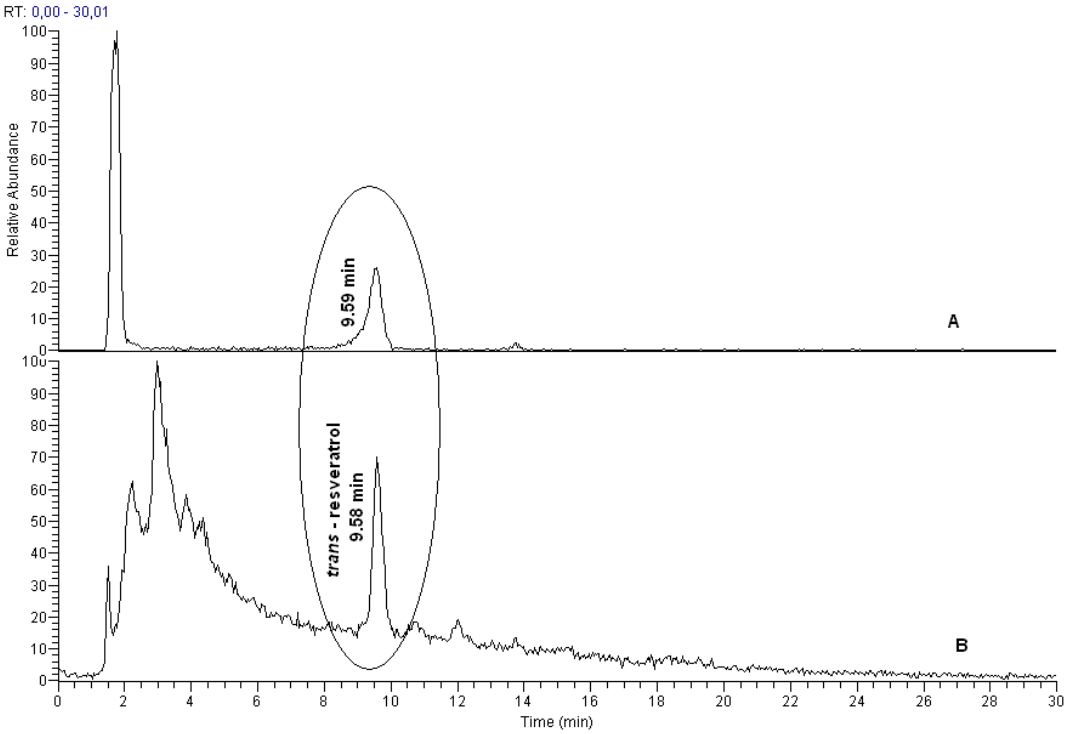
617

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

617 Fig. 2

618



619

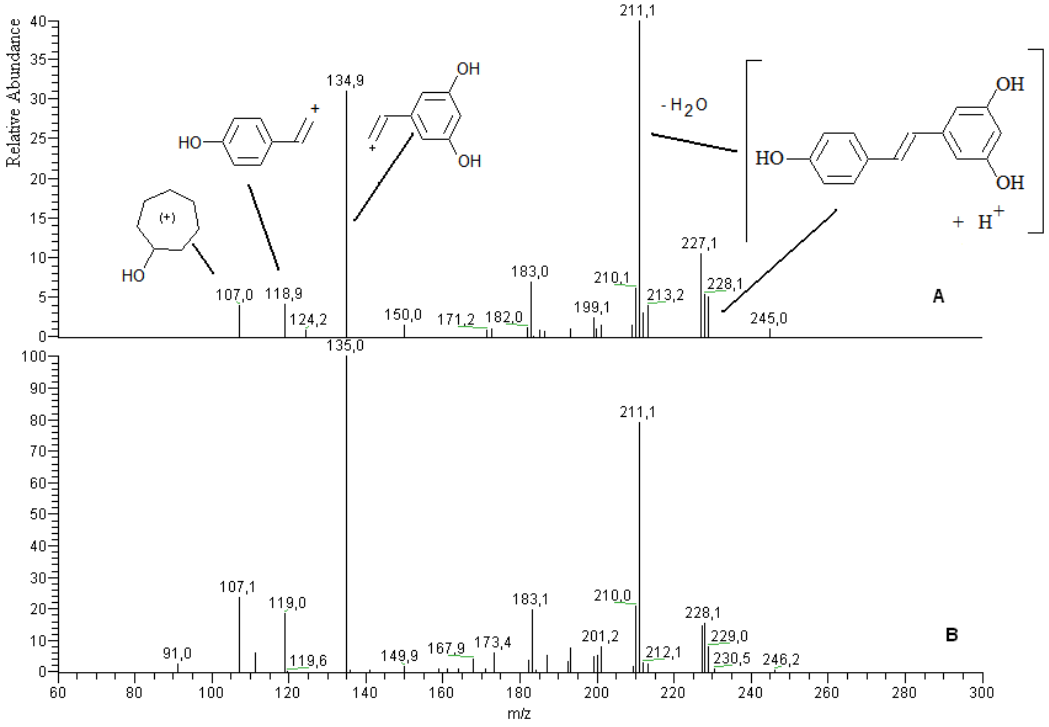
620

Accepted ma

ACCEPTED MANUSCRIPT

620 Fig. 3

621



622

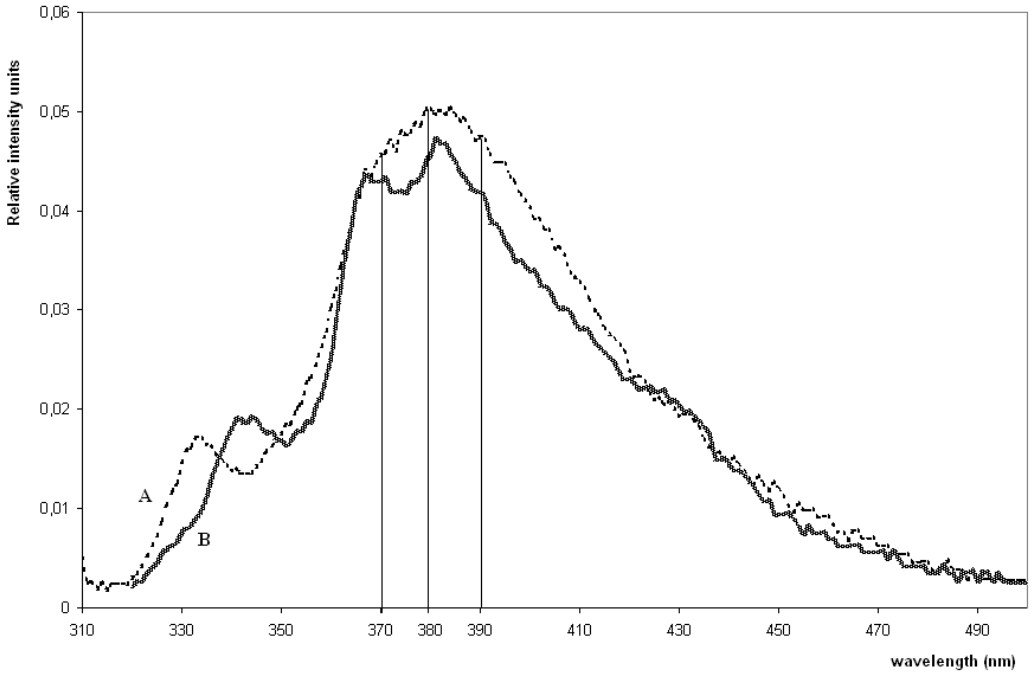
623

Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

623 Fig. 4

624



625

626

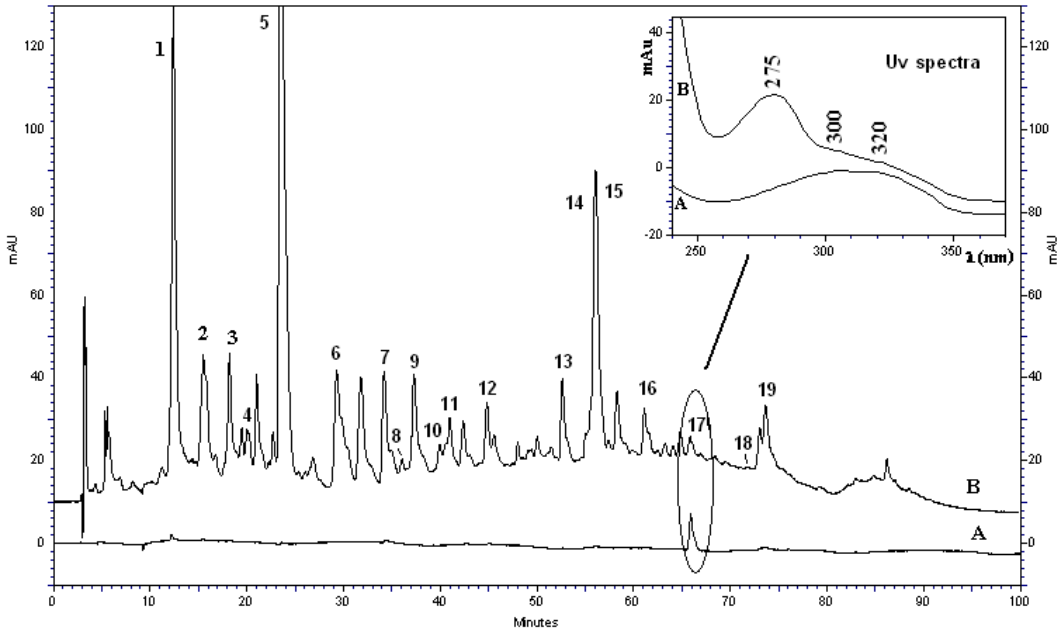
Accepted ma

ACCEPTED MANUSCRIPT

626 Fig. 5

627

628



629

630

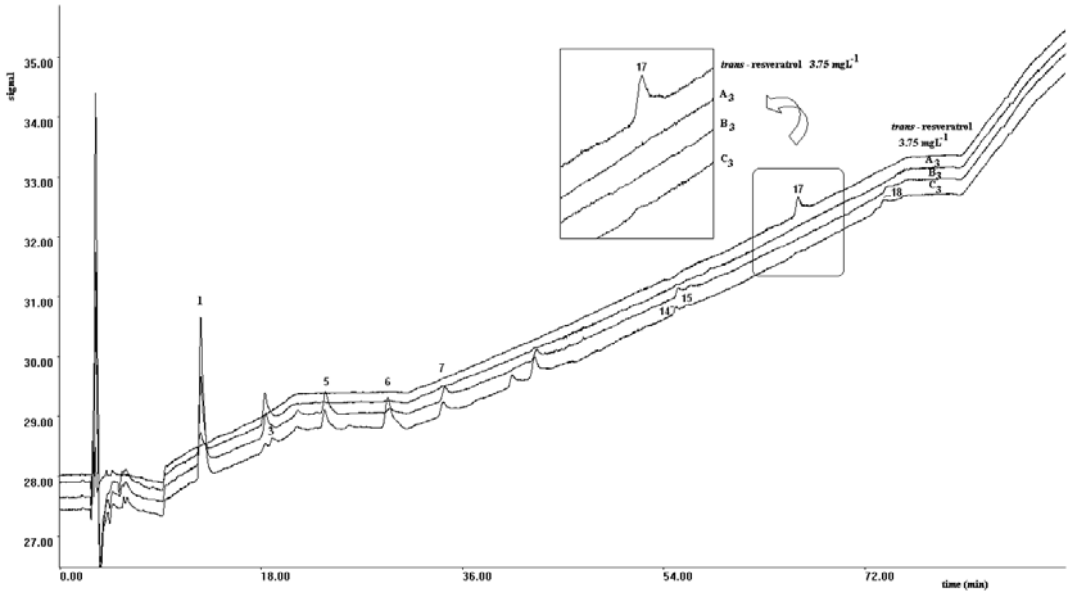
Accepted manuscript

ACCEPTED MANUSCRIPT

630 Fig. 6

631

632



633

634

Accepted manu

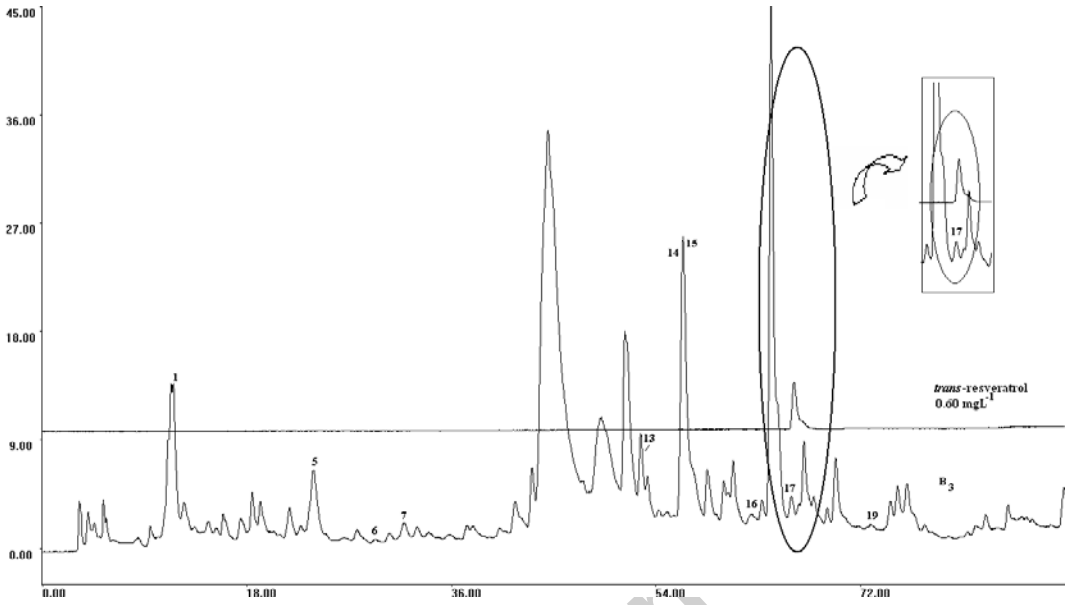
ACCEPTED MANUSCRIPT

634 Fig. 7

635

636

637



638

Accepted manuscript

- Artigo submetido na revista Food Analytical Methods

  Rodrigo P. Feliciano, Maria N Bravo, Marilda M. Pires, Ana T. Serra, Catarina M. Duarte, Luís V. Boas, Maria R. Bronze. Phenlic content and antioxidant activity of Moscatel dessert wines from Setúbal region in Portugal

Phenolic content and antioxidant activity of Moscatel dessert wines from Setúbal region in Portugal ([§])

Rodrigo P. Feliciano [a], Maria N. Bravo [b,c], Marilda M. Pires [d], Ana T. Serra [e], Catarina M. Duarte [e], Luís V. Boas [a,b,], Maria R. Bronze, [a,b,c *]

[a] *Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Apartado 12, 2781-901, Oeiras, Portugal*

[b] *Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Analytical Chemistry, Apartado 127, 2784-505, Oeiras, Portugal*

[c] *Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Av. das Forças Armadas, 1649-019, Lisboa, Portugal*

[d] *Escola de Tecnologia e Gestão Industrial, Estrada Octávio Pato, Faculdade de Engenharia, Piso 3, 2635-631 Rio de Mouro, Portugal*

[e] *Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Nutraceuticals and Controlled Delivery, Apartado 127, 2784-505, Oeiras, Portugal*

([§]) *Presented at the "AOAC Europe section international workshop: Enforcement of European Legislation on Food and Water: Analytical and Toxicological Aspects", in Lisbon, April 2008, and published in abstract form.*

* Corresponding author. Tel.: +351-214469770; fax: +351-214417062
E-mail address: mbronze@itqb.unl.pt (M.R. Bronze)

Abstract

Moscatel wines from Setúbal were analyzed for their phenolic and flavonoid composition by spectrophotometric and chromotographic methods and also their antioxidant activity was assessed by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, ferric reducing antioxidant power and oxygen radical absorbance capacity assays. Results were treated by principal component analysis and samples could be grouped in terms of both winemaking producer and vintage. Furthermore, by plotting correlation loadings it was possible to understand which variables were responsible for samples distribution. When correlating different parameters, the results show that flavonoid content is a better estimation of antioxidant activity in these samples than phenolic content is. Chromatographic profiles showed important differences among Moscatel wines and apart from gallic acid that could be strongly correlated with antioxidant activity tests, other phenolics as ethyl caffeate, ethyl gallate, caffeic acid, protocatechuic acid and *t*-caftaric acid could correlate rather well, depending on sample nature and type of test employed.

Keywords: Moscatel Wine; 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH); Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP); Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC); Flavonoids; Phenolics.

1. Introduction

The Muscat grape variety can be found mainly in Spain and Portugal but also in other countries as Australia, Bulgaria, South Africa, USA, France, Italy, Austria, Hungary, Romania, Greece and Cyprus. Traditionally, Portugal is a wine producer and actually there are 25 regions with Controlled Denomination of Origin (D.O.C.) and Setúbal is one of them. Setúbal D.O.C. region includes Palmela, Setúbal and also a part of Sesimbra's region.

Setúbal's Moscatel is a fortified wine which has a very low fermentation time period that ends upon the addition of 77% spirit to pressed white grapes (Moscatel Graúdo variety). Fermentation is stopped and non fermented sugars give the required sweetness (90-100 g/L of residual sugar) characteristic of this type of wine. The resulting product then stays in contact with grape skins (maceration period) and later is separated from solid materials which are pressed and the liquid obtained is added to the wine obtained. Afterwards, wine is stored in tanks during several months and in oak wood barrels for at least 2 years (maturation period), as required by law. Product certification is done by "Comissão Vitivinícola Regional da Península de Setúbal" (CVRPS).

Wine, along with other products as spices, tea, cocoa and fruits are major sources of phenolics. These phytochemicals are strongly correlated with anti-inflammatory, anti-viral, anti-mutagenic, anti-carcinogenic, antioxidant properties and with a marked risk decrease of cardiovascular diseases, among other reported properties [1,2]. Despite the ethanol content in wines, epidemiological studies have shown encouraging results as far as health promoting capacities and diseases prevention are concerned [3]. Wine is a liquid matrix in which phenolics are present in the soluble state providing better availability than some solid materials as fruits and vegetables in which phenolics are strongly bonded and are less easily absorbed in the gut [4].

In wine, phenolic compounds can be extracted from grape pulp, skins and seeds during winemaking but they can also be extracted from wood during ageing periods. The most important phenolic compounds in white wines are flavonoid (flavonols and flavan-3-ols monomers and polymers) and non-flavonoid compounds (benzoic and cinnamic acids, stilbenes, phenolic alcohols and aldehydes) [5]. These compounds are also of great importance in enology since they are related, direct or indirectly, with the quality of the wines, being responsible for organoleptic characteristics like colour, body and astringency and also with product stability and ageing processes during winemaking [6,7,8].

Beyond vitamin C, vitamin E and carotenoids, phenolic compounds exhibit intense antioxidant activity [9,10,11] which is due to their capacity to block free radical reactions by rapid donation of a hydrogen atom to lipid radicals [12]. In order to evaluate the total phenolic content in wine samples, the Folin-Ciocalteu reaction is used. However the selectivity of this reaction is low due to other non phenolic compounds that can display hydroxyl groups capable of being complexed with Folin reagent but also, because of distinct steric hindrances among phenolics. Phenolic content of red wines varies between 1800-4059 mg/L and in white wines the content is lower between 200-1000 mg/L, expressed as gallic acid equivalents (GAE). Fortified wines as Moscatel, Oporto, Madeira and Sherry may have higher phenolic contents than white wines due to the extraction that occurs with grape skins, during the maceration period. Total phenolic content ranges from 400 to 1700 mg/L in Moscatel wines [13], from 735-1116 mg/L in Oporto wines [14], from 201 to 446 mg/L in Sherry wines [15] and for Madeira wines a 720 mg/L value was reported [16].

Since flavonoids and non flavonoids can be found in white wines, the determination of the total flavonoids content is also important. This assay consists on a complexation reaction between aluminium chloride and flavonoids at alkaline pH yielding a redish compound which is measured at 510 nm [17].

Electron-spin resonance spectrometry is the only analytical technique that directly measures free radicals [12]. However, due to low sensitivity, indirect measurements as FRAP and DPPH assays have been commonly used.

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) and DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) can be used based on the ability of scavenging reactive oxygen species which are pro-oxidant, measuring products arising from these reaction at 593 nm and 517 nm, respectively. FRAP is more appropriate for hydrophilic antioxidants and DPPH for lypophilic antioxidants [18]. The reduction of Fe(III)-TPTZ complex to Fe(II)-TPTZ at low pH yielding a blue color is the basis of FRAP assay. In DPPH assay the radical captures hydrogen atoms changing its color from violet to yellow, turning the reagent into DPPH-H.

To evaluate the inhibition of lipid peroxidation, namely scavenging activity towards peroxyl radicals [19], oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC) was also used to evaluate Moscatel wines antioxidant activity in a kinetics approach that combines both inhibition time and the extent of inhibition.

Diode-array, electrochemical and fluorescence detection was used after separation of Muscatel wines components by RP-HPLC. Peak areas were measured and these results were correlated with the results obtained for the antioxidant activity tests.

2. Materials and Methods

2.1. Reagent and standards. Folin-Ciocalteu reagent (Fluka, Switzerland) and sodium carbonate (Panreac, Spain) for the determination of the total phenolic content assay using gallic acid ≥98% (Fluka, Germany) as standard. For total flavonoids analysis, (+) catechin 98% (Sigma, Germany) was used as reference compound and aluminium chloride and sodium nitrite (Sigma, Germany) as reagents. 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil - DPPH- 90% (Sigma,

Germany) and methanol (Fischer, UK) were used for DPPH assay. For FRAP assay, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid - Trolox- 97% (Sigma, Germany) was used as standard and the following reactives were employed: sodium acetate buffer (Merck, Germany), formic acid 98% (Panreac, Spain), 2,4,6-tris(2-pyridil)-5-triazine -TPTZ- 98% (Sigma, Germany), iron (III) chloride hexahydrate (Sigma, Germany) and hydrochloric acid 37% (Fisher, UK). For ORAC, 2',2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) was obtained from Fluka, Sigma Aldrich, Portugal and disodium fluorescein (FL) was from TCI Europe, Belgium.

Phosphoric acid (Panreac, Spain) and acetonitrile (Labscan, Ireland) were used for HPLC analysis. Deionized water (0.050 μS cm^{-1}) used in all experiments was obtained from Milli-Q system, (Millipore, France). All reagents used were from analytical grade.

For identification purposes in HPLC, gallic acid (Fluka, Spain), ethyl gallate (Fluka, China), protocatechuic and caffeic acids (Aldrich, UK), quercetin-3-glucosyde and tyrosol (Extrasyhntése, France) and resveratrol (Sigma, Germany) were used. Ethyl caffeate, *t*-caftaric acid, procyanidin dimer and quercetin-3-glucoronide were identified according to previous experiments by LC-MS [13].

2.2. Sampling. 60 samples from 13 different producers were supplied by CVRPS from producing years 1980 and 1995-2001 and 4 samples from Douro and 6 samples from Setúbal were bought in a local supermarket. Samples details and codes are summarized in table I.

2.3. Analytical procedures. **Total phenolic assay**. A standard solution of gallic acid (100 mg/L) was prepared in methanol and calibration solutions were prepared between 1 and 7 ppm in water. The methodology was based on previous works [20]. 0.05 ml of gallic acid or samples diluted 1/5 with water were mixed with 2.85 ml of deionized water, 2 ml of sodium carbonate 2% and finally 0.1 ml of Folin-Ciocalteu reagent. After 60 minutes of incubation at room temperature and in the dark, the absorbance was read against deionized water at 750 nm

on a Beckmann DU-70 (Fullerton, USA) spectrophotometer with 1 cm plastic cuvettes. The total phenolic content was reported in mg gallic acid equivalents (GAE)/L and determined as triplicates.

Total flavonoid assay. A standard solution of catechin (5000 mg/L) was prepared in methanol and calibration solutions were prepared between 10 and 150 ppm in water. The methodology was based on published work [17]. 0.5 mL of catechin standard solution or samples diluted 1/2 with water were mixed with 2 mL of deionized water and with 0.15 mL of sodium nitrite 5%. After 5 minutes 0.15 mL of aluminium chloride 10% was added, and after 6 minutes 1 mL of sodium hydroxide 1M was also added. Deionized water was used for a total volume of 5 mL and absorbance was read at 510 nm. The total flavonoid content was expressed as mg catechin (CE)/L and determined as triplicates.

DPPH assay. A standard solution of 1,1-diphenyl-2-pycrylhydrazyl –DPPH- 24 mg/L was prepared in methanol. The methodology was based on previous reports [21]. 0.05 mL of undiluted samples were mixed with 2 mL of DPPH solution and the absorbance was measured immediately at 517 nm against a methanol blank. After 16 minutes the absorbance was read again. The % inhibtion of DPPH radical caused by wine samples was determined according to the following formula: $(A_{C(0)} - A_{A(t)}) / A_{C(0)} \times 100$, where $A_{C(0)}$ is the absorbance of the control at t = 0 min and $A_{A(t)}$ is the absorbance of the antioxidant at t = 16 min. All samples were analyzed as triplicates.

FRAP assay. A standard solution of Trolox 100 mg/L was prepared in methanol and working solutions between 0.5 and 4.0 mg/L were used. The methodology was adapted from previous works [22]. Briefly, 0.1 mL of samples diluted 1/20 with water were mixed with 3 mL of FRAP reagent (25 mL of acetate buffer 300 mmol/L at pH=3.6 (corrected with formic acid) + 2,5 mL of Fe(II)-TPTZ 10 mmol/L in HCl 40 mmol/L + 2.5 mL of $FeCl_3.6H_2O$, 20 mmol/L). FRAP reagent was used as blank and final absorbance was read at 593 nm after 10

minutes. The ferric reducing antioxidant power of samples was ascertained in mg of Trolox equivalents (mg TEAC/L) and analysis was performed as triplicates.

ORAC assay. A modified method based on preceding work [19] was carried out. This assay measures the ability of the antioxidant species in the sample to inhibit the oxidation of FL catalysed by peroxyl radicals generated from AAPH. The composition of the reaction mixture was $1.5x10^{-7}$ mM FL, $1.9x10^{-1}$ M AAPH in 75 mM phosphate buffer (pH=7.4) and samples diluted 1/250, 1/500 or 1/1000 with water in a total final volume of 200 μL. This mixture was placed at 37ºC in a 96-well microplate and the reaction was started by the addition of AAPH. Fluorescence emitted by the reduced form of FL was measured in an FL800 microplate fluorescent reader (Bioteck Instruments, USA) and recorded every 1 minute at the emission wavelength of 530 ± 25 nm and excitation wavelength of 485 ± 20nm for a period of 30 minutes. Phosphate buffer was used as a blank and 10, 20, 30, 40 and 50 μmol/L of Trolox were used as control standards. All samples, including the blank and the controls, were analysed as triplicates. Final ORAC values were calculated by a regression equation between the Trolox concentration and the net area under the FL decay curve and were expressed as Trolox equivalents antioxidant capacity (μmol TEAC /L).

HPLC-DAD-ED-FD assay. Conditions of analysis of phenolic compounds by HPLC with the diode-array (DAD), electrochemical (ED) and fluorescence detection (FD) are described elsewhere [13,23]. Identification of compounds was done by comparing retention time, spectra and spiking samples with known amounts of pure standards, whenever available.

2.4. Data treatment. The Unscrambler (v 9.7, Camo Software) was used for Principal Components Analysis (PCA).

3. Results and discussion

The use of ED leads to simplified chromatographic profiles and detects compounds that are electrochemically active, providing an approach for studying the antioxidant capacities of Moscatel wines. The ED profile of samples analyzed by HPLC from Douro and Setúbal regions are shown in figure 1. Samples from Setúbal (JPV, JMF and ACP) showed more intense peaks, namely gallic acid than Douro's wines. Moreover, both JMF20 and MRC had less intense peaks because they corresponded to older vintages (1980 and 1989, respectively). When comparing MRC with JMF20 chromatographic profile, the first sample displayed more intense peaks because it is made from red Moscatel grapes.

Besides this analysis, several analytical parameters were determined in order to try to understand which phenolic compounds could elicit the antioxidant properties of Moscatel wine and if there were any correlations among them. Firstly, statistical analysis will be presented and then a general discussion concerning the most important parameters will be performed.

3.1. Statistical analysis

3.1.1. Discrimination of wine samples groups by PCA

PCA is a good statistical tool to evaluate associations between variables and detect groups among samples. In the present work 20 variables and all 70 samples were included for PCA. Variables were selected bearing in mind that they could directly or indirectly provide an estimation of antioxidant capacity in Moscatel wines (table II).

5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) had an important contribution to TOTALDAD but since it is not a phenolic compound, its area was excluded from the total area of the chromatogram. The model was then designed with 20 components and the first 3 components could only explain 60% of the total residual variance. If the sum of the explained variances

for the three first components is about 70-80%, the plot shows a large portion of the information in the data, so the relationships can be interpreted with a high degree of certainty. This was not the case. Considering the distribution of Moscatel wines along PC1 and PC2, and as shown in figure 2, some samples from the same producer laid mostly in the same quadrant: in quadrant I JPV, in II RIV and VCL, in III JMF, SSVP and XSS and in IV ACP, HSM and the majority of EOS samples. Even though, MRC sample was the only Moscatel wine made from a red grape variety, the variables used here could not discriminate this sample. Moscatel wines from Douro were located in quadrant III and very close to each other (ACF, CAM, PMD and FMC), showing that winemaking, raw materials found in this D.O.C. region and/or pedoclimatic conditions provide wines with similar characteristics.

Within each quadrant, samples from the same producer also formed clusters showing that winemaking of different producers can have impact on total phenolic content and antioxidant activity of these wines, as previously reported [13,24]. However, some samples had a more heterogeneous distribution and in some cases there were what we may call outliers, as some samples from some producers are not close to the corresponding producer group. Whereas JPV samples in x_{PC1}=-2 were produced during 1994-1998 vintages, two JPV samples laid in x_{PC1}=-4 and are productions from 1999 vintage. The JPV commercial wine in quadrant II was from 2001 and different from other vintages of this producer (1995-1999). HSM commercial sample (x_{PC1}=7.5) was also from a different vintage (2002) than samples supplied by CVRPS (1999-2000) but for this producer there are some differences among the samples analyzed and so the wines are not very close to each other. SVP sample in quadrant IV was the only wine from this producer from 1998 vintage and it had higher concentrations of *t*-caftaric acid and almost the double of ORAC value than other SVP samples. JMF samples in quadrant I were both a special 20-year edition from 1980, and were characterized by a lower phenolic composition in terms of gallic acid and ethyl gallate (figure 1) but also less total

flavonoids than any other samples from JMF, as can be expected in an older wine. These results reinforce the importance of vintage on phenolic composition, as already discussed by other authors [25].

In order to try to increase the accumulated variance in the first three PC, producers with less than 3 samples available were excluded from the data matrix, leaving 55 samples from 8 producers. Comparing the results obtained with the first model, slightly higher values in terms of explained variance were found: 37%, 54%, 65% and 72% for PC1, PC2, PC3 and PC4, respectively and a similar but more simplified scattering was achieved. However in this scattering different vintages were considered. In order to diminish this bias, only samples from the same year (1999) belonging to the eight previously selected producers were analyzed by PCA. This new model had only 26 wines with 20 components and 37%, 59%, 68% and 76% of the explained variance were achieved for PC1, PC2, PC3 and PC4.

Two main groups were found (figure 3): group A which was located in quadrants I and III and group B in quadrants II and IV. Within group A two subgroups were formed: (a) with XSS and SVP, and (b) with JMF and JPV wines. Within group B also two subgroups were represented: (c) with EOS and ACA and (d) with HSM and ACP wines. This representation illustrates once more the importance of different winemaking techniques used by different producers.

To understand which variables accounted more for the distribution obtained in figure 3, a correlation plot is shown in figure 4. In this representation, correlation loadings are computed for each variable for PC1 and PC2. In addition, the plot contains two ellipses that describe how much variance is taken into account. The outer ellipse is the unit-circle and indicates 100% explained variance. The inner ellipse indicates 50% of explained variance.

In quadrants II and IV laid not only variables corresponding to antioxidant activity assays (FRAP, ORAC and DPPH) but also total parameters (TOTALED, TOTALPH and

TOTALFL) and individual phenolics generally associated with antioxidant properties (GLAC, CFA, CFET and GLET). Therefore, it is reasonable to ascertain that wines from producers ACA, ACP, HSM and EOS included in group B have higher antioxidant activity than JMF, JPV, SVP and XSS wines integrated in group A.

3.1.2. Correlation between variables used in PCA

Wine is a complex mixture and its health benefits in terms of antioxidant properties are well described. It has been reported that these properties are the sum of the contribution of different components and synergistic effects may occur. Nevertheless, it was important to try to understand from our data which phenolic compounds detected in Moscatel wine samples could be related with the different methods used for measuring the antioxidant capacity. It is known that in red wines catechins account for more than 60% of antioxidant power but this values decrease to 24% in white wines [26], reinforcing the idea that other phenolics may have an important contribution to wine antioxidant properties.

Correlation between antioxidant activity and compounds detected with DAD, ED and FD

In a first approach the results obtained for each antioxidant assay were compared with TOTALED, TOTALDAD, TOTALPH and TOTALFL. Only producers with more than 3 samples were considered and results are shown in table III for the sum of all samples (n=55), and for each producer separately. The idea was to conclude about the contribution of all phenolic compounds detected or just flavonoids, to the antioxidant capacity of the wine. Correlation values (R^2) were considered very high if $R^2 \geq 0.900$, high if $0.750 \leq R^2 < 0.900$ and moderate if $0.500 \leq R^2 < 0.750$. All R^2 values below 0.500 were considered weak correlations and negative values showed inverse relationships.

R^2 values obtained show that TOTALDAD in some cases had an inverse correlation with antioxidant tests values obtained for different samples (table 3): samples from producer

ACP present an inverse correlation between TOTALDAD and values obtained for the different antioxidant tests. This can arouse from the fact that despite 280 nm is a typical wavelength for detecting phenolic compounds it is not exclusive of this type of compounds and other molecules, which do not react considerably in the antioxidant assays, are detected in such conditions, misleading the correlation. Moreover, some phenolics that absorb at 280 nm are not necessarily antioxidants and can behave as prooxidants. Considering all the samples studied, for ORAC and FRAP the highest correlations were achieved for TOTALFL (R^2=0.832 and R^2=0.677, respectively), although moderate correlation were also found for TOTALED (R^2=0.529 and R^2=0.671, respectively) showing that TOTALFL can be a better tool for assessing antioxidant activity than TOTALPH. For DPPH the best correlation was established with TOTALED (R^2=0.561). Even though, when considering all samples and comparing different antioxidant tests with TOTALPH and TOTALFL the lowest R^2 were found for DPPH assay. Other authors also found weak correlations (R^2=0.3116) between DPPH and phenolic content of white wines [27]. These authors stated that this correlation is often increased when comparing red wines with phenolic content (R^2=0.7941) mainly because of higher concentration of gallic acid in these samples. Our results demonstrate that the moderate correlation between gallic acid and antioxidant tests was similar, but higher for FRAP (R^2=0.672) than for DPPH (R^2=0.558) or ORAC (R^2=0.515).

During the vinification process when ethanol is added, gallic and caffeic acids convert into ethyl gallate and caffeate, respectively and the extent of esterification strongly depends on phenolic acids concentration. In fact, the R^2 values between gallic acid, caffeic acid and the corresponding esters were 0.816 and 0.872, respectively.

Correlation between antioxidant activity and compounds detected with DAD, ED and FD: data grouped by producer

As shown previously the producer origin seems to have an important effect on Moscatel wines both in phenolic composition and in antioxidant capacities. When analyzing each producer separately (table III), the results show that for most producers TOTALDAD was not strongly correlated with any of the antioxidant activity tests and in most cases there was an inverse correlation. However for ACA very high R^2 values were attained but only 3 samples from this producer were analyzed. Apart from ACA, the highest R^2 values attained corresponded to JPV and SVP wines when correlating TOTALDAD with ORAC, FRAP and DPPH tests, but also for JMF wines when considering TOTALDAD *vs.* DPPH.

As far as TOTALED is concerned the situation is somehow different and higher R^2 values were achieved. ORAC data showed R^2 values higher than 0.500, except for ACP and XSS. For HS and SVP wines the R^2 was around 0.900. Other authors found a significant positive linear correlation between ORAC and electrochemical data obtained by HPLC with coulometric array detection [12].

When analyzing single peak areas obtained in ED chromatograms for HS Moscatel wines it could be seen that some phenolic acids could be responsible for this strong correlation with ORAC, namely gallic acid (R^2=0.921), *t*-caftaric acid (R^2=0.961) and ethyl gallate (R^2=0.962). In SVP the correlation did not rely only on ethyl gallate (R^2=0.783) and gallic acid (R^2=0.891), but also on protocatechuic (R^2=0.803) and caffeic acids (R^2=0.920). If JPV samples are taken into account the moderate correlation between TOTALED and ORAC (R^2=0.666) can be explained by ethyl caffeate (R^2=0.952) and etyhl gallate (R^2=0.616).

When comparing TOTALED with FRAP data, the highest values were found for ACA, JPV and HS samples. Considering TOTALED *vs* FRAP, the correlation could be explained by gallic acid (R^2=0.818, R^2=0.741), *t*-caftaric acid (R^2=0.784) and ethyl gallate (R^2=0.787) for HS, whereas in JPV it could be due to gallic acid (R^2=0.818) and ethyl gallate (R^2=0.836).

While considering the correlation TOTALED *vs* DPPH the same compounds were highlighted for JPV samples ($R^2_{\text{gallic acid/DPPH}}$=0.741, $R^2_{\text{ethyl gallate/DPPH}}$=0.773), but for HS samples other compounds explained the strong correlation: protocatechuic acid (R^2=0.912) and *t*-caftaric acid (R^2=0.988). Surprisingly, for XSS there is a strong inverse correlation between TOTALED and DPPH and further data treatment allowed the individualization of compound UNK1 (R^2=-0.748) as one possible responsible for this relationship. Structure elucidation of this compound could be important as it also presented considerable inverse correlation with ORAC in ACP (R^2=-0.988) and JMF wines (R^2=-0.946), with DPPH in EOS (R^2=-0.550), HS (R^2=-0.936) and XSS wines (R^2=-0.748) and with FRAP in SVP wines (R^2=-0.980), showing that it could have pro-oxidant properties that weaken the correlations.

Gallic acid seemed to be the only phenolic that mostly correlated with ORAC and values ranged between R^2=0.576 and R^2=0.947 in all samples showing that concentration of this acid in Moscatel wines can provide a good estimate of antioxidant activity, when considering these kind of antioxidant activity tests. Previous works showed R^2=0.55 for gallic acid when comparing antioxidant capacity in red wines with single phenolic compounds [25]. Our data suggest that when considering FRAP or DPPH, also other components can take an important part as protocatechuic and caffeic acids, ethyl caffeate and ethyl gallate. Despite the fact that the contribution of caffeic and gallic acids for antioxidant activity seems relevant whatever the method used, caffeic acid has half the inhibitory capacity against DPPH radical than gallic acid has when analyzed as individual standards [28].

Our results show that it is difficult to establish a clear trend line between phenolic compounds detected electrochemically and antioxidant tests results and understand which compounds can be responsible for antioxidant activity in these samples. It is reasonable to assume that Moscatel antioxidant capacity depends on the whole group of compounds

present, rather than on single compounds activity, as already discussed by other works when white wines were analyzed [29].

When correlating TOTALPH with antioxidant activity tests, ACA, EOS and SVP had the highest values for ORAC and FRAP assays. For DPPH, the highest correlations were obtained for ACA, JMF, JPV and SVP wines. Strong correlations could be found for some samples when comparing antioxidant tests with individual phenolics determined by fluorescence detection (see table IV). *t*-Resveratrol was only determined in three samples but it correlated with ORAC in ACP and HS wines pretty well. Tyrosol could be strongly associated with ORAC in ACP, with FRAP in HS and with DPPH in XSS wine.

TOTALPH and TOTALFL were strongly correlated for all samples (R=0.784) as expected since flavonoids contribute to phenolic content, but when comparing these parameters individually with each antioxidant activity test, the results were different. In general, R^2 values were higher for TOTALFL than for TOTALPH (table III). DPPH seemed to be the only test in which correlations for TOTALPH and TOTALFL did not differ that much. The biggest disparity was for JPV samples where lower values were found for phenolics (R^2_{ORAC}=0.174, R^2_{FRAP}=0.472) compared with flavonoids (R^2_{ORAC}=0.726, R^2_{FRAP}=0.911). These differences can be explained by the higher content in quercetin-3-glucosyde that has different radical selectivities in both assays ($R^2_{ORAC/quercetin\text{-}3\text{-}glucosyde}$=0.616, $R^2_{FRAP/quercetin\text{-}3\text{-}glucosyde}$=0.374 in JPV samples). In our study, quercetin-3-glucosyde was also correlated with ORAC in XSS wine (R^2=0.745). Other works showed that the aglycon quercetin had the highest activity in FRAP when compared with other phenolics but in ORAC assay, catechin reacted in a greater extent than quercetin [30].

3.2. Chemical analysis

The values obtained for total phenolic and total flavonoids content and antioxidant activity tests are presented in table V.

According with other works dealing with red wines [25], some samples with lower phenolic content exhibit higher antioxidant capacity which can be due to the: dissimilar reactivity of each flavonoid and non-flavonoids, degree of polymerization and ratio between monomeric and polymeric forms, synergistic and antagonist effects and also possible radicalic molecules existing in wines.

3.2.1. Phenolics and flavonoids

Despite the fact that Folin-Ciocalteu assay is not selective because it determines both mono and polyphenols it has been often used as a reasonable approach for rough estimation of antioxidant activity of food samples.

The results show that even when comparing white Muscatel wines produced in the same D.O.C. region, the total phenolic content varied greatly, probably due to different winemaking and pedoclimatic conditions. The total phenolic content ranged from 756 to 1863 GAE mg/L, with an average value of 1243 mg GAE/L.

The variation within each group producer is in some cases high. In ACA, ACP, JMF and EOS producers the RSD % values were around 30% and in SVP samples this value was higher than 50%. The large-scale production of Moscatel wines is affected by some processing techniques like duration of skin contact and maturation temperature that are different for each producer, possibly explaining the high variability obtained both inter and intra producers.

On one hand, previous works [29] that compared Moscatel with other white grape varieties such as Pedro Ximenez and Palomo Fino, showed that Moscatel had higher content in catechin, epicatechin, epicatechingallate and caftaric acid, possibly explaining higher values obtained in the present work and frequently associated with red varieties described in literature. On the other hand, and most importantly, the maturation process, which does not

take place in white wines, explains the high phenolic content of these fortified wines produced in Portugal.

Some authors have described spectrophotometric methods to determine flavonoid content in foodstuffs, like precipitation with formaldehyde [26] but the most commonly used has been the aluminum chloride colorimetric method [17,31]. The selection of the reference compound is crucial and it should represent the matrix. In this context rutin has been widely used [17,32] but we could not detect this compound in samples analyzed so a more representative compound was selected. In fact, since Moscatel samples are rich in flavonols as procyanidins and catechin (CE), the former was chosen for the calibration curve. As referred when discussing total phenolic content, also total flavonoids content had a wide range of variation and four producers had RSD values higher than 50%. The mean value for total flavonoids content of Moscatel wines was 248 mg CE/L and ranged from 101 to 467 mg CE/L.

3.2.2. Antioxidant activity

For measuring antioxidant activity, the DPPH assay was chosen because it is easy, quick and it is more selective than $ABTS^{+}$ in the reaction with H-donors [33]. Although antioxidant parameters are frequently expressed in terms of IC_{50} (50% inhibitory concentration) or as external references, in the present study an equation was employed [21]. The use of IC_{50} can be tedious and implies longer times of analysis [18], which is not desirable for a large pool of samples. As expected the response of DPPH against single phenolics is variable. DPPH radical does not react with flavonoids that lack hydroxyl groups in B-rings and with monohydroxylated aromatic acids [33]. A higher % inhibition corresponds to a higher antioxidant activity for this radical. In the present study DPPH inhibition ranged from 55.1% to 80.4% with a mean value of 70.7%.

Three types of kinetics have been described for reactions between DPPH radicals and phenolics: rapid, intermediate and slow [21]. These kinetic differences along with variable

flavonoid and phenolic content in all samples turn correlations between DPPH and phenolic or flavonoids content rather weak in complex samples such as Moscatel wines. Drawbacks and limitations of this assay are related to a possible steric hinderance for heavier molecules, the unlikelihood of founding the DPPH radical in human organisms in physiological conditions and its high stability which is not characteristic of radicals formed *in vivo* [33].

In ORAC assay the area under the curve is used and phenolic acids, in general, have lower activity against peroxyl radicals than flavonoids that contain several hydroxyl groups [12]. For Moscatel wines, ORAC is the antioxidant test that provides the best correlations both with total phenolic and flavonoids content. In these samples ORAC values ranged between 6566 μmol TEAC/L and 16625 μmol TEAC/L, with a mean value of 10724 μmol TEAC/L. Limitations of this method match with interfering effect from proteins and the procedure of generating peroxyl radicals is not physiological.

FRAP assay measures the capacity of reducing metals, namely ferric to ferrous iron. However, the reaction may not be complete even after several hours after the reaction started[31], mainly because of subsequent dimerizations and polymerizations [34]. Drawbacks of this method are concerned with compounds that have low redox potential and can reduce the Fe^{3+} even though they do not behave as antioxidants *in vivo* [35], interfering compounds can absorb at the same wavelength and the assay is performed at a non-physiological pH. Due to the chemical nature of the reaction, initially, results were expressed as equivalents of iron sulphate but the use of Trolox has become widespread as standard and more representative for food samples. FRAP values varied between 2027 and 4483 mg TEAC/L with an average value of 3098 mg TEAC/L.

Although bioavailability studies should be performed for Moscatel wines, the results of chemical analysis show that, if this fortified wine is consumed with moderation it can represent a good source of antioxidants in the human diet.

4. Conclusions

The present results describe for the first time not only the total phenolic and flavonoid content of Moscatel wines from Setúbal D.O.C. region in Portugal but also their antioxidant capacities. Furthermore, the use of PCA allows these wines to be grouped in terms of their production characteristics, with both winemaking and vintage having an important effect on final product composition. ACP and HSM were the producers whose samples had the highest amounts in all studied parameters, except in the DPPH assay.

When considering antioxidant tests, DPPH is by far the method that provides the weakest correlations with phenolic and flavonoids composition. Whereas for ORAC and FRAP assays, total flavonoids content provide a better correlation, for DPPH, total electrochemical area should be used for a more accurate antioxidant activity estimation in these dessert wines. On the other hand, total area obtained by diode-array at 280 nm should be used with caution as an estimation of antioxidant activity.

It seemed that gallic acid was the most important phenolic compound for high correlations obtained between parameters but for some producers other compounds as protocatechuic, caffeic acid and *t*-caftaric acids, ethyl gallate and ethyl caffeate, could explain the strong relationships achieved, depending on their concentration in wines. Further work will be done in order to identify one compound (UNK1) that appears to behave as a prooxidant.

Results show that antioxidant activity of Moscatel wines is much more related with the sum of several phenolic rather than with each single compound activity. However, this trend was not clearly observed in every sample, justifying the need in using complementary methodologies. Total flavonoid content along with ORAC, FRAP and individual compounds obtained by HPLC-DAD-ED-FD, provide reliable information in terms of antioxidant activity and their results cannot be considered isolated.

Considerable variations in phenolic, flavonoids, FRAP, ORAC and DPPH values were obtained leading to high inter and intra producers RSD%. Apart from the differences in grapes chemical composition also the spirit added can have variable phenolic composition but these characteristics seem less important for a homogeneous final product than the winemaking process that characterizes different producers. Each producer makes a dessert wine that chemically can be distinguished from the others.

Setúbal Moscatel wines are a very unique and rich source of antioxidant compounds when consumed with moderation.

Acknowledgements

The authors would like to thank to Comissão Vitivinícola Regional da Península de Setúbal for providing Moscatel wines. We are grateful to Camo Software for providing a free-trial software sample.

References

[1] N. Balasundram, K. Sundram and S. Samman, Food Chem., 99, 191 (2006).

[2] W. Ren, Z. Qiao, H. Wang, L. Zhu and L. Zhang, Med. Res. Rev., 23, 4, 519 (2003).

[3] G. J. Soleas, E. P . Diamandis and D. M. Goldberg, J. Clin. Lab. Anal., 11, 287-313 (1997).

[4] A. M. Alonso, R. Castro, M. C. Rodríguez, D.A. Guillén and C.G. Barroso, Food Res. Intern., 37, 715 (2004).

[5] M. Monagas, B. Bartolomé and C. Mez-Cordovés, Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 45(2), 85 (2005).

[6] M. V. Moreno-Arribas and M. C. Polo, Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 45(4), 265 (2005).

[7] S. Pérez-Magarino and M. L. González-San José, Food Chem., 96, 2, 197 (2006).

[8] P. Sarni-Machado, V. Cheynier and M. Moutounet., J. Agric. Food Chem., 47, 42 (1999).

[9] J. A. Vinson, K. Proch and P. Bose, Methods Enzymol., 335, 103 (2001).

[10] H. Wang, G. H. Cao and R. L. Prior, J Agric Food Chem., 44 (3), 701 (1996).

[11] C. Kaur and H. C. Kapoor, Int. J. Food Sci. Technol., 36, 703 (2001).

[12] K. Robards, P. D. Prenzler, G. Tucker, P. Swatsitang and W. Glover, Food Chem., 66, 401 (1999).

[13] M. N. Bravo, S. Silva, A.V. Coelho, L. Vilas Boas and M. R. Bronze, Anal. Chem. Acta, 563, 84 (2006).

[14] A. Lugasi and J. Hóvári, Nahrung, 2, 79 (2003).

[15] D. Villaño, M.S. Fernández-Pachón, A. M .Trancoso and M. C. Garcia- Parrilla, Talanta, 62, 2, 501 (2004).

[16] M. Sato, N. Ramarathnam, Y. Suzuki, T. Ohkubo, M. Takeuchi and H. Ochi, J. Agric. Food Chem., 44, 37 (1996).

[17] J. Zhishen, T. Mengcheng and W. Jianming, Food Chem., 64, 555 (1999).

[18] M. D. Rivero-Pérez, P. Muñiz and M.L. González-San José, J. Agric. Food Chem., 55, 5476 (2007).

[19] D. Huang, B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J. A. Flanagan and R. L. Prior, J. Agric. Food Chem. 50, 4437 (2002).

[20] M. Shaghaghi, J. L. Manzoori and A. Jouyban, Food Chem., 108, 695 (2008).

[21] V. Katalinic, M. Milos, T. Kulisic and M. Jukic, Food Chem., 550 (2006).

[22] R. Szöllösi, I. S. Varga, Act. Biol. Szeg., 46, 125 (2002).

[23] M. N. Bravo, R. Feliciano, S. Silva, A. V. Coelho, L. Vilas Boas and M.R. Bronze, J. Food Compos. Anal. (2008), doi:10.1016/j.jfca.2008.04.007.

[24] J. Lachman, M. Šulc and M. Schilla, Food Chem., 103, 802 (2007).

[25] D. Di Majo, M. La Guardia, S. Giammanco, L. La Neve and M. Giammanco, Food Chem., 111, 45 (2008).

[26] V. Katalinić, M. Milos, D. Modun, I. Musić and M. Boban, Food Chem., 86, 593 (2004).

[27] A. Staško, V. Brezová, M. Mazúr, M. Čertík, M. Kaliňák and G. Gesheidt, LWT-Food Science and Technology (2008), doi:10.1016/j.lwt.2007.11.021.

[28] M. S. Fernández-Pachón, D. Villaño, A. M. Troncoso and M. C. García-Parrilla, Anal. Chem. Acta, 563, 101 (2006).

[29] A. M . A. Borbalán, L. Zorro, D. A. Guillén and C. G. Barroso, J. Chromatogr. A, 1012, 31 (2003).

[30] D. Deng, J. Zhang, J. M. Cooney, M. A. Skinner, A. Adaim, D. J. Jensen and D. E. Stevenson, FEBS Lett., 580, 5247 (2006).

[31] F. Biglari, A. F.M. AlKarkhi and A. M. Easa, Food Chem., 107, 1636 (2008).

[32] Z. Maksimović, D. Malenčić and N. Kovačević, Bioresour. Technol., 96, 873 (2005).

[33] V. Rosginsky and E. A. Lissi, Food Chem., 92, 235 (2005).

[34] N. Nenadis, O. Lazaridou and M. Z. Tsimidou, J. Agric. Food Chem., 55, 5452 (2007).

[35] J. Pérez-Jiménez, S. Arranz, M. Tabernero, M. E. Díaz-Rubio, J. Serrano, I. Goñi, F. Saura-Calixto, Food Res. Int., 41, 274 (2008).

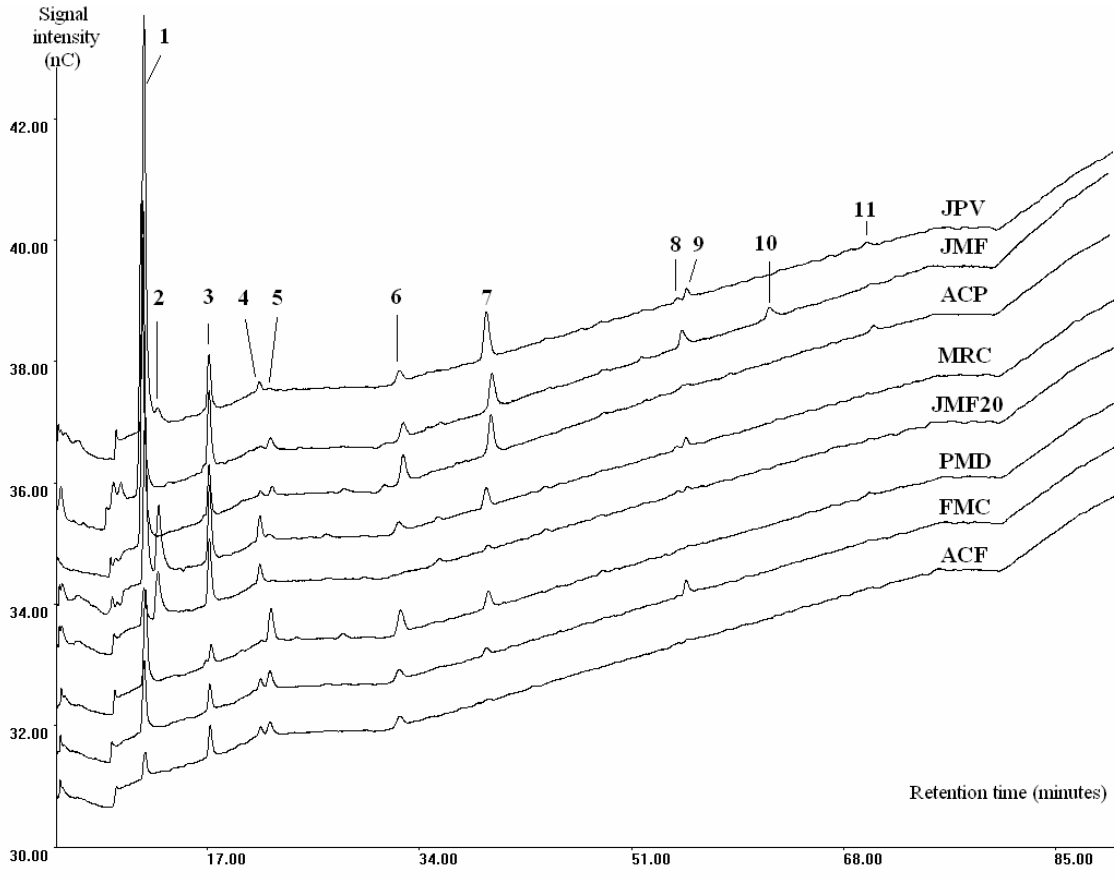


Figure 1. Electrochemical profiles obtained by RP-HPLC of Moscatel wines commercially available from Setúbal (JMF20, naturally aged wine from 1980, MRC from 1989, JMF from 1999, JPV from 2001 and ACP from 2004 vintage) and from Douro (ACF, FMC and PMD, unknown vintage). Legend: (**1**)-GLAC; (**2**)-UNK1; (**3**)-PA; (**4**)-CFTA; (**5**)-PRO; (**6**)-CFA; (**7**)-GLET; (**8**)-QUEGLR; (**9**)-QUEGLU; (**10**)-UNK2; (**11**)-CFET.

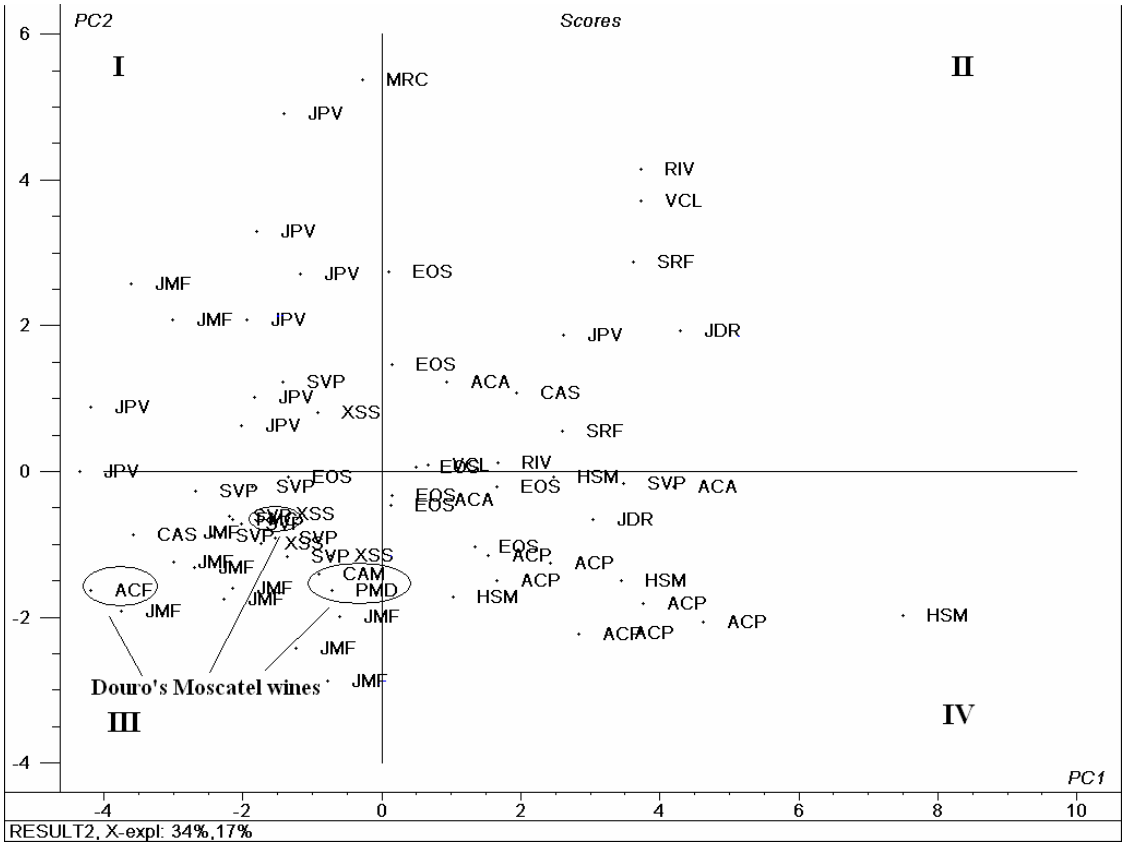


Figure 2. Distribution of 70 Moscatel wines from Douro and Setúbal D.O.C. regions along principal component 1 (PC1) and 2 (PC2) using 20 variables.

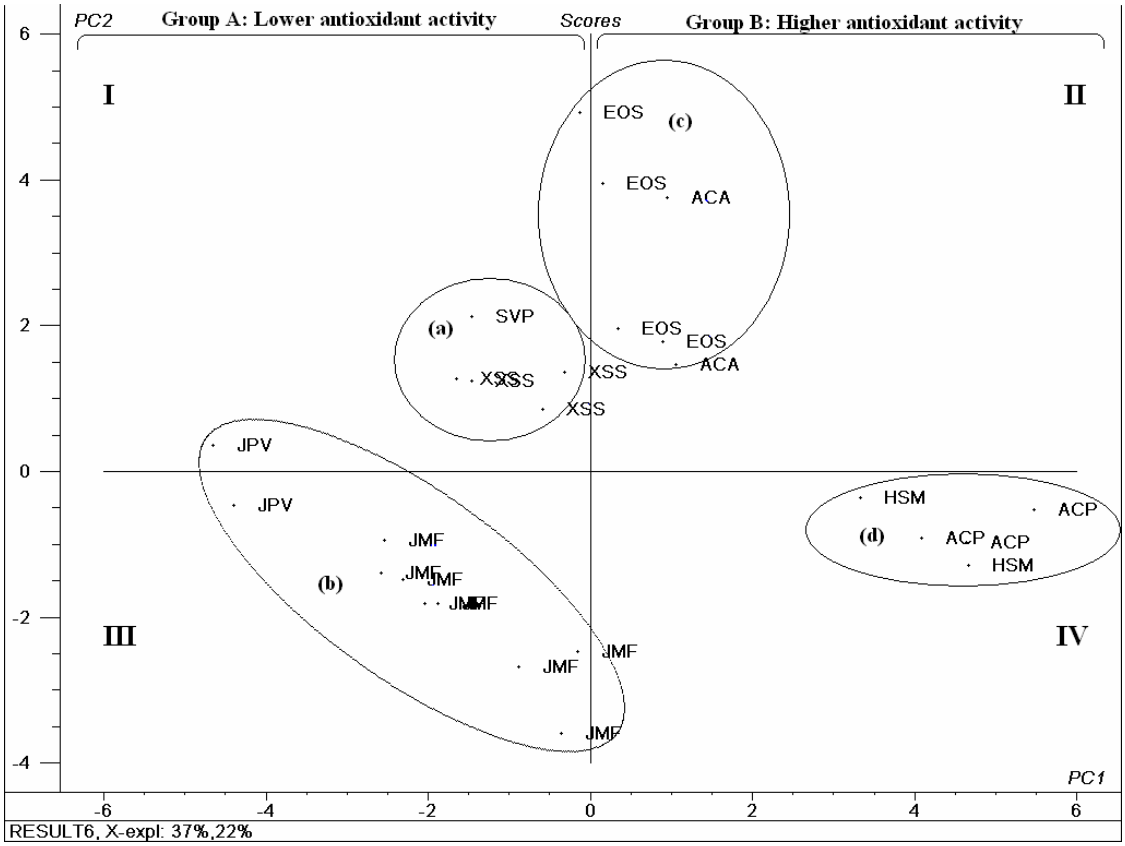


Figure 3. Distribution of 26 Moscatel wine samples along PC1 and PC2 using 20 variables.

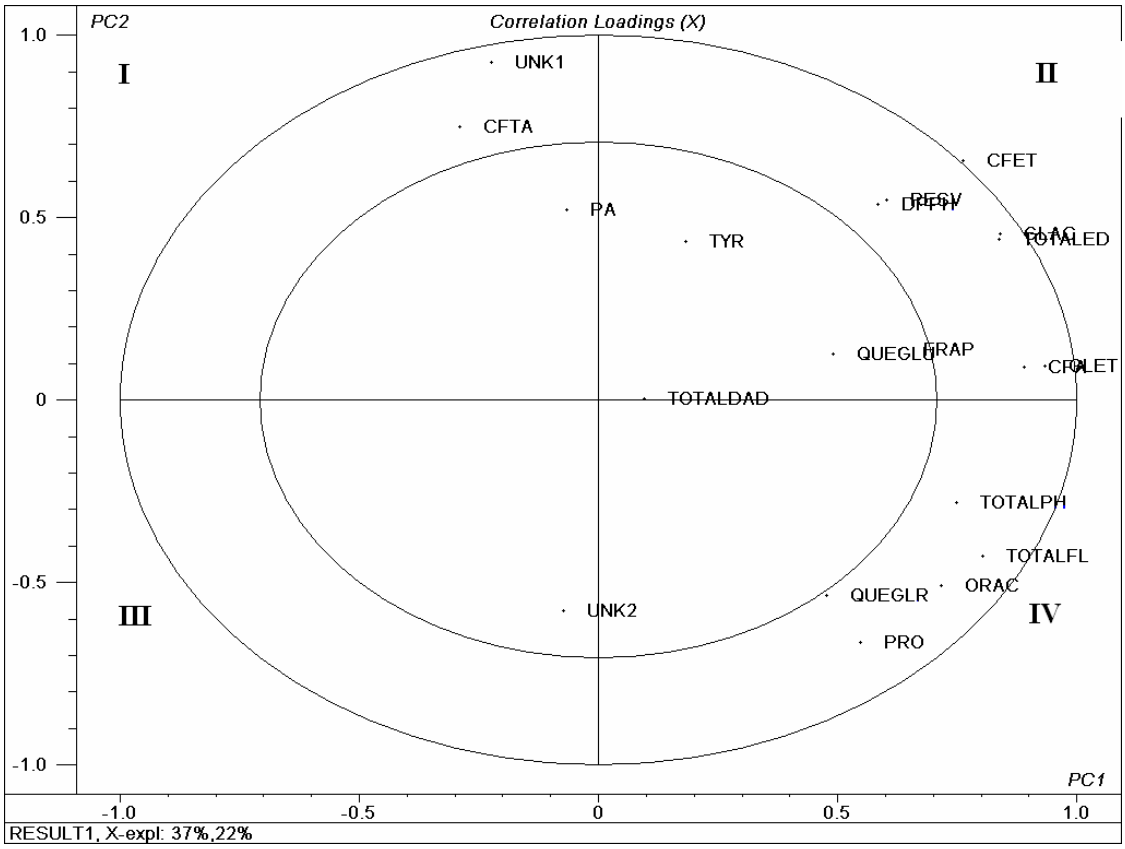


Figure 4. Correlation loadings for PC1 and PC2 of 26 wines produced in 1999 and using 20 variables.

Samples provided by CVRPS			
Producer code	Number of samples	Region	Vintages
ACA	3	Setúbal	1998, 1999
ACP	6		1999, 2001
CAS	2		1998
EOS	8		1998, 1999, 2000
HSM	3		1999, 2000
JDR	2		2000, 2001
JMF	9		1980, 1999
JPV	8		1995, 1996, 1997, 1998, 1999
RIV	2		1998
SVP	9		1998, 1999, 2000, 2001
SRF	2		1999
VCL	2		1998, 2000
XSS	4		1999, 2000
Commercially available samples			
ACF	1	Douro	n.a.
ACP	1	Setúbal	2004
CAM	1	Douro	n.a.
FMC	1	Douro	n.a.
HSM	1	Setúbal	2002
JMF	2	Setúbal	1980, 2001
JPV	1	Setúbal	2001
MRC	1	Setúbal	1989
PMD	1	Douro	1989

Table I. List of 70 Moscatel wine codes used for identification along with producing region, number of samples and corresponding vintages. “n.a” notation stands for “not available”.

Variables included in PCA	Abbreviation
t-Resveratrol with FD	RESV
Tyrosol with FD	TYR
Quercetin-3-glucosyde with ED	QUEGLU
Quercetin-3-glucoronide with ED	QUEGLR
Gallic acid with ED	GLAC
Ethyl gallate with ED	GLET
Caffeic acid with ED	CFA
Ethyl caffeate with ED	CFET
t-Caftaric acid with ED	CFTA
Procyanidin dimer with ED	PRO
Protocatechuic acid with ED	PA
Unknown compound 1with ED	UNK1
Unknown compound 2 with ED	UNK2
Total area with ED	TOTALED
Total area with DAD at 280 nm	TOTALDAD
Total phenolic assay	TOTALPH
Total flavonoid assay	TOTALPH
ORAC assay	ORAC
DPPH assay	DPPH
FRAP assay	FRAP

Table II. List and abbreviations of 20 variables considered for PCA.

	Sample	n	TOTALDAD	TOTALED	TOTALPH	TOTALFL
ORAC	**All**	**55**	**-0.054**	**0.529**	**0.680**	**0.832**
	ACA	3	0.971	0.514	0.985	0.863
	ACP	7	-0.796	0.319	-0.004	0.261
	EOS	8	-0.580	0.535	0.961	0.684
	HS	4	-0.070	0.889	0.669	0.729
	JMF	11	-0.168	0.538	0.671	0.756
	JPV	9	0.496	0.666	0.174	0.726
	SVP	9	0.472	0.909	0.852	0.906
	XSS	4	0.034	0.485	0.150	-0.208
FRAP	Sample	n	TOTALDAD	TOTALED	TOTALPH	TOTALFL
	All	**55**	**-0.188**	**0.671**	**0.372**	**0.677**
	ACA	3	0.973	0.848	0.955	0.998
	ACP	7	-0.235	0.150	-0.350	0.391
	EOS	8	-0.094	0.409	0.681	0.630
	HS	4	-0.816	0.779	0.132	0.930
	JMF	11	-0.282	0.315	-0.203	0.230
	JPV	9	0.397	0.884	0.472	0.911
	SVP	9	0.627	0.724	0.468	0.690
	XSS	4	-0.338	0.430	0.034	-0.301
DPPH	Sample	n	TOTALDAD	TOTALED	TOTALPH	TOTALFL
	All	**55**	**0.01**	**0.561**	**0.283**	**0.271**
	ACA	3	0.674	0.999	0.620	0.856
	ACP	7	-0.599	-0.080	-0.166	0.044
	EOS	8	0.348	-0.645	-0.806	-0.888
	HS	4	0.090	0.692	-0.313	0.587
	JMF	11	0.537	0.082	0.519	0.452
	JPV	9	0.481	0.860	0.583	0.841
	SVP	9	0.503	0.591	0.534	0.607
	XSS	4	-0.110	-0.920	0.910	0.997

Table III. Correlation values (R^2) between antioxidant tests and total chromatographic and spectrophotometric methods.

Sample	Correlation	R^2
ACP	ORAC/Resveratrol	0.895
	ORAC/Tyrosol	0.841
HS	ORAC/Resveratrol	0.980
	FRAP/Tyrosol	0.902
XSS	DPPH/Tyrosol	0.947

Table IV. Correlations between antioxidant tests and single phenolics analyzed by fluorescence detector

Samples	n	Total phenolics (mgGAE/L)	RSD %	Total flavonoids (mg CE/L)	RSD %	DPPH inhibition (%)	RSD %	ORAC (µmol TEAC/L)	RSD %	FRAP (mg TEAC/L)	RSD %
ACP	7	1863 ± 695	37,3	467 ± 123	26,3	71,8 ± 5,6	7,8	16625 ± 3533	21,3	3717 ± 1512	40,7
HSM	4	1634 ± 284	17,4	405 ± 237	58,4	71,7 ± 8,1	11,2	17433 ± 3969	22,8	4483 ± 2873	64,1
ACA	3	1354 ± 539	39,8	318 ± 169	42,5	80,4 ± 2,7	3,6	11947 ± 3182	26,6	4438 ± 1069	24,1
EOS	8	1236 ± 408	33,0	228 ± 55	24,3	76,7 ± 7,9	10,3	8773 ± 2051	23,4	3362 ± 638	19,0
XSS	4	1038 ± 286	27,6	150 ± 27	17,9	78,0 ± 7,7	9,9	7145 ± 739	10,3	2027 ± 826	40,7
SVP	9	1027 ± 533	51,9	182 ± 121	66,6	72,4 ± 7,5	10,3	6566 ± 2147	32,7	2289 ± 431	18,8
JMF	11	995 ± 362	36,3	234 ± 131	56,2	59,5 ± 13,0	21,8	9832 ± 4534	46,1	2200 ± 695	31,6
JPV	9	796 ± 205	25,8	101 ± 52	52,2	55,1 ± 12,1	22,0	7473 ± 1795	24,0	2265 ± 658	29,1

Table V. Total phenolic content, total flavonoid content, ORAC, FRAP and DPPH assay results for 8 producers from groups A and B in PCA. For each producer mean value ± standard deviation and relative standard deviations (RSD%) are summarized.