ANTOCIANINAS EM UVAS DE VARIEDADES VINÍFERAS, AMERICANAS E HÍBRIDAS

Wellington Bressan

Orientador: **Dr. Marco Antonio A. Cesar**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em
Tecnologia de Alimentos

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro, 1980

Aos meus pais

MAURO E ELZA,
eternamente grato

O F E R E Ç O

À minha esposa

Tânia Mara
e ao meu filho
Jean Paul,

D E D I C O

A G R A D E C I M E N T O S

- Ao Prof. Dr. MARCO ANTONIO AZEREDO CESAR, pela minha iniciação à pesquisa, orientação, amizade e constante dedicação durante a realização do trabalho;
- Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Prado Filho, pela amizade, apoio e orientação na determinação cromatográfica dos pigmentos;
- Ao Dr. Takuo Hashizume, pela amizade, estímulo e pelas valiosas sugestões apresentadas na feitura desta pesquisa;
- Ao Dr. Issao Shirose, pela orientação prestada à análise dos dados experimentais;
- Ao Prof. Dr. Fernando Valadares Novaes, pela amizade e colaboração na revisão deste trabalho;
- Ao Prof. Dr. Rodolpho de Camargo, pela revisão do resumo no idioma inglês;
- A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, pela oportunidade que nos concedeu à realização do curso de Pós-Graduação;
- Ao Técnico de Laboratório, Sr. José Fernandes Vieira, pela ajuda prestada durante a pesquisa;

- A Sra. Sonia Corrêa da Rocha, Bibliotecária da Biblioteca Central da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela orientação e organização da bibliografia citada;
- A Hamada & Cia. Ltda., por ter cedido as enzimas utilizadas nesta pesquisa;
- Ao Sr. Albino Fronza, pela cessão das variedades de uvas;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo apoio material do desenvolvimento deste trabalho;

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para o desenvolvimento desta pesquisa.

Í N D I C E

	Pág.
RESUMO	ix
SUMMARY	xii
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 - Características Gerais dos Antocianinas em Uvas	4
2.2 - Antocianinas em Diferentes Grupos do <u>Gê</u> nero <i>Vitis</i>	21
2.2.1 - Variedades viníferas	24
2.2.2 - Variedades americanas	35
2.2.3 - Variedades híbridas	38
3 - MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 - Material	42
3.1.1 - Matéria-prima	42
3.1.2 - Mostos	43
3.2 - Métodos	43
3.2.1 - Métodos de amostragem	43
3.2.2 - Preparo da matéria-prima e obtenção do mosto	44
3.2.3 - Métodos analíticos	44
3.2.3.1 - Brix refratométrico	45
3.2.3.2 - Acidez total	45
3.2.3.3 - Concentração total das anto cianinas	45

	Pág.
3.3 - Cálculo da Concentração das Antocianinas Monoglicosídeo, Diglicosídeo e Totais	48
3.4 - Métodos Estatísticos	49
3.4.1 - Análise da variância	49
3.4.2 - Teste de Tukey	50
4 - RESULTADOS OBTIDOS	51
5 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	67
5.1 - Variedades Viníferas	67
5.2 - Variedades Americanas	69
5.3 - Variedades Híbridas	72
6 - CONCLUSÕES	76
7 - LITERATURA CITADA	78

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1 - Matéria corante das várias espécies do gênero <i>Vitis</i>	22
TABELA 2 - Distribuição das espécies do gênero <i>Vitis</i> em grupos	24
TABELA 3 - Teor de antocianinas em variedades viníferas	34
TABELA 4 - Resultados obtidos para brix , acidez total , antocianinas 3-monoglicosídeo e totais, para as variedades viníferas	56
TABELA 5 - Resultados obtidos para brix , acidez total , antocianinas 3-monoglicosídeo , antocianinas 3,5-diglicosídeo e totais para as variedades americanas	57
TABELA 6 - Resultados obtidos para brix , acidez total , antocianinas 3-monoglicosídeo , antocianinas 3,5-diglicosídeo e totais para as variedades híbridas	58
TABELA 7 - Porcentagens de 3-monoglicosídeo e 3,5-diglicosídeo na concentração total de antocianinas	59
TABELA 8 - Resultados para análise de variância, em experimento inteiramente casualizado , "Teste F"	60

TABELA 9 - Comparação das médias de antocianinas 3-monoglicosídeo e totais, nas variedades viníferas, pelo "Teste de Tukey" 61

TABELA 10 - Comparação das médias de antocianinas 3-monoglicosídeo, 3,5-diglicosídeo e totais para as variedades americanas, pelo "Teste de Tukey" 62

TABELA 11 - Comparação das médias de antocianinas 3-monoglicosídeo, 3,5-diglicosídeo e totais para as variedades híbridas pelo "Teste de Tukey" 63

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1 - Cromatograma de separação das antocianinas das variedades viníferas	53
FIGURA 2 - Cromatograma de separação das antocianinas das variedades americanas	54
FIGURA 3 - Cromatograma de separação das antocianinas das variedades híbridas	55
FIGURA 4 - Representação gráfica das médias da concentração de antocianinas 3-monoglicosídeo para as variedades viníferas	64
FIGURA 5 - Representação gráfica das médias das concentrações de antocianinas 3-monoglicosídeo , antocianinas 3,5-diglicosídeo e totais, para as variedades americanas	65
FIGURA 6 - Representação gráfica das médias das concentrações de antocianinas 3-monoglicosídeo , antocianinas 3,5-diglicosídeo e totais, para as variedades híbridas	66

ANTOCIANINAS EM UVAS DE VARIEDADES VINÍFERAS, AMERICANAS E HÍBRIDAS

WELLINGTON BRESSAN

MARCO ANTONIO A. CESAR
ORIENTADOR

RESUMO

O presente trabalho objetivou buscar informações sobre a ocorrência das antocianinas em variedades de uvas tintas cultivadas no Brasil, colhidas em vinhedos industriais, na região vitivinícola de Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, durante a vindima de 1979.

As variedades foram reunidas em grupos, assim distribuídas:

- Variedades viníferas:

Bonarda ; Merlot ; Barbera D'Asti ; Gamay Beaujolais ; Cabernet Franc ; Canaiolo e Pinot Noir

- Variedades americanas:

Isabel ; Concord ; Bordô e Herbemont

- Variedades híbridas:

Seibel 2 ; Seibel 10096 e Seibel 5455

Das amostras destas variedades foram obtidos dois mostos. Um, para as determinações de Brix e acidez total, e outro, para o preparo dos extratos utilizados na separação cromatográfica e identificação das antocianinas.

A separação foi efetuada por cromatografia em camada delgada, unidimensional, em placas de 20 x 20 cm. Após o desenvolvimento dos cromatogramas verificou-se o aparecimento das bandas relativas às antocianinas 3-monoglicosídeo e 3,5-diglicosídeo, identificadas sob luz ultravioleta, (365 nm) e eluídas da placa para a determinação quantitativa por espectrofotometria a 520 nm. Os resultados foram expressos, respectivamente, em malvidina-3-monoglicosídeo (mg/l) e malvidina-3,5-diglicosídeo (mg/l).

As variedades viníferas não apresentaram antocianinas 3,5-diglicosídeo, comprovando portanto serem pertencentes à espécie *Vitis vinifera*.

Nas americanas e híbridas, verificou-se a presença das antocianinas 3-monoglicosídeo e 3,5-diglicosídeo.

Esses resultados confirmam que a espécie *Vitis vinifera* possui, como característica, somente antocianinas 3-monoglicosídeo, e que o caráter diglicosídeo das demais espécies do gênero *Vitis* é transmitido aos híbridos nos cruzamentos destas com *Vitis vinifera*.

O conhecimento da composição das diferentes variedades de uvas em antocianinas, permite a detecção de fraudes em vinhos de variedades viníferas, quando da mistura das mesmas com variedades não viníferas.

ANTHOCYANINS FROM VINIFERA, AMERICAN AND HYBRID GRAPE VARIETIES

WELLINGTON BRESSAN

MARCO ANTONIO A. CESAR
ADVISOR

SUMMARY

The objective of the present work was to gather informations on the occurrence of anthocyanins in varieties of red grapes grown in Brazil, harvested in Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, during the 1979's vintage.

The different grape varieties were distributed in groups, as follow:

- Vinifera varieties:

Bonarda ; Merlot ; Barbera D'Asti ; Gamay Beaujolais ; Cabernet Franc ; Canaiolo and Pinot Noir

- American varieties:

Isabel ; Concord ; Bordô and Herbemont

- Hybrid varieties:

Seibel 2 ; Seibel 10096 and Seibel 5455

From each of these varieties two different musts were obtained. One were used for Brix and total acidity determinations, and the other for the extract preparation to be used for chromatographic separation and identification of the anthocyanins.

The separation was performed by thin-layer monodimensional chromatography, in 20 x 20 cm plates. After the chromatograms development, bands relative to the anthocyanins 3-monoglicoside and 3,5-diglicoside were identified under U. V. light (365 nm), and then removed from the plates and eluted for quantitative determination by spectrophotometry at 520 nm. Results were expressed as malvidine-3-monoglicoside (mg/l) and malvidine-3,5-diglicoside (mg/l). The *Vinifera* varieties did not present 3,5-diglicoside, which confirm its identification as *Vitis vinifera*. The American and Hybrid varieties showed presence of 3-monoglicoside and 3,5-diglicoside anthocyanins. These results indicate that the species *Vitis vinifera* has, as characteristic, only 3-monoglicoside anthocyanins, while the diglicoside character of the other species of the genus *Vitis* is transmitted to the hybrids obtained by breeding them with *Vitis vinifera*.

Knowledge of the antocyanins content in grapes of different varieties may help in the detection of wine adulteration.

1 - INTRODUÇÃO

Uma das características dos sucos de uvas e vinhos tintos que mais influem sobre o seu grau de aceitação é a cor. A intensidade e tonalidade vermelha a roxa-violácea, são determinadas pela natureza e concentração dos componentes antociânicos, constituindo uma característica varietal.

A qualidade e o "bouquet" do vinho dependem muito da variedade de uva da qual é elaborado. Aquelas que produzem os melhores vinhos, são quase todas provenientes de variedades da espécie *Vitis vinifera*.

As variedades americanas possuem um "bouquet" denominado "foxado", devido principalmente ao antranilado de metila, o qual irá depreciar a qualidade do vinho elaborado.

As variedades híbridas, provenientes do cruzamento interespecífico das americanas com *Vitis vinifera*, podem levar consigo esse "bouquet", muitas vezes são percebido

por degustadores. Esses híbridos, apesar de transmitirem esse caráter indesejável, são produzidos a fim de se obter maior rusticidade e resistência a doenças e pragas.

Outra importância relativa ao conhecimento das antocianinas, diz respeito à sua influência na adstringência dos vinhos, que é um importante fator de qualidade. Vinhos que se apresentam altamente coloridos, provenientes de variedades de uvas muito tintas, tendem a ser mais adstringentes que os vinhos normais.

Os vinhos provenientes de variedades não viníferas tendem a ser de cor mais azulada.

A Alemanha e outros países têm desenvolvido métodos analíticos para distinguir vinhos de híbridos dos elaborados de viníferas, baseados na identificação das antocianinas, principalmente malvidina e outros diglicosídeos, com a finalidade de controlar a importação, exportação, produção interna e evitar fraudes.

Os métodos atuais de diferenciação entre vinhos tintos de variedades híbridas e de *V. vinífera*, são fundados na presença das antocianinas 3,5-diglicosídeo. Eles se baseiam na fluorescência dessas antocianinas à luz ultravioleta, (365 nm) após desenvolvimento dos cromatogramas.

As antocianinas conferem aos vinhos tintos a cor característica, além de intervir nas características gustativas e nas transformações durante o envelhecimento.

Considerando a importância do conhecimento das antocianinas e de suas influências na qualidade dos vinhos, bem como a ausência de dados sobre a ocorrência das mesmas nas variedades cultivadas no Brasil, desenvolveu-se um estudo inicial em variedades viníferas, americanas e híbridas cultivadas na região vitivinícola de Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS ANTOCIANINAS EM UVAS

O termo antocianina, derivado das palavras gregas "Anthos" (flor) e "Kyanos" (azul), introduzido por MARQUART, em 1835, designa os pigmentos responsáveis pelas colorações vermelha e azul, muito difundidas no reino vegetal, e constituem a matéria corante das uvas de variedades tintas, RAMOS e PEREIRA (1954) e RIBÉREAU-GAYON (1968). As antocianinas parecem ocorrer comumente dissolvidas no vacúolo celular, embora possam também ocorrer como massa amorfa ou finos grânulos, sendo esta a forma mais provável. Os grânulos representam as antocianinas adsorvidas ou combinadas com outras substâncias, JOSLYN e GOLDSTEIN (1964).

Os primeiros trabalhos sobre a composição e propriedades das antocianinas foram de Willstätter e Everest

(1913), citados por SINGLETON e ESAU (1969).

Do ponto de vista químico, são compostos polifenólicos, heterosídeos, que por hidrólise ácida liberam uma molécula de açúcar e um aglicônio, denominado antocianidina, a qual é um derivado do fenil-2 benzopirílio ou flavílio.

O cátion pirílio é um íon oxônio, onde o átomo de oxigênio tetravalente é carregado positivamente.

Em vez de considerar o íon flavílio como um oxônio, pode-se admitir que ele se comporta como um íon carbônio, onde a carga positiva está localizada no carbono 2. Esta carga corresponde à perda de um dos quatro elétrons perifê

ricos do átomo, que não mantêm mais que três ligações equivalentes, RIBÉREAU-GAYON (1968). Na prática, os autores utilizam, indiferentemente, ambas as formas.

As principais antocianidinas são: pelargonidina (I), cianidina (II), peonidina (III), delphinidina (IV), petudina (V) e malvidina (VI). Elas se diferem no número de grupos hidróxilos (OH) e metóxilos (OCH₃) e estado de glicosidação. A pelargonidina parece não ocorrer nas espécies do gênero *Vitis*.

Como os demais flavonóides, as antocianinas não existem na natureza sob a forma de aglicônio, mas na forma de heterosídeos, HARBORNE (1964). A glicosidação ocorre nas posições 3, 5 ou 7, sendo mais freqüente na posição 3, depois na 5 e, finalmente, na 7; entretanto, todas as antocianinas possuem uma molécula de açúcar na posição 3. Os açúcares que

ocorrem com maior frequência são monossacarídeos (hexoses e pentoses) como a glicose, frutose, galactose, arabinose, xilose e ramanose, sendo a glicose a mais frequente nas posições 5 e 7. Os açúcares conferem solubilidade e estabilidade às antocianinas.

De acordo com o número de moléculas de açúcar presentes, as antocianinas podem ser classificadas em monoglicosídeos, diglicosídeos e triglicosídeos. Em uvas, a ocorrência de triglicosídeos ainda não foi confirmada.

antocianina 3-diglicosídeo

antocianina 3,5-diglicosídeo

As variedades da espécie *V. vinifera* possuem como característica a presença de monoglicosídeos, enquanto que as

americanas e híbridas possuem mono e diglicosídeos. Essa distinção é importante para a seleção de variedades de uvas para a produção de sucos ou elaboração de vinhos, pois possuem características essenciais para cada utilização.

Quando a glicosidação passa de 3-monoglicosídeo para 3,5-diglicosídeo, há um aumento na coloração azul. A estabilidade dos pigmentos aumenta com o aumento dos grupos metoxilos e decresce com o aumento dos hidroxilos. A adição de grupos metoxilos aumenta a coloração violeta. Os grupos metoxilos, ligam-se ao radical fenil nas posições 3' e 5'.

As antocianinas podem ser também aciladas. A acilação é relativamente pouco comum entre as plantas, e restrita a poucas famílias e gêneros, porém, é freqüente em espécies do gênero *Vitis*. A mais comum é a acilação no radical hidroxilo, na posição 4 da molécula de glicose, com ácido p-cumárico, ácido cafeico e ácido ferúlico, ALBACH *et alii* (1965).

No estudo de quinze antocianinas aciladas, HARBORNE (1964) verificou que somente os ácidos p-cumárico, cafeico e ferúlico estão envolvidos na acilação. Entre as espécies do gênero *Vitis*, as da espécie *Vitis vinifera* possuem maior porcentagem de pigmentos acilados, porém, a variedade "Pinot Noir" (*V. vinifera*) não possui pigmentos acilados, que é uma característica da Região de Burgundy, na França, RANKINE *et alii* (1958).

Os grupos "acil" são particularmente lábeis. O ácido cafeico é mais freqüentemente hidrolisado que p-cumárico, mas ambos se hidrolisam rapidamente e aparecem como ácidos livres nos vinhos, WEBB (1962). Esses ácidos são mais estáveis em metanol.

A coloração apresentada pelas antocianinas varia em função do pH ; vermelha em meio ácido, tornam-se azuis em meio alcalino, contudo, apresentam uma forma incolor em meio levemente ácido. A modificação da cor entre pH 0,5 e pH 4,0 , é utilizada para a dosagem desses pigmentos. Em meio alcalino, a partir de pH 8,5 , as antocianinas são decompostas, devido a abertura do anel pirílio e por oxidação ; a reacidificação não regenera o anel rompido.

As transformações de cor ocorridas com as antocianinas em função do pH podem ser observadas no esquema a seguir, tomando-se como exemplo a cianidina-3-monoglicosídeo.

A estrutura inicial (a) corresponde a forma vermelha, em meio ácido ; uma outra, conhecida pela nome de pseudobase ou base carbinol (b) é incolor e aparece em meio levemente ácido, estando em equilíbrio com as bases anidras (c) e (d), correspondente à eliminação de uma molécula de água. Essa forma incolor é estável e a reacidificação regenera integralmente a forma vermelha. Em meio alcalino, a função fenol se ioniza, com formação de fenato (e) ou fenalato (f), mais estável que a base não dissociada, e desenvolvendo uma coloração azul. Entre pH 8,5 a 12,0 , pode aparecer uma tonalidade verde devido a combinação da coloração azul e amarela. Enfim, a um pH 12,0 , predomina a cor amarela, que corresponde à formação de uma calcona (g).

A estabilidade da cor desenvolvida pelas antocianinas também é influenciada por fatores como: dióxido de enxofre, ácido ascórbico, quelação com metais, enzimas, açúcares, temperatura e etc.

A utilização do dióxido de enxofre para a desinfecção do mosto a ser vinificado, previne o desenvolvimento da coloração marrom que ocorre no vinho durante o seu envelhecimento, porém, causa uma descoloração nas antocianinas. Essa reação não envolve hidrólise do glicosídeo, redução ou uma calcona intermediária. O íon negativo bissulfito liga-se diretamente ao íon flavílio positivo na posição 2 , ou talvez 4, produzindo flaveno 2 ou 4 ácido sulfônico, análogo à base carbinol. A reação é reversível e a posição de equilíbrio depende

de da concentração dos íons flavílio, bissulfito e hidrogênio. Abaixando o pH, desloca-se o equilíbrio para a forma colorida flavílio, porque a concentração do íon bissulfito é baixa, e tem menor efeito que o aumento do íon flavílio, JURD (1964). A reação de descoloração faz-se melhor a pH 3,0 que a pH 1,0. A adição de etanol também restitui a coloração, RIBÉREAU - GAYION (1959).

O dióxido de enxofre facilita a ruptura das células que contêm as antocianinas.

Segundo TIMBERLAKE e BRIDLE (1967), a hidroxilação na posição 7 ou 5, reduzindo a acidez do anel heterocíclico, também o torna menos suscetível ao ataque de reagentes nucleofílicos, como o dióxido de enxofre. As antocianinas 3,5-diglicosídeo não são somente mais ácidas que as 3-monoglicosídeo, mas também formam complexos mais fortes com o dióxido de enxofre.

O ácido ascórbico presente na composição do mosto de uva, embora tendo uma importância nutritiva, possui efeito prejudicial sobre as antocianinas, alterando a cor por elas desenvolvidas. A ação do ácido ascórbico é devido a sua oxidação, com produção de peróxido de hidrogênio, ou a sua presença na forma não oxidada, reação esta catalizada por íons ferro ou outros radicais peróxidos, SONDHEIMER e KERTESZ (1952).

A ação do peróxido de hidrogênio sobre as antocianinas, supõe-se ser uma reação destas com o peróxido, originando uma ruptura do anel heterocíclico, produzindo benzofuranos e outros derivados. O envolvimento do anel heterocíclico nesta reação explica não somente sua descoloração em frutas secas e vinhos, mas também que a oxidação depende da base carbinol, LUKTON *et alii* (1956).

A reação de oxidação da malvidina-3,5-diglicosídeo origina um produto cristalizado, a malvona, na qual a molécula de açúcar na posição 3 está ligada por uma ligação éster.

A ação oxidante do peróxido de hidrogênio é utilizada para a determinação da estrutura das antocianinas e, mais particularmente, por em evidência a existência da molécula glicosídica.

Por fusão alcalina das antocianinas origina-se ácido acético, um ácido aromático e um fenol ou éter fenólico, devido à destruição da sua estrutura molecular, propriedade esta de grande interesse, pois pode servir de recurso para a sua identificação. Com efeito, a cianidina, por exemplo, origina, por fusão, ácido protocatéquico. A delphinidina e petunidina, em idênticas condições, respectivamente, ácido gálico e metil-gálico, RIBÉREAU-GAYON (1968).

Os íons Cu , Al e Fe , encontrados nos sucos de uvas e vinhos, podem alterar a cor desenvolvida pelas antocianinas. A presença de íons metálicos, como alumínio e ferro, mudam a cor em direção ao azul. A formação desses complexos ocorre na natureza, envolvendo alguns pigmentos encontrados em variedades americanas.

A quelação verifica-se com os radicais hidroxilos livres do anel B em posição orto, e envolvem principalmente íons ferro e alumínio.

M = íon ferro ou alumínio

X = algum ânion

R₂ = radical, H, OH e OME

A formação de complexos de compostos fenólicos com metais, é muito utilizada na revelação dos cromatogramas, na dosagem dessas substâncias e, sobretudo, na realização dos espectros de absorção, RIBÉREAU-GAYON (1968).

A estrutura do complexo metálico formado com antocianinas, ou seja, o número de moléculas de antocianinas por íon metálico, varia em função do pH.

ASEN *et alii* (1972), indicam que a estabilidade das antocianinas pode ser devido à sua ligação com os metais.

Porém, SEGAL e ORANESCU (1978) verificaram que íons Fe^{3+} , na quantidade de 5 mg/l a 200 mg/l de suco de uva causavam imediatamente o escurecimento do suco, passando sua coloração para uma tonalidade amarronzada, com formação de um precipitado marrom. Quanto ao Cu^{2+} , o efeito foi pequeno, mesmo a 200 mg/l, embora um pequeno escurecimento fosse verificado.

Nas uvas maduras, as perdas de antocianinas e, conseqüentemente, perda da cor, têm sido atribuídas à atividade de enzimas, principalmente antocianase e polifenoloxidase. A antocianase hidrolisa mais rapidamente os galactosídeos e arabinosídeos que os glicosídeos e xilosídeos. A de origem fúngica, como *Aspergillus niger* e *Botrytis cinerea* hidroliza primeiramente os 3-monoglicosídeos, por serem mais simples. Os demais também são hidrolizados, porém, mais dificilmente. As antocianinas contendo ramanose são resistentes à hidrólise enzimática, HUONG (1955).

O efeito de fungos, como o *B. cinerea*, sobre a destruição das antocianinas tem sido atribuído à ação de enzimas oxidativas produzidas pelo fungo. Contudo, a reação de oxidação causada pelo referido fungo pode ocorrer na ausência de peroxidase ou fenolase, BOLCATO e LAMPARELLI (1962).

Na ação das polifenoloxidases é necessária a presença de catecol ou ácido clorogênico. A anidrobase é mais suscetível que a forma flavílio. A catecolase oxida o catecol

a quinona, que oxida as antocianinas não enzimicamente, a compostos incolores. As polifenoloxidasas, apesar de degradarem as antocianinas, podem contribuir para o "bouquet" do vinho durante o seu envelhecimento, devido a formação de aldeídos voláteis resultantes da inter-reação dos aminoácidos e quinonas. As fenolases não atacam a malvidina, pois ela não possui o grupo o-difenil livre, REYNOLDS (1965).

Outras enzimas como peroxidases e calatasas, parecem estar relacionadas com a maturação das uvas, ou seja, hã uma relação entre aumento da catalase e formação de antocianinas.

Como foi visto anteriormente, os açúcares ligados às antocianinas conferem-lhes estabilidade ; porém, os demais açúcares não ligados a esses pigmentos podem originar compostos como furfural e hidroximetil-furfural, derivados , respectivamente, de pentoses e hexoses, os quais podem produzir a degradação das antocianinas. Esse processo ainda não foi bem definido, MARKAKIS *et alii* (1957). O aumento da produção desses compostos é uma das razões pelas quais, açúcar a elevadas temperaturas diminui a retenção das antocianinas.

As antocianinas presentes nos sucos de uvas são mais estáveis que isolados em buffer no pH do suco, DARAVIN-GAS e CAIN (1965).

Os tratamentos térmicos utilizados na elaboração de vinhos e sucos têm efeito na degradação das antociani-

nas. As que possuem duas ligações monoglicosídicas são mais estáveis que as que possuem apenas uma monoglicosídica.

Os estudos de DÍAZ *et alii* (1976), sobre a estabilidade das antocianinas ao calor em uvas viníferas e híbridas, indicam que o pH no intervalo de 3,15 a 3,60 não influi de forma definida sobre a degradação ao calor. Porém, a um intervalo mais amplo (pH 1,0 a 5,0), quanto menor o pH, maior a retenção da cor. Dadas as pequenas diferenças observadas, concluíram que o pH não altera a degradação dos pigmentos, quando os sucos são esterilizados. À temperatura de 90°C, as perdas dos monoglicosídeos (25,4%) foram superiores às dos diglicosídeos (6,3%).

O grau de hidroxilação da molécula também afeta a estabilidade ao calor. Peonidina e malvidina são mais estáveis, pois possuem menor número de hidroxilos.

O aumento de grupos metoxilos também aumenta a estabilidade, HRAZDINA *et alii* (1970).

FLORA (1976), determinando a estabilidade das antocianinas aos tratamentos térmicos 71°C (2 h), 96°C (1 h), 96°C (2 h), em *Muscadinea grapes*, *V. rotundifolia* Michx, verificou que a delphinidina-3,5-diglicosídeo foi a que mais degradou, seguida da petunidina, cianidina, malvidina e peonidina.

PONTING *et alii* (1960), estudando a degradação térmica das antocianinas em sucos de uvas, verificaram que existe uma relação linear entre o logaritmo do tempo e a tempe

ratura necessária para a destruição de 10% das antocianinas.

As reações que envolvem a degradação térmica das antocianinas ainda não são conhecidas. Supõem-se haver uma hidrólise na ligação 3-glicosídeo ou hidrólise no anel pirilí - lio, com formação de calcona.

A destruição do pigmento pelo calor é grandemente afetada pelo pH e conteúdo de açúcar, TINSLEY e BOCKIAN (1960).

Durante a fermentação, as antocianinas parecem ter uma ação inibidora sobre os microrganismos que dela participam, tornando as fermentações mais demoradas e mesmo incompletas. Isto se verifica em mostos provenientes de variedades de uva muito tintas, POWERS *et alii* (1960).

ROSENSTIEHL (1902) verificou em suco de uva preparado com poucos sólidos e alta concentração de antocianinas, que as células de *Saccharomyces cerevisiae* não morriam, mas havia uma inibição na sua capacidade fermentativa. As células inibidas apresentavam-se muito coloridas. A inibição supõe-se ser devido a adsorção do pigmento às células da levedura.

Em mostos com teores elevados de antocianinas, deve-se fazer uma adaptação do fermento antes da fermentação, FLANZY (1935).

Apesar das antocianinas terem uma ação inibidora sobre as leveduras, outras leveduras fazem a conversão das antocianinas em compostos incolores e produtos insolúveis, por

reação do aldeído produzido pelos mesmos. Esse fenômeno foi verificado por CANTARELLI (1955) em vinhos tintos, os quais continham leveduras aeróbias.

A maior influência das leveduras sobre as antocianinas é na fase de pós-fermentação, onde as células mortas se sedimentam e arrastam as antocianinas por adsorção, diminuindo assim a intensidade da coloração. O efeito descolorante das leveduras é proporcional à sua capacidade de fermentação.

2.2 - ANTOCIANINAS EM DIFERENTES GRUPOS DO GÊNERO *Vitis*

Willstätter e Zollinger (1915 - 1916), citados por SINGLETON e ESAU (1969), verificaram que os pigmentos das uvas tintas das variedades européias (*Vitis vinifera*) eram constituídos de uma substância, cuja fórmula molecular descreveu como $C_{23}H_{25}O_{12}Cl$, cristalizada como cloreto. A essa substância denominou enina, e era formada de uma molécula de enidina e uma de açúcar, identificado como glicose. Também observaram que em variedades americanas em adição à enina, havia uma quantidade de pigmentos com duas moléculas de açúcar, diglicosídeos, concluindo que a matéria corante das uvas de variedades americanas eram diferentes das variedades européias.

Em complementação aos estudos efetuados, verificaram que em *Vitis riparia* Michx. e *Vitis hederacea* (Ampe-

loopsis quinquefolia Michx.) , os pigmentos eram idênticos à enina das variedades européias, mas diferiam destas devido a menor quantidade de grupos metoxilos.

As relações entre as várias espécies do gênero *Vitis*, quanto à sua matéria corante, foram estudadas por RIBEE REAU-GAYON *et alii* (1955). Essas relações são apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1 - Matéria corante das várias espécies do gênero

Nome das Espécies	Porcentagens		
	Monoglicosídeos	Diglicosídeos	Não identificados
<i>V. riparia</i>	32	57	11
<i>V. rupestris</i>	14	74	12
<i>V. lincecumii</i>	65	8	27
<i>V. aestivalis</i>	87	9	4
<i>V. coriacea</i>	88	8	4
<i>V. labrusca</i>	84	4	12
<i>V. arizonica</i>	74	21	5
<i>B. berlandieri</i>	93	5	2
<i>V. rubra</i>	91	7	2
<i>V. manticola</i>	97	-	3
<i>V. cordifolia</i>	84	9	7
<i>V. vinifera</i>	77	0	23

Os resultados encontrados permitiram as seguintes conclusões:

- As variedades *V. vinifera* não contêm diglicosídeos, mas algumas variedades americanas as contêm em pequena porcentagem, como a *Vitis berlandieri*.
- A presença de diglicosídeos é caráter de *V. riparia* e *V. rupestris*, sendo o caráter diglicosídeo dominante, e transmitido aos híbridos nos cruzamentos com *V. vinifera* permitindo assim uma diferenciação entre variedades *V. vinifera* e híbridas.
- Na *V. labrusca*, a maioria dos pigmentos são monoglicosídeos, com pequena quantidade de diglicosídeos.

As diferentes espécies do gênero *Vitis*, baseadas na sua origem, podem ser divididas em grupos, RIBÉREAU GAYON (1964), Tabela 2.

Considerações de FEDUCHY (1972) sobre as antocianinas, revelaram que a malvidina-3-monoglicosídeo é o principal constituinte da matéria corante das espécies *V. vinifera*, e malvidina-3,5-diglicosídeo, de *V. labrusca*.

Os conceitos descritos anteriormente esclarecem a distribuição qualitativa e quantitativa das antocianinas em diferentes espécies do gênero *Vitis*. Para facilidade da exposição e melhor coordenação deste trabalho, a revisão bibliográfica será feita em sub-capítulos.

TABELA 2 - Distribuição das espécies do gênero *Vitis* em grupos (RIBÉREAU-GAYON, 1964).

Espécies		
Americanas	Asiáticas	Europeias
<i>V. riparia</i>	<i>V. amurensis</i>	<i>V. vinifera</i>
<i>V. rupestris</i>	<i>V. coignetiae</i>	
<i>V. linecumii</i>	<i>V. flexuosa</i>	
<i>V. aestivalis</i>	<i>V. romaneti</i>	
<i>V. coriacea</i>	<i>V. pagnuccii</i>	
<i>V. labrusca</i>	<i>V. lanata</i>	
<i>V. arizonica</i>	<i>V. pedicellata</i>	
<i>V. berlandieri</i>		
<i>V. rubra</i>		
<i>V. monticola</i>		
<i>V. cordifolia</i>		

2.2.1 - VARIEDADES VINÍFERAS

No estudo das antocianinas da variedade Forogina, LEVY *et alii* (1931) compararam seus principais pigmentos com a malvidina-3-monoglicosídeo sintético. Os resultados foram que a malvidina-3-monoglicosídeo era a principal antocianina, com traços de delphinidina e petunidina-3-monoglicosídeo.

Na variedade Hanefoot, uma variedade da África do Sul, ROBINSON e ROBINSON (1932) identificaram o pigmento cianidina-3-monoglicosídeo e, na variedade Calmar, a malvi

dina-3-monoglicosídeo. Não foi detectada nestas variedades a presença de diglicosídeos, sendo elas classificadas como pertencentes às *Vitis vinifera*.

RIBÉREAU-GAYON (1953), nas variedades viníferas Cabernet Sauvignon e Merlot, isolou dez pigmentos, verificando que eles eram semelhantes em ambas. As variedades *V. vinifera* são geneticamente caracterizadas por monoglicosídeos de 4 ou 5 antocianinas, sendo a malvidina o pigmento presente em maior quantidade.

Os pigmentos da variedade vinífera Zinfandel foram isolados e separados por cromatografia, sendo observadas 14 bandas cromatográficas. Os pigmentos em oito bandas foram identificados como malvidina, petunidina, delphinidina e seus monoglicosídeos. As demais bandas, devido às suas fracas colorações, não foram identificadas, porém, evidenciou-se a presença de traços de outros monoglicosídeos. A hidrólise das antocianinas identificadas permitiu a determinação do açúcar a elas ligado como sendo glicose, STASUNAS (1956).

RANKINE *et alii* (1958) estudaram os pigmentos de 55 variedades de uvas viníferas. Em 42 delas, os pigmentos eram os mesmos, com uma pequena variação em sua quantidade. As diferenças de um modo geral foram qualitativas e quantitativas. As quantidades dos pigmentos presentes nas diferentes variedades são indicativas da intensidade da cor do vinho produzido desta variedade, embora não sejam diretamente relacionados. O número de pigmentos detectados por banda varia -

ram de dois para as variedades Emperor e Tokay , a nove para variedade Cinsaut. A variedade Barbera apresentou seis pigmentos. 'Cabernet Franc' apresentou sete bandas ; 'Merlot' sete bandas ; 'Pinot Noir' quatro bandas e 'Gamay Beaujolais' cinco bandas. Em todas essas variedades o pigmento encontrado em maior quantidade foi o da banda 5 , com uma coloração roxa. Também observaram que vinhos produzidos com a mesma variedade Pinot Noir, provenientes da França e Califórnia, possuíam diferentes colorações, embora essas variedades possuíssem as mesmas bandas. Todas as bandas identificadas continhas somente pigmentos monoglicosídeos.

A presença de oito bandas cromatográficas de antocianinas monoglicosídeo foi verificada por ALBACH *et alii* (1959), no estudo de 125 variedades viníferas. Também a banda 5 estava presente em maior quantidade, em um maior número de variedades, mas a banda 2 predominou em treze variedades, entre elas 'Tinta Pinheira'. No presente estudo, a banda 8 apareceu em pequeno número de variedades, sendo sua presença questionável. Esses resultados permitiram selecionar variedades como fontes para os diferentes pigmentos 'Saint Macaire' (banda 1) ; 'Tinta Flamusco' (banda 12) ; 'Petite Verdot' (banda 3) ; 'Antibo' (banda 4) ; 'Emile Royal' (banda 5) ; 'Rozovii Kishmish' (banda 6) ; 'Neiretta' (banda 7) e 'Parreira' (banda 8). Os valores dos Rf das bandas decrescem da banda 1 para a banda 8.

BERGERET (1961), pesquisando novos métodos para a separação e identificação das antocianinas, como variante do método proposto por RIBÉREAU-GAYON, para melhor distinguir vinhos de variedades híbridas e viníferas, verificou que as uvas viníferas contêm somente monoglicosídeos.

Na variedade Frisa (*V. vinifera*), proveniente de vinhedos da Califórnia, ALBACH *et alii* (1963), identificaram todos os pigmentos dessa variedade como sendo monoglicosídeos, e que a peonidina-3-monoglicosídeo era o pigmento encontrado em maior quantidade, sendo a glicose o açúcar predominante. Essa variedade mostrou ser uma das principais fontes de peonidina-3-monoglicosídeo.

As variedades viníferas Flame Tokay , Emperor e Red Malaga , são muito cultivadas no vale Central da Califórnia. A variedade Flame Tokay possui uma cor vermelha mais intensa que as demais. AKIYOSHI *et alii* (1963) estudaram os seus pigmentos, e os açúcares ligados aos mesmos. Na variedade Flame Tokay , 88% dos seus pigmentos são constituídos de cianidina-3-monoglicosídeo e 7% de peonidina, não sendo identificado a malvidina-3-monoglicosídeo. A 'Emperor' apresentou 51% dos seus pigmentos como peonidina-3-monoglicosídeo, 16% como malvidina-3-monoglicosídeo e 10% como cianidina-3-monoglicosídeo. A 'Red Malaga' possui 60% dos seus pigmentos como cianidina-3-monoglicosídeo, 24% como peonidina-3-monoglicosídeo e 2% como malvidina-3-monoglicosídeo. A identificação dos açúcares ligados aos segmentos foi realizada por hidrô

lise ácida das antocianinas, e identificados como glicose, sendo o ponto de ligação na antocianidina, o carbono 3.

SOMAATMADJA e POWERS (1963) isolaram e identificaram os pigmentos da variedade vinífera Cabernet Sauvignon, como delfinidina, petunidina, malvidina-3-monoglicosídeo e malvidina-3-monoglicosídeo acilada com ácido clorogênico. A malvidina-3-monoglicosídeo foi encontrada em maior quantidade. O açúcar isolado foi somente a glicose. O número de bandas foram sete e nas bandas 1, 2, 3, 4 e 5 encontram-se o maior número de pigmentos. A banda 7 não mostrou coloração, mas uma fluorescência à luz ultravioleta, similar ao ácido clorogênico.

Em estudos sobre os pigmentos da variedade vinífera Tinta Pinheira, proveniente de Solano Country, vinhedo experimental da Universidade da Califórnia, ALBACH *et alii* (1965), identificou-os através de seus Rf como 3-monoglicosídeo de malvidina, peonidina, delfinidina e petunidina, acilados com ácido p-cumárico e ácido cafeico. Também verificaram a presença dos mesmos pigmentos monoglicosídeos sem acilação. Os açúcares foram identificados por hidrólise ácida dos pigmentos monoglicosídeos, como glicose.

Na variedade Barlinka, KOEPPEN e BASSON (1966), identificaram as antocianinas como peonidina, delfinidina, petunidina e malvidina-3-monoglicosídeo e éster-p-cumárico de malvidina-3-monoglicosídeo. Não foi detectada a presença de diglicosídeo. Baseados na presença de monoglicosí -

deos, classificaram essa variedade como pertencente às viníferas.

ROBINSON *et alii* (1966), verificaram na variedade Cabernet Sauvignon que 61% dos seus pigmentos era constituído de malvidina-3-monoglicosídeo, e 18% de delphinidina-3-monoglicosídeo.

Os pigmentos da variedade Shiraz do Vale Bo-rassa, sul da Austrália, foram estudados por SOMERS (1966). As antocianinas isoladas foram: 3-monoglicosídeo de delphinidina, petunidina, malvidina e peonidina, junto com seus derivados acilados. O pigmento encontrado em maior quantidade foi a malvidina-3-monoglicosídeo, responsável por 70% da cor. Nenhum traço de diglicosídeo foi encontrado. A ausência de 3,5 diglicosídeo está de acordo com a teoria de que 3-monoglicosídeo é caráter das antocianinas de *V. vinifera*. A glicose foi o único açúcar encontrado. Os ácidos ligados aos açúcares foram p-cumárico e cafeico. As antocianinas delphinidina-3-monoglicosídeo e petunidina-3-monoglicosídeo acilados com esses ácidos apareceram apenas como traços, sendo as principais: malvidina-3-monoglicosídeo acilada com ácido cafeico e, peonidina-3-monoglicosídeo, acilada com p-cumárico.

A matéria corante de cinco variedades de uvas viníferas, Cabernet Franc, Gamay Beaujolais, Gamay Chardonnais, Gamay Fréau e Groslot, cultivadas em Anjou, foi avaliada por PUISSANT e LEÓN (1967). A estimativa do teor de antocianinas poderá dar uma orientação quanto à coloração do vi

nho elaborado com as referidas variedades. Entre as variedades estudadas, a 'Gamay Fréau' (2.820 mg/kg) e 'Gamay Chaude-noy' (1.610 mg/kg) poderiam ser utilizadas para vinhos tintos, enquanto que 'Cabernet Franc' (890 mg/kg) e 'Groslot' (1.190 mg/kg) , dariam um vinho tinto com menor coloração, e 'Gamay Beaujolais' (450 mg/kg), um vinho rosê.

BOUBALS *et alii* (1968), em variedades de uvas viníferas, estudaram as suas colorações, quando maduras, relacionando-as com suas diferentes antocianinas, e constataram que:

- A coloração azulada ou preta da película das bagas é devido aos pigmentos monoglicosídeos, delfinidina, petunidina, e malvidina, sendo esta a mais importante. Esses pigmentos são responsáveis por 70% da coloração, como ocorre nas variedades Carignane , Pinot , Grenache , Terret , Pirovano , Alicante Bouschet e Négrette.
- Os pigmentos que desenvolvem uma coloração vermelha são do ponto de vista químico, os monoglicosídeos de cianidina e peonidina, encontrados em maiores quantidades nas variedades Cardinal , Molinera e Muscat Rouge.
- A coloração rosada da película encontrada nas variedades Chasselas Violet e Muscat Rouge, é devida, em 70% , aos monoglicosídeos de cianidina.
- O número de antocianinas é muito variável, sendo que 3 a 6 nas rosadas e 11 nas pretas.

CONRADIE e NEETHLING (1968) estudaram a distribuição das antocianinas na variedade de uva Barlinka. Oito bandas foram observadas e divididas em dois sub-grupos: as quatro bandas com menor Rf são: 3-monoglicosídeo de delphinidina, petunidina, malvidina e peonidina; enquanto as quatro outras são os mesmos monoglicosídeos, porém, acilados com ácidos p-cumárico e cafeico.

Os pigmentos da variedade Tinto Cão, considerada uma das mais importantes da região do Douro, em Portugal, pela produção de vinho de alta qualidade, cor e estabilidade, foram estudados por LIAO e LUH (1970).

As antocianinas foram identificadas como sendo malvidina, peonidina, cianidina, petunidina-3-monoglicosídeo, petunidina-3-monoglicosídeo acilada com ácido cafeico, malvidina-3-monoglicosídeo acilada com ácido p-cumárico, peonidina-3-monoglicosídeo acilada com ácido cafeico. Malvidina-3-monoglicosídeo e malvidina-3-monoglicosídeo acilada com p-cumárico foram as antocianinas presentes em menor quantidade. O açúcar ligado aos pigmentos foi identificado como glicose.

MARTINIERE e RIBÉREAU-GAYON (1973), estudaram a influência do calor sobre a extração da matéria corante das variedades viníferas Merlot e Cabernet Sauvignon. O aquecimento foi efetuado a 70°C, durante uma hora e meia, a fim de se obter uma significativa dissolução da matéria corante. O total de antocianinas foi medido pela diferença das densidades ópticas a 520 nm a duas faixas de pH (0,6 e 3,5). As quan

tidades de antocianinas obtidas foram: para a variedade Merlot, de 600 a 620 mg/l e, para a 'Cabernet Sauvignon', de 436 a 472 mg/l, respectivamente, extração a frio e prensagem e extração a quente e prensagem, havendo um pequeno aumento dos pigmentos com a extração a quente.

PHILIP (1974), em estudos das antocianinas da variedade Beauty Seedless, a qual possui boas características para a elaboração de vinhos, isolou e identificou seus pigmentos como 3-monoglicosídeo de delphinidina, petunidina, malvidina, peonidina, além de malvidina-3-monoglicosídeo, acilada com ácido p-cumárico. O açúcar identificado foi a glicose. A malvidina constituiu 73% do total das antocianinas. O total das antocianinas expressas em malvidina-3-monoglicosídeo foi de 62 mg/100 g de uvas ou 770 mg/l de suco.

Na variedade *V. vinifera* Barbera, SAKALLARIDES e LUH (1974), isolaram e identificaram as suas antocianinas como: 3-monoglicosídeo de delphinidina, petunidina, cianidina-3-monoglicosídeo, acilada com ácido cafeico, e malvidina-3-monoglicosídeo, acilada com ácido p-cumárico. O açúcar presente foi identificado como glicose. O citado trabalho indicou que essa variedade só possui monoglicosídeos.

Os pigmentos de 16 variedades de uvas viníferas da Espanha foram determinados qualitativa e quantitativamente por DÍAZ *et alii* (1975.b). Os pigmentos foram identificados por cromatografia em camada delgada, baseados no valor de seus R_f, como 3-monoglicosídeo de delphinidina, petunidina,

malvidina, peonidina e cianidina. A determinação quantitativa dos pigmentos totais foi expressa em malvidina monoglicosídeo (mg/l).

Os autores observaram que o conteúdo total de antocianinas monoglicosídeo no suco da variedade Tintorera (1357 mg/l) é muito superior ao das outras variedades. Isto é devido provavelmente, a que essa variedade possui as antocianinas na película e na polpa, o que facilita sua incorporação ao suco. Os sucos das variedades Crujidera e Valenci Negro apresentaram os teores mais baixos (197 e 182 mg/l, respectivamente). A variedade Bobal (553 mg/l) apresenta grandes possibilidades de aplicação industrial, devido às suas propriedades organoléticas, sendo o seu teor médio de antocianinas suficiente para comunicar ao vinho uma coloração muito aceitável.

DÍAZ *et alii* (1976), estudando a estabilidade dos pigmentos antociânicos, nas variedades viníferas Bobal e Tempranillo, extraíram os pigmentos como no trabalho anterior DÍAZ *et alii* (1975.b), e verificaram que o suco da variedade Bobal contém 544 mg/l de antocianinas totais, e o da 'Tempranillo', 520 mg/l, expressos em malvidina-3-monoglicosídeo.

BISSON e RIBÉREAU-GAYON (1978) determinaram os teores de antocianinas em variedades de uvas viníferas, provenientes de duas regiões, Marseillan-Plage e Cosne-sur-Loire. As variedades foram: Pinot, Gamay, Côt, Merlot e Cabernet Franc, constatando os seguintes teores: (Tabela 3):

TABELA 3 - Teor de antocianinas em variedades viníferas
(BISSON e RIBÉREAU-GAYON, 1978)

Marseillan-Plage		Cosne-sur-Loire	
Variedades	Concentração Antocianinas (mg/kg)	Variedades	Concentração Antocianinas (mg/kg)
Pinot 19331	543	Pinot 158	579
Gamay 23026	952	Gamay 23026	677
Cot 32711	1.258,2	Cot I	914
Merlot 32602	844	Merlot 7	730
C. Franc 32406	702	C. Franc 9	610

Pelos resultados obtidos, os autores constataram que as condições do meio onde a variedade é cultivada, influi no teor das antocianinas. Em climas pouco favoráveis à maturação, os teores de antocianinas são deficientes.

A HPLC (cromatografia líquida de alta pressão) foi utilizada por WULF e NAGEL (1978), na separação dos pigmentos da variedade vinífera Cabernet-Sauvignon. As antocianinas identificadas foram: cinco monoglicosídeos, acilados com ácido p-cumárico e malvidina-3-monoglicosídeo acilada com ácido cafeico. A antocianina malvidina-3-monoglicosídeo foi responsável por 70% do total dos pigmentos.

2.2.2 - VARIEDADES AMERICANAS

A matéria corante das variedades Norton (*V. aestivalis* x *V. labrusca*), Concord (*V. labrusca*) e Clinton foi pesquisada por ANDERSON (1923) e ANDERSON e NABENHAUER (1924). As antocianinas encontradas nessas variedades foram idênticas, e sua composição semelhante à enina, mas diferiam desta quando em reação com cloreto fêrrico, desenvolvendo uma intensa coloração azul, como encontrado por Willstater e Zollinger (1915 - 1916), citados por SINGLETON e ESAU (1969), em antocianinas obtidas de *Vitis riparia*. As antocianinas diferiam daquelas pela baixa porcentagem de grupos metoxilos, ou seja, a enina das *V. vinifera* continha dois grupos metoxilos, enquanto que as isoladas possuem apenas um. Um outro pigmento era idêntico à enina, em composição e coloração, em cloreto fêrrico. Pela hidrólise ácida dos pigmentos foi identificado o açúcar como sendo glicose. A matéria corante consiste principalmente de monoglicosídeos cuja fórmula é $C_{23}H_{25}O_{12}Cl$, porém, evidenciou-se uma pequena quantidade de diglicosídeos.

A variedade Ives foi classificada como uma *V. labrusca*, com uma possível mistura de *V. aestivalis*. Os pigmentos dessa variedade são semelhantes aos encontrados na variedade Concord (*V. labrusca*). Foram identificados 3-monoglicosídeo de dimetoxi-delfinidina, monoglicosídeo de mono-metoxi-delfinidina e algum derivado de ácido p-hidroxicinâmico. A prova de que essa variedade era uma *V. labrusca* foi o apare

cimento da coloração azul escura devido a reação dos glicosídeos com cloreto férrico, SHRINER e ANDERSON (1928).

SASTRY e TISCHER (1952) pesquisaram a natureza dos pigmentos solúveis em água da variedade Concord. O pigmento encontrado em maior quantidade parece ter uma fórmula $C_{23}H_{25}O_{12}Cl$, indicando ser malvidina-3-monoglicosídeo. O açúcar presente é a glicose. Outros pigmentos monoglicosídeos e diglicosídeos foram verificados. As três bandas cromatográficas foram identificadas como: diglicosídeos, a mais baixa; monoglicosídeos, a intermediária; e a última, parece ser de açúcares livres de antocianidinas. A coloração da banda de diglicosídeos parece ser mais azul, enquanto que as do monoglicosídeos, mais vermelha.

INGALSBE *et alii* (1963), constataram a presença de 14 antocianinas na variedade Concord (*V. labrusca*). Os pigmentos encontrados em maiores quantidades foram: delphinidina e cianidina-3-monoglicosídeo e seus ésteres, e pequena quantidade de malvidina e peonidina. Também verificou-se a presença de antocianinas aciladas.

CLORE *et alii* (1965), estudando a composição dos mostos da variedade Concord e Saperavi, verificaram seus teores de antocianinas totais como sendo de 1.100 mg/kg e 1.280 mg/kg, respectivamente.

As características espectrofotométricas e identificação das antocianinas da variedade Concord proveniente de diferentes regiões da Califórnia foram estudadas por RICE

(1965), em três anos sucessivos (1961 - 1962 - 1963), como base para determinar possíveis adulterações do suco dessa variedade. As diferentes amostras estudadas apresentaram maior variação na intensidade do pigmento entre regiões, que as provenientes de uma mesma região, porém, todas aumentaram seus teores até o ponto de maturação. As análises espectrofotométricas, no período de três anos, revelaram que, embora o comprimento de onda de máxima absorbância foi mais ou menos uniforme entre as diferentes amostras, o seu pico máximo variou grandemente, apresentando uma transmitância entre 26,5% e 64%. Como resultado da variabilidade espectral e variação na intensidade do pigmento entre as amostras de diferentes regiões, concluíram que pode ser detectada adulteração do suco da referida variedade por análises espectrofotométricas. Os pigmentos identificados por cromatografia foram: monoglicosídeos de delphinidina, petunidina, cianidina, malvidina, peonidina ; monoglicosídeos acilados de cianidina, delphinidina ; diglicosídeos de delphinidina, petunidina, cianidina, malvidina, peonidina ; diglicosídeos acilados de malvidina, peonidina, delphinidina, e petunidina.

MATTICK *et alii* (1967) propuseram um método para a detecção da adulteração do suco de uva 'Concord' por misturas de sucos de outras variedades ou extratos. A separação foi baseada inicialmente na solubilidade em água. A ordem de desenvolvimento cromatográfico da origem foi monoglicosídeo a cilado, monoglicosídeo, diglicosídeo acilado e diglicosídeo.

Os vários componentes foram separados de acordo com sua solubilidade em água. Delfinidina, a menos solúvel, foi a banda mais baixa, enquanto que a malvidina mais solúvel, foi a mais alta. Os outros componentes foram delfinidina, petunidina, cianidina, peonidina e malvidina. Observou-se também que quando adulterado por variedades viníferas, há um aumento nos monoglicosídeos e, por variedades híbridas ou outras americanas, aumenta monoglicosídeos e diglicosídeos.

2.2.3 - VARIEDADES HÍBRIDAS

ANDERSON (1924), estudou os pigmentos das variedades híbridas Seibel 78 e Seibel 2044, cristalizados como picrato e convertidos a cloreto. As antocianinas identificadas correspondem a fórmula

não dando reação com o cloreto férrico, diferindo assim dos pigmentos das variedades americanas. A composição é idêntica ao cloreto de enina, constituído de um éster dimetil de delfinidina, porém, com menor número de radicais metoxilos. Foi observada a presença de algum éster monometil de delfinidina. O açúcar identificado foi a glicose.

Os pigmentos da variedade Izabella um híbrido *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera*, foram identificados por ANDERSON e NABENHAUER (1926). As antocianinas foram extraídas

como picrato. Verificou-se que o pigmento que ocorre nessa variedade é idêntico ao encontrado na variedade "Seibel", e a enina das variedades européias, porém, já se verificou a presença de algum diglicosídeo. A composição do glicosídeo foi determinada como

O pigmento não dá reação de cloreto fêrrico, diferindo neste aspecto das variedades americanas Concord , Norton e Clinton.

A diferença entre as antocianinas que ocorrem numa variedade americana pura, e os híbridos 'Seibel', é devido a maior porcentagem dos grupos metoxilos nos pigmentos isolados nas variedades híbridas, SHRINER e ANDERSON (1928).

Na identificação dos pigmentos da variedade Hunt Muscadine, um híbrido do Sul dos Estados Unidos, BROWN (1940), verificou que seu pigmento diferia dos encontrados em *Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*. O pigmento então isolado foi identificado como sendo 3,5-diglicosídeo de 3-o-metil delphinidina, chamado de muscadina. O pigmento isolado desenvolve uma coloração violeta com o cloreto fêrrico. O açúcar foi identificado como glicose.

As antocianinas da variedade híbrida Rubired , proveniente de vinhedos da Califórnia, foram estudadas por SMITH e LUH (1965). O açúcar identificado após hidrólise ácida foi a glicose, estando ligados na posição 3 e 3,5-diglicosídeo. Os pigmentos foram identificados pelo valor de seus Rf. Na ordem decrescente de concentração, os pigmentos foram:

malvidina-3,5-diglicosídeo, peonidina-3-monoglicosídeo, delfinidina-3-monoglicosídeo, petunidina-3-monoglicosídeo, delfinidina-3,5-diglicosídeo, petunidina-3-monoglicosídeo, petunidina-3,5-diglicosídeo, malvidina-3,5-diglicosídeo acilada com p-cumárico, malvidina-3-monoglicosídeo acilada com ácido p-cumárico, peonidina-3-monoglicosídeo acilada com p-cumárico e delfinidina-3,5-diglicosídeo.

CHEN e LUH (1967), estudaram os pigmentos da variedade híbrida Royalty (*V. vinifera*, *V. riparia* e *V. rupestris*) proveniente de vinhedos da Califórnia. As antocianinas identificadas foram malvidina-3,5-diglicosídeo, malvidina-3,5-diglicosídeo acilada com ácido p-cumárico, malvidina-3-monoglicosídeo acilada com ácido p-cumárico, malvidina-3-monoglicosídeo, peonidina-3-monoglicosídeo acilada com ácido p-cumárico, peonidina-3,5-diglicosídeo acilada com ácido p-cumárico, peonidina-3,5-diglicosídeo, malvidina-3,5-diglicosídeo acilada com ácido cafeico. Outros pigmentos não puderam ser identificados devido a sua baixa concentração. O açúcar foi identificado como glicose. Os ácidos ligados aos açúcares foram ácido p-cumárico e cafeico.

PUISSANT e LEÓN (1967), avaliaram a matéria corante da variedade híbrida Bacco, cultivada em Anjou. O total de antocianinas encontrado foi 2.000 mg/kg, considerando-a como uma variedade muito tinta.

As antocianinas das variedades híbridas Edo e Señorito foram estimadas por DÍAZ *et alii* (1975.a,c). Os pig

mentos dessas duas variedades foram identificadas como: malvidina-3-monoglicosídeo, peonidina-3-monoglicosídeo e petunidina-3-monoglicosídeo, além de 3,5-diglicosídeo de malvidina, e peonidina. Na análise quantitativa dos pigmentos totais verificou-se que a concentração na variedade Edo foi de 604,4 mg/l de antocianinas monoglicosídeo e 513 mg/l de antocianinas diglicosídeo. A variedade Señorito apresentou os valores 254,8 mg/l para os monoglicosídeos e 447 mg/l para os diglicosídeos. As concentrações das antocianinas monoglicosídeo foram expressas em malvidina-3-monoglicosídeo e, para as diglicosídeo, como malvidina-3,5-diglicosídeo.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - MATERIAL

O material utilizado na execução do presente trabalho constituiu-se de diferentes variedades de uvas coletadas durante o vindima de 1979, na região vitivinícola de Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul.

3.1.1 - MATÉRIA PRIMA

As matérias-primas utilizadas foram variedades de uvas tintas, divididas em grupos, ou seja, viníferas, (*Vitis vinifera*), americanas e híbridas.

A distribuição por grupos foi a seguinte:

- Variedades viníferas:
Bonarda ; Merlot ; Barbera D'Asti ; Gamay Beaujolais ;
Cabernet Franc ; Canaiolo e Pinot Noir.
- Variedades americanas:
Isabel ; Concord ; Bordô e Herbemont.
- Variedades híbridas:
Seibel 2 ; Seibel 10096 e Seibel 5455.

3.1.2 - MOSTOS

Os mostos foram obtidos pela prensagem das uvas após sua retirada dos cachos, conforme descrito em 3.2.2.

3.2 - MÉTODOS

3.2.1 - MÉTODOS DE AMOSTRAGEM

As amostras foram coletadas em vinhedos industriais, onde se procurou condições semelhantes de cultivo, solo e clima.

A amostragem foi efetuada ao acaso, tomando-se cinco amostras de três cachos de cada variedade, totalizando quinze cachos por variedade. Sendo quatorze as variedades estudadas, o número total de amostras analisadas foi setenta.

Após a coleta de três cachos, que constituía uma amostra, eles foram lavados, secos, acondicionados em sacos plásticos, identificados e armazenados à temperatura de -20°C .

3.2.2 - PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA E OBTENÇÃO DO MOSTO

As uvas, após o descongelamento, foram retiradas dos respectivos cachos, quando se procedeu a obtenção de dois mostos. O primeiro, destinado às análises do Brix refratométricos e acidez total, foi obtido pela compressão manual das amostras em sacos plásticos e, o segundo pela maceração, a 70°C , por cinco minutos. Em seguida foi efetuada a prensa - gem em prensa "Carven" a 6.000 libras, clarificação por adição de enzimas pecticas comerciais "FILL", na proporção de 0,03 - 0,05% , à temperatura de 35°C , por quatro horas, e filtrado à vácuo em funil "Buchner", obtendo-se assim um mosto clarificado.

3.2.3 - MÉTODOS ANALÍTICOS

As análises efetuadas durante o desenvolvimento do trabalho, para todas as variedades, foram as que se encontram citadas em sequência:

3.2.3.1 - Brix refratométrico

Utilizando-se o refratômetro Bausch e Lomb , modelo Abbe de laboratório.

3.2.3.2 - Acidez total

Avaliada pelo método proposto pelo Ministério da Agricultura, expressa em meq de NaOH N/10 por litro de mosto (TOLEDO, 1960).

3.2.3.3 - Concentração total das antociaminas

a - Preparo do extrato antociânico I

O preparo do extrato foi realizado tomando-se 25 ml do mosto clarificado e filtrado, precipitando-se as antocianinas pela adição de 10 ml de acetato de chumbo neutro a 10% e ajustando-se o pH a 8,0 - 8,5 com hidróxido de sódio.

O precipitado formado foi lavado com 10 ml de água destilada, por três vezes, metanol e acetona, centrifugando-se a 3.000 rpm por dez minutos, após cada lavagem, a seguir foi seco a vácuo (37°C) e os pigmentos extraídos com a mistura metanol a 50% e solução de ácido clorídrico 4 N , em sucessivas extrações. A solução obtida foi centrifugada a 3.000 rpm por dez minutos, obtendo-se sobrenadante que, concen

trado a vácuo a 37°C , foi reduzido ao volume de 5 ml. A seguir, completou-se o volume a 10 ml com etanol a 96°GL , obtendo-se assim o extrato para análise.

b - Preparo das placas para cromatografia

Como suporte utilizou-se sílica-gel (tipo 60, Merck), misturando-se 35 a 37 g de sílica em 75 a 80 ml de água, agitando-se até obter uma mistura homogênea, que foi aplicada sobre cinco placas de 20 x 20 cm. A espessura da camada utilizada foi de 0,50 mm.

As placas, a seguir, foram secas à temperatura ambiente por uma hora, e ativadas a 110°C , por trinta minutos, sendo após resfriadas e colocadas em dessecador, sendo utilizadas após 72 horas.

c - Separação cromatográfica das antocianinas monoglicosídeo e diglicosídeo

A separação efetuou-se aplicando-se 0,4 ml do extrato antocianico I , em faixas de 12 - 13 cm de comprimento e largura de 3 - 4 mm , sobre a placa de sílica-gel.

O solvente utilizado foi uma mistura de álcool amílico normal - ácido acético-água , na proporção 4 : 15 : 1 , e o desenvolvimento foi por cinco horas.

d - Identificação dos antocianinas monoglicosídeo e diglicosídeo

Os pigmentos separados no desenvolvimento dos cromatogramas foram observados a luz ultravioleta (365 nm). A banda inferior correspondente aos pigmentos 3,5-diglicosídeo apresenta uma coloração roxa - laranja e fluorescência característica. A banda superior, relativa aos pigmentos 3-monoglucosídeos, não apresenta a fluorescência.

A presença das antocianinas 3,5-diglicosídeo manifesta-se mais claramente, pulverizando-se a placa com o reativo de Dorier e Verelle, modificado por DÍAZ *et alii* (1975.b), composto de etanol 96% ; nitrato de sódio 2% ; ácido clorídrico 0,2 N e amoníaco 10% , na proporção 50:40:9:1. Na luz ultra-violeta a banda relativa ao 3,5-diglicosídeo, desenvolve uma fluorescência verde.

e - Obtenção dos extratos das antocianinas monoglicosídeo e diglicosídeo

Realizada a identificação dos pigmentos, separaram-se com espátula, as zonas correspondentes aos monoglicosídeos e diglicosídeos, raspando-as separadamente.

Os pós obtidos são tratados com a mistura etanol 99,5% e ácido clorídrico 2 N (90:10) durante três horas. O resíduo sólido é separado por filtração em Büchner. O filtrado é concentrado a vácuo até 5 ml, protegidos da luz, completando-se o volume a 10 ml com etanol 96%.

f - Determinação da concentração das antocianinas
monoglicosídeo e diglicosídeo

Toma-se 1 ml dos extratos de monoglicosídeos e diglicosídeos, e completa-se o volume a 10 ml com ácido clorídrico 0,1 N (pH = 1,0), efetuando-se a leitura das absorbâncias a 520 nm, em espectrofotômetro Coleman Junior II, as quais foram utilizadas nos cálculos da concentração.

3.3 - CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DAS ANTOCIANINAS MONOGLICOSÍDEO, DIGLICOSÍDEO E TOTAIS

Com os dados obtidos da leitura da absorbância das amostras, efetuou-se a determinação quantitativa das antocianinas monoglicosídeo e diglicosídeo, expressas em malvidina-3-monoglicosídeo e malvidina-3,5-diglicosídeo, segundo NIKETIC-ALEKSIC e HRAZDINA (1972).

$$\text{Concentração (g/l)} = \frac{\text{Absorbância}}{E} \times P M \times f$$

onde:

E = absorbância molar da malvidina-3-monoglicosídeo (28.000) ou malvidina-3,5-diglicosídeo (37.700);

P M = peso molecular da malvidina-3-monoglicosídeo (529) ou malvidina-3,5-diglicosídeo (691);

f = fator de diluição da amostra.

A concentração de antocianinas totais (mg/l) , foi obtida pela somatória das frações de antocianinas-3-mono-glicosídeo e antocianinas 3,5-diglicosídeo.

3.4 - MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Os métodos estatísticos utilizados na análise dos dados obtidos em 4.3 , obedeceram os seguintes esquemas:

3.4.1 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Para a interpretação dos dados, utilizou-se de análise de variância paramétrica, segundo esquema de experimento inteiramente casualizado, segundo GOMES (1977), o qual obedeceu o seguinte modelo estatístico:

a - Variedade vinífera

Causa de Variação	G. L.
Variedades	6
Resíduo	28
Total	34

b - Variedades americanas

Causa de Variação	G. L.
Variedades	3
Resíduo	16
Total	19

c - Variedades híbridas

Causa de Variação	G. L.
Variedades	2
Resíduo	12
Total	14

3.4.2 - TESTE DE TUKEY

Este teste foi empregado ao nível de 5% de probabilidade, para comparação das médias, segundo indicação de GOMES (1977).

4 - RESULTADOS OBTIDOS

- a - Os cromatogramas de separação das antocianinas referentes as variedades viníferas, americanas e híbridas encontram-se nas Figuras 1 , 2 e 3.
- b - Os resultados obtidos através dos métodos analíticos para a concentração das antocianinas 3-monoglicosídeo, antocianinas 3,5-diglicosídeo e total, encontram-se nas Tabelas 4 , 5 , 6 e 7.
- c - Os resultados obtidos para a análise da variância ("Teste F") e os coeficientes de variação encontram-se na Tabela 8.
- d - A comparação das médias dos teores de antocianinas das variedades pelo "Teste de Tukey" está contida nas Tabelas 9 , 10 e 11.

- e - Com os dados médios da concentração de antocianinas 3-monoglicosídeo , 3,5-diglicosídeo e total das variedades, foram traçados os gráficos das Figuras 4, 5 e 6.

antocianinas
3-monoglicosídeo

antocianinas
3,5-diglicosídeo

FIGURA 1 - Cromatograma de separação das antocianinas das variedades viníferas

1 - Bonarda	5 - Cabernet Franc
2 - Merlot	6 - Canaiolo
3 - Barbera D'Asti	7 - Pinot Noir
4 - Gamay Beaujolais	

FIGURA 2 - Cromatograma de separação das antocianinas das variedades americanas

- 1 - Isabel
- 2 - Concord
- 3 - Bordô
- 4 - Herbemont

FIGURA 3 - Cromatograma de separação das antocianinas das variedades híbridas

- 1 - Seibel 2
- 2 - Seibel 10096
- 3 - Seibel 5455

TABELA 4 - Resultados obtidos para Brix, Acidez total, Antocianinas 3-monoglicosídeo, 3,5-diglicosídeo, e totais para as variedades viníferas

Variedades	Local	Brix do mosto	Acidez total (meq/l de mosto	Concentração de Antocianinas				Totais mg/l de mosto
				3-monoglicosídeo		3,5-diglicosídeo		
				Absor- bância	mg/l de mosto	Absor- bância	mg/l de mosto	
Bonarda	S. Valentin	18,5	156	0,27572	520,9	-	-	520,9
		18,0	159	0,26201	495,0	-	-	495,0
		18,1	157	0,26360	498,0	-	-	498,0
		18,3	157	0,26440	499,5	-	-	499,5
		18,4	156	0,27084	511,7	-	-	511,7
Merlot	Linha Leopoldina	19,8	118	0,37572	709,8	-	-	709,8
		19,5	119	0,36552	690,6	-	-	690,6
		19,5	119	0,36653	692,5	-	-	692,5
		19,7	118	0,37469	707,9	-	-	707,9
		19,7	118	0,36051	681,1	-	-	681,1
Barbera D'Asti	S. Valentin	16,5	109	0,31247	590,3	-	-	590,3
		16,5	108	0,31876	602,2	-	-	602,2
		18,1	94	0,34486	651,5	-	-	651,5
		17,7	96	0,32239	609,1	-	-	609,1
		20,0	97	0,36653	692,5	-	-	692,5
Gamay Beaujolais	Embrapa	20,5	96	0,31785	600,5	-	-	600,5
		21,0	94	0,32698	617,8	-	-	617,8
		18,0	97	0,27084	511,7	-	-	511,7
		19,2	97	0,28400	536,6	-	-	536,6
		19,8	96	0,29243	552,5	-	-	552,5
Cabernet Franc	Embrapa	19,8	80	0,37059	700,2	-	-	700,2
		19,8	83	0,37572	709,8	-	-	709,8
		20,0	80	0,38616	729,6	-	-	729,6
		19,0	86	0,32514	614,3	-	-	614,3
		19,1	86	0,33442	631,8	-	-	631,8
Canaiolo	S. Valentin	15,0	114	0,25415	480,2	-	-	480,2
		16,8	110	0,27327	516,3	-	-	516,3
		15,0	120	0,26440	499,5	-	-	499,5
		17,0	98	0,27572	520,9	-	-	520,9
		16,5	109	0,25964	490,5	-	-	490,5
Pinot Noir	Embrapa	18,9	116	0,43180	815,8	-	-	815,8
		17,4	120	0,33348	630,0	-	-	630,0
		20,1	110	0,44010	831,5	-	-	831,5
		18,1	117	0,37670	711,8	-	-	711,8
		19,7	113	0,44010	831,5	-	-	831,5

(*) Expresso em malvidina-3-monoglicosídeo

(**) Não detectado

TABELA 6 - Resultados obtidos para Brix, Acidez total, Antocianinas 3-monoglicosídeo, 3,5-diglicosídeo, e totais para as variedades híbridas

Variedades	Local	Brix do mosto	Acidez total (meq/l de mosto	Concentração de Antocianinas				***
				3-monoglicosídeo *		3,5-diglicosídeo **		Totais mg/l de mosto
				Absor- bância	mg/l de mosto	Absor- bância	mg/l de mosto	
Seibel 2	S. Valentin	17,0	120	0,23657	446,9	0,12494	229,0	675,9
		17,7	118	0,25885	389,0	0,11464	210,1	699,1
		18,0	115	0,25493	481,6	0,15366	281,6	763,2
		17,4	118	0,22768	430,2	0,18442	338,0	768,2
		17,0	129	0,23210	438,5	0,09583	175,6	614,1
Seibel 10096	S. Valentin	17,8	112	0,16431	310,4	0,13136	240,8	551,2
		18,0	109	0,20761	392,2	0,15428	282,7	674,9
		15,0	121	0,18442	348,4	0,10073	184,6	533,0
		16,0	114	0,13077	247,1	0,11691	214,3	461,4
		17,3	113	0,15490	292,7	0,14026	257,0	549,7
Seibel 5455	S. Valentin	16,9	123	0,17070	322,5	0,14146	259,3	581,8
		15,0	132	0,15490	292,7	0,13608	249,4	542,1
		17,0	119	0,17070	322,5	0,16368	300,0	622,5
		17,1	119	0,20066	379,1	0,18111	331,9	711,0
		18,0	100	0,20691	390,9	0,20621	378,0	768,9

(*) Expresso em malvidina-3-monoglicosídeo

(**) Expresso em malvidina-3,5-diglicosídeo

(***) Somatória das antocianinas 3-monoglicosídeo e 3,5-diglicosídeo

TABELA 7 - Porcentagens de 3-monoglicosídeo e 3,5-diglicosídeo na concentração total de Antocianinas

Variedades	3-monoglicosídeo (%)	3,5-diglicosídeo (%)
viníferas:		
Bonarda	100	-
Merlot	100	-
Barbera D'Ast	100	-
Gamay Beaujolais	100	-
Cabernet Franc	100	-
Canaiolo	100	-
Pinot Noir	100	-
americanas:		
Isabel	68,7	31,3
Concord	69,4	30,6
Bordô	70,3	29,7
Herbemont	68,6	31,4
híbridas:		
Seibel 2	64,9	35,1
Seibel 10096	57,4	42,6
Seibel 5455	52,9	47,1

TABELA 8 - Resultados para análise de variância, em experimento inteiramente casualizado, Teste F

Variedades	Antocianinas					
	3-monoglicosídeo			3,5-diglicosídeo		
	Teste F	C. V.	Teste F	C. V.	Teste F	C. V.
Viníferas	23,45 *	7,47	-	-	23,45 *	7,47
Americanas	4,82 *	11,19	2,42	15,28	4,90 *	10,86
Híbridas	15,19 *	11,47	2,39	20,08	4,57 *	12,45

(C. V.) = Coeficiente de Variação

(*) = Significância ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 9 - Comparação das médias de antocianinas 3-monoglicosídeo, 3,5-diglicosídeo e totais para as variedades viníferas, pelo Teste de Tukey

Variedades	Antocianinas			
	3-monoglicosídeo (mg/l)	3,5-diglicosídeo (mg/l)	Totais (mg/l)	s ($\bar{m}$)
Pinot Noir	764,12	-	764,12	40,40
Merlot	696,38	-	696,38	5,46
Cabernet Franc	677,14	-	677,14	22,81
Barbera	629,12	-	629,12	18,95
Gamay Beaujolais	563,82	-	563,82	19,86
Bonarda	505,02	-	505,02	4,89
Canaiolo	501,48	-	501,48	7,68

TABELA 10 - Comparação das médias de antocianinas 3-monoglicosídeo, 3,5-diglicosídeo e totais, para as variedades americanas, pelo Teste de Tukey

Variedades	Antocianinas			
	3-monoglicosídeo (mg/ℓ)	s ($\bar{m}$)	3,5-diglicosídeo (mg/ℓ)	s ($\bar{m}$)
Concord	791,30	47,78	348,68	31,02
Isabel	736,16	27,26	334,84	18,62
Bordô	704,60	38,82	297,02	13,98
Herbemont	605,44	23,20	276,20	18,69
Totais				
			1.139,98	54,67
			1.071,00	57,75
			1.001,62	47,42
			881,64	37,09
D.M.S. (5%)	154,19		87,19	201,99

TABELA 11 - Comparação das médias de antocianinas 3-monoglicosídeo, 3,5-diglicosídeo e totais, para as variedades híbridas, pelo Teste de Tukey

Variedades	Antocianinas				
	3-monoglicosídeo (mg/ℓ)	s ($\bar{m}$)	3,5-diglicosídeo (mg/ℓ)	s ($\bar{m}$)	Totais (mg/ℓ)
Seibel 2	457,24	11,84	246,86	28,59	704,10
Seibel 5455	341,54	18,70	303,72	23,78	645,26
Seibel 10096	318,16	24,71	235,88	17,01	554,04
D.M.S. (5%)	72,22		95,77		133,63

Variedades:

- a = Bonarda
- b = Merlot
- c = Barbera D'Asti
- d = Gamay Beaujolais
- e = Cabernet Franc
- f = Canaiolo
- g = Pinot Noir

FIGURA 4 - Representação gráfica das médias das concentrações de antocianinas 3-monoglicosídeo para as variedades viníferas

FIGURA 5 - Representação gráfica das médias das concentrações de antocianinas 3-monoglicosídeo, antocianinas 3,5-diglicosídeo e total para as variedades americanas

Variedades: a = Seibel 2
 b = Seibel 10096
 c = Seibel 5455

FIGURA 6 - Representação gráfica das médias das concentrações de antocianinas 3-monoglicosídeo, antocianinas 3,5-diglicosídeo e total para as variedades híbridas

5 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

De acordo com os dados fornecidos pelas determinações físicas, químicas, pelos cálculos tecnológicos e pela interpretação estatística, evidenciaram-se as seguintes observações, à guisa de discussão:

5.1 - VARIEDADES VINÍFERAS

Sabe-se que o teor de antocianinas nas uvas é um dos fatores determinantes na qualidade do vinho (RIBÉREAU-GAYON, 1959 ; SEGAL e ORANESCU, 1978), como a adstringência, "bouquet" e cor (RANKINE *et alii*, 1958).

Ainda, a seleção de variedades procedentes de diferentes espécies, pode ser efetuada pela identificação das antocianinas (RIBÉREAU-GAYON, 1953 ; RIBÉREAU-GAYON *et alii*, 1955 ; FEDUSCHY, 1972 ; BERGERET, 1961).

Os dados contidos na Tabela 4 mostram os resultados obtidos para as antocianinas totais e 3-monoglicosídeo no mosto de uva. A análise da variância (Tabela 8) destes dados evidenciou uma significância entre as diferentes variedades ao nível de 5% de probabilidade. Os mesmos resultados foram comprovados pelo "Teste de Tukey", como pode ser visto na Tabela 9, de comparação das diferentes variedades quanto ao teor médio de antocianinas. A Figura 4 dá uma indicação do teor médio de antocianinas 3-monoglicosídeo das diferentes variedades.

Dentro das condições do trabalho, a variedade que apresentou maior teor médio de antocianina total foi a 'Pinot Noir', 764,12 mg/l, e a de menor concentração foi a 'Canaiolo', 501,49 mg/l, como se observa na Tabela 9. Esses dados podem dar uma indicação da intensidade de coloração do vinho elaborado com estas variedades, quando observadas as mesmas condições de vinificação, como se refere PUISSANT e LEON, 1967 e DÍAZ *et alii*, 1975.b.

As variedades estudadas apresentaram na composição dos seus mostos somente antocianinas 3-monoglicosídeo, indicando que as mesmas pertencem à espécie *V. vinifera*, visto que esta característica lhe é específica (LEVY *et alii*, 1931 ; ROBINSON e ROBINSON, 1932 ; RIBÉREAU-GAYON, 1953 ; STASUNAS, 1956 ; RANKINE *et alii*, 1958 ; ALBACH *et alii*, 1959 ; BERGERET, 1961 ; ALBACH *et alii*, 1963 ; AKIYOSHI *et alii*, 1963 ; SOMAATMADJA e POWERS, 1963 ; ALBACH *et alii*, 1965 ; KOEPPEN e

BASSON, 1966 ; ROBINSON *et alii*, 1966 ; SOMERS, 1966 ; PUIS - SANT e LÉON, 1967 ; BOUBALS *et alii*, 1968 ; CONRADIE e NEE - THLING, 1968 ; LIAO e LUH, 1970 ; MARTINIÈRE e RIBÉREAU-GAYON, 1973 ; PHILIP, 1974 ; SAKELLARIADES e LUH, 1974 ; DÍAZ *et alii*, 1975.b ; DIÁZ *et alii*, 1976 ; BISSON e RIBÉREAU-GAYON, 1978 ; WULF e NAGEL, 1978), como se observa no cromatograma de separação das antocianinas destas variedades na Figura 1.

A separação cromatográfica das antocianinas , das diferentes variedades de uva, poderá ser utilizada para a seleção clonal, visando o potencial de cor, e a caracterização das variedades (STASUNAS, 1956 ; RANKINE *et alii*, 1958 . ; BOUBALS *et alii*, 1968).

Dentre as variedades de uvas tintas cultivadas muitas ainda não se apresentam bem caracterizadas, recebendo a mesma variedade diferentes denominações. A identificação das antocianinas das variedades de uva poderá constituir-se em um meio para a sua caracterização, estudo este a ser desenvolvido posteriormente.

Os dados referentes a Brix e acidez total, contidos na Tabela 4 , indicam que as variedades se encontravam maduras.

5.2 - VARIEDADES AMERICANAS

As variedades americanas têm como característica, além da presença de antocianinas 3-monoglicosídeo, as an-

tocianinas 3,5-diglicosídeo (SASTRY e TISCHER, 1952 ; INGALSBE *et alii*, 1963 ; RICE, 1965 ; MATTICK *et alii*, 1967) , resulta dos esses também encontrados nas variedades estudadas ; Concord , Isabel , Bordô e Herbemont , como se observa no cromatograma de separação das antocianinas 3-monoglicosídeos e 3,5-diglicosídeo, na Figura 2.

As variedades americanas, destinadas à produção de sucos, conferem aos mesmos qualidades distintas. Os sucos dessas variedades podem ser identificados pelo conhecimento das suas antocianinas, pois a composição das mesmas quanto aos pigmentos antociânicos são diferentes, possibilitando assim a detecção de adulterações quando da mistura do suco das diferentes variedades ou extratos (RICE, 1965 ; MATTICK *et alii*, 1967). Essa identificação poderá servir de base para a elaboração de normas para sucos e para o controle dos sucos exportados. A presença dos pigmentos diglicosídeos confere ao suco maior estabilidade de cor e sabor, quando sujeitos a tratamentos térmicos (PONTING *et alii*, 1960 ; DÍAZ *et alii*, 1976; FLORA, 1976). As antocianinas 3,5-diglicosídeo também conferem aos mostos uma coloração azulada, a qual é apreciada para os sucos e indesejável aos vinhos.

Os resultados obtidos da determinação quantitativa dos antocianinas 3-monoglicosídeo em mostos das variedades americanas estudadas, podem ser verificados na Tabela 5 . Pela análise da variância (Tabela 8) desses resultados, verificou-se uma diferença significativa na concentração desses

pigmentos entre as variedades, ao nível de 5% de probabilidade. Esses resultados foram comprovados pelo "Teste de Tukey" (Tabela 10) de comparação das médias. A Figura 5 mostra o comportamento das diferentes variedades quanto aos teores médios.

As variedades Concord , Isabel e Bordô não diferiram significativamente entre si com relação a aquele caráter, o mesmo se verificando entre a 'Isabel' , 'Bordô' e 'Herbemont' , porém, a variedade Concord diferiu da 'Herbemont' , porém, a variedade Concord diferiu da 'Herbemont', como se observa na Tabela 10.

Nas condições do trabalho, a variedade Concord apresentou a maior concentração de antocianinas 3-monoglicosídeo, 791,30 mg/l , enquanto a 'Herbemont', 605,44 mg/l , sendo esta a de menor teor observado, como indica a Tabela 10.

Quando se aplicou a análise de variância aos dados obtidos para as antocianinas 3,5-diglicosídeo dessas variedades, não se observou uma relação significativa. O mesmo foi evidenciado pelo "Teste de Tukey" (Tabela 10).

Pela análise da variância (Tabela 8) as variedades americanas mostraram uma diferença significativa a 5%, quanto ao teor de antocianinas totais, o que ficou comprovado pelo "Teste de Tukey" (Tabela 10), considerando-se a média dos resultados obtidos. As diferentes concentrações médias das variedades podem ser observadas na Figura 5.

As variedades Concord , Isabel e Bordô não diferiram significativamente entre si, o mesmo ocorrendo quando se comparou as variedades Isabel , Bordô e Herbemont , quanto ao teor de antocianina total. Entretanto, as variedades Concord e Herbemont diferiram entre si ao nível de 5% , como evidencia a Tabela 10 , de comparação de médias.

Segundo aquela tabela, a maior concentração de antocianinas, dentro das condições do trabalho, foi verificado na variedade Concord, 1.139,98 mg/l , enquanto que na 'Herbemont' foi de 881,64 mg/l. Observou-se visualmente que a variedade Concord apresentou um mosto de coloração vermelha escura, tendendo ao violeta, enquanto que na 'Herbemont' a coloração observada foi a menos intensa.

As variedades americanas apresentaram um percentual de antocianinas 3-monoglicosídeo, em relação ao teor de antocianinas totais, variável de 68,6 a 70,3% , enquanto que, para os diglicosídeos, a variação foi de 29,7% a 31,4%.

Os dados sobre a maturação das variedades estudadas, referentes a Brix e acidez total, são encontrados na Tabela 5 , indicando que elas se encontravam maduras.

5.3 - VARIEDADES HÍBRIDAS

As variedades de uvas híbridas, embora não possuindo as qualidades das uvas viníferas, como "bouquet" e co-

loração, podem ser utilizadas para a elaboração de vinhos de inferior qualidade (RIBÉREAU-GAYON, 1959).

A concentração das antocianinas 3-monoglicosídeo nas variedades híbridas estudadas são mostradas na Tabela 6 . Na análise da variância desses resultados (Tabela 8), verificou-se uma diferença significativa entre as diferentes variedades ao nível de 5% de probabilidade, resultados estes comprovados pelo "Teste de Tukey" (Tabela 11), de comparação das médias. A Figura 6 mostra os teores médios das antocianinas 3-monoglicosídeo.

A variedade Seibel 2 diferiu da 'Seibel 5455', e da 'Seibel 10096' , ao nível de 5% pelo "Teste de Tukey" , quanto ao teor de antocianinas 3-monoglicosídeo, todavia, a 'Seibel 5455' e 'Seibel 10096' não diferiram entre si, como pode ser visto na Tabela 4.

Nas condições do presente estudo, a variedade Seibel 2 apresentou uma concentração de antocianinas 3-mono - glicosídeo igual a 457,24 mg/l, sendo a que possui esse pigmento em maior concentração, enquanto a 'Seibel 10096', com 318,16 mg/l , foi a de menor concentração.

As variedades híbridas, sendo um cruzamento de *V. vinifera* com outras espécies do gênero *Vitis* , apresentam como pigmentos antocianinas 3 - monoglicosídeo e antocianinas 3,5-diglicosídeo. O caráter presença de diglicosídeo é dominante sendo transmitido aos híbridos nos cruzamentos (BOUBALS *et alii*, 1962 ; RIBÉREAU-GAYON, 1968).

Nas variedades híbridas estudadas Seibel 2 , Seibel 5455 e Seibel 10096 , verificou-se aquela característica, como já fora observado por ANDERSON, 1924 ; ANDERSON e NABENHAUER, 1926 ; SHRIMER e ANDERSON, 1928 ; SMITH e LUH , 1965 ; CHEN e LUH, 1967 e DÍAZ *et alii*, 1975.c. O cromatograma de separação das antocianinas 3-monoglicosídeo e 3,5-diglicosídeo, é mostrado na Figura 3.

A análise da variância dos resultados obtidos para as antocianinas 3,5-diglicosídeo, mostrou uma não significância entre os valores, o que foi comprovado pelo "Teste de Tukey".

Os resultados obtidos para a concentração total de antocianinas nos mostos das variedades híbridas estudadas, estão expressos na Tabela 6. Pela análise da variância (Tabela 8) dos dados obtidos, observou-se uma significância entre as diferentes variedades ao nível de 5% de probabilidade. Estes resultados foram comprovados pelo "Teste de Tukey", como mostra a Tabela 11. A Figura 6 , mostra as concentrações totais médias de antocianinas.

As variedades Seibel 2 e Seibel 5455 não diferiram entre si pelo "Teste de Tukey", quanto à concentração total de antocianinas, o mesmo se verificando entre a 'Seibel 5455' e a 'Seibel 10096' , porém, a 'Seibel 2' diferiu da 'Seibel 10096' ao nível de 5% de probabilidade, como pode ser verificado na Tabela 11.

A variedade Seibel 2 apresentou a maior concentração total de antocianinas, com 704,10 mg/l , e a 'Seibel 10096' , com 554,04 mg/l, foi a de menor concentração.

As porcentagens de antocianinas 3-monoglicosídeo e 3,5-diglicosídeo daquelas variedades variaram, respectivamente, entre 68,6 a 70,3% e 30,6 a 31,4% , como mostra a Tabela 7.

Os dados de Brix e acidez total, referentes às variedades estudadas, são mostradas na Tabela 6.

6 - CONCLUSÕES

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente e discutidos, permitindo as seguintes principais conclusões:

- a - As variedades Cabernet Franc , Merlot , Pinot Noir , Gamay Beaujolais , Bonarda , Barbera e Canaiolo não possuem antocianinas 3,5-diglicosídeo, confirmando pertencerem à espécie *Vitis vinifera*.
- b - As variedades americanas (Concord , Isabel , Bordô e Herbemont) e híbridas (Seibel 2 , Seibel 5455 e Seibel 10096) apresentam, além das antocianinas 3 - monoglicosídeo, as antocianinas 3,5-diglicosídeo.

- c - A porcentagem de antocianinas 3-monoglicosídeo e 3,5-diglicosídeo em relação ao total de antocianinas para as variedades americanas variaram de 68,6 a 70,3% e 29,7 a 31,4% , respectivamente.
- d - As variedades híbridas apresentaram uma porcentagem de antocianinas 3-monoglicosídeo e antocianinas 3,5-diglicosídeo variando entre 52,9 a 64,9% e 35,1 a 47,1% , respectivamente.
- e - Esses resultados confirmam que as variedades pertencentes à espécie *Vitis vinifera* , possuem como característica, a presença de antocianinas 3-monoglicosídeo, e que o caráter diglicosídeo das demais espécies do gênero *Vitis*, é transmitido aos híbridos nos cruzamentos destas com *Vitis vinifera*.
- f - O conhecimento da composição das diferentes variedades de uvas em antocianinas, permite a detecção de fraudes em vinhos, de variedades viníferas, quando da mistura das mesmas com variedades americanas ou híbridas.

7 - LITERATURA CITADA

- AKIYOSHI, M. ; A. D. WEBB e R. E. KEPNER, 1963. The major anthocyanin pigments of *Vitis vinifera* varieties Flame Tokay, Emperor and Red Malaga. J. Fd. Sci., Champaign 28: 177-181.
- ALBACH, R. F. ; R. E. KEPNER e A. D. WEBB, 1959. Comparison of anthocyan pigments of red vinifera grapes. Am. J. Enol. Vitic., Davis, 10: 164-172.
- ALBACH, R. F. ; R. E. KEPNER e A. D. WEBB, 1963. Peonidin-3-monoglicoside in vinifera grapes. J. Fd. Sci., Champaign, 28: 55-58.
- ALBACH, R. F. ; R. E. KEPNER e A. D. WEBB, 1965. Structures of acylated anthocyan pigments in *Vitis vinifera* variety Tinta Pinheira. Identification of antocyanidin, sugar and acid moieties. J. Fd. Sci., Champaign, 30: 69-76.

ANDERSON, R., 1923. Concerning the anthocyanins in Norton and Concord grapes. A contribution to the chemistry of grape pigments. J. Biol. Chem., Easton, 57: 795-813.

ANDERSON, R. e F. P. NABENHAUER, 1924. II. Concerning the anthocyanins in Clinton grapes. J. Biol. Chem., Easton, 61: 97-107.

ANDERSON, R., 1924. A contribution to the chemistry of grape pigments. III. Concerning the anthocyanins in Seibel grapes. J. Biol. Chem., Easton, 61: 685-694.

ANDERSON, R. e F. P. NABENHAUER, 1926. A contribution to the chemistry of grape pigments. IV. The anthocyanins in Isabella grapes. J. Am. Chem. Soc., Easton, 48: 2997-3003.

ASEN, S. ; R. N. STEWART e K. H. NORRIS, 1972. Copigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. Phytochemistry, Paris, 11: 1139-1141.

BERGERET, J., 1961. Sur la séparation des pigments anthocyaniques du vin par chromatographie circulaire de papier. Bull. Soc. Chem. Fr., Paris, 121: 344-347.

BISSON, J. e P. RIBÉREAU - GAYON, 1978. Influence de cépage et du milieu sur la composition phénolique de cinq raisins noirs. Annals. Technol. Agric., Paris, 27: 827-835.

BOLCATO, V. e F. LAMPARELLI, 1962. Le probabili basi biologiche della rottura ossidativa del vino. Agrochimica, Pisa, 6: 366-374.

- BOUBALS, D. ; P. TRAVEL ; M. BOURZEIX ; V. KOVAC e T. GIOSANU, 1968. Étude des différentes couleurs de baies chez la vigne (*V. vinifera*). Annls. Technol. Agric., Paris, 17: 257-260.
- BROWN, W. L., 1940. The anthocyanin pigment of the Hunt muscadine grape. J. Am. Chem. Soc., Easton, 62: 2808-2810.
- CANTARELLI, C., 1955. Biochemical aspects of red wine accelerated aging by film-forming strains of *S. oviformis*. Biochim. appl., Roma, 2: 167-190.
- CHEN, L. F. e B. S. LUH, 1967. Anthocyanins in Royalty grapes. J. Fd. Sci., Champaign, 32: 66-74.
- CLORE, W. J. ; A. M. NEUBERT ; G. H. CARTER ; D. W. INGALSBE e V. P. BRUMMUND, 1965. Composition of Washington produced Concord grapes and juices. Tech. Bull. agric. Exp. Sta. Wash. St., Dullman, 48: 1-21.
- CONRADIE, J. D. e L. T. NEETHLING, 1968. A rapid thin-layer chromatographic method for the anthocyanins in grape varieties. J. Chromat., Amsterdam, 34: 419-420.
- DARAVINGAS, G. e R. F. CAIN, 1965. Changes in the anthocyanin pigments of raspberries during processing and storage. J. Fd. Sci., Champaign, 30: 400-405.
- DÍAZ, L. S. ; J. H. FERRERO ; F. GASQUE e B. LAFUENTE, 1975.a Detecção de antocianas diglicosídeos em zumos de uva tintos por cromatografia em capa fina de sílica-gel. R. Agroquím. Tecnol. Aliment., Valência, 15(2): 265-273.

- DÍAZ, L. S. ; F. GASQUE e B. LAFUENTE, 1975.b Estudio de los componentes antocianicos de uvas de variedades tintas cultivadas en el Levante español. R. Agroquím. Tecnol. Aliment., Valência, 15(3): 409-414.
- DÍAZ, L. S. ; J. H. FERRERO ; F. GASQUE e B. LAFUENTE, 1975.c Estudio de los componentes antociánicos de los zumos de las cepas híbridas "Edo" y "Señorito". R. Agroquím. Tecnol. Aliment., Valência, 15(4): 530-538.
- DÍAZ, L. S. ; F. GASQUE e B. LAFUENTE, 1976. Estabilidad de los pigmentos antociánicos de los zumos de uvas viníferas e híbridas. R. Agroquím. Tecnol. Aliment., Valência 19(4): 509-515.
- FEDUCHY, E., 1972. Les anthocyanes, nature, caractéristiques et dosage. Bull. Off. Int. Vin., Paris, 495: 423-433.
- FLANZY, M., 1935. Sur une cause d'arret de la fermentation alcoolique dans la vinification et d'égrappage. Revue Vitic., Paris, 83: 217-222.
- FLORA, L. F., 1976. Time-temperature influence on Muscadine grapes juice quality. J. Fd. Sci., Champaign, 41: 1312-1315.
- GOMES, F. P., 1977. Curso de Estatística Experimental. 4.^a ed., Piracicaba, Livraria Nobel, 468 p.
- HARBORNE, J. B., 1964. Plant phenols. XI. The structure of acylated anthocyanins. Phytochemistry, Paris, 3: 151-160.

- HRAZDINA, G. H. ; A. J. BORZELL e W. B. ROBINSON, 1970. Studies on the stability of antocyanidin 3,5-diglicoside. Rep. N. Y. St. Agric. Exp. Stn., Geneva, N.Y., nº 14456.
- HUONG, H. T., 1955. Decoloration of anthocyanins by fungal enzyme. J. agric. Fd. Chem., New York, 3: 141-145.
- INGALSBE, D. W. ; A. M. NEUBERT e G. H. CARTER, 1963. Concord grapes pigments. J. Agric. Fd. Chem., New York , 11: 263-268.
- JOSLYN, M. A. e J. L. GOLDSTEIN, 1964. Astringency of fruits products in relation to phenolic content. Adv. Fd. Res., New York, 13: 179-217.
- JURD, L., 1964. Reactions involved in sulfite beaching of anthocyanins. J. Fd. Sci., Champaign, 29: 16-19.
- KOEPPEN, B. H. e D. S. BASSON, 1966. The anthocyanin pigments of Barlinka grapes. Phytochemistry, Paris, 5: 183-187.
- LEVY, L. F. ; T. POSTERNAK e R. ROBINSON, 1931. Experiments on the synthesis of the anthocyanins. Part. VIII. Synthesis of oenin chloride. J. Chem. Soc., London, 1931: 2701-2715.
- LIAO, F. W. H. e B. S. LUH, 1970. Anthocyanin pigments in Tinto Cão grapes. J. Fd. Sci., Chicago, 35: 41-46.
- LUKTON, A. ; C. O. CHICHESTER e G. MACKINNEY, 1956. The breakdown of strawberry anthocyanin pigment. Fd. Technol., New York, 10: 427-432.

- MARKAKIS, P. ; G. E. LIVINGSTONE e C. R. FELLERS, 1957. Quantitative aspects of strawberry pigment degradation. Fd. Res., Champaign, 22: 117-119.
- MARTINIÈRE, P. e J. RIBÈREAU-GAYON, 1973. Étude expérimentale de l'influence du chauffage des raisin sur la vinification. Annls. Technol. Agric., Paris, 22: 1-20.
- MATTICK, L. R. ; L. D. WEIRS e W. B. ROBINSON, 1967. Detection of adulterated concord grapes juice with other anthocyanin containing products. J. Ass. Off. Agric. Chem., Washington, 50: 299-303.
- NIKETIC-ALEKSIC, G. K. e G. HRAZDINA; 1972. Quantitative analysis of the anthocyanin, content in grape juices and wines. Fd. Sci. Technol., Champaign, 5: 163-165.
- PHILIP, T., 1974. Anthoyanins of Beauty Seedless grapes. J. Fd. Sci., Champaign, 39: 449-451.
- PONTING, J. D. ; D. W. SANSHUCK e J. E. BREKKE, 1960. Color measurement and deterioration in grape and berry juices and concentration. Fd. Res., Champaign, 25: 471-478.
- POWERS, J. J. ; D. SOMARTMADJA ; D. E. PRATT e M. K. HAMDY, 1960. Anthocyanins. II. Actions of anthocyanin pigments and related compounds on the growth of certain microorganisms. Fd. Technol., New York, 14: 626-632.
- PUISSANT, A. e H. LÉON, 1967. La matière colorante des grains de certains cépages cultivés en Anjou em 1965. Annls. Technol. Agric., Paris, 16: 217-225.

- RAMOS, M. C. e J. PEREIRA, 1954. Matérias corantes no vinho do Porto. An. Inst. Vinho Porto, Porto, 15: 1-22.
- RANKINE, B. C. ; R. E. KEPNER e A. D. WEBB, 1958. Comparison of anthocyan pigments of vinifera grapes. Am. J. Enol. Vitic., Davis, 9: 105-110.
- REYNOLDS, T. M., 1965. Chemistry of non enzyme browning. Adv. Fd. Res., New York, 14: 167-283.
- RIBÉREAU-GAYON, J., 1953. Différenciation des matières colorantes des raisins et des vins des cépages français et hybrides. C. R. Acad. Agric. France, Paris, 39: 800-807.
- RIBÉREAU-GAYON, J. ; P. SUDAAUD e P. M. DURQUETY, 1955. Relation entre génétique et la nature chimique des pigments anthocyaniques de la baie dans le genre *Vitis*. Revue Gén. Bot., Paris, 62: 667-674.
- RIBÉREAU-GAYON, P., 1959. Recherches sur les anthocyanes des végétaux application au genre Vitis. Paris, Librairie Générale de l'enseignement. 114 p.
- RIBÉREAU-GAYON, P., 1964. Les composés phénoliques du raisin et du vin. Annls. Physiol. Vég., Bruxelles, 6: 211-242.
- RIBÉREAU-GAYON, P., 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Paris, Dunod, 254 p.
- RICE, A. C., 1965. Identification of grape varieties. J. Ass. Off. Agric. Chem., Washington, 48: 525-530.

- ROBINSON, G. M. e R. ROBINSON, 1932. CXCVII. A survey of anthocyanins II. Biochem. J., Liverpool, Cambridge, 26: 1647-1664.
- ROBINSON, W. B. ; L. D. WEIRS ; J. J. BERTINO e L. R. MATTICK, 1966. The relation of anthocyanin composition to color stability of New York State wines. Am. J. Enol. Vitic., Davis, 17: 178-184.
- ROSENSTIEHL, L. A., 1902. De l'action e des matiēres colorantes sur l'activitē des levures. C. R. Acad. Agric. France, Paris, 134: 119-122.
- SAKELLARIADES, H. C. e B. S. LUH, 1974. Anthocyanins in Barbera grapes. J. Fd. Sci., Champaign, 39: 329-333.
- SASTRY, L. V. L. e R. G. TISCHER, 1952. Stability of the anthocyanin pigments in Concord grapes juice. Fd. Technol., New York, 6: 264-268.
- SEGAL, B. e F. ORANESCU, 1978. Effect of Fe^{+3} and Fe^{+2} ions on the colour of anthocyanins-rich juice. Fd. Sci. Technol. Abstr., 10(10): 52, ref. 10 H 1257.
- SHRINER, R. L. e R. J. ANDERSON, 1928. A contribution to the chemistry of grape pigments. J. Biol. Chem., Baltimore, 80: 743-752.
- SINGLETON, V. L. e P. ESAU, 1969. Phenolic substances in grapes and wines and their significance. New York, Academic Press, 282 p.

- SMITH, R. M. e B. S. LUH, 1965. Anthocyanin pigments in the hybrid grape variety Rubired. J. Fd. Sci., Champaign, 30: 995-1005.
- SOMAATMADJA, D. e J. J. POWERS, 1963. Anthocyanins. IV. Anthocyanin pigments of Cabernet Sauvignon grapes. J. Fd. Sci., Champaign, 28: 617-622.
- SOMERS, T. C., 1966. The Anthocyanins of *Vitis vinifera*, variety Shiraz. J. Sci. Fd. Agric., London, 17: 215-219.
- SONDHEIMER, E. e S. I. KERTESZ, 1952. The kinetics of the oxidation of strawberry anthocyanins by hydrogen peroxide. Fd. Res., Champaign, 17: 288-292.
- STASUNAS, V. J., 1956. Anthocyan pigments of Zinfandel grapes and wine. J. Sci. Fd. Agric., London, 7: 165-170.
- TIMBERLAKE, C. T. e P. BRIDLE, 1967. Flavylum salts anthocyanins and anthocyanidins. II. Reactions with sulphur dioxide. J. Sci. Fd. Agric., London, 18: 479-485.
- TINSLEY, I. J. e A. H. BOCKIAN, 1960. Some effects of sugars on the breakdown of pelargonidin-3-glucoside in model system at 90°C. Fd. Res., Champaign, 25: 161-173.
- TOLEDO, O Z., 1960. Instruções para a fabricação do vinho. Campinas, Instituto Agronômico. 68 p. (Boletim 121).

- WEBB, A. D., 1962. Present knowledge of grape and wine flavors. Fd. Technol., New York, 16: 56-59.
- WILLSTÄTER, R. e A. E. EVEREST, 1913. Untersuchungen über die Anthocyane. I. Über den Farbstoffe der Kornblume. Justus Liebigs Annln. Chem., Leipsig, 401: 189-232. Apud: SINGLETON, V. L. e P. ESAU, 1969. Phenolic substances in grapes and wines and their significance. New York, Academic Press, 282 p.
- WILLSTÄTER, R. e E. H. ZOLLINGER, 1915. Untersuchungen über die Anthocyane. VI. Über die Farbstoffe der Weintraube und der Heidelbeere. Justus Liebigs Annln. Chem., Leipsig, 408: 83-109. Apud: SINGLETON, V. L. e P. ESAU, 1969. Phenolic substances in grapes and wines and their significance. New York, Academic Press, 282 p.
- WILLSTÄTER, R. e E. H. ZOLLINGER, 1916. Untersuchungen über die Anthocyane. XI. Über die Farbstoffe der Weintraube und der Heidelbeere. Justus Liebigs Annln. Chem., Leipsig, 412: 113-251. Apud: SINGLETON, V. L. e P. ESAU, 1969. Phenolic substances in grapes and wines and their significance. New York, Academic Press, 282 p.
- WULF, L. W. e C. W. NAGEL, 1978. High-pressure liquid chromatographic separation of anthocyanins of *Vitis vinifera*. Am. J. Enol. Vitic., Davis, 29(1): 42-49.