



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

ANÁLISE DE VINHOS POR RMN

Determinação do Limite de Detecção de Constituintes do Vinho por um Método Rápido

MARCELO CAMARGO MARTINS

ORIENTADOR

Prof. Dr. MIGUEL SORIANO BALPARDA CARO

Florianópolis, 22 de novembro de 2004.

MARCELO CAMARGO MARTINS

ANÁLISE DE VINHOS POR RMN

Determinação do Limite de Detecção de Constituintes do Vinho por um Método Rápido

Relatório de Estágio Supervisionado
submetido ao Curso de Graduação em
Química como pré-requisito para
Obtenção do grau de Bacharel em Química.

Coordenadora de Estágio: Prof. Dr^a. Iolanda da Cruz Vieira

Orientador: Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro

Florianópolis, novembro de 2004

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Marcos e Rosângela, simplesmente por tudo.

Aos meus irmãos Ricardo e Eduardo pelo amor e a amizade.

Ao amor da minha vida Cláudia Morgana Henn Bonfada.

À minha amiga Thaís Lohmann Provenzano pela ajuda no trabalho.

À minha colega e doutoranda Fabiana Mortimer do Amaral pela ajuda, disposição e dedicação exclusiva durante todo o período de estágio.

Ao professor Miguel Soriano Balparda Caro pelo apoio e orientação.

A Eliane da Central de Análises pela ajuda no RMN.

Aos AMIGOS, Gilmar Conte, Marcelo Vieira, Rafael Dias, Wallace Castigli, Jacks Priebe.

Às pessoas excluídas que patrocinam a Universidade Pública e não têm direito à própria educação.

A Deus por ter dado forças para continuar todas as vezes que pensei em desistir!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABELAS	VIII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	IX
RESUMO	X

1. INTRODUÇÃO.

1.1 Ressonância Magnética Nuclear	1
1.1.1 Princípios	1
i RMN varredura.....	1
i.i RMN Transformada Fourier.....	2
i.i.i Spin Nuclear: A Origem do Sinal.....	2
1.1.2 Espectro de RMN de ¹ H	4
i Blindagem e Desblindagem dos Hidrogênios.....	6
i.i Integração das Áreas.....	6
i.i.i Desdobramento do Sinal (acoplamento spin-spin).....	7
1.1.3 Vantagens da Técnica	8
1.1 O Vinho	8
1.2.1 A História do vinho	9
1.2.2 Mercado de uva e vinho no Brasil	10
1.2.3 A química do vinho	12
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Preparo das soluções	14
3.2 Análise da influência do número de varreduras.....	14
3.3 Análise das amostras diluídas	14
3.4 Análise dos dados obtidos	14
3.5 Análise das amostras dos vinhos comerciais	14

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
5. CONCLUSÃO.....	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 (a) O campo magnético associado ao próton associado. (b) O próton se assemelha a um ímã.....	3
FIGURA 2 Prótons desorientados na ausência de um campo magnético e orientados quando expostos a um campo magnético externo B_0	3
FIGURA 3 Integração das áreas proporcional ao número de Hidrogênios.....	7
FIGURA 4 O sinal a desdobra-se num dubleto por acoplamento com um Hidrogênio . O sinal b desdobra-se num tripleto por acoplamento com dois Hidrogênios.....	7
FIGURA 5 Estrutura do ácido succínico (singleto em 2,56 ppm relativo aos quatro hidrogênios dos carbonos 1 e 2.....	15
FIGURA 6 Espectro de RMN de ^1H do ácido succínico (0,025 g/L) com acumulo de 64 scans.....	17
FIGURA 7 Espectro de RMN de ^1H do ácido succínico (1,5 g/L) com acumulo de 64 scans.....	17
FIGURA 8 Gráfico da área do sinal do TSP/área do sinal 2,56 ppm em função da concentração do ácido succínico (g/L) com acumulo de 64 scans.....	18
FIGURA 9 Espectro de RMN de ^1H do ácido tartárico (sinal em 4,71 ppm) sobreposto ao sinal da água.....	20
FIGURA 10 Estrutura do ácido tartárico.....	20
FIGURA 11 Transformação do ácido málico em ácido láctico através da fermentação malolática.....	21

FIGURA 12 Espectro de RMN de ^1H para amostra de vinho “Marson” **22**

FIGURA 13 Espectro de RMN de ^1H para amostra de vinho “Aurora”. **22**

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Deslocamentos Químicos para diversos prótons **5**

TABELA 2. Valores de área em função do número de scans para diferentes medidas do mesmo sinal em 2,56ppm **15**

TABELA 3. Valores da relação: área do sinal do TSP/área em função do número de scans para diferentes medidas do mesmo sinal em 2,56ppm **16**

TABELA 4. Concentração de alguns componentes presentes no vinho **19**

LISTA DE ABREVIATURAS E LISTA DE SIGLAS

^{13}C – RMN : Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

^1H – RMN : Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

a.C: antes de Cristo

CFM : Centro de Ciências Físicas e Matemáticas

D_2O : Água Deuterada

EMBRAPA : Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Hz : Hertz

I : Número quântico de spin

O.C : Onda Contínua

ppm : parte por milhão

r.f : Radiofrequência

T.F: Transformada de Fourier

TMS : Tetrametil Silano

TSP : Trimetil Silil Propionato de sódio

UFSC : Universidade Federal de Santa Catarina

σ : ppm

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo principal determinar o limite de detecção para soluções de padrões de diferentes concentrações para os ácidos succínico, tartárico e málico (principais componentes do vinho), bem como estabelecer a relação do número de varreduras(scans) sobre a medida da área do sinal para a solução de ácido succínico 0,025 g/L (concentração limite determinada experimentalmente) em RMN de ^1H a 200 MHz.

Pela análise qualitativa dos espectros de RMN de ^1H nas amostras de vinho foram observados os picos dos principais compostos que caracterizam o vinho: ácido tartárico, ácido málico, ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, água, etanol, dentre outros.

Através dos dados obtidos mediante as análises foi construída uma curva de calibração (área TSP/área do sinal x concentração) que foi utilizada para quantificar a concentração de ácido succínico nas amostras de vinhos comerciais.

INTRODUÇÃO

1.1. A ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os núcleos de certos elementos e isótopos se comportam como se fossem magnetos rodando ao redor de um eixo. Os núcleos de hidrogênio simples ^1H e de carbono-13 (^{13}C) apresentam esta propriedade. Quando se submete um composto contendo átomos de ^1H ou de ^{13}C a um campo magnético muito forte e, simultaneamente, se irradia com energia eletromagnética, os núcleos do composto podem absorver a energia através de um processo denominado ressonância magnética. - Essa absorção de energia é quantizada e produz um espectro característico para o composto. A absorção de energia não ocorre, a menos que a torça do campo magnético e a frequência da radiação eletromagnética estejam em valores específicos ¹.

Instrumentos conhecidos como espectrômetros de ressonância magnética nuclear (RMN) permitem aos químicos medir a absorção de energia nestes núcleos de ^1H ou de ^{13}C , e pelos núcleos de outros elementos. Esses instrumentos utilizam magnetos muito poderosos e irradiam a amostra com radiação eletromagnética na região de radiofrequência (rf). Dois tipos de espectrômetros de RMN, baseados em diferentes projetos, são usados atualmente pelos químicos orgânicos: espectrômetro de varredura [ou de onda contínua (OC)] e o de transformada de Fourier (TF) ¹.

1.1.1. PRINCÍPIOS DA TÉCNICA

i. Espectrômetros de RMN por Varredura (OC)

Os espectrômetros de ressonância magnética nuclear podem ser projetados de modo a irradiarem o composto com energia eletromagnética numa frequência constante, variando (ou varrendo) ao mesmo tempo a força do campo magnético. Quando o campo magnético alcança a intensidade adequada, os núcleos absorvem a energia e ocorre a ressonância. Essa absorção provoca uma pequena corrente elétrica que flui ao longo de uma bobina receptora que envolve a amostra. O instrumento então amplifica esta corrente e a exibe como um sinal (um pico ou uma série de picos) em um papel gráfico, calibrado em unidades de frequência (Hz). O resultado é um espectro de RMN ¹.

i.i. Espectrômetros de RMN por Transformada de Fourier(TF)

Atualmente, os instrumentos de RMN usam magnetos supercondutores que possuem uma força de campo muito maior que seus antecessores. Também possuem computadores que permitem o ganho do sinal e realizam cálculos matemáticos conhecidos como Transformadas de Fourier (transformam o sinal de domínio do tempo para domínio da frequência). O instrumento acumula diversas varreduras dos dados e os incorpora na memória do computador de modo a cancelar o ruído eletrônico randômico, o que ressalta os sinais de RMN. Os instrumentos com transformada de Fourier têm resolução muito boa e sensibilidade muito maior que os instrumentos de RMN de OC. Ao invés de varrer o campo magnético, o instrumento com TF irradia a amostra com um pulso curto de radiação de rf ($\sim 10^{-5}$ s) excitando todos os núcleos de uma só vez, diferentemente da excitação individual de cada núcleo, como ocorre no método da varredura. A grande vantagem é o tempo, enquanto na varredura leva-se de 2-5 minutos para se obter um espectro completo, o método por pulso realiza a mesma tarefa em até 5s ¹.

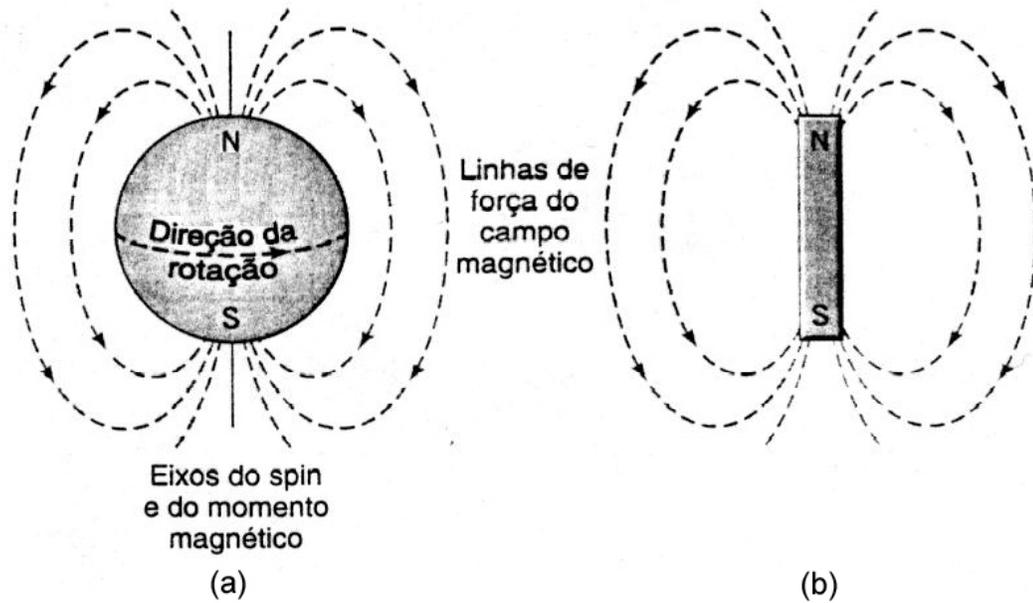
i.i.i. Spin nuclear: A Origem do Sinal

O spin do elétron é a base para o princípio para a exclusão de Pauli, e nos permite compreender como dois elétrons com spins emparelhados podem ocupar os mesmos orbitais atômicos ou moleculares ¹.

Os núcleos de certos isótopos também têm spin e possuem número quântico, I . O núcleo de hidrogênio comum, ^1H (um próton), é como o elétron: seu número quântico de spin I é $1/2$ e pode assumir um dos dois estados de spin: $+1/2$ e $-1/2$. Isso significa que os momentos magnéticos permitidos para $I = 1/2$ são $m = +1/2$ ou $m = -1/2$. Outros núcleos com número quântico de spin $I = 1/2$ são o ^{13}C , o ^{19}F e o ^{31}P . Alguns núcleos como o ^{12}C , ^{16}O e o ^{32}S não possuem spin ($I = 0$), esses núcleos não apresentam espectro de RMN.

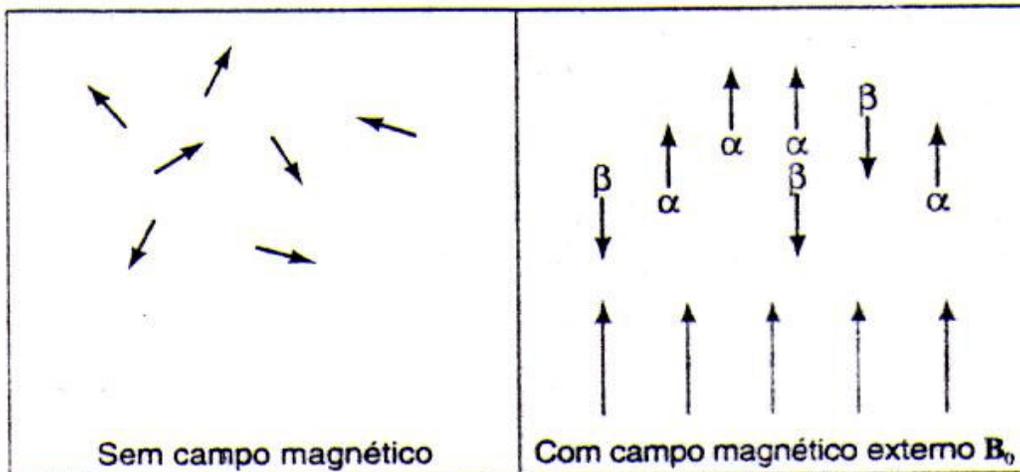
Como o próton possui carga elétrica, a rotação do próton gera um pequeno momento magnético. Este pequeno momento magnético confere ao próton em rotação as propriedades de uma pequena barra magnética ¹.

Figura-1 (a) O campo magnético associado ao próton em rotação. (b) O próton em rotação se assemelha a um ímã.



Na ausência de um campo magnético (**figura-2**), os momentos magnéticos dos prótons de uma dada amostra estão orientados aleatoriamente. Quando o composto contendo hidrogênio (e portanto prótons) é colocado em um campo magnético externo aplicado, os prótons podem assumir uma das duas orientações possíveis, com relação ao campo magnético externo. O momento magnético do próton pode estar alinhado “a favor” do campo externo (estado de spin α) ou “contra” o mesmo (estado de spin β)².

Figura-2 Prótons desorientados na ausência de um campo magnético e orientados quando expostos a um campo magnético externo B_0



Como era de se esperar, os dois alinhamentos do próton em um campo magnético externo não possuem energias iguais. Quando o hidrogênio está alinhado a favor do campo magnético, sua energia é menor do que quando está alinhado contra o campo magnético.

É necessária energia para fazer o próton passar de seu estado de menor energia (a favor do campo) para seu estado de maior energia (contra o campo). Em um espectrômetro de RMN essa energia é fornecida pela radiação eletromagnética na região de rf. Quando essa absorção de energia ocorre, diz-se que os núcleos estão em ressonância com a radiação eletromagnética. A energia é necessária proporcional à intensidade do campo magnético ¹.

1.1.2. Espectro de RMN de ¹H. Deslocamento Químico

Se os núcleos de hidrogênio perdessem seus elétrons e fossem completamente isolados de outros núcleos, todos os núcleos de hidrogênio (prótons) absorveriam energia na mesma força de campo magnético, para uma dada frequência de radiação eletromagnética. Felizmente não é isso o que acontece. Numa dada molécula, alguns núcleos de hidrogênio estão em regiões de maior densidade eletrônica que outros, e em consequência disso os núcleos (prótons) absorvem energia em forças de campo magnético ligeiramente diferente. Conseqüentemente, os sinais para tais prótons ocorrerão em diferentes posições no espectro de RMN; diz-se que eles possuem diferentes **deslocamentos químicos**. A força de campo real, na qual a absorção ocorre (o deslocamento químico), depende muito do ambiente magnético de cada próton. Esse ambiente magnético depende de dois fatores: os campos magnéticos gerados por elétrons circulantes e os campos magnéticos que resultam de outros prótons vizinhos (ou outros núcleos magnéticos) ¹.

Os deslocamentos químicos são medidos ao longo da escala horizontal do espectro, a escala delta σ (em unidades de parte por milhão). A Força do campo magnético aplicado externamente aumenta da esquerda para a direita, logo os sinais do lado esquerdo do espectro estão em campo baixo e os do lado direito em campo alto ¹.

O **ponto de referência** a partir do qual se medem os deslocamentos químicos, dá-se em relação ao composto tetrametilsilano (CH₃)₄Si (TMS) ou ao TSP(trimetil-silil-propionato de sódio). Devido à baixa eletronegatividade do silício, os prótons do silano apresentam uma blindagem maior que na maioria das moléculas orgânicas ³.

Tabela 1. Deslocamentos Químicos para diversos prótons.

Tipo de próton		Deslocamento químico δ /ppm
Ciclopropano		0,2
Primário	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$	0,9
Secundário	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{R}_2\text{C}-\text{H} \end{array}$	1,3
Terciário	$\text{R}_3\text{C}-\text{H}$	1,5
Vinílico	$\text{C}=\text{C}-\text{H}$	4,6-5,9
Acetilénico	$\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$	2-3
Aromático	$\text{Ar}-\text{H}$	6-8,5
Benzílico	$\text{Ar}-\text{C}-\text{H}$	2,2-3
Alílico	$\text{C}=\text{C}-\text{CH}$	1,7
Fluoretos	$\text{H}-\text{C}-\text{F}$	4-4,5
Cloretos	$\text{H}-\text{C}-\text{Cl}$	3-4
Brometos	$\text{H}-\text{C}-\text{Br}$	2,5-4
Iodetos	$\text{H}-\text{C}-\text{I}$	2-4
Álcoois	$\text{H}-\text{C}-\text{OH}$	3,4-4
Éteres	$\text{H}-\text{C}-\text{OR}$	3,3-4
Ésteres	$\text{RCOO}-\text{C}-\text{H}$	3,7-4,1
Ésteres	$\text{H}-\text{C}-\text{COOR}$	2-2,2
Ácidos	$\text{H}-\text{C}-\text{COOH}$	2-2,6
Compostos de carbonilo	$\text{H}-\text{C}-\text{C}=\text{O}$	2-2,7
Aldeídico	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{RC}=\text{O} \end{array}$	9-10
Hidroxílico	$\text{RO}-\text{H}$	1-5,5
Fenólico	$\text{ArO}-\text{H}$	4-12
Enólico	$\text{C}=\text{C}-\text{O}-\text{H}$	15-17
Carboxílico	$\text{RCOO}-\text{H}$	10,5-12
Amínico	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{RN}-\text{H} \end{array}$	1-5

i. BLINDAGEM E DESBLINDAGEM DOS PRÓTONS

Nem todos os prótons absorvem energia num campo magnético de mesma intensidade. A posição geral do sinal em um espectro de RMN - isto é, a intensidade do campo magnético necessária para provocar a absorção de energia – pode estar relacionada com as densidades eletrônicas e com a circulação dos elétrons nos compostos. Sob a influência de um campo magnético externo, os elétrons se movimentam em determinados caminhos preferenciais. Por isso, e por serem também partículas carregadas, geram pequenos campos magnéticos. Esse pequeno campo magnético é chamado de **campo induzido**. Se o campo magnético se opõe ao campo magnético externo, o campo magnético percebido pelo próton é ligeiramente menor do que o campo externo. Então, diz-se que os elétrons blindam o próton, porém, se o campo induzido reforça o campo externo, então o campo sentido pelo próton aumenta e o próton apresenta-se blindado¹.

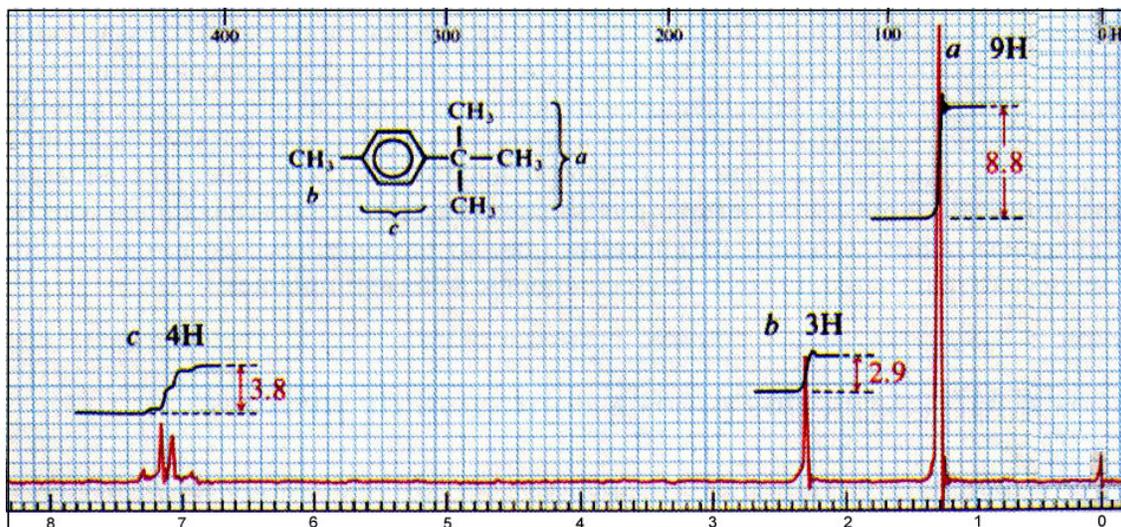
O grau de blindagem de um próton é proporcional à densidade eletrônica relativa ao redor do mesmo, e este, por sua vez depende, em grande parte da presença ou não de grupos eletronegativos ligados ao carbono do hidrogênio³.

Um próton blindado requer uma indução magnética mais forte, enquanto que o próton desblindado requer uma indução magnética mais baixa para se obter o valor particular da indução magnética de acordo com a absorção adequada. Conseqüentemente, a blindagem desloca a absorção para campos mais altos e a desblindagem desloca a absorção para campos mais baixos³.

i.i. Integração das Áreas dos Picos. A Curva Integral

A magnitude relativa dos sinais é muito importante no assinalamento de grupos particulares de átomos de hidrogênio. Porém, o que importa não é necessariamente a altura de cada pico, mas a área abaixo deles. Quando medidas com exatidão, estas áreas estão na mesma proporção do número de hidrogênios responsáveis por cada sinal do espectro³.

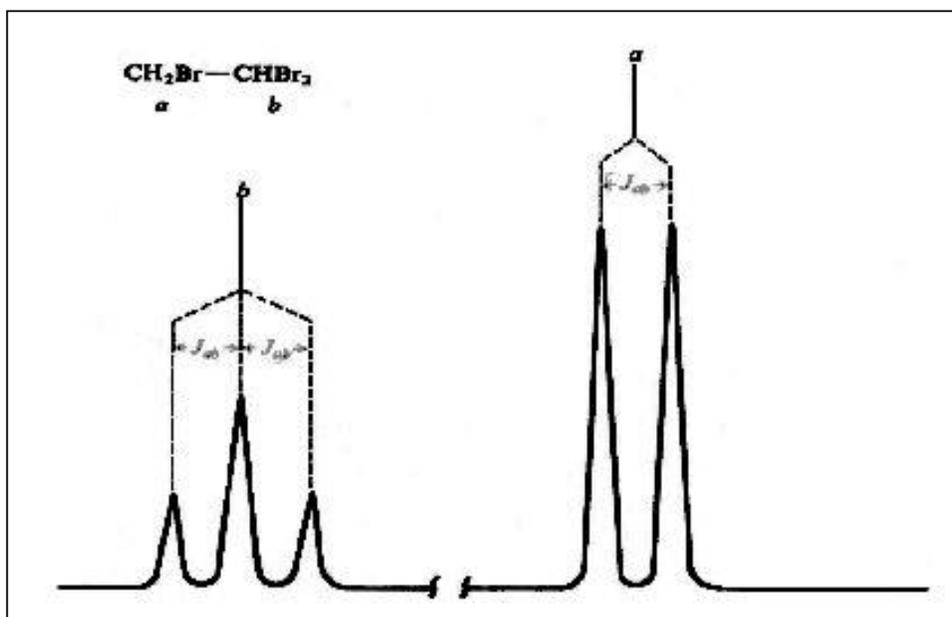
Figura-03 Integração das áreas proporcional ao número de H.



i.i.i. Desdobramentos de sinais (acoplamento spin-spin).

O desdobramento dos sinais no espectro de RMN resulta do acoplamento spin-spin. O sinal esperado de cada conjunto de prótons equivalentes aparece não como pico singelo, mas sim como um grupo de picos. O desdobramento traduz o ambiente dos prótons responsáveis pela absorção, não em relação aos elétrons, mas em relação a outros prótons adjacentes³.

Figura-4 O sinal a desdobra-se num dubleto por acoplamento com um próton. O sinal b desdobra-se num triplete por acoplamento com dois prótons



1.1.3. Vantagens da Técnica

Atualmente a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) vem apresentando um enorme crescimento na pesquisa pura, como: a química e a física, e também na pesquisa aplicada, como na indústria farmacêutica, petrolífera, alimentícia, dentre outras. Na área agrícola é utilizada na análise do teor da umidade de sementes de milho, trigo, arroz, feijão e sorgo, possibilita controlar rapidamente a qualidade de grãos e sementes durante armazenamento². Outro fator de grande importância é o tempo gasto. "Quando comparamos a análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa, que leva cerca de seis horas para ser realizada, com a RMN, que leva uma hora, percebemos a grande vantagem desta última"⁴.

As vantagens do uso da técnica de RMN frente às outras técnicas qualitativas, como: infravermelho, ultravioleta e técnicas quantitativas, como: cromatografia líquida e gasosa são inúmeras, dentre elas pode-se citar:

- Rapidez da análise (segundos ou minutos)
- Não destrói a amostra (a análise pode ser repetida na mesma amostra)
- A amostra não precisa de uma pré-preparação sofisticada
- Os resultados podem ser coletados, processados e armazenados no computador.

1.2.O Vinho

O Vinho

O vinho, não é, talvez, o sangue da vinha, mas sim o das rosas

A noite, não é, talvez, se não a pálpebra do dia

Procura ser feliz ainda hoje

Não sabes o que te reserva o dia de amanhã

Toma uma taça cheia de vinho

Senta-te ao clarão do luar

Talvez amanhã a lua te procure em vão.

Poeta Persa: Omar Khayyam (poeta do vinho)

1.2.1. A história do Vinho

Não se pode apontar precisamente o local a época em que o vinho foi feito pela primeira vez, do mesmo modo que não sabemos quem foi o inventor da roda. Uma pedra que rola é um tipo de roda; um cacho de uvas caído, potencialmente, torna-se, um tipo de vinho. O vinho não teve que esperar para ser inventado: ele estava lá, onde quer que uvas fossem colhidas e armazenadas em um recipiente que pudesse reter seu suco ⁵.

A mais citada de todas as lendas sobre a descoberta do vinho é uma versão persa que fala sobre Jamshid, um rei persa sem-imitológico que parece estar relacionado a Noé, pois teria construído um grande muro para salvar os animais do dilúvio. Na corte de Jamshid, as uvas eram mantidas em jarras para serem comidas fora da estação. Certa vez, uma das jarras estava cheia de suco e as uvas espumavam e exalavam um cheiro estranho sendo deixadas de lado por serem inapropriadas para comer e consideradas possível veneno. Uma donzela do harém tentou se matar ingerindo o possível veneno. Ao invés da morte ela encontrou alegria e um repousante sono. Ela narrou o ocorrido ao rei que ordenou, então, que uma grande quantidade de vinho fosse feita e Jamshid e sua corte beberam da nova bebida ⁵.

Um fato muito interessante, que ocorreu no Egito, e que mostra o cuidado que os egípcios dedicavam ao vinho, foi a descoberta feita em 1922 na tumba do jovem faraó Tutankamon (1371-1352 a.C.). Foram encontradas 36 ânforas de vinho algumas das quais continham inscrições da região, safra, nome do comerciante e até a inscrição "muito boa qualidade!" ⁶.

Já em terras gregas, o amor dos gregos pelos vinhos pode ser avaliado pelos "Simpósios", cujo significado literal é "bebendo junto". Eram reuniões (daí o significado atual) onde as pessoas se reuniam para beber vinho em salas especiais, reclinados confortavelmente em divãs, onde conversas se desenrolavam num ambiente de alegre convívio. Todo Simpósio tinha um presidente cuja função era estimular a conversação. Embora muitos Simpósios fossem sérios e constituídos por homens nobres e sábios, havia outros que se desenvolviam em clima de festa, com jovens dançarinas ao som de flautas ⁷.

O vinho chegou no sul da Itália através dos gregos a partir de próximo de 800 a.C. No entanto, os etruscos, já viviam ao norte, na região da atual Toscana, e elaboravam vinhos e os comercializavam até na Gália e, provavelmente, na Borgonha. Não se sabe, no entanto se eles trouxeram as videiras de sua terra de origem (provavelmente da Ásia Menor ou da Fenícia) ou se cultivaram uvas nativas da Itália, onde já havia videiras desde a pré-história. Deste

modo, não é possível dizer quem as usou primeiro para a elaboração de vinhos. A mais antiga ânfora de vinho encontrada na Itália é etrusca e data de 600 a.C.⁵.

Quanto ao paladar, os romanos tinham predileção pelo vinho doce, daí fazerem a colheita o mais tardiamente possível, ou, conforme a técnica grega, colher o fruto um pouco imaturo e deixá-lo no sol para secar e concentrar o açúcar (vinhos chamados "Passum"). Outro modo de obter um vinho mais forte e doce era ferver, aumentando a concentração de açúcar (originando o chamado "Defrutum") ou ainda adicionar mel (originava o "Mulsum"). Preparavam também o "semper mustum" (mosto permanente), um mosto cuja fermentação era interrompida por submersão da ânfora em água fria e, portanto, contendo mais açúcar. Esse método é o precursor do método de obtenção do "Süssreserve" das vinícolas alemãs⁵.

Da Europa, através das expedições colonizadoras, as vinhas chegaram a outros continentes, se aclimataram e passaram a fornecer bons vinhos, especialmente nas Américas do Norte (Estados Unidos) e do Sul (Argentina, Chile e Brasil) e na África (África do Sul). A uva foi trazida para as Américas por Cristóvão Colombo, na sua segunda viagem às Antilhas em 1493, e se espalhou, a seguir, para o México e sul dos Estados Unidos e às colônias espanholas da América do Sul. As videiras foram trazidas da Ilha da Madeira ao Brasil em 1532 por Martim Afonso de Souza e plantadas por Brás Cubas, inicialmente no litoral paulista e depois, em 1551, na região de Tatuapé⁸.

1.2.2. Mercado de uva e Vinho no Brasil

A exploração vitícola no Brasil é uma atividade bastante antiga, conforme demonstram os registros de cultivo de uva pelos jesuítas no Estado do Rio Grande do Sul, no século XVII. No Estado de Santa Catarina, o cultivo de videira teve seu início no ano de 1864. Contudo, a introdução desta atividade no Vale do Rio do Peixe, principal região produtora naquele Estado, data do ano de 1913, tendo sido intensificada a partir de 1930, notadamente pelos colonizadores de origem italiana que imigraram do Rio Grande do Sul⁹.

A produção de uvas no Brasil está localizada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Constitui-se em atividade consolidada, com importância sócio-econômica nos Estados do Rio Grande do Sul, que apresenta participação majoritária em área colhida com 58,14% (safra 1999), seguido por São Paulo (18,77%), Paraná (9,17%), Santa Catarina (4,97%), Pernambuco (4,76%), Bahia (2,89%) e Minas Gerais (1,30%). Cerca de 56,13% da produção

de uvas é destinada à elaboração de vinhos, sucos, destilados e outros derivados, perfazendo um total de 549.306 toneladas daquela fruta (safra 2000). Além dos Estados tradicionalmente produtores de uva, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Ceará despontam como potenciais de uvas de mesa ¹⁰.

A produção de vinhos e derivados ocorre em doze regiões viti-vinícolas, com maior concentração no Estado do Rio Grande do Sul, onde são elaborados anualmente 300 milhões de litros de vinho e mosto em média, representando 90% da produção nacional. Cerca de 20% da produção de uvas provêm de variedades viníferas e 80% de variedades americanas e híbridas ¹⁰.

O Brasil apresenta uma característica incomum quanto à estrutura produtiva e mercadológica no setor vinícola. Enquanto que em outros países somente são admitidos produtos originários de variedades de uvas finas (*Vitis vinífera*), além destes, existem no mercado produtos de variedades americanas e híbridas (*V. labrusca* e *V. Bouquirna*), os quais representam 80% do volume total da produção ¹¹.

O único lugar do país que se produz uva destinada à elaboração de vinhos finos é a região de Campanha Central no Rio Grande do Sul, diferentemente do perfil observado na Serra Gaúcha, que se caracteriza por uma exploração empresarial em grandes áreas e uso intensivo da mecanização ⁸.

Porém, atualmente a população brasileira está consumindo mais vinho de melhor qualidade, devido às profundas alterações estruturais no parque vinícola brasileiro, fruto de esforços que permitiram um grau de evolução satisfatório em relação às exigências do mercado nacional. Aspectos como qualidade e preço são, atualmente, compatíveis com a dimensão do mercado e com as exigências da maioria dos consumidores ¹².

O nível tecnológico atingido pelo setor agro-industrial para vinhos finos é comparável ao existente nos países de avançada vitivinicultura. Como consequência disso, os vinhos finos nacionais são considerados de boa qualidade, enquanto os vinhos de consumo corrente apresentam qualidade regular. Para estes últimos, há maior necessidade de investimentos em tecnologia de produção, tanto da matéria-prima quanto no processamento ⁸.

Um dos aspectos mais críticos à competitividade do setor vitivinícola nacional está na tributação que incide sobre os produtos. Diversos estudos têm mostrado que, enquanto no Brasil o conjunto de impostos incidente sobre o vinho supera a 40% do preço ao consumidor, nos principais países concorrentes como Argentina, Uruguai e Chile, este valor gira em torno de 20%. Com estas cargas tributárias a onerar os custos de produção, além de outros fatores também de ordem política (cotas com imposto de importação diferenciada para o Chile,

isenção de tributação para países do Mercosul, entre outros), criou-se um cenário onde o Brasil possui baixa capacidade competitiva, tanto para vender o produto nacional no exterior, quanto para manter-se competitivo no próprio mercado interno ¹¹. Por isso, os investimentos nesta área devem ser cautelosos, visto que na década passada investiu-se muito na produção de vinho branco, pois se acreditava que este seria o produto que obteria maior aceitação no Brasil devido ao clima do país. Contudo após a descoberta e a divulgação das propriedades terapêuticas do vinho tinto em momentos mais recentes, este passou a ser consumido, levando centenas de produtores ao replantio de grandes áreas, desta vez com variedades tintas⁷.

1.2.3. O Vinho e seus constituintes

O vinho é composto por uma mistura complexa formada por centenas de compostos presentes em diferentes concentrações. Os compostos dominantes são água, glicerol, açúcares, ácidos orgânicos e vários íons. Alguns álcoois aromáticos, compostos fenólicos, bem como aminoácidos, aldeídos e ésteres estão presentes como compostos minoritários. A presença de aminoácidos é de grande importância, além de serem fontes de nitrogênio para as leveduras durante a fermentação, possuem um importante papel na composição de flavorizantes ¹³.

Os principais elementos que o identificam na boca são a acidez, a maciez, o tanino e o álcool. Alguns ácidos orgânicos como o cítrico, málico, tartárico, são formados pelo conjunto dos ácidos minerais e orgânicos presentes no solo e na planta. Os ácidos tartárico e málico são responsáveis por mais de 90% da acidez total. ^{14,15,16}. A acumulação desses ácidos dá-se durante o período de crescimento da uva por translocação das partes vegetativas¹⁷ ou por síntese nos próprios grãos ¹⁸. O ácido tartárico é específico da uva e do vinho. Não é encontrado em nenhum outro vegetal superior em quantidades significativas ¹⁹. No grão da uva, aumenta da antese até o início da maturação, declinando contínua e lentamente até a maturação completa ^{20,21}. Tem característica de ácido mediantemente forte e é relativamente resistente à oxidação. Por possuir duas funções de ácido, tem duas possibilidades de dissociação em solução aquosa, nos valores de pK_1 e $pK_2 = 3,04$ e $4,37$, respectivamente ²².

O ácido málico é o mais encontrado no reino vegetal. Na uva, forma-se como componente secundário da glicólise ²³. Aumenta da antese até o início da maturação e decresce marcadamente até a maturação completa ^{24,25,26}. É considerado um ácido fraco e pouco resistente à respiração oxidativa. Possui duas funções de ácido, a exemplo do ácido

tartárico, e dissocia-se em solução aquosa nos valores de pK_1 e $pK_2 = 3,46$ e $4,13$, respectivamente²². Durante a fermentação alcoólica seu teor pode diminuir 20 a 30%¹⁴. Em vinhos que sofrem fermentação malolática seu teor diminui ainda mais, chegando a zero na maioria dos casos²⁷.

Já os ácidos succínico, láctico, acético, butírico, fórmico, propiônico e carbônico, se originam durante a fermentação. O ácido succínico, também denominado ácido butanodióico, foi observado pela primeira vez por Agricola em 1946 no destilado do âmbar. É encontrado em fósseis, fungos e liquens. Tem um poder antioxidante forte e é empregado como um inibidor orgânico para proteção do aço-carbono, ferro e outros metais³³. Caracteriza-se fisicamente por ser inodoro, cristaliza-se na forma de prisma monocíclico e tem um sabor muito ácido³³. A maciez é determinada pelos açúcares presentes nas uvas (frutose e glicose) e também pela glicerina, pectinas, gomas etc. O tanino é formado por substâncias presentes, sobretudo na casca, sementes e cabinhos das uvas, o que causa a sensação de adstringência na boca. Por fim, o álcool mais presente é o etílico, que ajuda a suavizar a acidez e a equilibrar os sabores do vinho.

2. OBJETIVOS

- Determinar o limite de detecção da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) de 1H (200 MHz) através de estudos da relação concentração x área.
- Através da análise qualitativa dos vinhos, determinar a complexidade da mistura dos compostos orgânicos presentes além dos compostos majoritários (água, álcool).
- Desenvolver procedimentos de análise qualitativa e quantitativa de vinhos por RMN visando à obtenção de resultados rápidos e precisos.
- Aplicação da metodologia até o momento desenvolvida na quantificação dos ácidos succínico, tartárico e málico presentes diretamente nas amostras de vinhos comerciais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram preparadas três soluções de padrões dos ácidos orgânicos mais importantes na composição do vinho, ácido succínico, tartárico e málico.

3.1. Preparo das soluções dos respectivos ácidos.

Primeiramente preparou-se 5 mL de uma solução estoque de ácido succínico 0,04mol/L em H₂O com 25% em D₂O (v/v). A partir desta solução foram preparadas 6 diluições (em água destilada) de concentrações: 0,025 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4; 0,6; 0,8 ; 1,0; 1,5 g.L⁻¹. Todas estas diluições continham 36 µL de uma solução 0,5% de TSP em D₂O.

O preparo da solução do padrão do ácido málico e do ácido tartárico procedeu-se da mesma forma como descrito anteriormente para o ácido succínico.

3.2. Análise da influência do número de varreduras

Cada amostra diluída foi submetida a cinco diferentes varreduras com os seguintes números de scans: 16, 32, 64, 128, 256.

3.3. Análise das amostras diluídas.

As amostras diluídas dos três ácidos orgânicos foram analisadas pelo método de RMN ¹H em um aparelho Bruker 200 MHz (4,7 Tesla).

3.4. Análise dos dados obtidos

Através dos dados obtidos pelos espectros de RMN de ¹H, foi construída uma curva de calibração (área sinal TSP/área do sinal ácido x concentração) para cada ácido analisado.

3.5. Análise das amostras dos vinhos comerciais.

Foram obtidas alíquotas de 4 mL de vinho com 25% de D₂O (v/v), sem nenhum método de pré-preparação, das amostras e analisadas por RMN de ¹H.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1 Preparação da curva de calibração com ácido succínico

Inicialmente foram estudadas soluções do ácido succínico de diferentes concentrações (1,5 g/L até a concentração limite) a fim de determinar o limite de detecção do aparelho BRUKER 200 MHz (4,7 Tesla). O valor encontrado para a concentração limite foi de 0,025 g/L, levando em consideração a relação sinal/ruído no espectro.

Uma vez delineado o valor de concentração limite para a substância em estudo, foram realizados experimentos a fim de investigar a influência do número de varreduras (scans) sobre a medida da área do sinal e também da relação área do TSP(0,00 ppm)/área do sinal do ácido (normalização) para a solução de ácido succínico 0,025g/L como mostram as tabelas 2 e 3.

Neste estudo determinou-se o desvio padrão e o erro num total de três medidas para diferentes números de scans (16, 32, 64, 128, 256).

Figura 5-Estrutura do ácido succínico (singlete em 2,56 ppm relativo aos quatro hidrogênios dos carbonos 2 e 3).

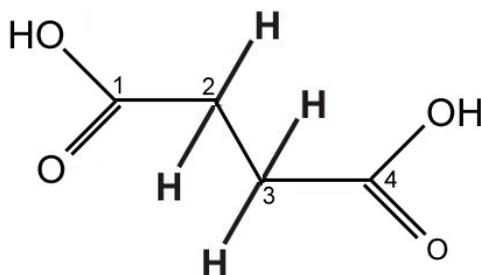


Tabela 02: Valores de área em função do número de scans para diferentes medidas do mesmo sinal em 2,56ppm.

[0,025] (g/L)	16 Scans	32 Scans	64 Scans	128 Scans	256Scans
Experimento	Área sinal				
medida 1	0,01205	0,01195	0,01216	0,01027	0,01054
medida 2	0,01205	0,01284	0,01120	0,01117	0,01068
medida 3	0,01422	0,01067	0,01140	0,01022	0,01094
valor médio	0,01280	0,01180	0,01160	0,01060	0,01070
desvio padrão	0,0013	0,0011	0,0005	0,0005	0,0002
erro %	9,8083	9,2286	4,3713	5,0660	1,8934

Tabela 03: Valores da relação área do sinal TSP/área do sinal do ácido succínico (normalização) em função do número de scans para diferentes medidas do mesmo sinal em 2,56ppm

[0,025] (g/L)	16 Scans	32 Scans	64 Scans	128 Scans	256Scans
Exp.	ÁreaTSP/sinal	ÁreaTSP/sinal	ÁreaTSP/sinal	ÁreaTSP/sinal	ÁreaTSP/sinal
medida 1	27,0772	32,6828	26,3553	30,5969	30,6708
medida 2	27,0772	26,7632	29,2482	27,8469	30,2472
medida 3	23,2799	29,8754	28,1518	30,5176	29,4334
valor médio	25,8114	29,7738	27,9184	29,6538	30,1171
desvio padrão	2,1924	2,9611	1,4605	1,5653	0,6289
erro %	8,4938	9,9453	5,2313	5,2787	2,0881

Como pode ser observado, os valores de área e da relação área TSP/área sinal ácido para concentração de 0,025g/L de ácido succínico sofrem influência das condições experimentais das medidas.

O desvio padrão e o erro diminuiram consideravelmente a partir de 64 scans, mantiveram-se próximos em 128 scans e apresentaram os menores valores em 256 scans.

Entretanto, considerando-se os três últimos scans (64, 128, 256), percebeu-se a vantagem da leitura de 64 scans devido à relação tempo/benefício, haja vista que a mesma demorou 5 minutos, enquanto que a leitura em 256 scans levou cerca de 25 minutos e não houve ganhos tão significativos em relação aos erros apresentados nas tabelas anteriores.

Depois de determinados o limite de detecção do aparelho (0,025 g/L) e o número ideal de varreduras (64 scans), foi estudada a correlação entre a área do sinal do TSP (0,00 ppm) x área do sinal do ácido a ser estudado, ácidos: tartárico, málico e succínico em D₂O.

4.2 Quantificação do ácido succínico

Na análise do ácido succínico observou-se um singlete em 2,56 ppm como mostram os espectros a seguir. A figura 6 mostra o espectro de RMN de ¹H para concentração limite de ácido succínico; 0,025g/L . A figura 7 mostra o espectro de RMN de ¹H para concentração de 1,5g/L. Os espectros foram obtidos com acúmulo de 64 scans.

Figura 6. Espectro de RMN de ^1H do ácido succínico (0,025 g/L) com acumulo de 64 scans

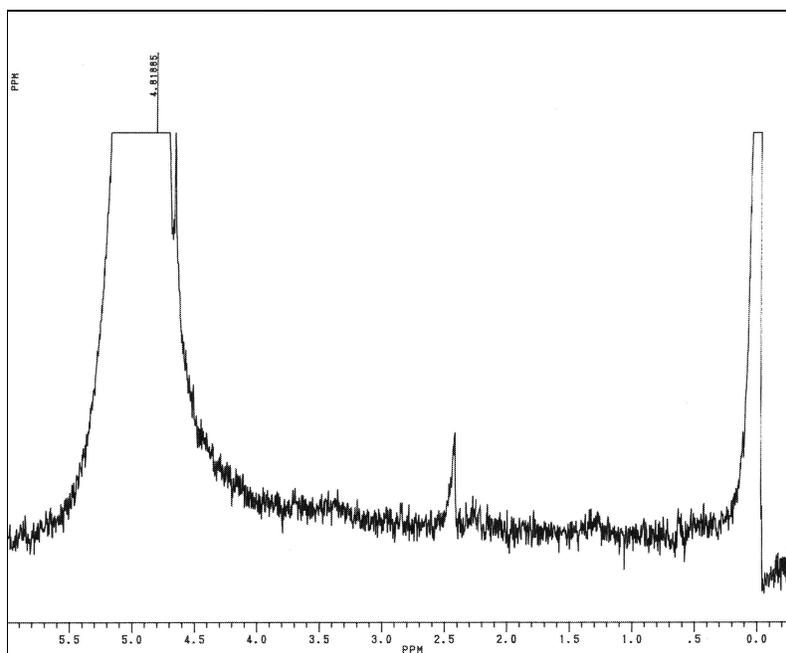
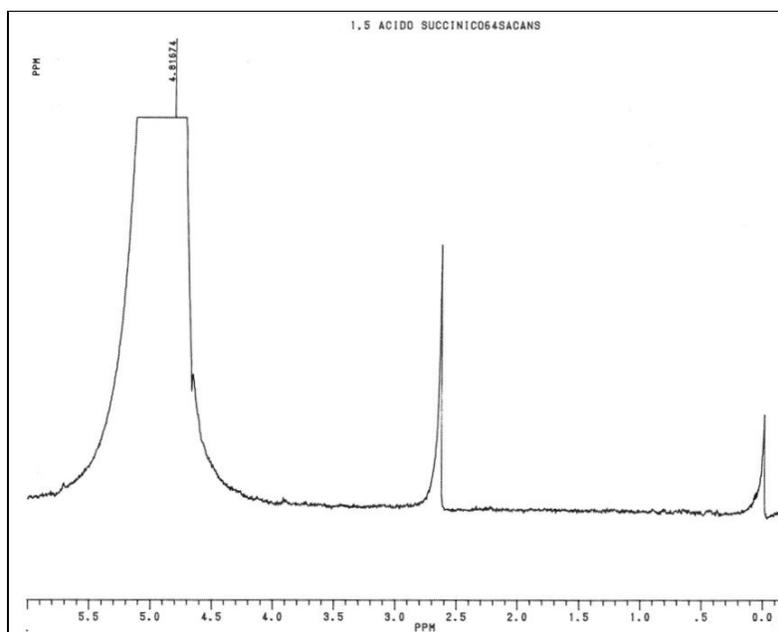


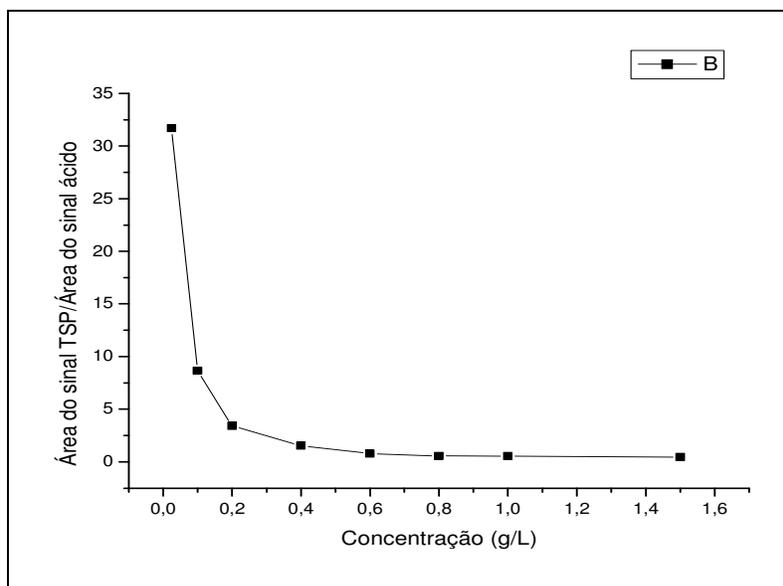
Figura 7. Espectro de RMN de ^1H do ácido succínico (1,50 g/L) com acumulo de 64 scans



O gráfico da relação entre a área do sinal do TSP pela área do ácido em função da concentração de ácido succínico(g/L) (sinal em 2,56 ppm), tendeu para uma equação de 2ª ordem do tipo:

$$Y = 8,0927 - 16,3421 X + 7,7191 X^2, \text{ com fator de correlação de } 0,79655.$$

Figura 8. Gráfico área do sinal TSP/área do sinal 2,56ppm em função da concentração do ácido succínico (g/L) com acumulo de 64 scans



Para valores de maior concentração (1,5 até 0,6 g/L) observou-se uma certa linearidade, devido a grande área do sinal e conseqüentemente medidas mais precisas dos mesmos. Já para valores de concentrações menores (0,4 até 0,025 g/L) houve um crescimento tipicamente exponencial. Para um número fixo de scans (por exemplo, 64), a relação sinal ruído varia grandemente em concentrações menores que 0,4 g/L o que introduz uma falta de precisão nas medidas.

Considerando apenas os pontos de 0,4 até 1,5 g/L, houve um significativo aumento no fator de correlação (0,93432), tornando-se possível a quantificação dos compostos majoritários do vinho com maior precisão para concentrações nessa faixa.

Assim, componentes como: ácido málico, ácido láctico, etanol, glicerol, dentre outros, poderão ser determinados diretamente nas amostras de vinho sem pré-concentração, uma vez que a sua faixa de concentração no vinho fica acima deste limite, conforme mostra a tabela a seguir.

Tabela 4. Concentração de alguns componentes presentes no vinho.

Componente	Concentração (g/L)
Água ²⁹	850-950
Etanol ²⁹	72-120
Frutose ²⁹	1-3
Glicerol ²⁹	5-12
Glicose ²⁹	1-3
Ácido Málico ³⁰	1,70-2,10
Ácido Lático ³⁰	1,70-2,10

Já, em compostos com concentrações abaixo de 0,4 g/L (ácido succínico, ácido acético) este tipo de procedimento poderá fornecer medidas imprecisas, sendo necessário uma pré-concentração que não provoque uma perda por evaporação e nem degradação por ação de temperaturas elevadas.

4.3 Quantificação do ácido tartárico

Na análise da solução do ácido tartárico verificou-se a sobreposição do sinal do mesmo com o sinal da água, fato que tornou impossível a quantificação deste ácido, como mostra a figura 9 abaixo.

Figura 9. Espectro de RMN de ^1H do ácido tartárico(sinal em 4,71 ppm relativo aos hidrogênios dos carbonos 2 e 3) sobreposto ao sinal da água.

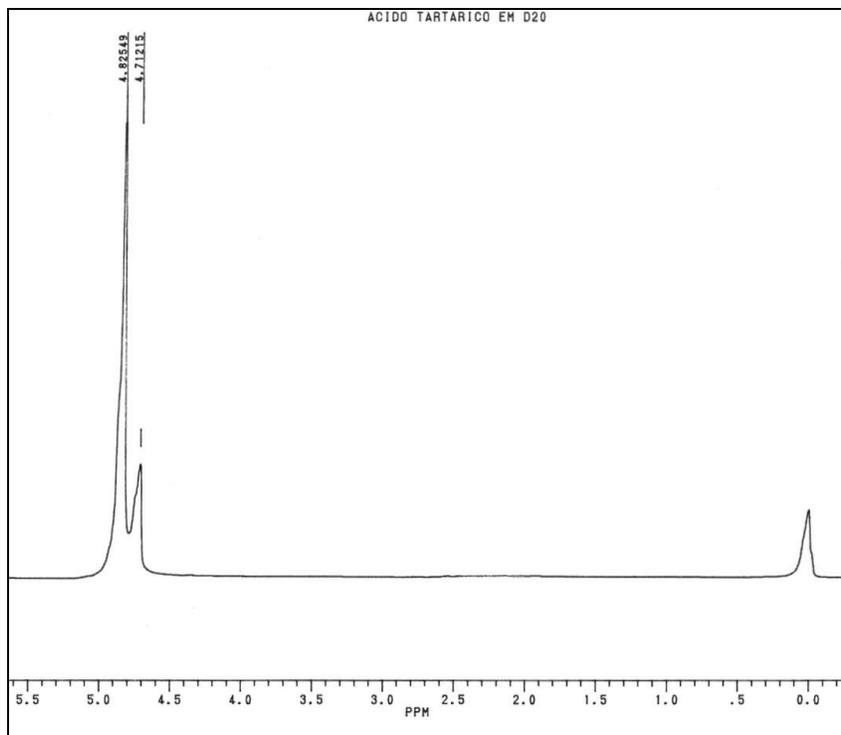
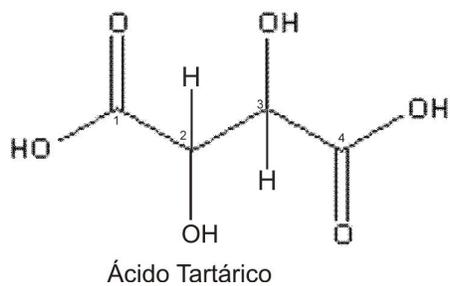


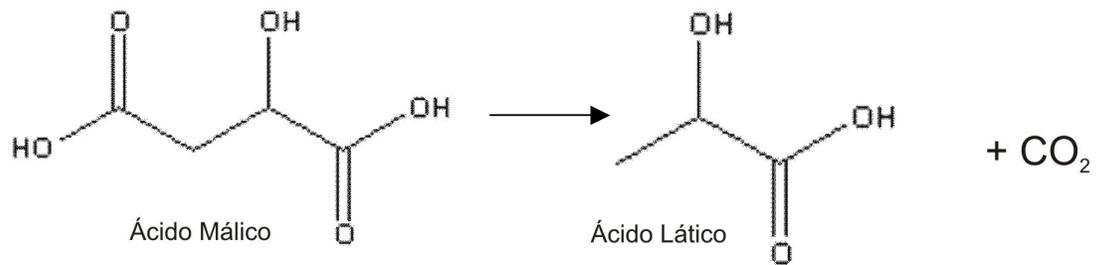
Figura 10. Estrutura do ácido tartárico.



4.4 Quantificação do ácido málico

O ácido málico sofre naturalmente um processo de decomposição chamado de fermentação malolática. A fermentação malolática ocorre devido às bactérias presentes no vinho, que transformam o ácido málico em ácido láctico com a liberação de gás carbônico³¹. Normalmente a preparação do vinho compreende dois processos de fermentação: fermentação alcoólica seguida da fermentação malolática³². Por se tratar de um processo complexo amplo e de extrema importância na qualidade do vinho, o monitoramento deste processo por RMN está sendo desenvolvido em cooperação com produtores de vinho, os quais são os principais interessados neste tipo de quantificação.

Figura 11. Transformação do ácido málico em ácido láctico através da fermentação malolática.



4.5 Aplicação da técnica em amostras de vinhos

Foram analisadas duas amostras de vinhos comerciais para determinação da concentração de ácido succínico das mesmas (figuras 12 e 13).

Figura-12: RMN de ^1H para amostra de vinho Marson.

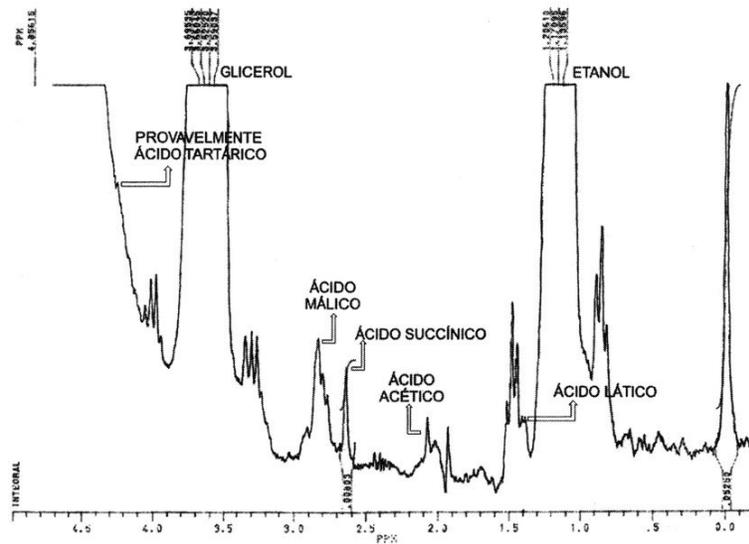
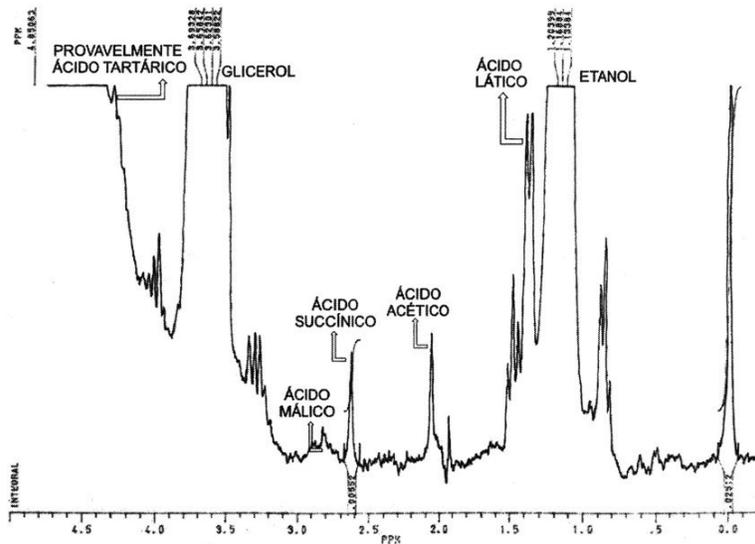


Figura-13: RMN de ^1H para amostra de vinho Aurora



Conforme as duas figuras anteriores obtêm-se através da relação da área TSP/área do sinal do ácido succínico o valor de 6,5 para o vinho Marson e 4,5 para o vinho Aurora, que através do gráfico da figura 9 (área do sinalTsp/área do sinal ácido x concentração de ácido succínico g/L) determinou-se experimentalmente as seguintes concentrações de ácido succínico para os dois vinhos comerciais: 0,15 g/L para o vinho Marson e 0,2 g/L para o vinho Aurora.

Os valores encontrados estão dentro da faixa esperada, haja vista que o ácido succínico encontra-se presente no vinho na faixa de 0,1-0,25 g/L ¹³.

5. CONCLUSÃO

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma ótima técnica na determinação qualitativa de compostos majoritários do vinho, onde através dos espectros de RMN de ^1H dos vinhos comerciais (figuras 12 e 13) foi possível observar vários compostos que caracterizam e influenciam diretamente na qualidade desta bebida tão apreciada no mundo inteiro.

Através dos espectros foi possível observar os picos dos seguintes compostos: água, ácido tartárico, ácido málico, ácido succínico, ácido acético, ácido láctico, etanol e outros mais.

Já a quantificação de certos compostos orgânicos, como, por exemplo, a do ácido tartárico, ficou dificultada pela sobreposição do mesmo com o pico da água. No que diz respeito ao ácido málico e o ácido láctico se faz necessário estudos mais aprofundados sobre o processo denominado de “fermentação malolática”, um processo químico e biológico, que depende de certas culturas de bactérias presentes no vinho que transformam o ácido málico em ácido láctico, e assim conferem ao vinho um sabor mais suave. É o processo mais importante que ocorre durante a vinificação³¹.

Foi possível quantificar a concentração do ácido succínico (singlete em 2,56 ppm) nas amostras dos vinhos comerciais, no entanto, as concentrações encontradas: 0,15 e 0,2 g/L estavam localizadas na parte da curva onde os pontos apresentaram certa imprecisão. Porém os valores encontrados estão de acordo com a literatura.

A partir de concentrações maiores ou iguais a 0,4 g/L é perfeitamente possível quantificar os compostos que estejam nessa faixa (Tabela-4), haja vista o ótimo coeficiente de correlação entre os pontos. O número de varreduras onde se consegue a melhor relação tempo/benefício foi de 64 scans.

Na faixa de 0,4 até 0,025 g/L (limite de detecção) os erros provenientes da relação sinal ruído à 64 scans podem ser minimizados aumentando o número de scans em 256-512. Entretanto, está melhora no ajuste da curva nos implica em um grande aumento no tempo de análise, o que nos desvia do objetivo proposto.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- SOLOMONS T. W. G. ; FRYHLE C. B. **Química Orgânica**, 7ª Edição, V.1, São Paulo, 2002.
- 2- COLAGNO L. A. **Análise do Teor de Óleo em Sementes por RMN**. Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento da Instrumentação Agropecuária. CNPDIA, São Carlos SP,2004
- 3- MORRISON, R. ; BOYD, R. **Química Orgânica**, 13ª Edição, Lisboa, 1996.
- 4- HOFFMAN, F. A. **Aplicação da Ressonância Nuclear Magnética (RMN) na Avaliação da Qualidade do Azeite de Oliva**. Universidade de São Paulo/SP.
- 5- JONHSON, H. **The Story of Wine**, Mitchell-Beazley, Londres, 1989.
- 6- PASSOS, R.; OLTRAMARI, A. C.; SILVA, A. L.; CARO, M.S.B; MARASCHIN, M.- **Análise de trans-resveratrol por 1H-RMN em vinhos tintos produzidos no sul do Brasil**. In: VIII ENCONTRO DE USUÁRIOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR – I ENCONTRO LUSO-BRASILEIRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR, Mangaratiba, 2001. Anais. Rio de Janeiro: AUREMN, 2001.v. 1 , p. 107-108.
- 7- MARASCHIN, R. P. **Caracterização química de vinhos Cabernet Sauvignon produzidos na região da Serra Gaúcha, RS**. (Ênfase em compostos fenólicos). Florianópolis, 2003. 116p.
- 8- MELO L. M. R. **Mercado Brasileiro de Uvas e Vinhos**. Embrapa/CNPUV, Bento Gonçalves, Instrução Técnica 001, 2000.
- 9- ROSIER, J. P & LOSSO, M. **Cadeias produtivas do Estado de Santa Catarina: vitivinicultura**, EPAGRI, Boletim Técnico, 1997. 83:41.
- 10- MELO L. M. R. **Atuação do Brasil no Mercado Internacional de Uvas e Vinhos**. www.cnpuv.embrapa.br/atuamerc.html (29/05/2002)
- 11- PROTAS, J. F. S., CAMARGO, U. A., MELLO, L.M. **A viticultura brasileira: realidade e perspectivas**. In: **Viticultura e Enologia**-atualizando conceitos. EPAMIG. Belo Horizonte, 2002.
- 12- LAPOLLI, J.N. **A competitividade da vitivinicultura brasileira**: Análise setorial e programa de ação com destaque para o Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS: BANRISUL/EMBRAPA – CNPUV/SEBRAE/RS, 1995.
- 13- MORTIMER F. A.; MARTINS M. C.; CARO.M.S.B. **Estudos de limite de detecção de ressonância magnética nuclear ¹H a 4,7 tesla**. IX Jornada brasileira de ressonância magnética nuclear, Rio de Janeiro, 2004.
- 14- PEYNAUD, E. **Étude sur les acides organiques du raisin et du vin**. Bulletin de L'OIV, v.20, n. 191, p.34-51, 1947.

- 15- KLIOWER, H.M. ; HOWARTH, L. ; OMORI, M. **Concentration of tartaric acid and their salts in the *Vitis vinifera* grapes.** American Journal of Enology and Viticulture, v.18, p.42-54, 1967.
- 16- POSSNER, D.R.E. ; KLIOWER, W. M. The localization of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries, *Vitis*, v.24, p.229-240, 1985.
- 17- KLIOWER, W. M. **Changes in concentration of malates, tartrates and total free acids in flowers in berries of *Vitis vinifera*.** American Journal of Enology and Viticulture, v.16, p.92-100,1965.
- 18- HALE, C. R. **Synthesis of organic acids in the fruit of the grape.** Nature, v.195, p. 917-918, 1962.
- 19- WINKLER, A. J. ; COOK, J. A. ; KLIOWER, W. M. ; LIDER, L. A. **General viticulture.** Berkeley: University of California, 1947. 710 p.
- 20- JONHSON, T. ; NAGEL, C. V. **Composition of central Washington grapes during maturation.** American Journal of Enology and Viticulture, v.16, p.92-100, 1965.
- 21- MATSUI, H. ; YUDA, E. ; NAKAGAWA, S. **Physiological studies on the ripening of Delaware Grapes** – Effects of the number of leaves and changes in polysaccharides or organic acids on the sugar accumulation in berries. Engei Gakkai Zasshi, v.48, n.1, p.9-18, 1979.
- 22- USSEGLIO – TOMASSET, L. **Chimica Enologica**, Brécia: A e B, 1979. 309 p.
- 23- RUFFNER, H. P. **Metabolism of tartaric and malic acids in Vitis**; a review. Part A and Part B. *Vitis*, v.21, p.247-259; 346-358, 1982.
- 24- RAO, M. M. ; PANDEY, R. M. **Organic Acid metabolism during development and storage of Pusa seedless grapes.** Indian Plant Physiology, v.18, n.1, p. 20-25, 1975.
- 25- CASH, J. N. ; SISTRUNK, W. A. ; STUTTE, C. A. **Changes in nonvolatile acids of Concord grapes during maturation.** Journal Food Science, v.42, n.2, p.543-544, 1997.
- 26- CARROL, D. E. ; MARCY, J. E. **Chemical and physical changes during maturation of muscadine grapes (*Vitis rotundifolia*).** American Journal of Enology and Viticulture, v.33, n.3, p.168-172, 1982.
- 27- DAVIS, C. R. ; WIBOWO, D. ; ESCHENBRUNCH, R ; LEE, T. H. ; FLEET, G. H. **Practical implication of malolatic fermentation.** A review. American Journal of Enology and Viticulture, v.36, n.4, p.290-298,1985.
- 28- PEYNAUD, E. **Enologia prática** – conocimiento y elaboración Del vino. Madrid: Mundi – Prensa, 1984. 405 p.
- 29- www.academiadovinho.com.br (acessado em 15/11/04)

30- GUERRA, C. C. ; DAUD C. E. ; RIZON L. A. **Evolução dos teores dos ácidos tartárico e málico durante a maturação de uvas tintas.** Universidade Federal de Santa Maria/ RS.

31- REVEL, G. **Contribution to the Knowledge of Malolactic Fermentation Influence on Wine Aroma,** J. Agric. Food. Chem., 1999, 47, 4003.

32- FUNEL, L. A. ; **Microbiology of Malolactic Fermentation: Molecular aspects.** Elsevier, Letters 126, p.209-214,1995.

33-AMADORI, M. F.; SPINELLI, A.. **Estudos do ácido succínico como inibidor da corrosão do aço-carbono .** Florianópolis, 1998. 51f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina.