

# Influência da Concentração de Levedura na Concentração de Polifenóis em Vinhos Tintos Cabernet Sauvignon

Jandora Severo Poli<sup>1</sup>, Gildo Almeida da Silva<sup>2</sup>, Poliana Deyse Gurak<sup>1</sup>, Carolina Madalozzo Poletto<sup>1</sup> e Guido Wenzel<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista CNPq-Categoria DTI/Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, 95700-000 Bento Gonçalves - RS - E-mail: [jandorap@yahoo.com.br](mailto:jandorap@yahoo.com.br). <sup>2</sup>Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, 95700-000 Bento Gonçalves - RS. <sup>3</sup>Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo - RS.

## RESUMO

O consumo regular de vinhos tintos previne doenças degenerativas como câncer e doenças cardiovasculares. Atribui-se a este fato, a presença de polifenóis. Estes compostos são importantes componentes do vinho, pois são transferidos da casca e das sementes para o mosto. O presente trabalho teve como objetivo verificar se o aumento da concentração de levedura altera a concentração de polifenóis de vinhos tintos. Foram realizadas análises de polifenóis por Folin-Ciocalteu e a capacidade antioxidante por DPPH de vinhos elaborados com uvas da cultivar Cabernet Sauvignon com diferentes concentrações da levedura *Sacch. cerevisiae* Embrapa 1vvt/97 (0; 2; 4; 6; 8 e 10% v/v), contendo  $10^7$  células/mL. Os polifenóis, assim como a capacidade antioxidante, não apresentaram diferenças significativas com o aumento da concentração da levedura, mas o tratamento referente à concentração de 6% indica ter induzido à formação de compostos fenólicos polimerizados.

## INTRODUÇÃO

Evidências epidemiológicas relacionam os compostos fenólicos com algumas propriedades preventivas contra doenças crônicas, como câncer, doenças cardiovasculares, entre outras. O consumo de bebidas alcoólicas fermentadas (não destiladas) em quantidades moderadas tem sido associado à redução de risco de doenças coronarianas. O vinho tinto tem maior efeito protetor do que outras bebidas alcoólicas, sugerindo o papel dos compostos fenólicos do vinho tinto na prevenção de doenças relativas ao estresse oxidativo. Os compostos fenólicos são importantes componentes do vinho, pois contribuem com suas características sensoriais de cor, aroma, “corpo” e adstringência; esta última propriedade organoléptica é atribuída à presença de taninos (Ribéreau-Gayon et al., 1982, Liu, 2004).

A importância dos compostos fenólicos na enologia é bem conhecida. Estas substâncias intervêm nas características organolépticas do vinho (aroma, adstringência e dureza), em problemas de higiene alimentar (efeito vitamínico P e efeito bactericida), e estão envolvidos com o processo de transformação do vinho (durante o envelhecimento). São substâncias provenientes das partes sólidas do rácimo, cascas e sementes, responsáveis pelas diferenças encontradas entre vinhos brancos e tintos (Ribéreau-Gayon et al., 1982).

Entre os compostos fenólicos, os flavonóides destacam-se por apresentarem atividade antioxidante, contribuição no sabor e na cor de muitas frutas, vegetais e seus derivados, tais como o vinho, chá e chocolate (Croft, 1999). Entre eles estão as antocianinas, que são as responsáveis pela

coloração vermelha e azul de algumas frutas e vegetal (Liu, 2004, Villiers et al., 2004), como uvas e flores (Villiers et al., 2004).

Os taninos se caracterizam por sua propriedade de combinar-se com proteínas e com outros polímeros, tais como polissacarídeos (Ribéreau-Gayon et al., 1982), estão presentes, principalmente, na casca, no engaço e nas sementes das uvas (Amerine e Joslyn, 1970). Dentre as características dos taninos destaca-se o sabor adstringente que ele provoca nos vinhos, pois ele precipita as proteínas impedindo a função lubrificante da saliva, além de ser um inibidor enzimático, pois reagem com os sítios ativos das enzimas (Ribéreau-Gayon et al., 2000). Um fator importante dos taninos é a sua ligação com antocianinas. Trata-se de uma reação de condensação, tendo o etanal como a ponte de ligação entre as duas moléculas. O complexo formado se apresenta com maior estabilidade. Torna-se mais resistente à ação do pH e do SO<sub>2</sub> (Guerra, 1997).

Os antioxidantes impedem a ação dos radicais livres, que beneficia a saúde humana. Eles diminuem a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), previnem doenças cardiovasculares, arteriosclerose, câncer, entre outras, desde que sejam consumidos numa quantidade não superior a exigida pelo organismo humano. São capazes de doar átomos de hidrogênio (H•), formando um radical de pouca reatividade, anulando o potencial inicial dos radicais livres, altamente reativos.

Como os flavonóides estão envolvidos nos processos de inibição de processos oxidativos, se reveste de importância por aumentar os níveis de ingestão destes agentes antioxidantes. Muitos compostos fenólicos, como os flavonóides, pertencem a uma grande classe de metabólitos secundários de plantas e podem ser encontrados em diversos tipos de vegetais. O processo de vinificação, especialmente em tinto, proporciona uma significativa transferência desses compostos fenólicos para o vinho, devido à maceração.

Na elaboração de vinhos, leveduras selecionadas são utilizadas para garantir a qualidade do produto final. A linhagem de *Sacch. cerevisiae* empregada no processo fermentativo, determina o *bouquet*, aroma e *flavour* a serem formados. Caridi et al., (2004), mostraram que a utilização de diferentes linhagens de levedura *Sacch. cerevisiae* para a elaboração de vinhos tintos, pode alterar a coloração, o perfil fenólico e o poder antioxidante do produto final. A seleção de leveduras, portanto, para a elaboração de vinho, é um passo importante que deve ser ressaltado (Silva e Silva, 1987, Silva, 2003). As leveduras podem contribuir de forma positiva ou negativa na qualidade do vinho. Tem-se verificado que linhagens autóctones apresentam diferenças com relação à produção de H<sub>2</sub>S (Silva 1999a, Silva e Dalarmi, 2003, Silva et al., 2005a), de SO<sub>2</sub> (Silva e Ficagna, 2003) e de compostos orgânicos como glicerol e etanal. Além disso, determinadas linhagens de *Sacch. cerevisiae* mostram um comportamento agressivo podendo matar outras linhagens sensíveis (Silva, 1999a, Silva, 1999b). Como pode ser visto, a gama de operações funcionais da levedura é elevada.

Sob o ponto de vista microbiológico, deve-se salientar que o uso de leveduras diferentes em safras distintas pode levar a produtos sem padronização. Isto se dá porque as diferentes linhagens apresentam atividades metabólicas distintas. O emprego de leveduras autóctones selecionadas e adequadas pode ser um importante coadjuvante no processo de padronização e diferenciação do produto final. Entre os fatores que contribuem para tal caracterização encontram-se os aromas (Silva, 2003).

No processo de elaboração de vinhos tintos, vários fatores podem interferir na concentração de polifenóis, entre estes pode-se citar, tempo de maceração, oxidação do vinho, cultivar de uva, as remontagens, entre outros. Como os compostos fenólicos são agentes que previnem problemas de saúde e as leveduras são extremamente versáteis no que se refere à transformação de substrato e ainda, como possuem um aparato enzimático capaz de decompor compostos extraídos da matéria prima, foi investigada a ação de diferentes concentrações de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 1vvt/97 (0- sem adição de levedura; 2; 4; 6; 8 e 10% v/v), contendo 10<sup>7</sup> células/mL, sobre os polifenóis de vinhos tintos elaborados com a cultivar Cabernet Sauvignon.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Foram analisados vinhos tintos elaborados a partir da cultivar Cabernet Sauvignon produzidos com diferentes concentrações de levedura *Saccharomyces cerevisiae* Embrapa 1vvt/97. As concentrações empregadas foram 0 - (sem adição) 2, 4, 6, 8 e 10% (v/v). O número de células da suspensão foi de  $10^7$  células/mL. O experimento foi conduzido num delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

### Análises Químicas

#### *Polifenóis*

A análise de compostos fenólicos foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, conforme Klenar et al., (2004) e Teszlák et al., (2005). Foi utilizado ácido gálico para a realização da curva padrão. As amostras foram diluídas em água na proporção de 0,1:2 mL. A leitura dos resultados foi realizada em espectrofotômetro PerKin Elmer Lambda Bio a 765nm. Os valores obtidos nesta leitura foram calculados através da curva padrão. Os resultados foram expressos em ácido gálico (mg/L).

#### *Taninos*

Na análise de taninos, proposto por Ribéreau – Gayon et al., (2000), prepararam-se duas baterias de amostras dos tratamentos diluídos em água, junto com HCl. Os tubos da bateria A foram acoplados a tubos de hidrólise preparados com gelo e transferidos ao banho-maria à 100°C durante 30 minutos, enquanto o tubo B ficou em repouso durante este tempo. Após a retirada dos tubos de hidrólise, depois de frios, foi adicionado etanol em todos os tubos (A e B). Em seguida, a leitura das duas baterias foi realizada em espectrofotômetro PerKin Elmer Lambda Bio a 550nm. Os resultados foram expressos em g/L.

#### *Antocianinas*

Na análise de antocianinas prepararam-se duas baterias de amostras dos tratamentos. Na bateria A, em tubo de ensaio com tampa rosqueada, foram adicionados 1mL de vinho, 1mL de etanol 0,1% em HCl e 10mL de ácido clorídrico 2%. Na bateria B, foram adicionados 1mL de vinho, 1mL de etanol 0,1% em HCl e 10mL de solução tampão, pH 3,5. A leitura das duas baterias foi realizada em espectrofotômetro PerKin Elmer Lambda Bio a 520nm. Os resultados foram expressos em mg/L. Esta metodologia é a empregada no Laboratório de Análises Químicas do Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho.

#### *Etanol*

Amostras foram destiladas antes das análises e os componentes determinados por meio de cromatógrafo de gás Perkin Elmer AutoSystem XL, com detector de ionização de chama; coluna capilar CPWAX 57CB (50m x 0,25mm i.d.). A técnica de injeção utilizada foi *splitless*, e as condições de análise foram as seguintes: gás de arraste: hélio (30psi, vazão 1,8mL/min); temperatura do injetor: 160°C; temperatura do detector: 210°C; período *splitless*: 2 minutos; temperatura da coluna: 40°C por 5 minutos até 60°C, a 2°C/min, sendo mantida a 200°C por 8 minutos. Os resultados foram expressos em mg/L. Esta metodologia é a empregada no Laboratório de Análises Químicas do Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho.

### Capacidade antioxidante

A análise de capacidade antioxidante foi realizada utilizando o método DPPH proposto por Brand – Williams et al., (1995). Para a curva padrão foi feita uma solução utilizando Trolox (como padrão) e solução de DPPH. As amostras foram diluídas em água na proporção de 0,1: 2 mL. A leitura foi realizada em espectrofotômetro PerKin Elmer Lambda Bio a 515nm. Os valores obtidos nesta leitura foram calculados através da curva padrão. Os resultados foram expressos em Trolox (mM).

### Análise estatística

Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de regressão utilizando o método dos quadrados mínimos. A análise de variância não foi aqui empregada por não haver independência entre os tratamentos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para polifenóis, analisados pelo método de Folin-Ciocalteu, medidos por absorbância a 765 nm, não mostraram diferenças entre as concentrações de *Saccharomyces cerevisiae* empregadas (Figura 1). A análise de regressão linear mostrou um  $r^2$  baixo, indicando reduzida relação entre os tratamentos e a concentração destes compostos. Isto mostra que a concentração inicial de inóculo não influi na concentração final de compostos fenólicos. Como os polifenóis são importantes produtos do metabolismo de plantas, a não variação na concentração destes compostos no vinho elaborado com as diferentes concentrações (2%, 4%, 6%, 8% e 10%) de levedura selecionada (*Sacch. cerevisiae* Embrapa 1vvt/97) e com a levedura autóctone (0%) indica que estas não os metabolizaram de forma significativa e nem os adsorveram de forma diferenciada. Foi observado que leveduras podem adsorver polifenóis tanto durante a elaboração do vinho como durante seu envelhecimento (Mazauric e Salmon, 2005). Os autores relatam ainda, que compostos fenólicos, em contato com a borra de levedura durante o processo de envelhecimento, podem afetar largamente as características de cor e propriedades sensoriais do produto final.

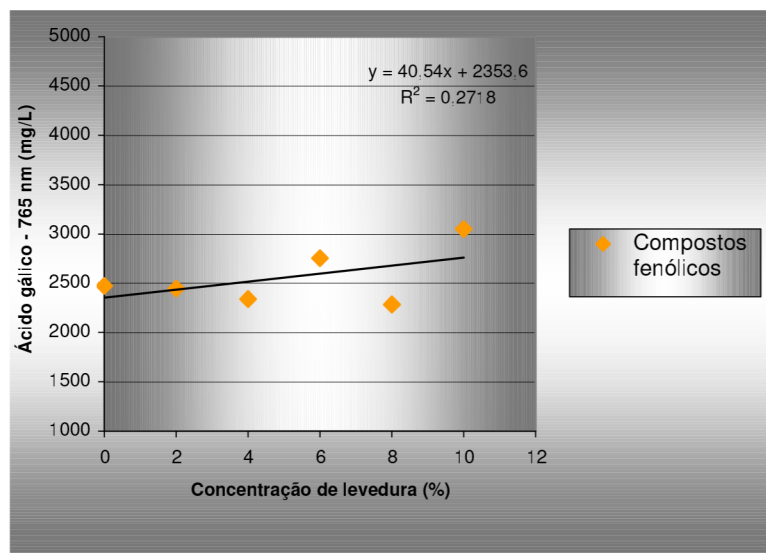
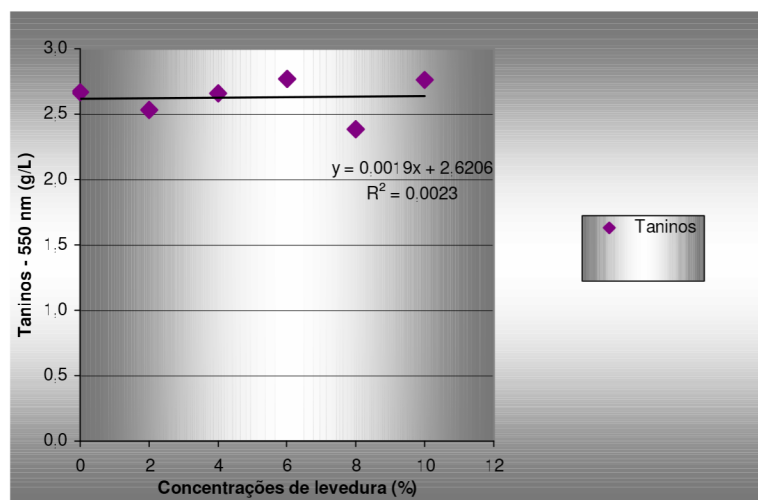


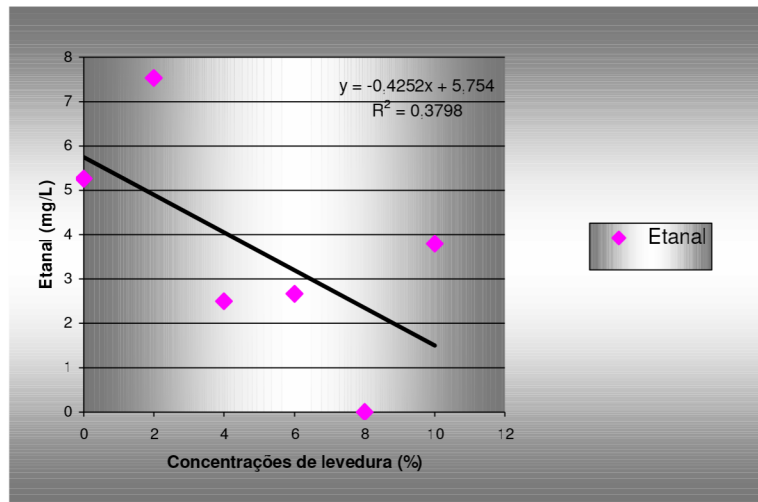
Figura 1: Influência do aumento da concentração de levedura selecionada *Sacch. cerevisiae* 1vvt/97 na concentração de compostos fenólicos (765nm).

Os resultados obtidos para taninos, medidos por absorvância a 550 nm, também não mostraram relação direta, pois foi obtido um  $r^2$  extremamente baixo, com as concentrações de *Sacch. cerevisiae* empregadas (Figura 2). Os taninos, que dão características de adstringência ao vinho, são importantes compostos fenólicos devido à sua polimerização com as antocianinas e outros compostos, proporcionando maior estabilidade da cor (Ribéreau – Gayon et al., 2000). Na concentração de 6% de levedura, observou-se maior quantidade de taninos por litro de vinho (2,77g/L). Já na concentração de 8%, observou-se a menor quantidade (2,38g/L). Este resultado mostra a possibilidade de os taninos estarem em sua forma polimerizada com as antocianinas, já que, para esta mesma concentração, o etanal, que serve de ponte de ligação entre estes dois compostos, variou de 7,5 a 0 mg/L e a análise de regressão, como era de se esperar, mostrou uma baixa relação entre a concentração de levedura adicionada e o teor de etanal residual (Figura 3).



**Figura 2: Influência do aumento da concentração de levedura *Sacch. cerevisiae* 1vvt/97 na concentração de taninos. (550nm).**

Na concentração (8%), o fato de a quantidade de etanal ter sido nulo, indica a possibilidade de a sua produção não ter sido suficiente, ou seja, todo o etanal produzido pode ter sido utilizado como pontes de ligação antocianinas-taninos, faltando ainda para formar mais compostos polimerizados.



**Figura 3: Influência do aumento da concentração de levedura selecionada *Sacch. cerevisiae* 1vvt/97 na quantidade de etanal.**

Com relação às antocianinas, medidas a 520 nm, a quantidade destes pigmentos, para as formas coloridas e incolores, foi decrescendo à medida que a concentração de células no inóculo foi aumentando de 0 à 4% (Figura 4). Pela análise de regressão (Figura 5), foi observado uma queda de 23,28 mg/unidade de porcentagem ( $r^2=0,998$ ) para a forma colorida e de 12,61 mg/unidade de porcentagem ( $r^2=0,912$ ) para a incolor. Para a forma polimerizada, a regressão mostrou uma queda de 11,15 mg/unidade de porcentagem ( $r^2=0,908$ ) de 0 até a concentração de 6%, indicando efeito de saturação. Para explicar a redução linear das antocianinas na faixa de concentração de 0 a 4%, é necessário entender que o etanol, como observaram Somers e Evans (1979), precipita de forma drástica as antocianinas. A concentração da forma mais estável (antocianinas na forma polimerizada), decrescendo também com a concentração de levedura de 0% até 4%, reforça a hipótese de precipitação pelo etanol formado nos estádios iniciais da fase tumultuosa. A fermentação tumultuosa destes vinhos efetuada por Silva et al., (2005b), como mostra a Figura 6, indica, de fato, ter havido influência do etanol sobre estes resultados. Deve-se salientar que no tempo 2 e na concentração (0%) o teor de etanol foi nulo. Os resultados obtidos dão a entender que quanto menos etanol tiver o mosto durante a fase tumultuosa, maior será a extração e/ou maior a permanência de antocianinas em solução. Esta hipótese parece não ser verdadeira porque foi na concentração de 6% onde se obteve um teor de antocianinas semelhante ao que foi encontrado na concentração (0%) de levedura selecionada. Parece óbvio que outros fatores estejam participando do processo de extração e manutenção do pigmento em solução. Uma das explicações para estes resultados podem ser a síntese e liberação para meio de metabólitos como ácido pirúvico (Fulcrand et al., 1998) e etanal (Sims e Morris, 1986). Os autores têm mostrado que o tanino comercial não possui ação sobre a intensidade de cor, indicando que a cor do vinho depende do tipo de tanino empregado.

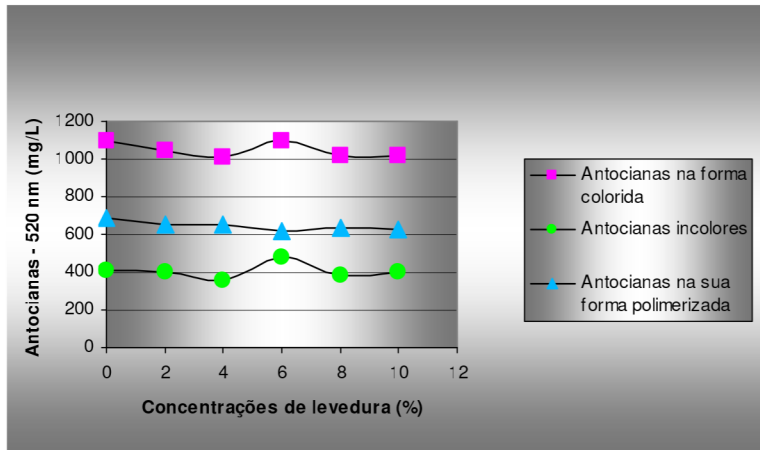


Figura 4: Influência do aumento da concentração de levedura selecionada *Sacch. cerevisiae* 1vvt/97 na concentração de antocianinas (520nm).

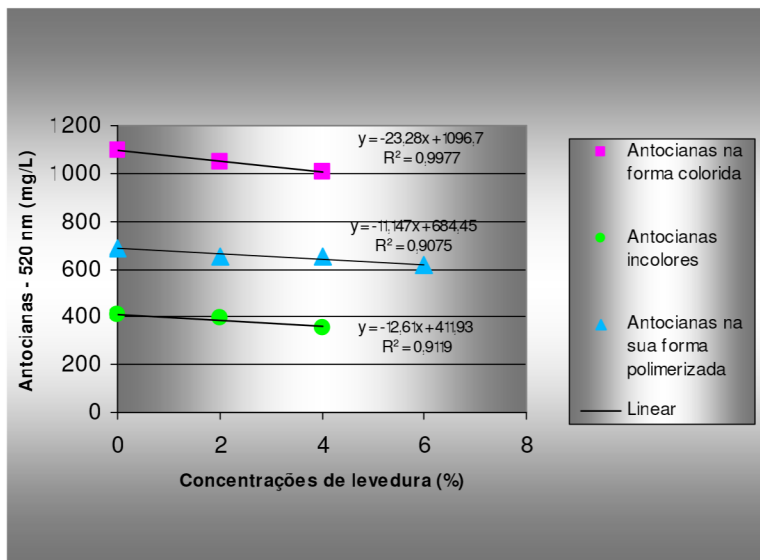
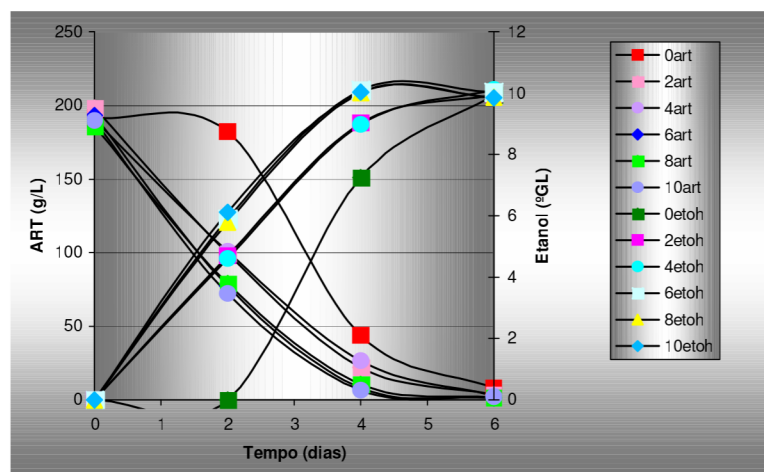


Figura 5: Análise de regressão linear para as antocianinas nas suas formas coloridas, incolores e polimerizadas.



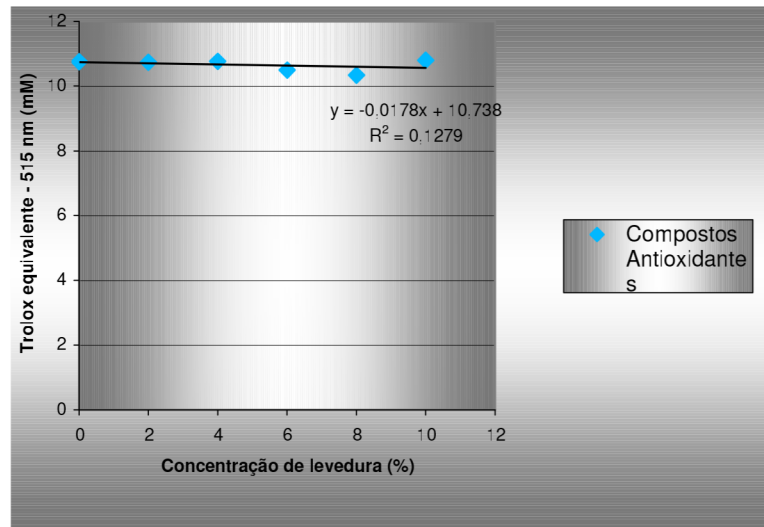


**Figura 6: Consumo de açúcar e produção de etanol durante a fase tumultuosa da vinificação com diferentes concentrações de *Sacch. Cerevisiae* 1vvt/97. Fonte: Silva et al., 2005b.**

Na concentração de 6%, observou-se maior quantidade de antocianinas na sua forma polimerizada (mais estável), indicando ser esta a concentração de levedura selecionada que melhor estabiliza a cor do vinho. Considerando o fato de o teor de etanol influenciar a extração da antociana e a concentração de levedura indicada ter sido de 6%, sugere-se que se inocule a levedura selecionada após dois dias de maceração. É evidente que esta técnica aumenta o risco de haver maior concorrência entre as leveduras autóctones e a selecionada. Pode ser que, na concentração de 6%, haja maiores teores de etanol e ácido pirúvico envolvidos nas reações de polimerização como mencionado por Fulcrand et al., (1998).

Os resultados obtidos para compostos antioxidantes, medidos com DPPH a 515 nm, não mostraram diferenças entre as concentrações de *Sacch. cerevisiae* selecionada empregadas e nem com relação à linhagem autóctone (Figura 7). Entre as substâncias sintetizadas pelas plantas, os polifenóis, particularmente os flavonóides e seus derivados (oligômeros e polímeros), têm-se mostrado potentes antioxidantes em ensaios *in vitro* (Landrault et al., 2001). Estudos realizados indicam diferenças significativas para o poder antioxidante do vinho com relação a diferentes linhagens de leveduras (Caridi et al., 2004, Mazauric e Salmon, 2005). Resultados semelhantes aos aqui encontrados foram também obtidos por Zoecklein et al., (1999). Estes autores observaram que o efeito de quatro diferentes linhagens de *Sacch. cerevisiae* sobre glicosídeos fenólicos foi nulo durante a fermentação e após 40 meses de envelhecimento.





**Figura 7: Influência do aumento da concentração de levedura selecionada *Sacch. Cerevisiae* 1vvt/97 na concentração de compostos antioxidantes (515nm).**

## CONCLUSÃO

Com análise nos resultados obtidos, pôde-se concluir que o aumento da concentração de *Saccharomyces cerevisiae* 1vvt/97 (0 - sem adição de levedura, 2%, 4%, 6%, 8% e 10%) não interfere na concentração de compostos fenólicos, assim como o melhor solvente de extração de antocianinas é a água e a melhor concentração de levedura a ser utilizada na vinificação foi a de 6% de uma suspensão de células contendo  $10^7$  células/mL, por induzir a polimerização dos compostos fenólicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERINE, A., M.; JOSLYN, A., M. (1970), Table Wines: The technology of their production. 6. ed. Califórnia

BRAND – WILLIAMS, W.; CUVELIER, M., E.; BERSET, C. (1995), Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28, 25-30.

CARIDI, A.; CUFARI, A.; LOVINO, R. et al. (2004), Influence of Yeast on Polyphenol Composition of Wine. *Food Technology and Biotechnology*, 42, 37-40.

CROFT, K.D. (1999), Antioxidant Effects of Plant Phenolic Compounds. In: *Antioxidants in Human Health and Disease*. London: 449p.

FULCRAND, H.; BENABDELJALIL, C.; RIGAUD, J. et al. (1998), A New Class of Wine Pigments Generated by Reaction Between Pyruvic Acid and Grape Anthocyanins. *Phytochemistry*, 47, 1401-7.

GUERRA, C. C. (1997), Recherches sur les interactions anthocyanes – flavanols: Application à l'interprétation chimique de la couleur des vins rouges. Bordeaux: Université Victor Segalen Bordeaux 2, 1997. These pour le Doctorat de L'Université de Bordeaux 2.

KLENAR, I.; BEROVIC, M.; WONDRA, M. (2004), Phenolic Compounds from the Fermentation of Cultivars Cabernet Sauvignon and Merlot from the Slovenian Coastal Region. *Food Technology and Biotechnology*, 42, 11-7.

LANDRAULT, N.; POUCHERET, P.; RAVEL, P. et al. (2001), Antioxidant Capacities and Phenolics levels of French Wines from Different Varieties and Vintages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3341-8.

LIU, R.H., (2004), Potencial Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. American Society for Nutritional Sciences.

MAZURIC, J.P., SALMON, J.M. (2005), Interactions between Yeast Lees and Wine Polyphenols during Simulation of Wine Aging: Analysis of Remnant Polyphenolic Compounds in the Resulting Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5647-53.

RIBÉREAU – GAYON, J. et al. (1982), *Traité d'Oenologie Sciences et Techniques du Vin*. 2.ed. Bordas, Paris : Dunod.

RIBÉREAU – GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A. et al. (2000), *Handbook of Enology: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. England: 2v.

SILVA, M.A.A.A. da; SILVA, G. A. da. (1987), Leveduras nacionais Seleccionadas para a Elaboração de Vinho. EMBRAPA – CNPQV, Bento Gonçalves: Circular técnica, 14, 19p.

SILVA, G. A. da. (1999a), Comportamento de leveduras isoladas no vale dos vinhedos em Bento Gonçalves, RS, com relação à atividade killer. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 1999, Bento Gonçalves. *Anais*. Bento Gonçalves: pg 170.

SILVA, G. A. da. (1999b), Evidência de uma linhagem de levedura com característica killer, neutra e sensível. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 1999, Bento Gonçalves. *Anais*. Bento Gonçalves: pg 169.

SILVA, G. A. da. (2003), Elaboração de Vinho: Aspectos Microbiológicos. Uva para processamento Pós-colheita. Embrapa uva e Vinho, Bento Gonçalves.

SILVA, G. A. da; DALARMI, L. (2003), Comportamento das leveduras isoladas de uvas Cabernet Sauvignon do Vale dos Vinhedos na safra 2003. In: X CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 2003, Bento Gonçalves. *Anais*. Bento Gonçalves.

SILVA, G. A. da; FICAGNA, E. (2003), Características fermentativas de quatro linhagens de leveduras autóctones e uma linhagem comercial. In: X CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 2003, Bento Gonçalves. *Anais*. Bento Gonçalves.

SILVA, G. A. da; ESTEVES, M. C.; GURAK, P. D. et al. (2005a), Influência da concentração inicial de SO<sub>2</sub> sobre a acidez volátil do vinho tinto. In: SINAFERM: XV SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2005, Recife. *Anais*. Recife.

SILVA, G. A. da; GURAK, P. D.; MICHELON, H. et al. (2005b), Influência da concentração de levedura sobre o vinho tinto Cabernet Sauvignon. In: X CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 2005. Bento Gonçalves. *Anais*. Bento Gonçalves.

SIMS, C. A.; MORIS, J. R. (1986), Effects of acetaldehyde and tannins on the color and chemical age of red Muscadine (*Vitis rotundifolia*). *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 163-5.

SOMERS, T. C.; EVANS, M. E. (1979), Grape pigment phenomena: Interpretation of major colour losses during vinification. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 30, 623-33.

TESZLÁK, P.; GAÁL, K.; NIKFARDJAM, M. S. P. (2005), Influence of grapevine flower treatment with gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) on polyphenol content of *Vitis vinifera* L. wine. *Analytica Chimica Acta*, 543, 275-81,

VILLIERS, de A.; VANHOENACKER, G.; MAJEK, P. et al. (2004), Determination of anthocyanins in wine by direct injection liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and classification of wines using discriminant analysis. *Journal of Chromatography A*, 1054, 195-204.

ZOECKLEIN, B.; HACKNEY, C.; DUNCAN, S. et al. (1999), Effect of fermentation, aging and thermal storage on total glycosides, phenol-free glycosides and volatile compounds of White Riesling (*Vitis vinifera* L.) wines. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 22, 100-107.