

# Quantificação de 5-metiltetrahidrofolato no processamento e conservação de vinhos de uvas viníferas e híbridas

## Quantification of 5-methyltetrahydrofolate in the processing and conservation of wines made of winegrapes and hybrid grapes

Elizete Maria Pesamosca FACCO<sup>1\*</sup>, Aline de Oliveira FOGAÇA<sup>2</sup>, Carlos Eugenio DAUDT<sup>2</sup>, Helena Teixeira GODOY<sup>1</sup>

### Resumo

Os folatos compõem uma classe de vitaminas redescoberta nas últimas décadas pela sua importante associação com diversas funções, nos vários processos metabólicos no organismo humano. As principais fontes descritas na literatura são os vegetais, os cereais e as leveduras. Objetivou-se quantificar o 5-metiltetrahidrofolato (5-metilTFH) em vinhos durante o processamento e conservação. Foram coletadas amostras de vinhos tintos das variedades viníferas Cabernet Sauvignon, Merlot e Pinot *noir*, e das não viníferas Isabel (tinta) e Niágara (branca) na colheita, no final da fermentação alcoólica, e maloláctica e seguindo-se aos 4, 7, 12 e 24 meses de conservação a partir do início da fermentação. A técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi utilizada para a separação, identificação e quantificação. Os resultados mostraram que os níveis de 5-metil-TFH aumentaram consideravelmente durante a fermentação alcoólica e continuaram aumentando até o término da fermentação maloláctica. Os níveis mantiveram-se estáveis durante um período de 3 a 6 meses para o vinho branco e de 1 a 2 anos para os vinhos tintos, dependendo da variedade. Os vinhos tintos de viníferas se mostraram uma boa fonte de 5-metilTFH.

**Palavras-chave:** folatos; vinho; leveduras.

### Abstract

Folates are a class of vitamins that have been rediscovered in recent decades because of their association with various metabolic processes in the human organism. The main sources of folates described in the scientific literature are vegetables, cereals and yeasts. The purpose of this study was to quantify 5-methyltetrahydrofolate (5-methyl-TFH) in wines during wine production and aging. Red wines made from Cabernet Sauvignon, Merlot, and Pinot Noir wine grape varieties, and from Isabel (red) and Niagara (white) non-wine grape varieties were analyzed. The samples were analyzed at the beginning of fermentation, at the end of alcoholic and malolactic fermentation, and periodically at 4, 7, 12 and 24 months of age. High Performance Liquid Chromatography was used to separate, identify and quantify the folates. The results showed that the levels of 5-methyl-TFH increased considerably during fermentation and continued to increase until the end of malolactic fermentation. The levels remained stable over a period of 3 to 6 months in the white wines and for 1 to 2 years in red wines, depending on the variety. The red wines proved to be a good source of 5-methyl-TFH.

**Keywords:** folate; wine; yeast.

## 1 Introdução

O ácido fólico (2-amino-4-hidroxi-6-metilenoaminobenzol-L-glutâmico), também é conhecido como ácido pteroilglutâmico, vitamina B<sub>9</sub> e vitamina M. Está naturalmente presente em alimentos, geralmente, na forma reduzida, como derivados de poliglutamatos, com 2 a 7 resíduos de ácido glutâmico, conhecidos como folatos<sup>16</sup>. Folato é um termo geral que se refere a compostos não só estruturalmente, mas também com atividade semelhante a do ácido fólico<sup>5,27</sup>.

O interesse pelos folatos tem crescido nos últimos anos com as descobertas relacionadas às suas funções nos diversos processos metabólicos no organismo humano. Os folatos são essenciais na prevenção e redução significativa do risco de má formação do tubo neural na gestação<sup>9,11,12,15,17</sup>. Também

participam na produção normal das hemáceas, sendo que a carência de alimentos que contenham a vitamina na dieta pode levar à anemia megaloblástica<sup>14,41,4</sup>, além de doenças crônicas como câncer de mama e cólon, mal de Alzheimer e depressão<sup>1,23,28,29,31</sup>.

Desde a década de 90 muitos estudos dos componentes do vinho estão sendo realizados. Baseados principalmente no chamado “paradoxo Francês”, que é uma análise de multivariáveis que mostra que o consumo de vinho tinto foi o único fator da dieta que mostrou correlação negativa com a aterosclerose e os distúrbios coronários<sup>37</sup>. O “paradoxo francês” é uma aparente discrepância entre o alto consumo de gorduras saturadas e colesterol pelos franceses e a baixa incidência de doenças do coração e aterosclerose. Há estudos mostrando que, não somente os compostos fenólicos, mas também os folatos estariam associados a esse paradoxo<sup>34</sup>. Além disso, o tetraidrofolato juntamente com a vitamina B<sub>12</sub> é necessário para a conversão de homocisteína em metionina<sup>13</sup>. A homocisteína vem alcançando grande importância como fator de risco para a doença arterial coronária<sup>43,38,39</sup>, pois o alto nível desta no sangue pode aumentar a agregação de plaquetas, causando trombose e inativando anticoagulantes<sup>30,40,44</sup>. Com o suplemento dos folatos na dieta ocorre redução dos níveis de homocisteína<sup>22,32,8,6</sup>.

De acordo com BRODY<sup>5</sup> e FRANCO<sup>16</sup> entre outros autores, os vegetais e as leveduras, seguidos pelas carnes, fígado, rim,

Recebido para publicação em 28/3/2007

Aceito para publicação em 7/8/2007 (002188)

<sup>1</sup> Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, CEP 13083-970, Campinas - SP, Brasil, E-mail: elizetefacco@gmail.com

<sup>2</sup> Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos, Centro de Ciências Rurais – CCR, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, CEP 97105900, Santa Maria - RS, Brasil

\*A quem a correspondência deve ser enviada

frutas e cereais são considerados as principais fontes desse grupo de vitamina.

A capacidade de leveduras típicas de fermentação, como a *Saccharomyces cerevisiae*, para produzir folatos em meios específicos para o crescimento dos microrganismos é maior que outros tipos de levedura e bactérias. A quantidade de vitamina encontrada na biomassa celular é 40 vezes maior que a encontrada no meio<sup>25</sup>, fato que confirma que não só os alimentos produzidos por leveduras contêm folatos, mas também o próprio microrganismo. Vinho, cerveja e pães são exemplos de alimentos produzidos através da fermentação por leveduras<sup>42</sup>.

Folatos são encontrados em produtos de bioprocessos como produtos lácteos<sup>10</sup> e de panificação<sup>33,3,26</sup>, mostrando que as leveduras, mesmo em processos de transformação de alguns tipos de produtos de origem animal e vegetal, mantêm e/ou aumentam a quantidade de folatos originalmente presentes nesses alimentos<sup>26</sup>.

Diante do exposto, objetivou-se quantificar o 5-metilTHF durante o processamento e conservação, por um período de 12 meses, em vinhos de uvas viníferas (Merlot e Pinot *noir*) e não viníferas (Isabel tinta e Niágara branca), e por um período de 24 meses em vinhos de uvas viníferas Cabernet Sauvignon.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Material

#### Amostras

As amostras das variedades de uvas tintas viníferas Pinot *noir* (PN), Cabernet Sauvignon (CS), Merlot (ME) utilizadas no experimento foram provenientes da Vinícola Velho Amâncio localizada em Itaara, região central do Rio Grande do Sul. As outras amostras são das variedades americanas tinta Isabel (IS) e branca Niágara (NI) e provenientes da serra gaúcha. A vinificação foi realizada na Vinícola Velho Amâncio. Foram coletadas amostras nas seguintes etapas do processo: início e final da fermentação alcoólica, final da fermentação maloláctica e, no vinho, aos 4, 7 e 12 meses após o início da vinificação, e para o vinho Cabernet Sauvignon até os 24 meses.

A levedura utilizada no processo da fermentação alcoólica foi a *Saccharomyces cerevisiae*, com variação de cepa dependendo da variedade da uva vinificada. *Saccharomyces cerevisiae* (var. bayanus) foi utilizada para as variedades Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot *noir* e *Saccharomyces* sp. na vinificação da uva Isabel e Niágara. As amostras foram coletadas em duplicata e devidamente armazenadas a -18 °C até análise. As amostras foram filtradas em filtros MILLIPORE 0,45 µm e injetadas diretamente no cromatógrafo a líquido.

#### Reagentes

O padrão do 5-metil-5,6,7,8-tetraidrofolato de cálcio (5-MetilTHF) foi adquirido do Laboratório Dr. Schircks (Suíça). A acetonitrila (grau cromatográfico), o ácido acético e o hidróxido de potássio (grau analítico) eram da marca Merck. A água

utilizada tanto no preparo das amostras como no preparo das fases móveis, foi purificada no sistema Milli-Q (Millipore). As fases móveis foram filtradas em filtros Millipore (HAWP e HVLP 04700 Millipore), com poros de 0,45 µm de diâmetro.

### Instrumento

Utilizou-se um cromatógrafo líquido HEWLETT PACKARD (HP) série 1100, com injetor automático, degaseificador, bomba quaternária, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), UV-visível e de fluorescência, dispostos em seqüência. A coluna Microsorb-MV, ODS-2, 5 µm, 250 x 4,6 mm d.i. (Rainin Instrument Company) foi utilizada para a separação dos folatos, protegida por uma coluna de guarda Bondesil C<sub>18</sub>, 5 µm, 10 x 4,6 mm d.i (Varian).

### 2.2 Método

O método foi desenvolvido e validado por CATHARINO et al.<sup>7</sup> para a determinação simultânea das várias formas de folatos. O padrão foi eluído através de um sistema por gradiente, com vazão de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> sendo a fase móvel composta por solução de ácido acético (a pH 2,8) no início da corrida, chegando a 76% de solução de ácido acético e 24% de acetonitrila em 26 minutos. As condições iniciais foram retomadas e a coluna reequilibrada durante 15 minutos antes da próxima injeção. O 5-metilTHF foi detectado em detector de fluorescência, sendo  $\lambda_{\text{excitação}} = 290 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{emissão}} = 360 \text{ nm}$ .

A identificação foi feita por comparação entre os tempos de retenção dos analitos com o padrão analisado nas mesmas condições, por co-cromatografia e através dos espectros de fluorescência. E a quantificação foi realizada por curva de calibração externa.

## 3 Resultados e discussão

Os resultados da quantidade de 5-metilTHF em vinhos tintos de uvas viníferas e não viníferas encontram-se na Tabela 1. Observou-se que a quantidade de 5-metilTHF no mosto é menor quando comparada com o vinho. O aumento é maior na fermentação alcoólica, na qual segundo AMERINE et al.<sup>2</sup> é intensa a atividade da levedura. Baseado nesses resultados pode-se especular que a vitamina encontrada no vinho pode ser proveniente das leveduras responsáveis pelo processo de fabricação do vinho ou talvez da ação destas sobre algum composto presente nas uvas ou das próprias uvas.

O vinho Pinot *noir* foi o que apresentou quantidades maiores de 5-metilTHF, seguido do vinho Cabernet Sauvignon e do Merlot. Já o vinho Isabel apresentou 6 vezes menos 5-metilTHF que o vinho Pinot *noir*. Dentre os vinhos analisados, o vinho branco de Niágara apresentou os menores valores, 30,7 µg.L<sup>-1</sup>, que se reduziu a traço seis meses após o início da vinificação.

Após 6 meses, os maiores valores de 5-metilTHF foram encontrados nos vinhos Pinot *noir* 368,1 µg.L<sup>-1</sup>, seguido do Merlot 145,4 µg.L<sup>-1</sup> e do Cabernet Sauvignon 145,1 µg.L<sup>-1</sup>. Já o vinho não varietal, Isabel, apresentou valores de 64,7 µg.L<sup>-1</sup>.

**Tabela 1.** 5-metilTHF ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) em diferentes variedades de vinhos avaliados nas diferentes etapas da vinificação e conservação.

Fases da vinificação	Cabernet Sauvignon	Merlot	Pinot noir	Isabel	Niágara
Colheita	0,6 (4,1)	9,3 (1,8)	49,9 (3,7)	nq	1,7 (1,6)
Alcoólica	65,6 (3,7)	74,8 (1,9)	263,8 (0,6)	53,5 (1,7)	11,1 (3,9)
Maloláctica	87,0 (2,2)	na	333,3 (1,8)	58,7 (1,4)	17,5 (3,2)
4 meses*	127,3 (0,5)	126,4 (1,9)	366,1 (4,0)	60,6 (2,8)	30,7 (3,8)
7 meses*	145,1 (1,6)	145,4 (2,3)	368,1 (4,2)	64,7 (3,2)	nq
12 meses*	152,4 (1,2)	154,9 (3,8)	335,4 (2,1)	na	na
24 meses*	150,7 (3,6)	164,2 (1,3)	na	na	na

Valores médios e coeficiente de variação das determinações em duplicata; nq = não quantificado; na = não analisado; alcoólica: final da fermentação alcoólica; maloláctica: final da fermentação maloláctica; e \*Tempo em meses a partir do início da fermentação alcoólica.

No estudo de JÄGERSTAD et al.<sup>24</sup>, pães, leite e vegetais fermentados tiveram um aumento na concentração de folatos de no mínimo 100%. Esses dados corroboram com o conhecimento de que as leveduras são fonte desta vitamina<sup>5</sup>. Das leveduras testadas, as que mais produzem folatos são: a *Saccharomyces cerevisiae* ALKO 743 e a *Candida milleri* CBS 8195<sup>25</sup>. Os autores ainda citam que a levedura comumente usada em panificação, *Saccharomyces cerevisiae* ALKO 743, produz folatos quando incubada sozinha assim como em combinação com bactérias lácticas. Essas leveduras são da mesma espécie usada neste estudo. Comumente diferentes espécies de *Saccharomyces cerevisiae* são usadas para a fermentação de mostos de uva.

A diferença no teor de 5-metilTHF nas diferentes etapas do processamento e das variedades pode ser explicada pelas diferentes espécies de leveduras usadas no processo fermentativo, já que a quantidade de folatos está relacionada ao tipo e à cepa da levedura<sup>36,35</sup>.

No processo da vinificação, a fermentação é a transformação de fontes de carbono em etanol. Nesse processo, ocorre também um crescimento na quantidade de levedura no meio<sup>2</sup>. Essa levedura depois dos processos fermentativos permanece no meio por um certo tempo. À medida que o vinho sofre os processos posteriores da fermentação maloláctica, como processos da clarificação e envelhecimento, estas leveduras tendem a se precipitar para o fundo do recipiente, sendo separadas do líquido por trasfegas e/ou filtração. Como consequência o teor de 5-metilTHF tende a diminuir ou mesmo desaparecer. Quando este último fato ocorre pode ser dito que o 5-metilTHF presente é oriundo das leveduras, e quando estas diminuem, provavelmente, é pela retirada das leveduras do meio.

Quando o vinho não possuía mais leveduras (ao redor dos 6 meses) o aumento do 5-metilTHF foi menor ou até diminuiu. Uma possível explicação para o aumento das quantidades de 5-metilTHF, mesmo na ausência das leveduras, pode ser devido à ação das enzimas e ao potencial de oxi-redução do meio. Por outro lado a diminuição pode ser explicada pelo processo inverso ou pela degradação da vitamina.

#### 4 Conclusão

A quantidade de 5-metilTHF aumenta durante os processos de fermentação alcoólica e maloláctica, sendo maior na fermentação alcoólica. Depois desse processo, para os vinhos tintos, a quantidade de 5-metilTHF se estabiliza e, para os vinhos brancos ocorre uma diminuição.

#### Referência bibliográfica

- ALPERT, J. E. et al. Nutrition and depression: focus on folate. **Nutrition**, v. 16, n. 7/8, p. 544-546, 2000.
- AMERINE, M. A.; BERG, H. W.; CRUESS, W. V. **The technology of wine making**. 2º edição. The AVI Publishing company, Connecticut, 1967.
- ARCOT, J. et al. Folate levels in twelve Australian wheats and changes during processing into bread. **Food Aust.**, v. 54, p. 18-20, 2002.
- ASOK C. A., **Megaloblastic anemias**. In: HOFFMAN, R. et al. Hematology. Basic Principles and Practice. 2 ed.. Nova York: Churchill Livingstone, p. 519-556, 2005.
- BRODY, T. Folic acid In: MACHLIN, L. J. **Handbook of vitamins**. 2ª. edição. New York: Marcel Decker, p. 453-490, 1991.
- CARUSO, R. et al. Effect of homocysteine lowering by 5-methyltetrahydrofolate on redox status in hyperhomocysteinemia. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 47, n. 4, p. 549-555, 2006.
- CATHARINO, R. R.; LIMA-PALLONE, J. A.; GODOY, H. T. Metodologia analítica para determinação de folatos e ácido fólico em alimentos, **Quim. Nova**, v. 29, n. 5, p. 972-976, 2006.
- COPPOLA, A. et al. Reduced in vivo oxidative stress following 5-methyltetrahydrofolate supplementation in patients with early-onset thrombosis and 677TT methyltetrahydrofolate reductase genotype. **Br. J. Haematol.**, v. 131, n. 1 p. 100-108, 2005.
- CRANE, N. T. et al. Evaluating food fortification options: general principles revisited with folic acid. **Am. J. Public Health**, v. 85, n. 5, p. 660-666, 1995.
- CRITTENDEN, R. G.; MARTINEZ, N. R.; PLAUNE, M. J., Synthesis and utilization of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. **Int. J. Food Microbiol.** v. 80, n. 3 p. 217-222, 2003.
- CZEIZE, A. E.; DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. **N. Engl. J. Medicine**, v. 327, n. 226, p. 1832-1835, 1992.
- DALY, S. et al. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural tube defects. **Lancet**, v. 350, n. 9092, p. 1666-69, 1997.
- DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 5ª. edição, São Paulo: Edgard Blücher, 1998.
- DIERKES, J.; KROESEN, M.; PIETRZIK, K. Folic acid and vitamin B<sub>6</sub> supplementation and plasma homocysteine concentrations in healthy young women. **Int. J. Vitamin Nutr. Res.**, v. 68, n. 2, p. 98-103, 1998.
- EVANS, M. I. et al. Impact of folic acid fortification in the United States: Markedly diminished high maternal serum alpha-feto-protein values. **Obstet. Gynecol.**, v. 103, p. 474-479, 2004.

16. FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9ª edição. São Paulo: Atheneu, 1992.
17. GREGORY, J. F. Case study: Folate bioavailability. **J. Nutr.**, v. 131, p. 1376-1382, 2001.
18. HASLAM, E. **Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites**. Chichester: John Wiley and Sons, 1993.
19. HERRMANN, K. M. The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. **Plant Cell.**, v. 7, p. 907-919, 1995.
20. HJORTMO, S. et al. Inherent biodiversity of folate content and composition in yeasts. **Trends Food Sci. Techn.** v. 16, n. 6-7, p. 311-316, 2005.
21. IWATANI Y.; ARCOT J.; SHRESTHA A. K. Determination of folate contents in some Australian vegetables. **J. Food Comp. Anal.**, v. 16, n. 1, p. 37-48, 2003.
22. JACQUES, P. F. et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. **Circulation**, v. 93, p. 7-9, 1996.
23. JACQUES, P. F. et al. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. **New Engl. J. Med.**, v. 340, n. 19, p. 1449-1454, 1999.
24. JÄGERSTAD, M. et al. Increasing natural food folates through bioprocessing and biotechnology. **Trends Food Sci. Techn.** v. 16, n. 6-7, p. 298-306, 2005.
25. KARILUOTO, S. et al. Effects of yeasts and bacteria on the levels of folates in rye sourdoughs. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 106, n. 2, p. 137-143, 2006.
26. KARILUOTO, S. et al. Effect of baking method and fermentation on folate content of rye and wheat breads. **Cereal Chem.**, v. 81, n. 1, p. 134-139, 2004.
27. KEAGY, P. M. Folic acid: Microbiological and animal assays. In: AUGUSTIN, J.; KLEIN, B. P.; VENUGOPAL, P. B. (4a. edição) **Methods of Vitamin Assay**, New York: John Wiley and Sons, p. 445-471, 1985.
28. KIM, Y. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms and implications. **J. Nutr. Biochem.**, v. 10, n. 2 p. 66-88, 1999.
29. LUCOCK, M. D. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology and role in disease process. **Mol. Genet. Metab.**, v. 71, n.1-2, p. 121-38, 2000.
30. MALINOW, M. R.. Plasma homocystine and arterial occlusive diseases: a mini-review. **Clin. Chem.**, v. 40, p. 173-176, 1994.
31. MALINOW, M. R. et al. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary disease. **New Engl. J. Med.**, v. 338, n. 15, p. 1009-1015, 1998.
32. MOAT, S. J.; LANG, D.; McDOWELL, I. F. W. Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. **J. Nutr. Biochem.**, v. 15, n. 2 p. 64-79, 2004.
33. OSSEYI, E. S.; EWHLING, R. L.; ALBRECHT, J. A. HPLC determination of stability and distribution of added folic acid and some endogenous folates during breadmaking. **Cereal Chem.**, v. 78, n. 4, p. 375-378, 2001.
34. PARODI, P. W. The French Paradox unmasked: the role of folate. **Med. Hypotheses**, v. 49, n. 4, p. 313-318, 1997.
35. PATRING, J. D. M. et al. Characterization and quantification of folates produced by yeast strains isolated from kefir granules. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 223, p. 633-637, 2006.
36. PATRING, J. M. D. et al. Development of a Simplified Method for the Determination of Foliates in Baker's Yeast by HPLC with Ultraviolet and Fluorescence Detection. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n.7, p. 2406-2411, 2005.
37. RENAUD, S.; LORGERIL, M. Wine, alcohol, plateles and the French Paradox for coronary heart disease. **Lancet**, v. 339, p. 1523-1526, 1992.
38. RODRIGO, R.; PASSALACQUA, W.; ARAYA, J. Implications of oxidative stress and homocysteine in the pathophysiology of essential hypertension. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 42, n. 4, p. 453-461, 2003.
39. SCHNABEL, R. et al. Glutathione peroxidase-I and homocysteine for cardiovascular risk prediction. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 45, p. 1631-1637, 2005.
40. SCHOLL, T. O.; JOHNSON, W. G. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, n. 5, p. 1295-13035, 2000.
41. SCOTT, J.; RÉBEILLE, F.; FLETCHER, J. Review: Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **J. Sci. Food Agric.**, v. 80, n. 7, p. 795-824, 2000.
42. SEYOU, E.; SELHUB, J. Properties of food folates determined by stability and susceptibility to intestinal pteroylpolyglutamatehydrolase action. **J. Nutr.**, v. 128, n.11, p. 1956-1960, 1998.
43. WELCH, G. N.; LOSCALZO, J., Homocysteine an atherothrombosis. **New. Engl. J. Med.**, v. 338, n.15, p. 1042-1050, 1998.
44. WILLCOX, J. K.; CATIGNANI, G. L.; LAZARUS, S. Tomatoes and cardiovascular health. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 43, n. 1, p. 1-18, 2003.