



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ESTUDO DO PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS E
ATIVIDADE ANTI-RADICALAR DE VINHOS TINTOS DO
RIO GRANDE DO SUL

JUNE ANE COSTA MACIEL

JOÃO PESSOA, PARAÍBA-BRASIL

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DO PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS E
ATIVIDADE ANTI-RADICALAR DE VINHOS TINTOS DO
RIO GRANDE DO SUL**

JUNE ANE COSTA MACIEL

Sob a Orientação do Professor: Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

**Dissertação submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Ciência
e Tecnologia de Alimentos, da Universidade
Federal da Paraíba.**

JOÃO PESSOA/PB

2009

Ficha Catalográfica

M152e Maciel, June Ane Costa.

Estudo do perfil de compostos fenólicos e atividade anti-radicalar de vinhos tintos do Rio Grande do Sul / June Ane Costa Maciel.- João Pessoa, 2009.

92f. : il.

Orientador: Eduardo de Jesus Oliveira

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CT/PPGCTA

1. Tecnologia de Alimentos. 2. Vinhos Tintos – Rio Grande do Sul. 3. Vinho – atividade antioxidante. 4. Compostos fenólicos.

UFPB/BC

CDU: 664(043)

**ESTUDO DO PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE
ANTI-RADICALAR DE VINHOS TINTOS DO RIO GRANDE DO SUL**

JUNE ANE COSTA MACIEL

Aprovada em: _____/_____/_____

Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira _____
(Orientador)

Prof^a. Dra. Helenice Duarte de Holanda _____
(Examinadora Externa)

Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros _____
(Examinador Externo)

*Aos meus pais pela força e educação
que me deram, ao meu marido e à
minha filha, que fazem minha
felicidade.*

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pela vida e por ter permitido que este trabalho fosse realizado.
- A minha filha Mariana, que é minha coragem pra enfrentar qualquer obstáculo nessa vida, e pela alegria que ela me proporciona;
- A meu marido Valson Dantas, pela paciência, amor, carinho e companheirismo e principalmente pela grande ajuda em todos os momentos;
- A meus pais João Reinato e Detinha pelo amor e exemplo de vida que são pra mim;
- Aos meus irmãos Alex, Fabrício, Júnior, Léo, e Marco André que mesmo distantes sempre me apoiaram;
- A minha vó Jacy, por suas orações e toda a minha família;
- Ao Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira, pela orientação, paciência, amizade e por se mostrar um grande exemplo a ser seguido;
- Aos profs. Dr. Isac Almeida de Medeiros e Dr^a Helenice Duarte de Holanda por aceitarem compor a banca avaliadora e pelas alterações sugeridas para a melhoria do trabalho;
- Aos professores da pós-graduação;
- Aos colegas da pós-graduação pelos momentos que compartilhamos;
- Aos colegas de trabalho e grandes amigos Roberto Jefferson e Ana Paloma por todos os ensinamentos transmitidos;
- Aos amigos e colegas de laboratório, Renata, Antônio, José Alves, Juliara, Mayara, Camila e Adriana por toda a ajuda para a realização deste trabalho;
- Aos funcionários do LTF, especialmente Sócrates, Nonato e Alessandro Marinho;
- Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos;
- Ao Departamento de Tecnologia Química e Alimentos, por possibilitar que este trabalho fosse desenvolvido, em especial ao prof. Vital de Queiroz e Samaritana, pela confiança e amizade;
- A Vinícula Salton, pelas amostras de vinhos doadas;
- A todos os amigos que encontrei neste caminho, que ao partirem levam um pouco de nós, mas com certeza deixam um pouco si;
- A todos que ajudaram de uma forma ou de outra na realização deste trabalho, muito obrigada.

SUMÁRIO

Ficha Catalográfica -----	III
Índice de Figuras-----	IX
Índice de Gráficos-----	X
Índice de Quadros e Tabelas-----	XI
Abreviaturas-----	XII
RESUMO-----	XIV
ABSTRACT-----	XV
1 - INTRODUÇÃO -----	16
2 – OBJETIVOS-----	19
2.1 - Objetivo Geral-----	19
2.2 – Objetivos Específicos-----	19
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -----	20-
3.1 – Histórico do vinho no Brasil-----	20
3.2 - Produção de vinhos na Região sul do Brail -----	21-
3.3 - Clima na Região Sul do Brasil-----	23
3.4 – Elaboração de Vinho Tinto-----	24
3.5 – Compostos Fenólicos-----	25
3.5.1 - Origem e presença de fenólicos na uva e no vinho-----	25
3.5.2 - Fatores que afetam a presença de compostos fenólicos na uva e no vinho-----	28
3.5.3 - Compostos fenólicos na saúde-----	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS -----	35
4.1 – Materiais e Solventes -----	355
4.1.1. Determinação do Teor de Fenólicos Totais-----	355
4.1.2. Quantificação de Antocianinas-----	355
4.1.3. Atividade Sequestradora do Radical DPPH•-----	355
4.1.4. Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (CAET)-----	355
4.1.5. Quantificação da Concentração de <i>Cis e Tran</i> - Resveratrol e Quercetina-----	366
4.1.6. Análise do Perfil Cromatográfico-----	36
4.2. Amostras -----	37
4.3 – Preparação das Amostras -----	377

4.4. Análise do Teor de Fenólicos Totais dos Vinhos Tintos do Rio Grande do Sul e de suas frações -----	38
4.5 – Quantificação de Antocianinas Monoméricas (AM) -----	39
4.6 - Análise da Atividade Antioxidante -----	411
4.6.1 - Avaliação da Atividade Seqüestradora do Radical(DPPH·) dos vinhos inteiros e de suas frações-----	411
4.6.2 - Avaliação da Atividade Sequestradora do Radical ABTS ^{·+} dos vinhos inteiros e de suas frações -----	422
4.7. Quantificação da Concentração de <i>Cis e Trans</i> -Resveratrol e Quercetina-----	44
4.8. Análise do Perfil Cromatográfico-----	44
4.9. Análise Estatística -----	45
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	47
5.1 - Análise dos Componentes Fenólicos dos Vinhos Tintos do Rio Grande do Sul e de suas Frações -----	47
5.2. Concentração de Antocianinas Monoméricas-----	54
5.3. Análise da Atividade Antioxidante-----	59
5.3.1 - Avaliação da Atividade Seqüestradora do Radical DPPH· dos vinhos inteiros e de suas frações-----	59
5.3.2 - Avaliação da Atividade Seqüestradora do Radical ABTS ^{·+} -----	64
5.4 – Quantificação da Concentração de <i>Cis e Trans</i> -Resveratrol e Quercetina-----	69
5.5 - Determinação do Perfil Cromatográfico dos Vinhos-----	71
6– CONCLUSÕES-----	79
7 – REFERÊNCIAS-----	80

Índice de Figuras

Figura 1-Mapa das regiões vitivinícolas do Rio Grande do Sul-----	21
Figura 2- Estrutura Química das Principais Classes de Compostos Polifenólicos-----	26
Figura 3- Estrutura dos isômeros <i>trans</i> e <i>cis</i>-resveratrol-----	27
Figura 4-Fluxograma do Fracionamento dos Vinhos Tintos Analisados-----	38
Figura 5-Estruturas da Forma do Oxônio (Colorido) e da Forma do Hemicetal (Descolorido)-----	40
Figura 6- Estruturas do Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH·) e do Ácido Ascórbico-----	42
Figura 7- Estrutura do Trolox -----	42
Figura 8 - Formação do Cátion Radical ABTS⁺ a Partir do ABTS e K₂S₂O₈-----	43
Figura 9 – Cromatograma do Vinho Tinto SCME -----	71
Figura 10 – Cromatograma do Vinho Tinto SCCS-----	71
Figura 11 – Cromatograma do Vinho Tinto SCTA-----	72
Figura 12 – Cromatograma do Vinho Tinto SVME-----	72
Figura 13 – Cromatograma do Vinho Tinto ALME-----	72
Figura 14 – Cromatograma do Vinho Tinto MJCS-----	72
Figura 15– Cromatograma do Vinho Tinto CSCS-----	73
Figura 16 – Cromatograma do Vinho Tinto MJTA-----	73
Figura 17 – Cromatograma do Vinho Tinto CSME-----	73

Índice de gráficos

Gráfico 1 – Teores de fenólicos totais em Vinhos Tintos do Rio Grande do Sul e de um vinho Francês(CSME)-----	47
Gráfico 2 – Teores de fenólicos totais de Vinhos Tintos do Rio Grande do Sul e de Vinhos Tintos do Vale do São Francisco-----	49
Gráfico 3 – Concentração de Fenólicos totais de vinhos do Rio Grande do Sul X Vinhos do Vale do São Francisco-----	50
Gráfico 4 – Teores de Fenólicos Totais de frações dos vinhos tintos do Rio Grande do Sul em mgEAG/g.*N.D. Não Detectado-----	51
Gráfico 5 – Comparação de Teor de Fenólicos Totais entre frações dos vinhos do Rio Grande do Sul-----	52
Gráfico 6 – Comparação entre teor de fenólicos totais da fração 1 do RGS e do VSF.-----	53
Gráfico 7 – Comparação entre teor de fenólicos totais da fração 3 do RGS e do VSF.-----	53
Gráfico 8 – Antocianinas Monoméricas em vinhos inteiros do Rio Grande do Sul (mgAM/L). *AM=Antocianinas Monoméricas-----	54
Gráfico 9 – Concentração de Antocianinas Monoméricas de vinhos inteiros do Rio Grande do Sul e do Vale do São Francisco-----	55
Gráfico 10 – Comparação entre a concentração de Antocianinas Monoméricas de vinhos inteiros do Rio Grande do Sul(cinza) e Vale do São Francisco.-----	56
Gráfico 11 – Concentração de Antocianinas Monoméricas nos extratos dos vinhos (mgAM/L).*N.D. – Não Detectado-----	57
Gráfico 12 – Comparação entre a concentração de Antocianinas monoméricas da fração 2 do RGS e do VSF.-----	58
Gráfico 13 – CE ₅₀ (µg/mL) para teste antioxidante com radical DPPH, para vinhos inteiros do Rio Grande do Sul-----	59
Gráfico 14 – Determinação da Atividade Anti-radicalar ao DPPH·, das 3 frações dos vinhos estudados. Ác. Asc.= Ácido Ascórbico-----	61
Gráfico 15 – Comparação entre a fração 1 de vinhos do RGS x VSF com relação a Atividade Anti-radicalar DPPH·.-----	62
Gráfico 16 – Comparação entre a fração 3 de vinhos do RGS x VSF com relação a Atividade Anti-radicalar DPPH·.-----	62
Gráfico 17 – Correlação linear entre o Teor de Fenólicos Totais e a Atividade Antioxidante frente ao radical DPPH·, das frações dos vinhos-----	63
Gráfico 18 - CE ₅₀ (µg/mL) para teste antioxidante radical ABTS ^{•+} , para vinhos inteiros do Rio Grande do Sul-----	64
Gráfico 19 – Determinação da Atividade Anti radicalar ao ABTS' das 3 frações dos vinhos estudados-----	65
Gráfico 20 - Comparação entre a fração 2 de vinhos do RGS x VSF com relação a Atividade Anti-radicalar ABTS·.-----	66

Gráfico 21 - Correlação Linear do Teor de Fenólicos Totais em função da Atividade Sequestradora de Radicais ABTS ⁺ das Três Frações dos Vinhos Tintos Analisados-----	
67	
Gráfico 22 - Correlação Linear dos Valores de CE ₅₀ do Ensaio ABTS ⁺ em Função dos Valores de CE ₅₀ do Ensaio DPPH [·] dos Extratos dos Vinhos Analisados-----	
68	
Gráfico 23 - Escores das Amostras SCME, SCCS, SCTA, SVME, ALME, MJCS, CSCS, MJTA e CSME de Vinhos Tintos do Rio Grande do Sul e 1(um) Francês(CSME), nos Dois Primeiros Componentes Principais, Calculados com Base nas Áreas Relativas dos Picos Seleccionados-----	75
Gráfico 24 - Valores de <i>loadings</i> nos Dois Primeiros Componentes Principais Calculados dos Diferentes Componentes Seleccionados para as Amostras dos Vinhos Estudados-----	76
Gráfico 25 - Dendrograma Obtido a Partir da Análise Hierárquica de Agrupamentos dos Dados das Amostras dos Vinhos Tintos Estudados-----	77

Índice de Quadros e Tabelas

Quadro 1: Produção anual de vinhos no Rio Grande do Sul (L)-----	23
Tabela 1: Concentração de <i>Cis</i>, <i>Trans</i>-Resveratrol e Quercetina, expressos em µg/mL-----	69

ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico]
ABTS^{•+}	Cátion radical ABTS
SCME	Vinho Tinto SC Merlot
SCME1	Fração 1 do Vinho Tinto SCMerlot
SCME2	Fração 2 do Vinho Tinto SCMerlot
SCME3	Fração 3 do Vinho Tinto SCMerlot
SCCS	Vinho Tinto SC Cabernnet Sauvignon
SCCS1	Fração 1 do Vinho Tinto SC Cabernnet Sauvignon
SCCS2	Fração 2 do Vinho Tinto SC Cabernnet Sauvignon
SCCS3	Fração 3 do Vinho Tinto SC Cabernnet Sauvignon
SCTA	Vinho Tinto SC Tannat
SCTA 1	Fração 1 do Vinho Tinto SC Tannat
SCTA 2	Fração 2 do Vinho Tinto SC Tannat
SCTA 3	Fração 3 do Vinho Tinto SC Tannat
SVME	Vinho Tinto SV Merlot
SVME 1	Fração 1 do Vinho Tinto SV Merlot
SVME 2	Fração 2 do Vinho Tinto SV Merlot
SVME 3	Fração 3 do Vinho Tinto SV Merlot
ALME	Vinho Tinto AL Merlot
ALME 1	Fração 1 do Vinho Tinto AL Merlot
ALME 2	Fração 2 do Vinho Tinto AL Merlot
ALME 3	Fração 3 do Vinho Tinto AL Merlot
CAET	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector com Arranjo de Diodos
DPPH[•]	Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila
EAG	Equivalente de ácido gálico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ET	Equivalente de Trolox
FT	Teor de fenólicos totais

MJCS	Vinho Tinto MJ Cabernnet Sauvignon
MJCS 1	Fração 1 do Vinho Tinto MJ Cabernnet Sauvignon
MJCS 2	Fração 2 do Vinho Tinto MJ Cabernnet Sauvignon
MJCS 3	Fração 3 do Vinho Tinto MJ Cabernnet Sauvignon
CSCS	Vinho Tinto CS Cabernnet Sauvignon
CSCS 1	Fração 1 do Vinho Tinto CS Cabernnet Sauvignon
CSCS 2	Fração 2 do Vinho Tinto CS Cabernnet Sauvignon
CSCS 3	Fração 3 do Vinho Tinto CS Cabernnet Sauvignon
MJTA	Vinho Tinto MJ Tannat
MJTA1	Fração 1 do Vinho Tinto MJ Tannat
MJTA2	Fração 2 do Vinho Tinto MJ Tannat
MJTA3	Fração 3 do Vinho Tinto MJ Tannat
HCA	Análise Hierárquica de <i>Cluster</i>
MeOH	Metanol
PCA	Análise de Componentes Principais
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
CSME	Vinho Tinto CS Merlot
CSME 1	Fração 1 do Vinho Tinto CS Merlot
CSME 2	Fração 2 do Vinho Tinto CS Merlot
CSME 3	Fração 3 do Vinho Tinto CS Merlot

RESUMO

Vinhos monovarietais produzidos na Região Sul do Brasil (estado do Rio Grande do Sul), e um vinho francês, foram estudados quanto ao seu perfil polifenólico, atividade antioxidante e concentração de quercetina, e *cis*, e *trans*-resveratrol. O perfil polifenólico e atividade antioxidante dos vinhos estudados foram comparados aos dados de um estudo feito anteriormente com vinhos da região do Vale do São Francisco. As amostras consistiram de oito vinhos monovarietais do Rio Grande do Sul e um francês, codificados da seguinte maneira: dois Merlots 2005 - ALME e SCME, um Merlot 2004 - SVME, um francês Merlot - CSME, um Cabernet Sauvignon 2004 - SCCS, um Cabernet Sauvignon 2005 - MJCS, um Cabernet Sauvignon 2006 - CSCS, um Tannat 2005 - SCTA e um Tannat 2006 - MJTA. As amostras (100 mL) foram particionadas em esquema utilizando diferentes solventes, produzindo três frações de cada vinho: uma aquosa, rica em antocianinas (fração 1, extraído em pH = 2), uma orgânica acetato de etila, fração rica em flavonóides e outros polifenóis não-polares (fração 2, extraída em pH = 7) e outra orgânica acetato de etila rica em ácidos fenólicos e outros polifenóis polares (fração 3, extraída em pH = 2). Os fenólicos totais das amostras foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu e variou entre $1702,27 \pm 78,74$ (n = 3) mg Equivalente Ácido Gálico/L (mg EGA/L), para a amostra ALME a $3337,77 \pm 118,42$ mg EGA/L para a amostra SCME (n = 3). O teor de compostos fenólicos nos vinhos foram significativamente menores (p <0,0001) do que os fenólicos totais dos vinhos previamente estudados na Região do Vale do São Francisco, embora o conteúdo de antocianinas monoméricas, conforme determinado pelo método do pH diferencial foi significativamente maior (p = 0,0003). A atividade antioxidante das frações foi significativamente maior para as frações 2, em geral, com a fração mais ativa no teste DPPH sendo a amostra MJTA (um Tannat, 2006), que apresentou uma CE₅₀ de $4,02 \pm 0,06$ mg/mL (n = 3), enquanto o controle positivo, o ácido ascórbico apresentou uma CE₅₀ de $2,62 \pm 0,04$ mg/mL (n = 3). No ensaio antioxidante com radical ABTS, a amostra mais ativa foi MJTA (Tannat, 2006), fração 2, com uma CE₅₀ inferior a 2 mg/mL, que foi mais ativa do que o padrão utilizado, Trolox, que teve uma CE₅₀ de $2,62 \pm 0,04$ mg/mL (n = 3). A concentração de *cis*-resveratrol em vinhos testados variou de $2,85 \pm 0,0294$ mg/mL para a amostra MJTA a $6,10 \pm 0,0255$ mg/mL para SCCS e foram significativamente mais elevados do que a concentração de *trans*-resveratrol, que variou de $0,22 \pm 0,0015$ mg/mL de amostra SCTA para $1,46 \pm 0,0050$ mg/mL para a amostra CSME (n = 2). A concentração de quercetina variou de $4,84 \pm 0,0332$ mg/mL para o CSME a $0,59 \pm 0,0049$ mg / mL para o ALME (N = 2). Tomados em conjunto, nossos resultados confirmam que os vinhos do Sul do Brasil (Rio Grande do Sul) têm significativamente menor teor de fenólicos totais e atividade antioxidante quando comparados com os vinhos da Região Nordeste (Vale do São Francisco). Outro resultado importante é a confirmação de um estudo publicado anteriormente sugerindo que vinhos brasileiros têm significativamente maiores concentrações de *cis*-resveratrol em comparação com seu isômero mais estudado, o *trans*.

Palavras- chave: vinho, compostos fenólicos, atividade antioxidante, *cis*, *trans*-resveratrol.

ABSTRACT

Monovarietal wines from the southern wine-making regions of Brazil (in the state of Rio Grande do Sul), and a French wine were studied regarding their polyphenolic profile, antioxidant activity and concentration of quercetin, and *cis*, and *trans*-resveratrol. The polyphenolic profile and antioxidant activity of the wines studied were compared to data from the northern wine-making region of the Vale do São Francisco previously published. The wine samples consisted of eight monovarietal wines from the Rio Grande do Sul wine-making regions (two Merlots 2005, coded as ALME and SCME, a Merlot 2004, coded as SVME, a French Merlot, coded as CSME, a Cabernet Sauvignon 2004, coded as SCCS, a Cabernet Sauvignon 2005 coded as MJCS, a Cabernet Sauvignon 2006, coded as CSCS, a Tannat 2005, coded as SCTA and a Tannat 2006, coded as MJTA). The wine samples (100 mL) were submitted to a pH-controlled partitioning scheme using different solvents to afford three fractions for each wine: an aqueous, anthocyanin-rich fraction (Fraction 1, aqueous, extracted at pH=2), an organic ethyl acetate fraction rich in flavonoids and other non-polar polyphenols (Fraction 2, extracted at pH=7) and an organic ethyl acetate fraction rich in phenolic acids and other polar polyphenols (Fraction 3, extracted at pH=2). The total phenolic content of the samples was determined by the Folin-Ciocalteu method and varied between $1702,27 \pm 78,74$ (n=3) mg Equivalent Galic Acid/L (EGA/L), for sample ALME to $3337,77 \pm 118,42$ mg EGA/L for the SCME sample (n=3). The content of total phenolics of the wine samples were significantly lower ($p < 0,0001$) than the total phenolic content of the previously studied wines from the São Francisco Region, although the content of monomeric anthocyanins as determined by the pH differential method was significantly higher ($p = 0,0003$). The antioxidant activity of the fractions was significantly higher for Fractions 2 in general, with the most active fraction in the DPPH test being from the sample MJTA (a Tannat, 2006), which presented a EC_{50} of $4,02 \pm 0,06$ $\mu\text{g/mL}$ (n=3), while the positive control, ascorbic acid showed an EC_{50} of $2,62 \pm 0,04$ $\mu\text{g/mL}$ (n=3). In the ABTS antioxidant assay, the most active fraction studied was from the sample MJTA (Tannat, 2006), Fraction 2, with a EC_{50} below 2 $\mu\text{g/mL}$ which was more active than the standard used, Trolox, which had an EC_{50} of $2,62 \pm 0,04$ $\mu\text{g/mL}$ (n=3). The concentration of *cis*-resveratrol in the wines tested varied from $2,85 \pm 0,0294$ $\mu\text{g/mL}$ for the sample MJTA to $6,10 \pm 0,0255$ $\mu\text{g/mL}$ for SCCS and were significantly higher than the concentration of *trans*-resveratrol, that varied from $0,22 \pm 0,0015$ $\mu\text{g/mL}$ for sample SCTA to $1,46 \pm 0,0050$ $\mu\text{g/mL}$ for the sample CSME (n=2). The concentration of quercetin varied from $4,84 \pm 0,0332$ $\mu\text{g/mL}$ for the CSME sample to $0,59 \pm 0,0049$ $\mu\text{g/mL}$ for the ALME sample (n=2). Taken together, our results confirm that the wines from the Brazilian southern wine-making regions of Rio Grande do Sul have significantly lower total phenolics and antioxidant activity when compared with wines from the Northern Vale do São Francisco region. Another important result is the confirmation of a previously published study suggesting that Brazilian wines have significantly higher concentrations of *cis*-resveratrol compared with the more studied, *trans* isomer.

Key-words: wine, phenolic compounds, antioxidant activity, *cis*, *trans*-resveratrol.

1 – INTRODUÇÃO

Um cálice diário de vinho faz muito bem à saúde, dirá o francês, que tem a bebida dos deuses (e dos padres) culturalmente incorporada à sua dieta. Afinal, é na França que se observa o fenômeno de uma população que consome altos níveis de gorduras saturadas, mas que apresenta baixa incidência de doenças do coração e de arteriosclerose (GODOY,2007).

Segundo Pacheco (1995), as primeiras videiras teriam sido encontradas na Ásia Ocidental e na Europa por ter sido nessas duas regiões, em cavernas pré-históricas, localizadas folhas de videiras e sementes de uvas. Daí, a vinha se expandiu para outras regiões tais como Portugal, Espanha, França e Itália onde até hoje são produzidos os melhores vinhos do mundo. O vinho, assim como a maioria das bebidas alcoólicas existentes na Idade Média, era usado em medicina, no tratamento de feridas e outros males.

O homem faz vinhos há milhares de anos e deve ter descoberto essa maravilhosa bebida por acaso. Não se sabe quando isso se deu. É possível que algumas uvas silvestres tenham sido amassadas acidentalmente e transformadas em algo parecido com o vinho. Algum ancestral com mais imaginação provou e deve ter ficado entusiasmado com o resultado, com o efeito, digamos, inebriante. Isso se deu, provavelmente no Cáucaso, de onde as uvas chegaram ao Crescente Fértil, no Oriente Médio (GALVÃO, 1999).

O vinho desempenhou um enorme papel cultural e econômico no mundo clássico, greco-romano: era uma das mercadorias mais importantes. Os navios gregos e fenícios disseminaram o vinho por todo o mediterrâneo e, posteriormente, o exército romano interiorizou essa marcha. Até recentemente, o vinho era normalmente muito mais saudável que a água e os romanos sabiam disso. Assim seus exércitos levavam sempre o vinho e plantavam videiras nas mediações de seus quartéis em quase toda a Europa (GALVÃO, 1999).

O vinho se beneficiou dos avanços das ciências da Renascença, mas precisou esperar Pasteur, no fim do século passado, para ser explicado. Foi ele quem demonstrou cientificamente a fermentação, dando origem à moderna enologia, que beneficiou enormemente a bebida. Também graças à essa moderna enologia, pode-se dizer que o vinho é muito melhor hoje do que há 50 anos (GALVÃO, 1999).

O vinho é uma bebida alcoólica obtida pelo processo de fermentação do mosto da uva sã e madura, sendo o resultado de uma atividade biológica exercida por diversos tipos de leveduras. Estas leveduras atuam sobre o açúcar da uva (glicose e frutose), transformando-o em álcool e gás carbônico. Como subprodutos desta fermentação, encontramos glicerina, ácidos succínico e acético, aldeídos e outros.

No mundo existem mais de 10 mil variedades diferentes de uvas, que se adaptam a diferentes tipos de solo e clima, sendo cultivadas em várias regiões.

As uvas podem ser classificadas em dois grandes grupos:

- De origem européia – *Vitis vinifera* – que se destina principalmente à produção de vinhos finos.

- De origem americana – *Vitis labrusca* – destinada à produção de vinhos, sucos e derivados, entram na categoria das uvas comuns. A alta produção de *V. labrusca* no Brasil (80%) é devido às suas características de rusticidade ao clima e alta produção de mosto (ALVES, 2006).

O mercado de vinhos no Brasil é ainda bastante incipiente. Tanto a produção de uvas para vinhos como o processamento desta bebida iniciou-se na região sul do país pela iniciativa de imigrantes europeus italianos no Vale dos Vinhedos, no município de Bento Gonçalves, onde estão presentes vinícolas nacionais tais como a Miolo, Salton, Cooperativa Aurora, Casa Valduga e outras multinacionais como a Forestier e Chandon do Brasil.

A cada dia que passa cresce o número de adeptos à ingestão de vinho tinto devido às suas propriedades benéficas a saúde. Na mesma proporção, cresce também o desenvolvimento de produtos alternativos, mas que possam trazer as mesmas características procuradas nos vinhos. O alvo deste interesse é um grupo de substâncias denominadas polifenóis, entre as quais se encontra o resveratrol, presente em diversas plantas, como eucalipto, amendoim, amoras, e especialmente na uva e seus derivados (HILLIS *et al.*, 1974, LANGCAKE *et al.*, 1976, SOUTO *et al.*, 2001).

Criar competências para produzir um produto de qualidade internacional é a meta das vinícolas brasileiras que produzem vinhos varietais. Através do gerenciamento eficaz da cadeia produtiva aliada às estratégias de marketing, estas empresas nacionais de pequeno e médio porte vêm buscando ampliar um mercado bastante restrito (PORTER, 1986 e 1989). O consumo de vinho no país esbarra ainda na falta de informação do consumidor, condições climáticas e, principalmente, na restrição da

renda do brasileiro. Porém, nas faixas de renda elevadas, existe potencial para substituir o vinho importado pelo vinho nacional de boa qualidade.

Verifica-se aqui no Brasil uma escassez de dados sobre os vinhos nacionais no que se refere à atividade antioxidante e composição fenólica, e uma necessidade de melhor caracterizá-los do ponto de vista físico-químico, para ampliar a penetração desses vinhos no mercado internacional.

2 – OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antioxidante e a composição em compostos fenólicos de vinhos tintos do Rio Grande do Sul.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a concentração de polifenóis totais nos vinhos tintos do Rio Grande do Sul;
- Determinar a concentração de antocianinas monoméricas nos vinhos tintos do Rio Grande do Sul;
- Determinar a atividade antioxidante de vinhos tintos do Rio Grande do Sul;
- Determinar a concentração de *cis* e *trans*-resveratrol e quercetina nos vinhos;
- Correlacionar a atividade antioxidante com a concentração de polifenóis;
- Determinar o perfil cromatográfico desses vinhos;
- Classificar os vinhos quanto a variedade de uva e marca através do perfil cromatográfico de seus polifenóis, utilizando técnicas de análise multivariada;
- Comparar o grau de atividade antioxidante e perfil de compostos fenólicos de vinhos brasileiros com correspondente importado.
- Comparar os resultados obtidos neste trabalho para vinhos do Rio Grande do Sul com estudo semelhante realizado com vinhos da região do Vale do São Francisco.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Histórico do vinho

As primeiras videiras do Brasil foram trazidas pela expedição colonizadora de Martim Afonso de Souza, em 1532. Brás Cubas, fundador da cidade de Santos, é, reconhecidamente, o primeiro a cultivar a vinha em nossas terras.

No ano de 1813, D. João VI reconhece oficialmente a primazia de Manoel de Macedo Brum da Silveira no plantio de videiras e produção de vinho no Rio Grande. Por volta de 1840, a introdução da variedade americana Isabel, por Thomas Master, na ilha dos Marinheiros, foi teve grande sucesso. Sua resistência e rusticidade fizeram com que ela se implantasse preferencialmente na região em detrimento das cepas viníferas, mais frágeis. A uva Isabel foi-se disseminando nas áreas de colonização alemã, como São Leopoldo.

A partir de 1875 desponta o grande surto do crescimento da vitivinicultura gaúcha, graças à chegada da colonização italiana, pois os italianos traziam na bagagem além das cepas de uva européias da região de Vêneto, o hábito do consumo do vinho como um alimento, e o ainda chamado espírito vitivinícola. As cepas com o passar do tempo começaram a morrer por causa de doenças fúngicas, mas a força italiana e a vontade de manter sua tradição permitiram aos imigrantes que encontrassem uma cultivar que se adaptasse à região. A variedade de origem americana chamada de Isabel (*vitís labrusca*) foi encontrada na região no vale do rio dos Sinos, onde os imigrantes levaram para a encosta Superior do Nordeste, sendo que essa cultivar se adaptou muito bem àquelas condições, e permitiu a continuidade da produção de uvas e vinho.

Há algumas décadas a preocupação com a qualidade e as melhorias das técnicas agronômicas fizeram com que, novamente, se iniciasse o plantio de variedades viníferas. A partir de 1970, vinícolas multinacionais, como a Moët & Chandon, a Martini & Rossi e a Heublein estabeleceram-se na Serra Gaúcha, trazendo equipamentos de alta tecnologia e técnicas viticulturais modernas. Essas empresas implementaram, também, junto aos calouros da Serra, um programa de estímulo à modificação do sistema de plantio, passando da latada à espaldeira. Estimularam, igualmente, a produção de cepas viníferas. Essas medidas tiveram como consequência

um grande salto qualitativo no vinho brasileiro que hoje, a despeito das dificuldades de solo e clima, ostenta padrão internacional de qualidade.

O Vale dos Vinhedos, na Serra Gaúcha (Figura 1), localizado entre as divisas dos municípios de Bento Gonçalves, Garibaldi e Monte Belo do Sul e onde imigrantes italianos encontraram no final do século XIX, as condições ideais para o cultivo das pequenas mudas de videira que traziam em sua bagagem, é a região principal e originária das vinícolas brasileiras. Privilegiada pelo clima temperado, de invernos rigorosos e excepcionais períodos de sol no verão, o Vale dos Vinhedos transformou-se em uma das melhores regiões produtoras de vinho do Brasil. Nesta região observa-se que os costumes e as tradições italianas continuam fortemente enraizados, passados de geração à geração, com famílias inteiras trabalhando em suas pequenas vinícolas, na elaboração de vinhos da mais alta qualidade.



Figura 1-Mapa das regiões vitivinícolas do Rio Grande do Sul.
Fonte: FREITAS, 2006.

3.2. Produção de Vinhos na Região Sul do Brasil

As uvas cultivadas no Brasil são classificadas como européias (*Vitis vinifera*), denominadas finas, e americanas ou híbridas (cruzamento entre européias e

americanas), denominadas comuns (CATALUÑA, 1988). As cultivares americanas ou híbridas são cultivares de *Vitis labrusca*, *Vitis bourquina* e híbridos interespecíficos, às vezes complexos, envolvendo várias espécies americanas e também *Vitis vinifera*. Como regra, são cultivares de alta produtividade e resistentes às doenças fúngicas, adaptando-se bem às condições ambientais do Sul do Brasil. Para a produção de vinhos comuns de mesa e sucos são utilizadas as variedades híbridas e americanas (CAMARGO, 2003).

Por outro lado, as cultivares de *Vitis vinifera* usadas para a fabricação de vinhos finos, são as mais cultivadas no mundo, produzindo uvas para mesa, vinho, passas e outros derivados. São consideradas uvas de alta qualidade. Dentre as viníferas tintas, destacam-se as cultivares Cabernet Sauvignon, Merlot, Cabernet Franc e Tannat e, entre as brancas, destacam-se a Moscato, Riesling Itálico, Trebbiano e Chardonnay (CAMARGO, 2003).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a safra de 2004, foi uma das maiores em termos de quantidade de uva produzidas: 1.283.203 t de uvas. Já na safra de 2005 houve uma redução de 2,89%, o que segundo Mello (2006), não chega a representar uma redução no agronegócio, pois a qualidade da safra 2005 foi excepcional. No quadro 1 são apresentados os valores da quantidade em litros da produção de vinhos, no estado do Rio Grande do Sul.

Cerca de 80% da produção é de uvas americanas (*V. labrusca*, *V. bourquina*) e híbridas, sendo a Isabel a cultivar de maior expressão. A maior parte da uva cultivada é destinada à elaboração de vinhos, sucos e outros derivados. Uma pequena porcentagem da produção é destinada ao consumo *in natura* (PROTAS *et al.*, 2002).

Quadro 1: Produção anual de vinhos no Rio Grande do Sul, em litros

PRODUÇÃO	2005	2006	2007
VINHO COMUM	226.080.432	185.075.887	275.251.898
Tinto	180.698.666	149.527.555	228.120.210
Branco	39.212.146	31.738.390	42.118.552
Rosado	6.169.620	3.809.942	5.013.136
VINHO DE VINÍFERAS	45.453.898	32.168.977	43.176.484
Tinto	25.409.805	18.868.108	24.786.071
Branco	20.012.363	13.249.969	17.598.428
Rosado	31.730	50.900	791.985
VINHO ESPECIAL	43.000	25.000	36.010
Tinto	43.000	25.000	36.010
Total	543.145.660	434.517.228	636.928.784

Fonte: União Brasileira de Vitivinicultura - UVIBRA.
Elaboração: EMBRAPA/CNPUV

3.3.Clima na Região Sul do Brasil

O clima do Rio Grande do Sul é temperado do tipo subtropical, classificado como mesotérmico úmido. Devido à sua posição geográfica, entre os paralelos 27°03'42" e 33°45'09" latitude sul, e 49°42'41" e 57°40'57" longitude oeste, apresenta grandes diferenças em relação ao Brasil. A latitude reforça as influências das massas de ar oriundas da região polar e da área tropical continental e Atlântica. A movimentação e os encontros destas massas definem muitas de nossas características climáticas.

As temperaturas apresentam grande variação sazonal, com verões quentes e invernos bastante rigorosos, com a ocorrência de geada e precipitação eventual de neve. As temperaturas médias variam entre 15 e 18°C, com mínimas de até -10°C e máximas de 40°C. Com relação às precipitações, o Estado apresenta uma distribuição relativamente equilibrada das chuvas ao longo de todo o ano, em decorrência das massas de ar oceânicas que penetram no estado.

O volume de chuvas, no entanto, é diferenciado. Ao sul a precipitação média situa-se entre 1.299 e 1.500 mm e ao norte a média está entre 1.500 e 1.800 mm, com intensidade maior de chuvas, a nordeste do Estado, especialmente na encosta do planalto, local com maior precipitação no Estado.

No cultivo da videira o desenvolvimento, crescimento e alta produtividade estão relacionados a aspectos como: temperatura, radiação solar, umidade atmosférica e a disponibilidade hídrica do solo. O processo de evapotranspiração da videira é determinado pela quantidade de energia disponível para o processo de vaporização da água, onde evaporação é a água perdida pelo solo e transpiração é a água perdida pelas plantas influenciadas pela radiação solar. A temperatura do ar interfere na atividade fotossintética das plantas, envolvendo as reações bioquímicas, cujos catalisadores, as enzimas, são dependentes da temperatura para expressar sua atividade máxima. Estas reações são menos intensas com as temperaturas inferiores a 20°C, se intensificam com o aumento da temperatura, atingindo o máximo entre 25 a 30°C, voltando a cair quando a temperatura se aproxima dos 45°C. As temperaturas abaixo de -15°C provocam a morte e as temperaturas acima de 38°C causam danos as plantas e a faixa ideal para um bom desenvolvimento é de 20 a 30°C (EMBRAPA – UVA E VINHO, 2003).

3.4.Elaboração de Vinho Tinto

A avaliação da maturidade da uva tinta é observada pelo aumento na porcentagem de açúcares redutores e pH, e decréscimo da acidez titulável (AMERINE *et al.*, 1967) e mais recentemente, também pelo grau da maturação fenólica (VIVAS, 1998).

No Brasil a colheita é manual e, geralmente, é executada entre os meses de janeiro e abril. O primeiro processo que a uva sofre ao chegar na vinícola é o esmagamento, feito em desengaçadeira. A desengaçadeira tem duas funções fundamentais: retirar o engaço (cacho da uva) e esmagamento do grão sem o rompimento da semente, evitando assim um excesso de taninos no vinho. As uvas esmagadas ou mosto são, então, transportados para os tanques onde inicia o processo de fermentação (AMERINE *et al.* 1967).

Após o processo de desengaço é feita a sulfitagem, adição de SO₂ para prevenir a fermentação acética e inibir a atividade de polifeniloxidases. (AMERINE *et al.*1967).

Nos fermentadores, geralmente de inox, o mosto, junto com o bagaço recebe a adição de cultura de leveduras selecionadas (*Saccharomyces cerevisiae*) para favorecer uma fermentação homogênea. Na primeira etapa ocorre a fermentação alcoólica ou tumultuosa, responsável pela transformação do açúcar em álcool e a extração dos compostos presentes na casca e nas sementes do grão da uva (CATALUÑA, 1991). A variação do tempo de exposição das cascas e da semente durante a fermentação e a temperatura usada nesse processo são fatores marcantes na extração de compostos fenólicos (KOVAC *et al.*, 1992). Logo após ocorre a segunda etapa, fermentação lenta ou maloláctica que constitui uma melhora considerável do vinho, que o torna macio e elimina a característica ácida do vinho novo ou de vinhos excessivamente ácidos (AMERINE *et al.*, 1967).

A característica principal da vinificação em tinto reside no fato de o mosto fermentar em contato com quase todo o cacho. Esse processo é responsável pela extração de substâncias úteis para o envelhecimento e maturação dos vinhos tintos, como os compostos fenólicos (CATALUÑA, 1991).

Após a fermentação lenta o mosto é transfegado (transferido) para outros recipientes, sendo submetido aos estágios de estabilização, onde as partículas sólidas se depositam na parte inferior. O vinho é, periodicamente, transfegado para outros recipientes esterilizados até que atinja o ponto de clarificação desejado (JACKSON, 1994).

Assim, o vinho pronto inicia o processo de envelhecimento, que pode ocorrer na garrafa, em tonéis ou em barris de carvalho. Os vinhos tintos precisam dessa etapa para que adquiram o “bouquet” característico de cada variedade e desejáveis ao consumidor.

3.5. Compostos Fenólicos

3.5.1. – Origem e Presença de Fenólicos na Uva e no Vinho

Os compostos fenólicos são largamente distribuídos no reino vegetal fazendo parte da composição da dieta de forma significativa e são particularmente importantes devido às várias atividades farmacológicas que vêm sendo relatadas para esta classe de substâncias, tais como antioxidante, antiviral, antiinflamatória, hipoglicemiante, entre outras (TAPIERO *et al.*, 2002). São classificados em dois grandes grupos, os flavonóides e os não flavonóides. Os flavonóides representam o maior grupo de

polifenóis encontrados em alimentos (SCALBERT e WILLIANSON 2000), além de serem considerados os mais potentes antioxidantes entre os compostos fenólicos (SHAHID *et al.*, 1992; SOOBRAATTEE *et al.*, 2005). Os principais flavonóides presentes no vinho abrangem os flavonóis (quercetina, kaempferol e miricetina); os flavanóis, catequinas, como a (+)-catequina, (-)-epicatequina, galocatequina, procianidinas, taninos condensados e as antocianinas (cianidina e principalmente a malvidina-3-glicosídeo).

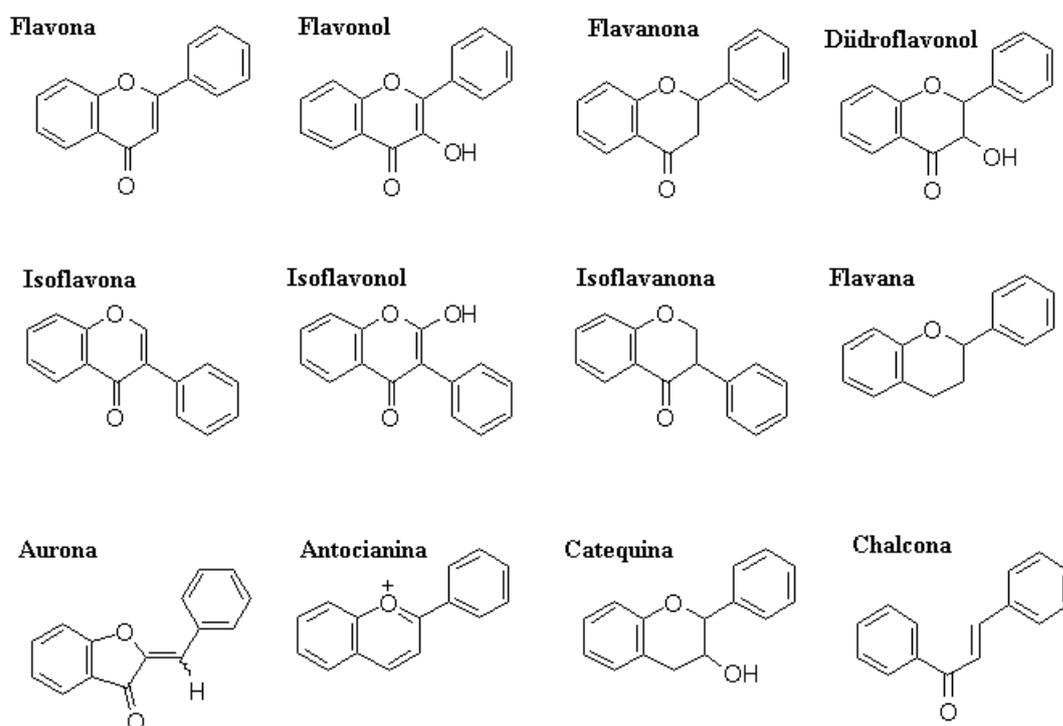


Figura 2- Estrutura Química das Principais Classes de Compostos Polifenólicos.

As antocianinas são flavonóides que se encontram largamente distribuídos na natureza e são responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e todas as tonalidades de vermelho que aparecem em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas (MARKAKIS, 1982). Nas videiras, elas acumulam-se nas folhas durante a senescência e são responsáveis pela coloração das cascas das uvas tintas, sendo encontradas também na polpa de algumas variedades de uvas (RENAUD e LORGEHIL, 1992).

As antocianinas são compostos que, com o envelhecimento do vinho tendem a formar complexos com outros compostos fenólicos através de um processo de

polimerização, dando a estabilidade de cor desejável ao vinho, e também estão associadas aos efeitos benéficos à saúde (TEDESCO *et al.*, 2001).

Os flavonóis se acumulam nas cascas e folhas das plantas porque a sua síntese é estimulada pela luz. Isso pode explicar a possível diferença de composição entre frutos de uma mesma planta, ou seja, os frutos que recebem uma maior quantidade de luz tendem a ter uma síntese pronunciada desses compostos (PRICE *et al.*, 1995). Os flavonóis são os pigmentos amarelos da uva e são encontrados principalmente na película, e geralmente, ligados a açúcares como a glicose, rafinose e o ácido glucorônico. O flavonol predominante nas cultivares de *Vitis vinifera* é o kaempferol, enquanto que nas cultivares de *Vitis labrusca* é a quercetina (JACKSON, 1994).

A (+)-catequina e (-)-epicatequina são as unidades básicas do grupo dos flavanóis. As procianidinas (também conhecidos como taninos condensados) são formadas pela associação de várias unidades monoméricas (2 a 5 unidades) de catequinas oligoméricas, além de 5 unidades de catequinas poliméricas. As procianidinas diferem em posição e configuração de outras ligações monoméricas.

A catequina e a epicatequina são, normalmente, encontradas em frutas, enquanto que a galocatequina, a epigalocatequina e a epigalocatequina são encontradas em sementes (YILMAZ e TOLEDO, 2004) e, principalmente, em chás (LUXIMONRAMMA *et al.*, 2005).

Em vinhos, os flavonóis contribuem, principalmente, para as características aromáticas e de cor e os flavanóis, especialmente na sua forma condensada, os taninos, contribuem com a adstringência (AMERINE e OUGH, 1980).

Os estilbenos formam uma outra classe de compostos fenólicos, e são representados no vinhos principalmente pelo resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno, Figura 3).

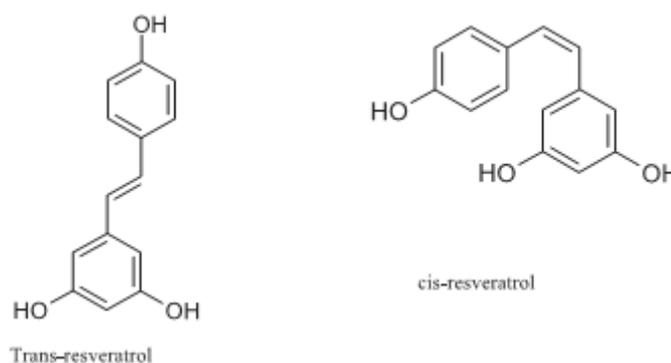


Figura 3 – Estrutura dos isômeros *trans* e *cis*-resveratrol.

Dentre todos os compostos fenólicos das uvas, o resveratrol tem atraído atenção especial nas últimas décadas em decorrência de estudos epidemiológicos que mostram correlação inversa entre o consumo moderado de vinho e a incidência de doenças cardiovasculares. Os estudos com resveratrol tiveram início a partir de investigações relacionadas à dieta francesa, que apesar de rica em gorduras de origem animal, parece associada à baixa incidência de doenças cardiovasculares, fenômeno conhecido como “Paradoxo Francês”. O resveratrol pode ser encontrado em amendoim, cacau, algumas variedades de chás, porém, a principal fonte são as uvas e seus derivados (COUNET, CALLEMIEN e COLLIN, 2006). Sua biossíntese nas plantas é induzida por fatores ambientais como a radiação UV e infecção por fungos (LANGCAKE, 1976).

As uvas e os produtos relacionados, como o vinho são, provavelmente, os produtos alimentícios que contêm os maiores teores de resveratrol. Primeiramente, foi demonstrado que o resveratrol atua como fitoalexina, uma classe de antibiótico da planta, e que é sintetizado quando a planta é submetida a um estresse, como o ataque de patógenos, radiação UV ou lesão (BRAVO, 1996). A segunda razão do grande interesse dos pesquisadores sobre o resveratrol são os possíveis benefícios para a saúde humana, principalmente pelas suas propriedades antioxidantes e a diminuição da incidência de distúrbios cardiovasculares (FRANKEL *et al.*, 1995; BRAVO, 1996; STIVALA *et al.*, 2001).

Até pouco tempo atrás, praticamente não se comentava muito da importância dos compostos fenólicos na alimentação. No entanto, nos últimos anos, em função da popularização do conceito de alimentos funcionais e da sua associação a essa classe, os compostos fenólicos passaram a ter grande importância na alimentação.

A busca de novas fontes e o avanço nas hipóteses formuladas para os mecanismos de ação na prevenção de doenças, tem impulsionado as pesquisas na área.

3.5.2. Fatores que Afetam a Presença de Compostos Fenólicos na Uva e no Vinho

A síntese dos polifenóis tem início durante o desenvolvimento do grão da uva. Algumas antocianinas são sintetizadas nas primeiras etapas, mas a maior produção, nesta fase, é mesmo de outros fenóis flavonóides e não flavonóides (JACKSON, 1994). A síntese pronunciada de compostos fenólicos somente começa depois do “veraison”, mas o tempo específico da produção desses pigmentos característicos da uva e do vinho depende de diversos fatores. “Veraison” é o período do começo da maturação

da baga. As bagas tornam-se macias e adquirem a cor característica da sua variedade específica. Do começo do “Veraison” à colheita, as bagas aumentaram no volume, no peso e no índice de açúcar (MULLINS *et al.*, 2002).

A presença desses compostos em uvas e seus derivados está sendo muito estudada nos últimos anos. Os taninos situam-se no envelope externo das sementes e um pouco nas camadas internas. Encontram-se basicamente taninos oligoméricos, que são bastante agressivos e ásperos ao paladar, mas importantes durante a estabilização do vinho, pois participam das reações de condensação com as antocianinas (DAUDT, 1998).

O longo contato com a casca durante a vinificação, a temperatura, a presença das sementes e, às vezes, do engaço e de enzimas, são fatores que tem grande influência na extração dos fenólicos (catequinas e procianidinas) durante a fermentação do suco da uva (KOVAC *et al.*, 1992).

Fatores de importante influência são a vindima (período entre a colheita das uvas e o início da produção do vinho), o tempo de colheita da uva e o tempo de armazenagem do vinho na garrafa, pelas reações que ocorrem durante o processo de maturação do vinho. Essas reações de condensação que têm efeito em antocianinas, catequinas e procianidinas proporcionam uma longa vida de prateleira para os vinhos tintos, resultando numa diminuição destas substâncias em prol da formação de novos pigmentos poliméricos (ECHEVERRY *et al.*, 2005; NETZEL *et al.*, 2003; SAUCIER *et al.*, 1997).

Uma das técnicas que está sendo muito usada nas vinícolas é a substituição do barril de carvalho pelo uso dos chips (adição de lascas ou grânulos de madeira ao vinho - normalmente carvalho). Arapitsas *et al.* (2004) analisando vinhos que foram submetidos ao tratamento com os chips e com o envelhecimento do barril de carvalho, concluíram que para a maioria dos compostos fenólicos não houve diferença marcante entre os dois vinhos. Os autores também comentaram que alguns desses compostos, como o guaiacol, o ácido vanílico e o furfural poderiam ser usados para identificar qual foi a técnica usada no amadurecimento do vinho.

Em função da grande quantidade e da diversidade dos compostos fenólicos em uvas e vinhos, esses, mais recentemente, vem sendo usados como um parâmetro a mais na classificação de vinhos. A similaridade de alguns compostos e a diferença de outros servem como base de dados para a análise de variáveis e classificação dos vinhos (VILLERS *et al.*, 2005).

Os compostos fenólicos interagem entre si e com outras moléculas para formar novos compostos que são responsáveis pela estabilidade e maturação dos vinhos e são formados, principalmente, durante a estocagem e envelhecimento. Recentemente algumas pesquisas (ES-SAFI *et al.*, 2003; DUENAS *et al.*, 2006) objetivam elucidar essas moléculas e também relatam a importância da presença desses compostos na qualidade do vinho. Essas pesquisas sugerem que a seqüência de diversas reações enzimáticas e não enzimáticas, que ocorrem em derivados de frutas, podem alterar a coloração e a estabilidade durante a estocagem e o envelhecimento (SINGLETON *et al.*, 1987; ES-SAFI *et al.*, 2003).

Geralmente, as reações enzimáticas ocorrem durante as operações tecnológicas iniciais, como o esmagamento e as interações não enzimáticas nos últimos estágios do processamento, na estocagem e no envelhecimento (ES-SAFI *et al.*, 2003; SINGLETON *et al.*, 1987). Na etapa de envelhecimento de vinhos foi demonstrada a formação de novos pigmentos por copigmentação uma condensação direta entre aldeídos, antocianinas e flavonóis e pela influência de derivados de aldeídos (MONAGAS *et al.*, 2005; ALCALDE-EON *et al.*, 2006).

3.5.3. Compostos Fenólicos na Saúde

A grande procura da humanidade por meios que favoreçam uma vida saudável tem impulsionado as pesquisas por novas substâncias capazes de satisfazer tais necessidades. Entre estas substâncias encontram-se os polifenóis, destacando-se as pesquisas sobre os efeitos biológicos do resveratrol, que está presente em diversas plantas, em especial na uva e seus derivados (SAUTTER *et al.*, 2005).

Nas uvas, os compostos fenólicos constituem o terceiro grupo mais importante dentre os compostos orgânicos. Os compostos fenólicos são metabólitos secundários naturalmente presentes em uvas e extraídos durante os processos de vinificação. A importância dos compostos fenólicos em enologia está em sua participação na cor dos vinhos tintos, no sabor amargo e adstringente, intervenção nos fenômenos de turvamento, participação sobre o aroma, além de constituir o principal reservatório de substâncias auto-oxidáveis, formando o maior sistema de proteção dos vinhos contra fenômenos de oxidação (DAUDT e POLENTA, 1999).

A autoxidação em alimentos e nos sistemas biológicos tem diversas implicações não somente para a grande área da ciência e da tecnologia de alimentos, mas

também para o estado nutricional e para a saúde humana. Nos sistemas celulares, a peroxidação lipídica leva a produção de radicais livres. O sistema biológico é dotado de mecanismos de inativação desses radicais livres, pela ação de enzimas endógenas. Quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de radicais livres, seja pela queda de ação do sistema enzimático ou pelo excesso de produção de espécies radicalares, induz-se o estresse oxidativo. O estresse oxidativo está diretamente relacionado com diversos distúrbios do organismo como doenças coronárias, aterosclerose, câncer e processos de envelhecimento e de doenças degenerativas (MADHAVI *et al.*, 1996).

Antioxidantes naturais ou sintéticos são amplamente estudados e têm um papel importante na prevenção ou retarde das reações de autoxidação. Mais recentemente, as pesquisas estão direcionadas aos antioxidantes naturalmente presentes em alimentos, ou extratos desses. As bebidas alcoólicas têm sido associadas a esses efeitos benéficos pela possível ação dos compostos fenólicos e do álcool presente nesses produtos (FRANKEL *et al.*, 1993; FRANKEL *et al.*, 1995; NIGIDIKAR *et al.*, 1998; ESTRUCH, 2000; ORRALO *et al.*, 2002; WALLERATH *et al.*, 2005; PADILLA *et al.*, 2005).

Um dos mais notórios estudos que investigaram a relação dos benefícios do consumo moderado de vinho e a sua relação com as doenças cardiovasculares foi realizado por Reunaud e Lorgerill (1992), que correlacionaram os hábitos da população francesa, como o sedentarismo e o consumo de gordura saturada e colesterol, com a baixa incidência dessas doenças. O estudo revelou que possivelmente, esse paradoxo se devia ao consumo habitual de vinho tinto, que em comparação a outras bebidas alcoólicas é rico em compostos fenólicos (FRANKEL *et al.*, 1993; FRANKEL *et al.*, 1995; NIGIDAKAR *et al.*, 1998; ESTRUCH 2000; ORALLO *et al.*, 2002; WALLERATH *et al.*, 2005; PADILLA *et al.*, 2005).

Além disso, o consumo moderado de bebida alcoólica, especialmente o consumo de vinho tinto, está associado à diminuição da concentração de homocisteína, a qual reduz os riscos de problemas cardiovasculares, o que pode explicar o “Paradoxo Francês” (DIXON *et al.*, 2002).

Soleas *et al.* (1997), numa revisão apresentada em 1997, relataram experimentos *in vitro* e *in vivo*, que mostram que o resveratrol possui muitos atributos biológicos que favorecem a proteção contra a arteriosclerose incluindo atividade

antioxidante, inibição da agregação plaquetária, bem como a produção de eicosanóides através das plaquetas humanas.

Em vinhos tintos a quantidade de *cis e trans*-resveratrol encontrada varia de valores não detectados a valores próximos de 2mg/L, valores que concordam com os encontrados por Dominguez *et al.* (2001) e López *et al.* (2001).

Recentemente verificou-se que o resveratrol é um potente ativador da enzima SIRT-1 (Sirtuína 1), o principal ortólogo humano da SIR2, encontrada em leveduras. As sirtuínas são uma classe de histona-desacetilases dependentes de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD), cuja função celular principal é o controle da transcrição do DNA através do controle do grau de acetilação das histonas. Outros alvos das sirtuínas além das histonas foram identificados, e hoje estas enzimas estão implicadas na fisiopatologia de várias doenças degenerativas, como o câncer, processos inflamatórios, e o diabetes. Um dado bastante interessante é que a ativação das sirtuínas pelo resveratrol foi capaz de mimetizar os efeitos da restrição calórica em leveduras, aumentando a vida-média das células em até 70% (HOWITZ *et al.*, 2003). Desta forma, grande atenção tem sido dada ao desenvolvimento de substâncias ativadoras de sirtuínas, e várias moléculas com até 1000 vezes maior potência que o resveratrol foram identificadas. O elo entre a ativação das sirtuínas pelo resveratrol e o aumento da longevidade já foi inclusive demonstrado em mamíferos *in vivo* (BAUR *et al.*, 2006) e fornece uma nova luz à interpretação do paradoxo francês.

A literatura também chama a atenção de um item importante para a constatação da atividade benéfica à saúde dos compostos fenólicos. A maior parte das pesquisas desse gênero é realizada *in vitro* e com os compostos provenientes de plantas. No entanto, estudos têm mostrado que os compostos fenólicos são metabolizados *in vivo*, no trajeto do intestino delgado pela ação do fígado e da microflora presente, resultando em alterações na estrutura inicial. Dessa forma ainda não se sabe ao certo qual é a ação desses compostos no organismo (DONAVAN e WATERHOUSE, 2003).

Frankel e Meyer (1998) resumiram dados da atividade antioxidante de vinhos e sucos comerciais de uva, com relação aos mais diversos compostos fenólicos, dentre eles as antocianinas, os flavonóis, os flavanóis, os derivados hidroxibenzoatos e hidroxicinâmicos. Polifenóis como o resveratrol e a quercetina, bem como outros antioxidantes do vinho, possuem baixas propriedades antioxidantes quando comparadas com extrato de vinhos envelhecidos em barris de carvalho,

indicando que a interação entre os constituintes pode induzir os efeitos antioxidantes, e que estes não são, necessariamente, provenientes dos compostos isolados (TEDESCO *et al.*, 2000). O consumo moderado de vinho por um longo tempo induz efeitos protetores cardiovasculares provenientes, principalmente, da presença do trans-resveratrol na bebida. (ORALLO *et al.*, 2002).

Segundo Soobrattee e colaboradores (2005), a atividade antioxidante dos flavonóis na forma aglicona é relativamente alta, seguindo uma ordem decrescente para quercetina, a miricetina e o kaempferol. Segundo os autores, a atividade antioxidante dessa classe de compostos está relacionada com o número de grupos hidroxila, sendo que as moléculas com mais grupos hidroxila tem maior capacidade antioxidante.

Frankel *et al.* (1993) estudaram, *in vitro*, o efeito dos fenólicos do vinho na susceptibilidade do LDL (low density lipoprotein) à oxidação e concluíram que os compostos fenólicos extraídos do vinho inibem a oxidação dessas lipoproteínas. Frankel *et al.* (1995) determinaram, *in vitro*, a atividade antioxidante de 20 vinhos comerciais da Flórida na inibição da oxidação do LDL. A inibição relativa foi de 37 a 65% em vinhos tintos e 3 a 7% em vinhos brancos, concluindo que a proteção à oxidação do LDL estaria atribuída a um grande número de fenóis constituintes do vinho. Teissedre e Landrault (2000) sugeriram que a inibição da oxidação do LDL estaria associada à presença de compostos fenólicos presentes no vinho, particularmente a catequina, a malvidina, a procianidina B1 e a quercetina.

O aumento nos teores de lipoproteínas de alta densidade (HDL), inibição da agregação de plaquetas, aumento na fibrinólise, são alguns mecanismos bioquímicos conhecidos que podem ser favorecidos com o consumo de vinhos tintos, e que estão associados a prevenção ou atenuação do desenvolvimento da aterosclerose (GOLDBERG *et al.*, 1998).

O extrato de vinho respondeu positivamente a ação antioxidante quando testado o seu efeito sobre as espécies reativas ao oxigênio. No entanto, a resposta encontrada quando o resveratrol e a quercetina foram testados de forma isolada, em concentrações similares as presentes no vinho, não foi a mesma. O maior efeito protetor do extrato é atribuído aos outros compostos fenólicos presentes no vinho, e que atuam como responsáveis pela proteção dos danos oxidativos (TEDESCO *et al.*, 2000).

Alguns estudos defendem a hipótese de que a ação benéfica das bebidas alcoólicas sobre os fatores de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares é de responsabilidade do álcool. Ou seja, a presença de compostos fenólicos não tem uma importância primária na diminuição dos fatores de risco (HANSEN *et al.*, 2005). O efeito benéfico na inibição da oxidação do LDL pode vir também do álcool que exerce proteção aumentando os níveis séricos do colesterol HDL, das apolipoproteínas A-I, A-II, LpA-I (ESTRUCH, 2000).

Outros pesquisadores defendem que o efeito benéfico do consumo regular de vinho está baseado no efeito somatório da ação dos compostos fenólicos e do etanol sobre o sistema cardiovascular, aterosclerose e oxidação do LDL (ESTRUCH, 2000; FRANKEL *et al.*, 1993; FRANKEL *et al.*, 1995; NIGIDAKAR *et al.*, 1998; ORALLO *et al.*, 2002; WALLERATH *et al.*, 2005; PADILLA *et al.*, 2005).

Estruch (2000) relatou o estudo realizado pela European Commission chamado “Wine and Cardiovascular disease” que mostrou o efeito positivo do consumo moderado de vinho. O autor cita e discute, como possíveis mecanismos de ação benéfica, o aumento dos níveis séricos de colesterol HDL e de apolipoproteínas, a atuação no sistema de coagulação, no enfarto do miocárdio, a ação antioxidante e a regulação do fluxo sanguíneo diminuindo os problemas com a aterosclerose.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais e Solventes

4.1.1. Determinação do Teor de Fenólicos Totais

- Reagente de Folin-Ciocalteu, Fluka, Cod. 47641;
- Ácido gálico, Sigma-Aldrich, Cod. 27645;
- Etanol 95% P.A., Quimex (BRASIL).

4.1.2. Quantificação de Antocianinas

- Cloreto de potássio, Merck, Cod. TA822436;
- Ácido clorídrico concentrado, Merck;
- Acetato de sódio, Merck, Cod. TA944368;
- Água destilada.

4.1.3. Atividade Seqüestradora do Radical DPPH.

- DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila), Sigma, Cod. D9132-1G;
- Ácido ascórbico, Sigma-Aldrich, Cod. A4403;
- Etanol 95% P.A., Quimex, (BRASIL).

4.1.4. Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (CAET)

- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), Sigma-Aldrich, Cod. 238813-1G;
- ABTS (ácido 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico]), Sigma, Cod. A1888-1G;
- Persulfato de potássio, Sigma – Aldrich, Cod. 216224;
- Etanol 95% P.A., Quimex (BRASIL).

4.1.5. Determinação da Concentração de *Cis*, *Trans*-Resveratrol e Quercetina em Vinhos Tintos do Rio Grande do Sul

- Descrição dos módulos do cromatógrafo:
 - Bombas de solvente modelo SCL-10Avp (Shimadzu)
 - Degaseificador DGU-14^a (Shimadzu)
 - Válvula misturadora de solventes (Shimadzu)
 - Detector com arranjo de diodos modelo SPD-M10Avp (Shimadzu)
- Coluna cromatográfica C8 de 15 cm X 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 5,0 µm de diâmetro;
- Pré-coluna C8 de 1,0 cm X 4,0 mm de diâmetro interno;
- Injetor manual, com loop de 100 µL;
- MeCN;
- Solução aquosa de ácido fórmico 0,1 % (25:75, v/v).

4.1.6. Análise do Perfil Cromatográfico

- Descrição dos módulos do cromatógrafo
 - Bombas de solvente modelo SCL-10Avp (Shimadzu)
 - Degaseificador DGU-14^a (Shimadzu)
 - Válvula misturadora de solventes (Shimadzu)
 - Detector com arranjo de diodos modelo SPD-M10Avp (Shimadzu)
- Coluna cromatográfica de fase reversa (25 cm x 4,6 mm x 5 µm, Supelco, Bellefonte, USA)
- Pré-coluna C18 Sulpelco[®] 4,0 mm.
- Acetonitrila / J.T.Baker[®], grau HPLC/Espectro UV-visível.
- Ácido fórmico Merck[®] (Alemanha)
- Água destilada obtida através de um sistema de purificação de água MilliQ Academic (Millipore, Billerica, USA).
- Cartuchos com membrana Millipore[®] com poros de 0,45 µm de diâmetro (SUPELCO, USA).
- Liofilizador Terroni Equipamentos LTDA. – Modelo LS 3000.

4.2.Amostras

Algumas amostras dos vinhos tintos foram adquiridas em supermercados da cidade de João Pessoa – PB e outras foram doadas pela vinícola Salton .

Foram analisados 08 (oito) vinhos tintos monovarietais de vinícolas da região Sul do Brasil e um vinho importado (Francês), sendo analisada uma amostra de cada vinho. Cada amostra foi analisada em triplicata.

Os vinhos analisados foram provenientes de 4 (quatro) vinícolas (representadas pelas siglas SC, MJ, CS e AL). Para efeito de estudo, foram utilizadas as seguintes siglas: SCME (variedade Merlot-2005), SCCS (variedade Cabernet Sauvignon-2004), SCTA (variedade Tannat-2005), SVME (variedade Merlot-2004), ALME (variedade Merlot-2005), MJCS (variedade Cabernet Sauvignon-2005), CSCS (variedade Cabernet Sauvignon-2006), MJTA (variedade Tannat-2006) e CSME – Frnacês (variedade Merlot).

4.3.Preparação das Amostras

Foram utilizadas alíquotas dos vinhos inteiros para a determinação do teor de fenólicos totais, quantificação de antocianinas monoméricas, testes antioxidantes com radical DPPH e ABTS e análise do perfil cromatográfico.

Para cada vinho analisado foram obtidas três frações distintas, perfazendo um total de vinte e sete frações, mais o vinho inteiro. Estas frações foram utilizadas na determinação do teor de fenólicos totais, na quantificação de antocianinas monoméricas e nos testes antioxidantes.

O fracionamento dos vinhos foi realizado com diferentes solventes, em diferentes pHs, segundo metodologia proposta por Ghiselli *et al.* (1998).

Inicialmente uma alíquota de 100 mL de cada vinho foi acidificada com ácido acético até pH 2.0. Então foi feita a extração com 100 mL de Acetato de Etila (3 vezes) em funil de separação de 1000 mL. A fase aquosa foi evaporada em evaporador rotatório sob pressão reduzida a 50°C com auxílio de etanol P.A, obtendo-se o Extrato Aquoso (Fração 1). A fase orgânica foi evaporada em evaporador rotatório e posteriormente redissolvida em 100 ml de água destilada obtida através de um sistema de purificação de água MilliQ Academic (Millipore, Billerica, USA). O pH foi ajustado para 7.0 com hidróxido de amônio e então foi realizada extração com 100 mL de

Acetato de Etila (3 vezes). A fase orgânica desta extração foi evaporada para obter a fração AcOEt pH 7.0 (Fração 2) e a fase aquosa teve o pH ajustado para 2.0 com ácido acético e extraída com 100 mL de Acetato de Etila (3 vezes). A fase orgânica desta última extração foi então evaporada da mesma forma que a anterior para obter a fração AcOEt pH 2.0 (Fração 3) e a fase aquosa foi descartada.

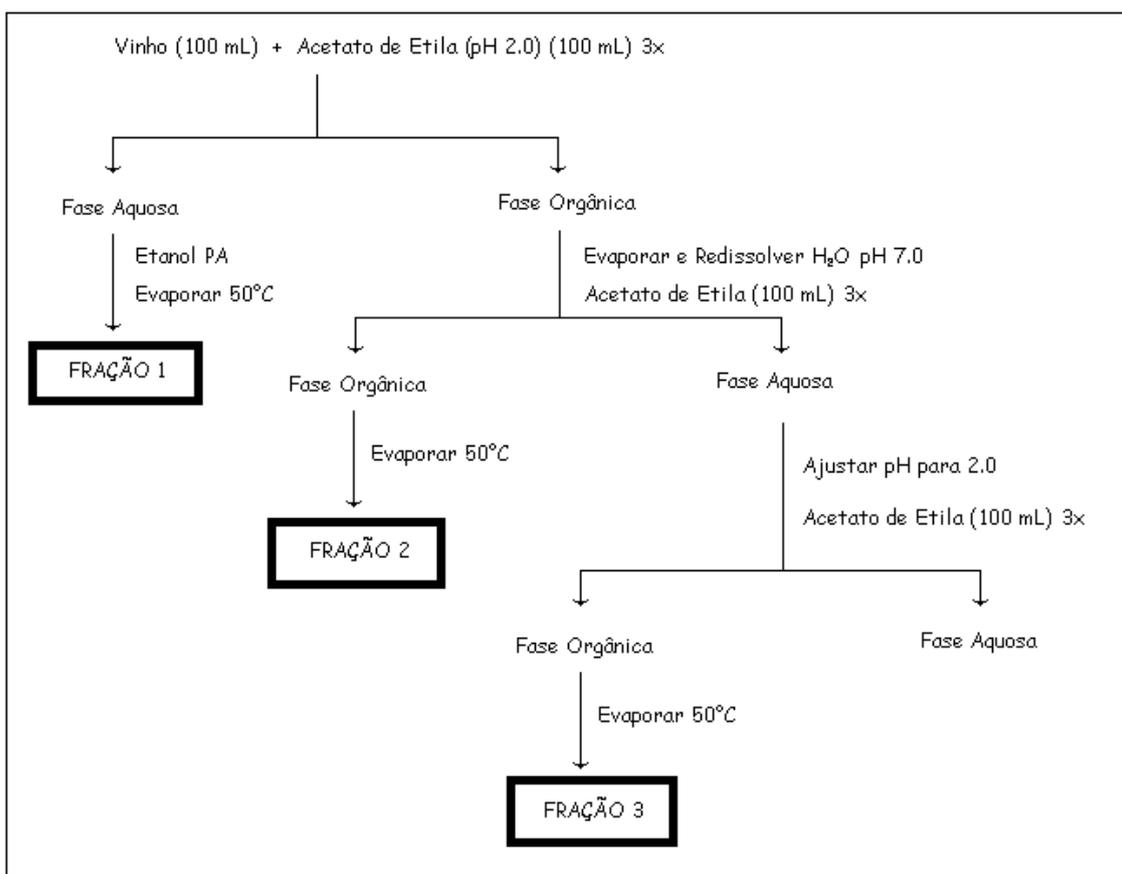


Figura 4 – Fluxograma do Fracionamento dos Vinhos Tintos Analisados.

Segundo Ghiselli *et al.* (1998), a fração 1 (Fase Aquosa) concentra as Antocianinas; a fração 2 (Fase orgânica pH 7.0) concentra as Procianidinas, Catequinas, Epicatequinas, Glicosídeos de quercetina e flavonóis; e a fração 3 (Fase orgânica pH 2.0) concentra os ácidos fenólicos e os glicuronídeos de quercetina.

4.4. Análise do Teor de Fenólicos dos Vinhos Tintos do Rio Grande do Sul e de suas Frações

O teor de fenólicos totais foi analisado para os vinhos inteiros e seus extratos Aquoso, AcOEt pH 7.0 e AcOEt pH 2.0. Tal determinação foi feita pelo método de

Folin-Ciocalteu (GULCIN *et al.*, 2004) que figura entre os mais extensivamente utilizados para tal análise (NACZAK e SHAHIDI, 2004; BONOLI *et al.*, 2004). O reagente consiste de uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6+. Porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (IKAWA *et al.*, 2003).

Inicialmente, uma alíquota de 250 μL de cada solução dos extratos Aquoso, AcOEt pH 7,0 e AcOEt pH 2,0 (1000 $\mu\text{g/mL}$) solubilizada em EtOH e uma alíquota de 10 μL de cada vinho foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL, adicionando-se 100 μL do reagente de Folin-Ciocalteu e 3 mL de água destilada, agitando-se por 1 min. Em seguida, 300 μL de Na_2CO_3 (15%) foram acrescentados à mistura e agitados por 30 segundos. Finalmente a solução teve seu volume aferido para 5 mL com água destilada. Após duas horas, a absorbância das amostras foi medida a 760 nm utilizando-se cubetas de vidro. As análises foram realizadas em triplicata e o teor de Fenólicos Totais (FT) foi determinado pela equação da regressão linear a partir da curva de calibração construída com soluções padrão de ácido gálico (0,5 a 50 $\mu\text{g/mL}$) e expressos como miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mgEAG/g), para as frações; e, para as amostras de vinhos, em miligramas de equivalentes de ácido gálico por litro de vinho (mg EAG/L) e em milimolar de Equivalentes de Ácido Gálico (mM EAG), considerando-se o Erro Padrão da Média (E.P.M.). A equação da curva de calibração do ácido gálico foi: $A=0,0818C +0,1664$, com o coeficiente de correlação de $r^2 = 0,9986$, onde C é a concentração do ácido gálico e A é a absorbância a 760 nm.

4.5. Quantificação de Antocianinas Monoméricas (AM)

Neste trabalho foi realizada a determinação de Antocianinas Monoméricas tanto para as amostras de vinhos inteiros quanto para as frações de todos os vinhos analisados. Esta determinação foi realizada pelo método do pH diferencial (WROLSTAD, 1976). As antocianinas sofrem transformações estruturais reversíveis com mudanças de pH. Essas mudanças são evidenciadas através das diferenças nos valores de absorbância no espectrofotômetro. A forma do oxônio colorido predomina

em pH 1.0 e o hemiacetal descolorido predomina em pH 4.5. Este método é baseado nesta reação abaixo e permite medidas rápidas e precisas das antocianinas totais.

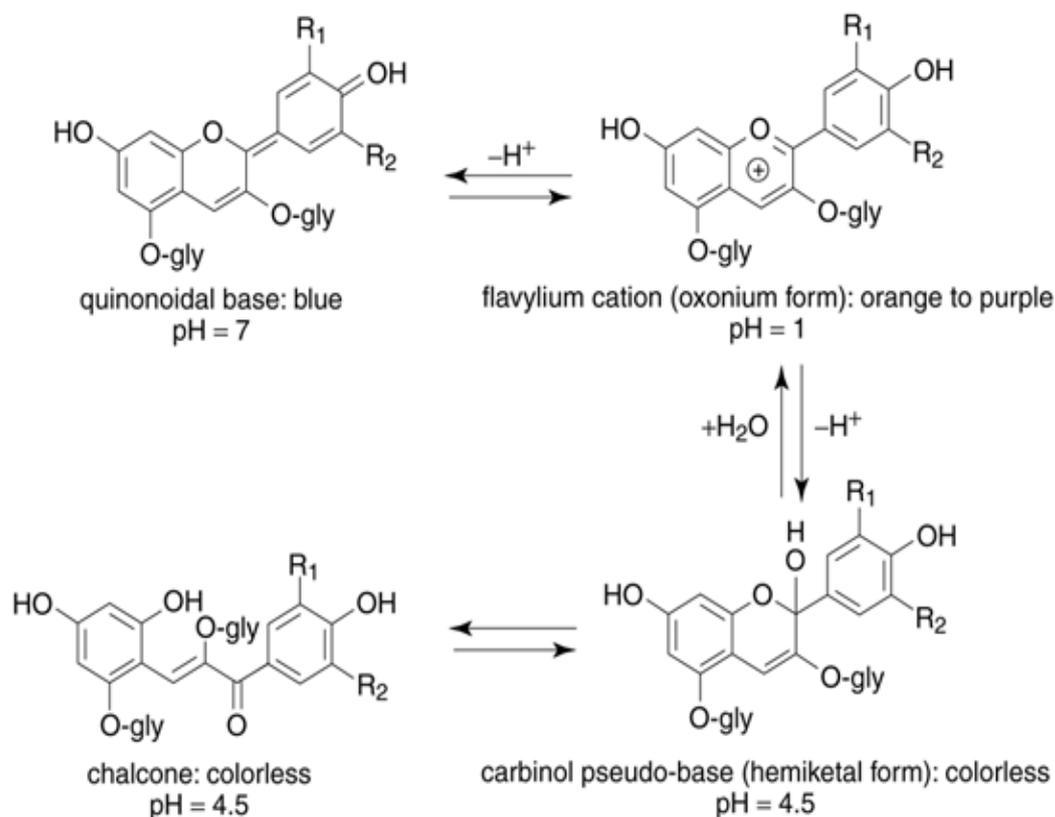


Figura 5 -Estruturas da Forma do Oxônio (Colorido) e da Forma do Hemiacetal (Descolorido).

Inicialmente foi determinado o fator de diluição das amostras, através da diluição com tampão cloreto de potássio, pH 1.0, até a absorbância da amostra no $\lambda_{vis-max}$ (510 nm) estar na faixa de linearidade do espectrofotômetro (para a maioria dos espectrofotômetros a absorbância deve ser menor que 1.2). Dividindo o volume final da amostra pelo volume inicial se obtém o fator de diluição (DF).

Para não exceder a capacidade do tampão a amostra não deve ser mais que 20% do volume total.

O aparelho foi zerado com água destilada em todos os comprimentos de onda que seriam utilizados (510 e 700 nm).

Foram preparadas duas diluições da amostra, uma com o tampão cloreto de potássio 0,025M, pH 1.0 (ajustado com ácido clorídrico concentrado), e outra com o tampão acetato de sódio, 0,4M, pH 4.5 (também ajustado com ácido clorídrico concentrado), diluindo cada uma pelo fator de diluição previamente determinado.

Deixou-se que essas diluições equilibrassem por 15 minutos.

A absorbância de cada diluição foi medida em 510 e 700 nm, contra um branco de água destilada.

As absorbâncias das diluições foram calculadas através da seguinte equação:

$$A = (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

A concentração de antocianinas monoméricas na amostra original foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg/litro)} = (A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

Onde: PM é o peso molecular referente a cianidina-3-glicosídeo = 449,2 g/mol, FD é o fator de diluição, e ϵ é a coeficiente de absorvidade molar = 26900 L.cm⁻¹ mol⁻¹

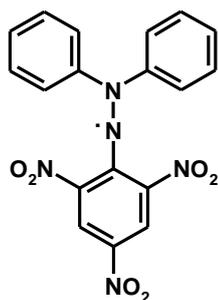
4.6. Análise da Atividade Antioxidante

4.6.1. Avaliação da Atividade Seqüestradora do Radical DPPH· dos Vinhos Tintos do Rio Grande do Sul e de suas Frações

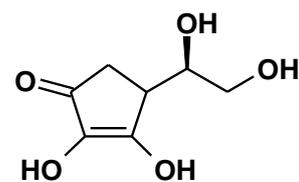
O teste foi realizado seguindo a metodologia descrita por Silva *et al.* (2006). As soluções estoque dos extratos foram preparadas a 1,0 mg/mL. Quantidades apropriadas (obtidas através da triagem preliminar) destes extratos foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL da solução de DPPH· (23,6 µg/mL em EtOH) fornecendo concentrações finais que variaram de 2 a 96 µg/mL. Cada concentração foi testada em triplicata. Após 30 minutos de agitação em aparelho de ultra-som, a quantidade de radicais DPPH· foi registrada em espectrofotômetro UV-Visível em comprimento de onda de 517 nm. A percentagem da atividade seqüestradora (% AS) foi calculada pela equação:

$$\% \text{ AS} = 100 \times (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}$$

onde A_{controle} é a absorbância do controle, uma solução que contém apenas o radical DPPH· e EtOH, e A_{amostra} é a absorbância do radical na presença dos extratos ou do padrão ácido ascórbico.



1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH·)



Ácido ascórbico

Figura 6 -Estruturas do Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH)·e do Ácido Ascórbico.

A eficiência anti-radicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95 % ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 4.0. Os resultados foram expressos através da $CE_{50} \pm E.P.M.$, que representa a concentração da amostra (em $\mu\text{g/mL}$) necessária para obter metade da atividade sequestradora máxima. Os extratos são considerados ativos quando apresentam $CE_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$ (CAMPOS *et al.*, 2003). Como controle positivo foi utilizado o ácido ascórbico.

4.6.2. Avaliação da Atividade Sequestradora do Radical $ABTS^{+\cdot}$ dos Vinhos Tintos do Rio Grande do Sul e de suas Frações

A determinação da CAET (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox) e CE_{50} dos extratos Aquoso, AcOEt pH 7.0 e AcOEt pH 2.0 dos vinhos tintos do Rio Grande do Sul, foi realizada pelo ensaio da CAET descrito por Re *et al.* (1999), utilizando o Trolox (ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) como composto padrão, um análogo da vitamina E solúvel em água.

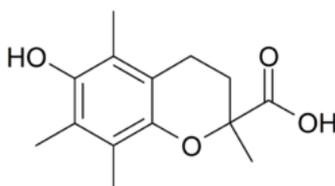


Figura 7 - Estrutura do Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico).

O cátion radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ foi preparado pela mistura de uma solução de ABTS com uma solução de persulfato de potássio em água ultra-pura (Figura7), a fim de obter concentrações finais de 7 mM e 2,45 mM, respectivamente. A solução foi mantida no escuro e à temperatura ambiente durante um período de 12-16 h antes do uso. Então a solução $\text{ABTS}^{+\cdot}$ foi diluída com etanol (1:90 v/v, aproximadamente) até uma absorbância (A) de $0,7 \pm 0,02$ no comprimento de onda de 734 nm, em UV-Visível, 30°C. As soluções estoque dos extratos Aquoso, AcOEt pH 7.0 e AcOEt pH 2.0 foram preparadas em EtOH, obtendo-se concentração de 1,0 mg/mL. Quantidades apropriadas (obtidas através da triagem preliminar) destes extratos ou do padrão Trolox (concentrações finais de 0 a 15 μM) foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL da solução de $\text{ABTS}^{+\cdot}$, fornecendo concentrações finais que variaram de 1 a 120 $\mu\text{g/mL}$. As soluções foram agitadas e, após 10 minutos, a absorbância das amostras e do padrão foram medidas a 734 nm, utilizando-se cubetas de vidro.

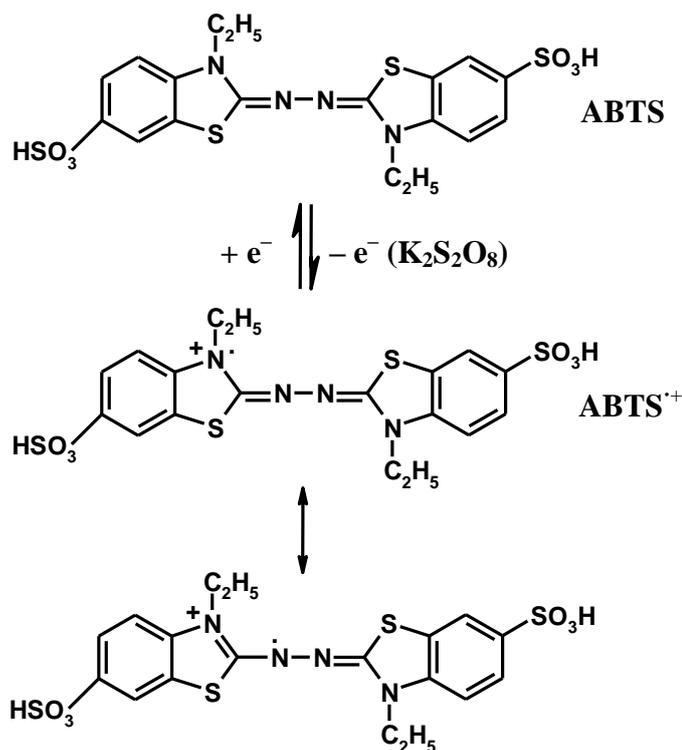


Figura 8 - Formação do Cátion Radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ a Partir do ABTS e $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$.

As análises foram realizadas em triplicata e a percentagem de inibição (% I) em relação ao branco foi calculada pela equação:

$$\% I = 100 \times (A_{\text{branco}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{branco}}$$

A eficiência da inibição do $\text{ABTS}^{+\cdot}$ foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95 % ($p < 0,05$) obtido pelo programa de estatística GraphPad Prism 4.0. Os resultados foram expressos através da $\text{CE}_{50} \pm \text{E.P.M.}$ (PAYET *et al.*, 2006), que representa a concentração da amostra necessária para obter metade da inibição máxima do cátion radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$. Os resultados também foram expressos em valores de CAET (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox), ou seja a quantidade (em μmol) de equivalente de Trolox (ET) por grama de extrato ($\mu\text{mol ET/g}$) $\pm \text{E.P.M.}$ (JAVANMARDI *et al.*, 2003; ZHAO *et al.*, 2006), considerando a curva de calibração do Trolox: $A = 4,6342C - 0,3521$, e coeficiente de correlação de $r^2 = 0,999$, onde C é a concentração do Trolox e A é a absorbância a 734 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, utilizando cinco concentrações.

4.7. Quantificação das Concentrações de *cis*, *trans*-Resveratrol e Quercetina nos Vinhos Tintos do Rio Grande do Sul

Um método de quantificação foi validado utilizando-se os padrões resveratrol (isômeros *cis* e *trans*) e quercetina usando concentrações dos três padrões que variaram de 0,1 a 13 $\mu\text{g/mL}$, tomando-se como base para avaliação do método a resolução n^0 899 da ANVISA. O método utilizou um aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV-Visível (CLAE-UV-Vis), com coluna cromatográfica C8 de 15 cm X 4,6 mm de diâmetro interno e partículas de 5,0 μm de diâmetro e pré-coluna C8 de 1,0 cm X 4,0 mm de diâmetro interno. A amostra foi introduzida através de um injetor manual, com loop de 100 μL . A fase móvel utilizada foi uma mistura de MeCN:solução aquosa de ácido fórmico 0,1 % (25:75, v/v) sob um fluxo de 2,0 mL/minuto.

4.8. Determinação do Perfil Cromatográfico dos Vinhos Tintos do Rio Grande do Sul

A comparação do perfil cromatográfico dos vinhos é uma forma de se adquirir dados inerentes aos constituintes químicos presente em cada vinho, e que podem permitir um agrupamento dos vinhos através de análise multivariada, imprimindo dessa forma um perfil de metabólitos que são marcantes para cada região vitivinicultora.

As amostras dos vinhos foram preparadas como segue: Uma alíquota de 4,0 mL de cada vinho foi transferida para um vial e submetidas ao congelamento a -20°C por 8 h. Em seguida as amostras foram liofilizadas em aparelho de liofilização da marca Terroni Equipamentos LTDA, modelo LS 3000. O produto liofilizado foi resuspenso em 1,5 mL de água deionizada. As amostras foram filtradas sob membrana Millipore de $0,45\ \mu\text{m}$ de diâmetro de poro. Para determinação do perfil cromatográfico, foram injetados, de cada amostra, $20\ \mu\text{L}$ de cada.

A análise do perfil cromatográfico foi permitida a partir do desenvolvimento de um método cromatográfico, utilizando um aparelho da marca Shimadzu[®], composto pelos seguintes módulos: Controlador de Sistema (SCL 10Avp), detector com arranjo de diodos (SPD-M10Avp), com faixa de análise entre 190 a 500 nm, duas bombas (LC-6AD) e coluna cromatográfica C-8 de 4,6 mm diâmetro interno (DI) x 25 cm, $5,0\ \mu\text{m}$ de diâmetro de partícula e $100\ \text{Å}$ de diâmetro de poro da marca Shimadzu[®] (Shim-pack) e pré-coluna Shimadzu[®] (Shim-pack) C8 de 4,0 mm de DI x 1,0 cm, $5,0\ \mu\text{m}$ de diâmetro de partícula. O método de separação dos analítos constituiu de eluição em modo gradiente, o qual inicialmente começou com 1,0 % do eluente orgânico B (acetonitrila / J.T.Baker[®]) e 99 % de eluente aquoso A (ácido fórmico 0,1 % / Vetec[®]), após 50 minutos a concentração de B passou para 25 %, passados mais 45 minutos a concentração de B chegou a 80 %, permanecendo nessa concentração por 5 minutos, finalizando a corrida em 100 minutos.

A área relativa de cada pico obtido nos cromatogramas foi submetida à análise multivariada (Análise de Componentes Principais - ACP e Análise Hierárquica de *Clusters* - AHC) através do Software “*Statistica*” versão 6.0 (*Statsoft Inc.*), maiores detalhes sobre ACP e AHC, ver LUCENA,2008.

4.9. Análise Estatística

A significância estatística entre médias foi realizada através de teste *t* de student não pareado. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$). Os testes *t* foram realizados utilizando-se o software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Inc.). Com relação à análise multivariada, foram realizadas análise de componentes principais e análise hierárquica de agrupamentos. A variável utilizada foi a área relativa de cada pico nos cromatogramas. Para a análise hierárquica de agrupamentos, utilizou-se a distância

euclidiana como medida de agrupamento. A análise multivariada foi implementada com o uso do software Statistica 6.0 (Statsoft Inc.).

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Análise dos Componentes Fenólicos dos Vinhos Tintos do Rio Grande do Sul e de suas Frações

O teor de fenólicos totais para vinhos inteiros variou de 1702 a 3338 mg EAG/L (equivalentes de ácido gálico por litro). Observa-se que as amostras de vinhos mais ricas em fenólicos totais são os vinhos com siglas SCME (Nacional) e CSME (Francês) com 3338 e 3307 mg EAG/L respectivamente, sendo ambos da variedade Merlot. O gráfico 1 mostra os resultados dos teores de Fenólicos Totais nos vinhos inteiros analisados, expressos em miligramas de Equivalentes de Ácido Gálico por litro de vinho (mgEAG/L).

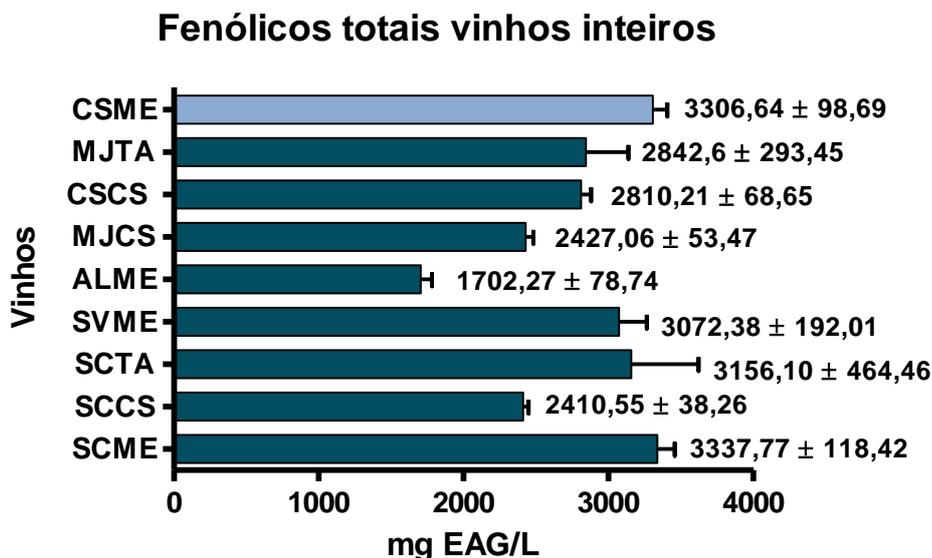


Gráfico 1 – Teores de fenólicos totais em Vinhos Tintos do Rio Grande do Sul e de um vinho Francês(CSME).Obs: SCME (Merlot-2005), SCCS (Cabernet Sauvignon-2004), SCTA (Tannat-2005), SVME (Merlot-2004), ALMeE(Merlot-2005), MJCS (Cabernet Sauvignon-2005), CSCS (Cabernet Sauvignon-2006, MJTA(Tannat-2006) e CSME (Merlot)

Freitas (2006), estudando a composição química de vinhos tintos em diferentes regiões do Rio Grande do sul, encontrou valores de Fenólicos Totais que variaram entre 1141,8 a 2574,3 mg/L, nas variedades Cabernet Sauvignon e Tannat respectivamente.

Blasi (2004), analisando os constituintes químicos de vinhos tintos secos produzidos na Quarta Colônia de imigração italiana do Rio Grande do Sul, encontrou valores de Polifenóis totais que variaram entre 1117,9 a 3227,82 mg EAG/L, resultado similar ao encontrado neste trabalho.

Paixão *et al.* (2007) também determinaram o teor de fenólicos totais pelo método de Folin–Ciocalteu em cinco variedades de vinhos tintos portugueses e encontraram resultados que variavam de 1724 a 1936 mgEAG/L.

Lopez-Velez (2003), relatou que encontrou um total de fenóis com quantidades que variaram de 1800 a 2300 mg EAG/L.

Uma análise estatística (teste *t* de student não-pareado) para verificar se os vinhos estudados da variedade Merlot do Rio Grande do Sul, diferiam significativamente do vinho da variedade Merlot Francês testado, mostrou que apenas a amostra ALME (Merlot, 2005) diferiu do vinho francês com relação ao teor de fenólicos totais ($p=0,0002$).

Em um estudo realizado por Landrault *et al.* (2001), trinta e quatro amostras de vinhos tintos franceses de diversas variedades de uvas tiveram o teor de fenólicos totais testado utilizando metodologia de Folin-Ciocalteu. O teor de fenólicos totais variou de 1,018 a 3,545gEAG/L (grama de Equivalente em Ácido Gálico por Litro). O valor obtido neste trabalho para vinho tinto Francês da variedade Merlot (3,4 g EAG/L) encontra-se na faixa dos valores reportados por Landrault (2001).

Fernández-Pachón (2004) estudando a relação entre atividade antioxidante e a composição fenólica de diferentes tipos de vinhos, relatou uma concentração de fenólicos totais em vinhos tintos que variou de 1289 a 2389 mg EAG/L.

Lucena (2008), encontrou teores de Fenólicos Totais para vinhos tintos do Vale do São Francisco que variaram entre 3211 a 5889 mg EAG/L, valores bem superiores aos apresentados no presente trabalho. Uma possível explicação para esse fato é uma maior incidência solar na Região do Vale do São Francisco durante praticamente todo o ano, fator este já demonstrado estar relacionado a um aumento no teor de polifenóis (SPAYD *et al.*, 2002). Neste sentido, há estudos mostrando que o teor de polifenóis em uvas expostas ao sol pode, em alguns casos, ser até 10 vezes maior do que o encontrado em uvas cultivadas na sombra (SPAYD *et al.*, 2002).

O gráfico 2, abaixo apresenta teores de fenólicos totais para os vinhos do Rio Grande do Sul (cinza) e vinhos do Vale do São Francisco (bege), expressos em mgEAG/L.

F.T. VRGS x VVSF

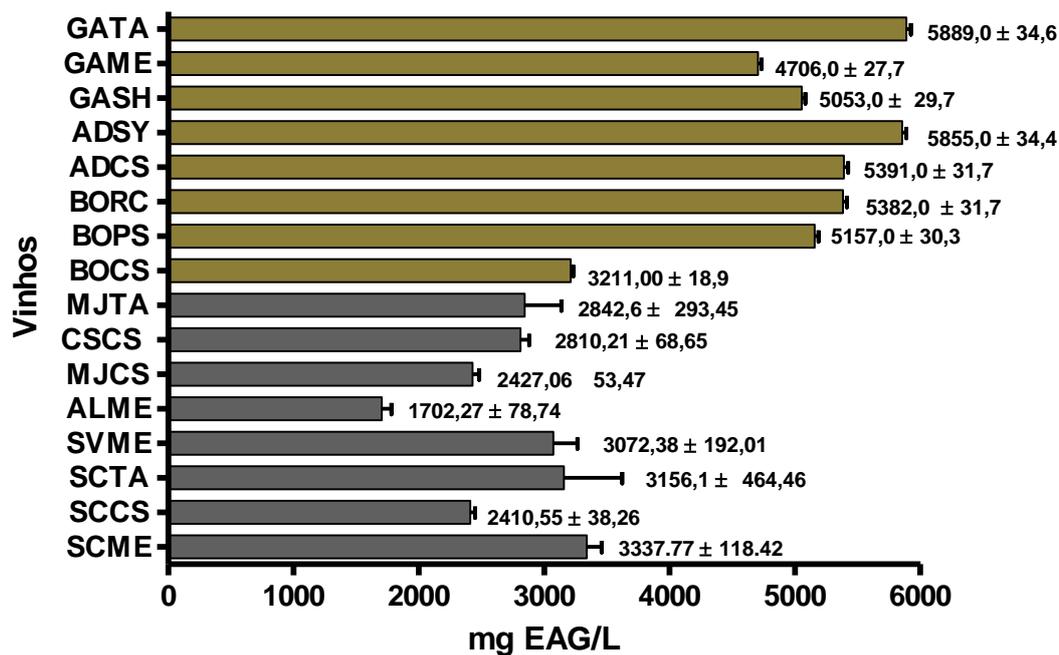


Gráfico 2-Teores de fenólicos totais de Vinhos Tintos do Rio Grande do Sul(cinza) e de Vinhos Tintos do Vale do São Francisco(LUCENA,2008).

Obs: SCME (Merlot-2005), SCCS (Cabernet Sauvignon-2004), SCTA (Tannat-2005), SVME (Merlot-2004), ALMeE(Merlot-2005), MJCS (Cabernet Sauvignon-2005), CSCS (Cabernet Sauvignon-2006, MJTA(Tannat-2006) e CSME (Merlot), BOCS (Cabernet Sauvignon-2006), BOPS (Shiraz-2005), BORC (Ruby Cabernet-2006), ADCS (Cabernet Sauvignon-2005), ADSY (Shiraz-2005), GASH (Shiraz-2003), GAME (Merlot-2003) e GATA (Tannat-2002).

Em seguida apresentamos um gráfico tipo Box Plot (gráfico 3), que compara dispersão de diferentes conjuntos de dados e foi feito um “teste t” de Student entre as amostras dos vinhos tintos do Rio Grande do Sul e Vale do São Francisco (LUCENA,2008).

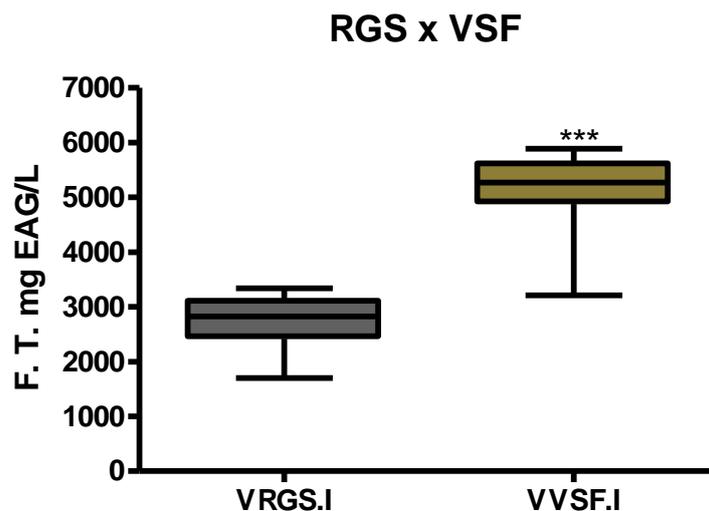


Gráfico 3 – Concentração de Fenólicos totais de vinhos do Rio Grande do Sul X Vinhos Vale do São Francisco. *** $p < 0,0001$.

Freitas (2006), avaliando a variação dos compostos fenólicos e de cor dos vinhos de uvas tintas (*Vitis Vinifera*) em diferentes ambientes, observou que um ambiente com condições meteorológicas que apresentaram precipitação pluvial mais elevada e pouca insolação durante o período de maturação das uvas, dificultou o desenvolvimento fisiológico das mesmas, obtendo assim um resultado inferior com relação a concentração de flavonóides antociânicos, flavonóides não-antociânicos, flavonóides totais, polifenóis polimerizados, polifenóis totais, antocianinas livres e antocianinas totais, que em um ambiente com menor precipitação pluvial, maior insolação e menor umidade relativa do ar, além de temperaturas na faixa de 22°C a 26°C, consideradas amenas, constituindo condições meteorológicas favoráveis que possibilitam à uva melhores condições de maturação, principalmente a fenólica, mais completa, beneficiando a qualidade dos vinhos.

O teor de fenólicos totais das frações dos vinhos estudados variou de N.D.(Não Detectado) a $1558,19 \pm 98,43$ mg EAG/g de extrato.

A amostra ALME F2 (Fração 2) da variedade Merlot, foi a mais concentrada em Fenólicos Totais com $1558,19 \pm 98,43$ mg EAG/G de extrato.

O gráfico 4 apresenta os teores de Fenólicos Totais das frações expressos em mg EAG/g de extrato.

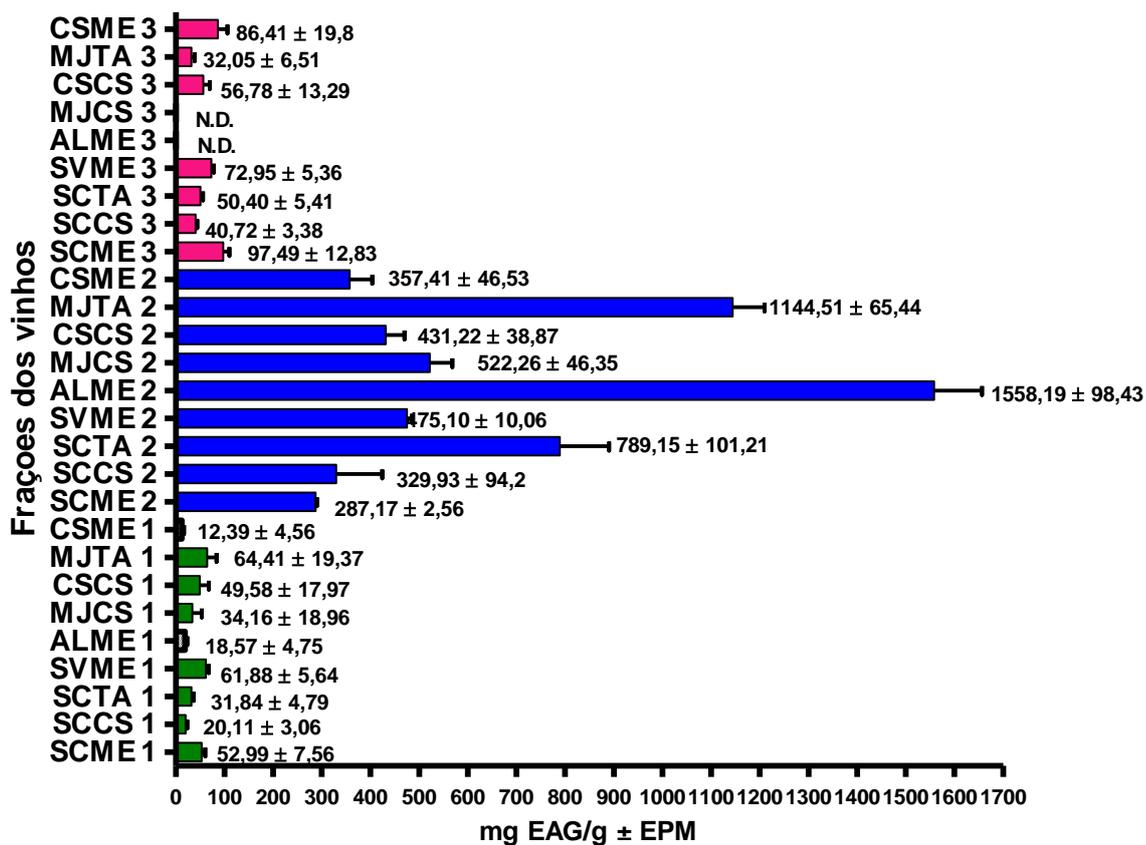


Gráfico 4 – Teores de Fenólicos Totais de frações dos vinhos tintos do Rio Grande do Sul em mg EAG/g. *ND: Não Detectado.

Obs: SCME (Merlot-2005), SCCS (Cabernet Sauvignon-2004), SCTA (Tannat-2005), SVME (Merlot-2004), ALMeE (Merlot-2005), MJCS (Cabernet Sauvignon-2005), CSCS (Cabernet Sauvignon-2006), MJTA (Tannat-2006) e CSME (Merlot),

Analisando o gráfico, pode-se concluir que não houve diferença significativa entre as frações 1 e 3, mas essas duas frações diferiram estatisticamente da fração 2. Para confirmar esse resultado foi feito um teste *t* de student, e um gráfico tipo “Box Plot” apresentados a seguir:

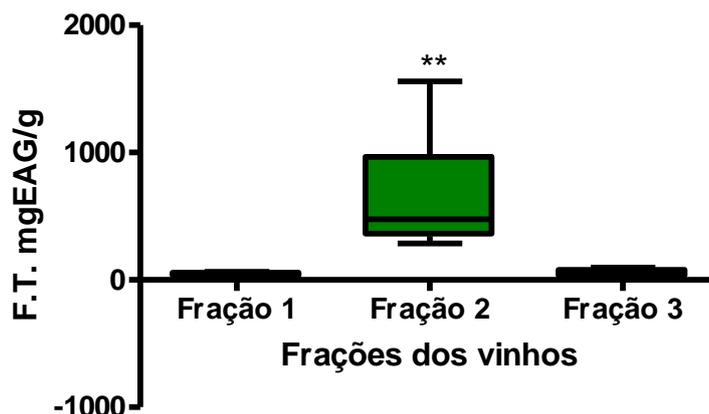


Gráfico 5 – Comparação de Teor de Fenólicos Totais entre frações dos vinhos do Rio Grande do Sul. $^{***}p < 0,001$

Percebe-se pelo gráfico 5, a grande diferença entre a Fração 2 (AcOEt pH 7.0) das demais frações. O teste *t* de student feito entre a fração 1 (Aquosa) e a fração 2 (AcOEt pH 7.0) resultou em médias: F1 = $38,44 \pm 6,49$ e F2: $655,0 \pm 144,5$ mgEAG/g com $p=0,0006$, para fração 1 (Aquosa) e a fração 3 (AcOEt pH 2.0), obteve-se médias: F1 = $38,44 \pm 6,49$ e F3 = $48,53 \pm 11,51$ mgEAG/g, com $p=0,4560$ e para fração 2 (AcOEt pH 7.0) e fração 3 (AcOEt pH 2.0) as médias foram F2: $655,0 \pm 144,5$ e F3 = $48,53 \pm 11,515$ mgEAG/g, com $p=0,0007$.

Os valores de fenólicos totais das frações dos vinhos foram comparados em teste *t* de student, com frações dos vinhos do Vale do São Francisco. Os resultados estão expressos a seguir e apresentados em gráfico:

- RGS F1: $41,69 \pm 6,364$ X VSF F1: $71,97 \pm 5,689$, com $p < 0,0032$.
- RGS F2: $692,2 \pm 158,3$ X VSF F2: $626,7 \pm 21,17$, com $p=0,6882$.
- RGS F3: $43,80 \pm 11,90$ X VSF F3: $149,0 \pm 17,08$, com $p=0,0002$.

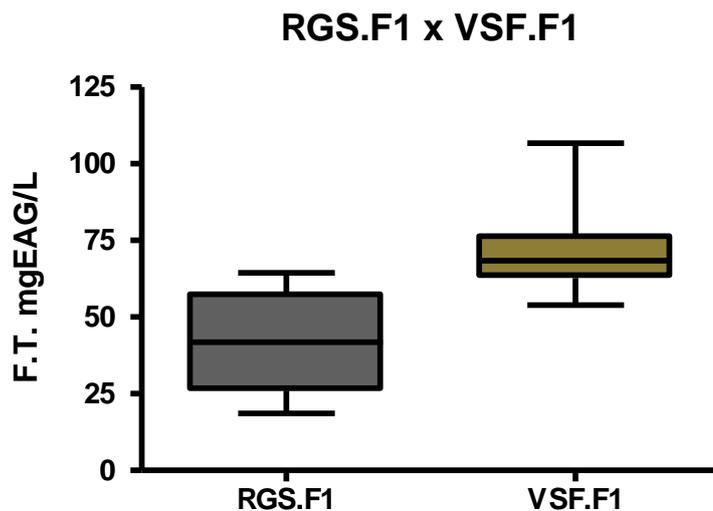


Gráfico 6 – Comparação entre teor de fenólicos totais da fração 1 do RGS e do VSF.

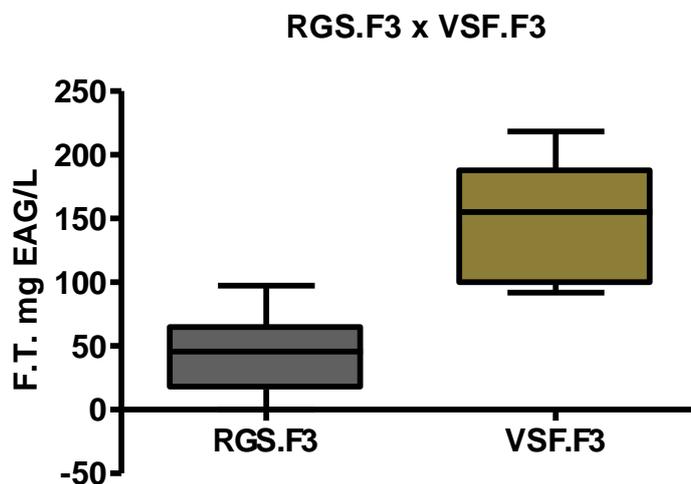


Gráfico 7 – Comparação entre teor de fenólicos totais da fração 3 do RGS e do VSF.

A fração 1(Aquosa) do Vale do São Francisco, teve média maior que a fração 1 do Rio Grande do Sul, entre as frações 2 (AcOEt pH 7.0) não houve diferença significativa; já para a fração 3 (AcOEt pH 2.0), do Vale do São Francisco teve média bem superior que a do Rio Grande do Sul. Estes resultados sugerem que os vinhos do Vale do São Francisco tem Antocianinas Totais e Ácidos Fenólicos, em quantidades bem maiores que os vinhos do Rio Grande do Sul.

5.2. Quantificação de Antocianinas Monoméricas

A quantificação de Antocianinas Monoméricas foi realizada para as oito amostras de vinhos tintos do Rio Grande do Sul e para 1(uma) amostra de vinho Francês da variedade Merlot, bem como para os extratos das três frações de cada uma das 09 amostras destes vinhos.

Para as amostras de vinhos os resultados foram expressos em miligramas de antocianinas monoméricas por litro de vinho (mg AM/L). Para as frações, em miligramas de antocianinas monoméricas por litro do extrato (mg AM/L).

O gráfico 8 mostra o resultado dessa quantificação para os vinhos inteiros:

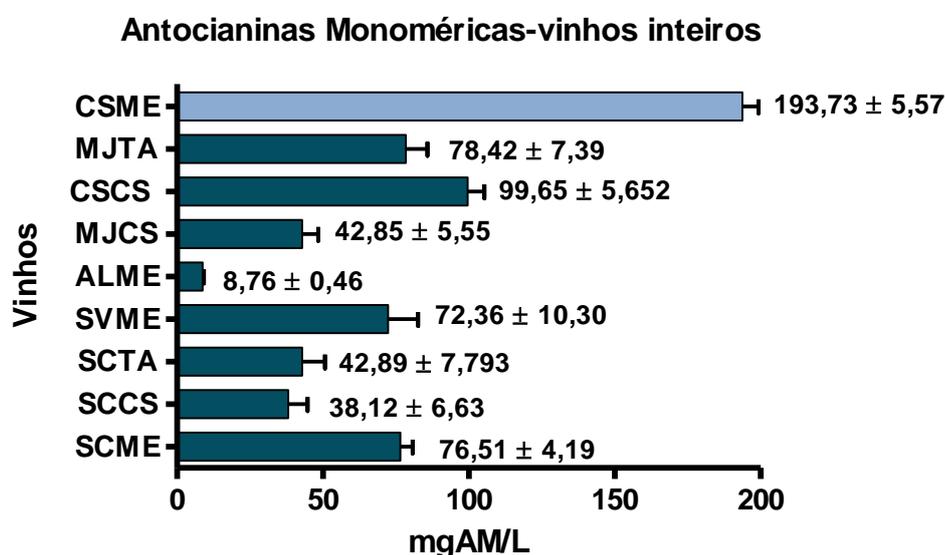


Gráfico 8 – Antocianinas Monoméricas em vinhos inteiros do Rio Grande do Sul (mg AM/L). *AM=Antocianinas Monoméricas.

Obs: SCME (Merlot-2005), SCCS (Cabernet Sauvignon-2004), SCTA (Tannat-2005), SVME (Merlot-2004), ALMeE(Merlot-2005), MJCS (Cabernet Sauvignon-2005), CSCS (Cabernet Sauvignon-2006, MJTA(Tannat-2006) e CSME (Merlot)

A concentração de Antocianinas Monoméricas para os vinhos inteiros variou entre $8,76 \pm 0,46$ a $193,73 \pm 5,57$ mg AM/L, das amostras ALME, e CSME, ambos da variedade Merlot, sendo o último Francês.

As antocianinas estão contidas na casca das uvas, com exceção de poucos cultivares cuja polpa também é pigmentada (FERNÁNDEZ-LÓPEZ *et al.*, 1998). A casca de uva *Vitis vinifera* L. representa de 5 a 10% do peso fresco da fruta e age como uma barreira hidrofóbica contra a infestação fúngica, além de proteger a fruta da desidratação, raios ultravioletas e injúrias físicas. Contém substâncias responsáveis pela

pigmentação, *flavor* e aroma (LECAS E BRILLOUET, 1994). O conteúdo de antocianinas de uva pode variar de 30-750 mg/100 g de fruta e, como em outras plantas, varia de acordo com o cultivar, estação e condições ambientais (Bridle e Timberlake, 1997).

O gráfico 9 apresenta as concentrações de Antocianinas Monoméricas de alguns vinhos do Rio Grande do Sul e de correspondentes da Região do Vale do São Francisco:

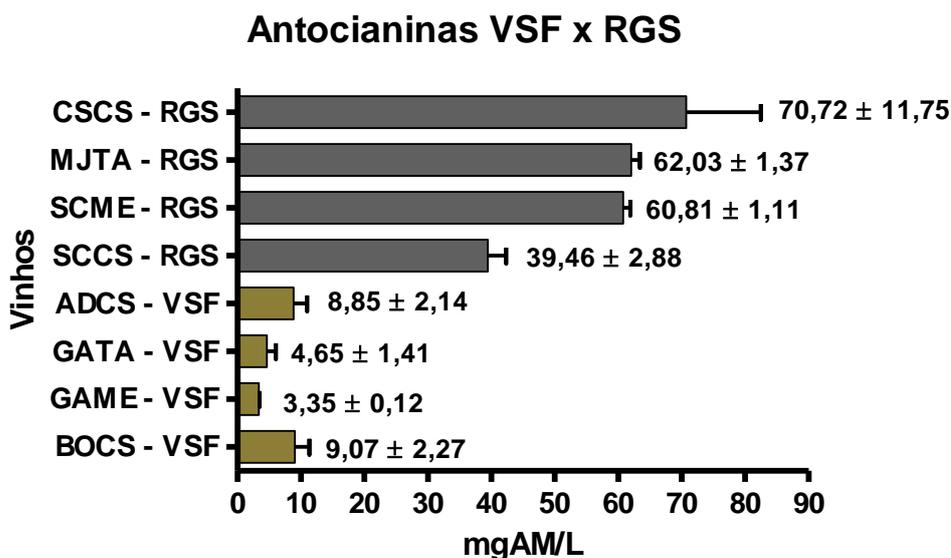


Gráfico 9 – Concentração de Antocianinas Monoméricas de vinhos inteiros do Rio Grande do Sul (cinza) e Vale do São Francisco (bege).

Obs: SCME (Merlot-2005), SCCS (Cabernet Sauvignon-2004), CSCS (Cabernet Sauvignon-2006), MJTA(Tannat-2006) BOCS (Cabernet Sauvignon-2006), ADCS (Cabernet Sauvignon-2005), GAME (Merlot-2003) e GATA (Tannat-2002).

Pelo gráfico podemos observar que, a concentração de Antocianinas Monoméricas dos vinhos do Rio Grande do Sul foi bem superior aos vinhos do Vale do São Francisco. Em teste *t* de student entre as amostras encontramos o resultado a seguir: RGS :58,26 ± 6,64 e VSF : 6,48 ± 1,46 mgAM/L, com $p=0,0003$, mostrado no gráfico 10.

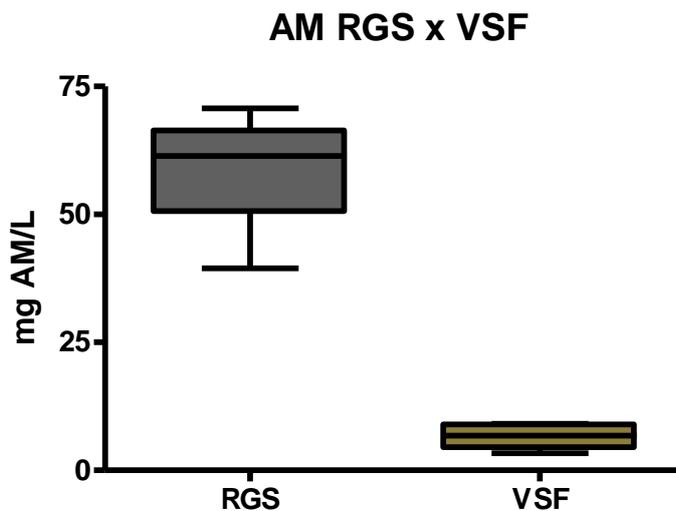


Gráfico 10 – Comparação entre a concentração de Antocianinas Monoméricas de vinhos inteiros do Rio Grande do Sul (cinza) e Vale do São Francisco.

A média da concentração de Antocianinas Monoméricas dos vinhos inteiros do Rio Grande do Sul foi aproximadamente 8 vezes maior que a dos vinhos do Vale do São Francisco. Uma possível explicação para tal fato pode ser por que a temperatura média da Região do Vale do São Francisco que é mais alta que a temperatura no Rio Grande do Sul praticamente durante todo o ano, o que pode prejudicar a estabilidade das Antocianinas, fazendo com que elas se polimerizem formando outros compostos.

Atualmente é sabido que o oxigênio pode degradar antocianinas através de um mecanismo de oxidação direta ou indireta, oxidando os constituintes do meio que reagem com as antocianinas (JACKMAN E SMITH APUD HENDRY E HOUGHTON, 1992).

Calvi e Francis (1978) estudaram a estabilidade das antocianinas de uvas *Vitis labrusca* (var. “Concord”) em sistemas de alimentos líquidos e sólidos, e concluíram que em sistemas líquidos o oxigênio foi um dos mais importantes fatores na degradação das antocianinas. Stringheta (1991) também observou que o efeito do oxigênio na degradação de antocianinas da inflorescência de capim gordura (*Melinis minutiflora* Pal de Beauv) é acentuado; em pH 3,0 as amostras mantidas na presença de oxigênio do ar apresentaram tempo de meia vida de 276 horas, enquanto que amostras sob efeito de nitrogênio, 1018 horas.

De acordo com Brouillard e Dubois (1977), o mecanismo de degradação das antocianinas pelo calor ocorre provavelmente devido à abertura do anel do cátion flavilium e sua conversão à forma chalcona, que é incolor. Essa degradação é irreversível e confere a formação de produtos de coloração marrom. Normalmente o aumento da temperatura causa um aumento logarítmico na destruição das antocianinas (Markakis,1982); isto pode ocorrer durante o armazenamento e estocagem dos alimentos (Mazza e Miniati, 1993).

A estabilidade de seis antocianidinas 3-monoglicosídicas foi avaliada por Cabrita, Fossen e Andersen (2000). Verificou-se a influência das temperaturas de 10°C e 23°C em diferentes valores de pH, durante 60 dias de estocagem. Em pH 3,2 e presença de ar, as antocianinas estudadas apresentaram acima de 80% da cor inicial quando mantidas a 10°C e 35% (em média) da cor inicial quando estocadas a 23°C.

O gráfico 11 a seguir apresenta as concentrações de Antocianinas Monoméricas nos extratos das frações dos vinhos em mgAM/L de extrato de vinho.

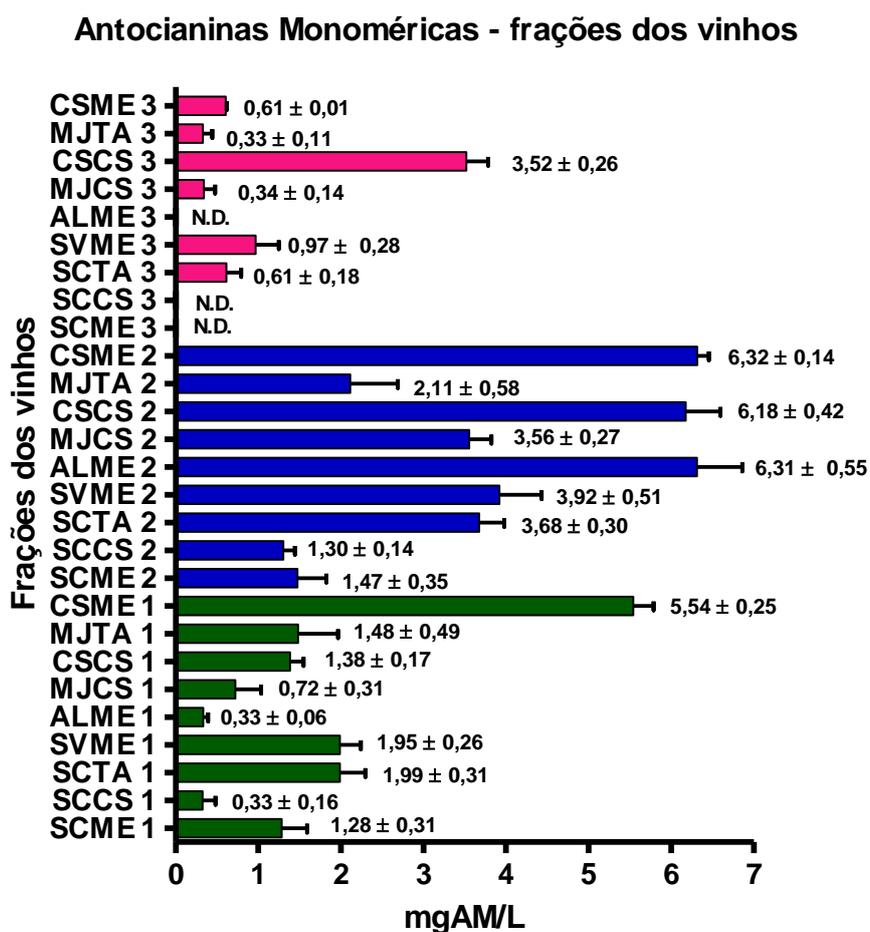


Gráfico 11 – Concentração de Antocianinas Manoméricas nos extratos dos vinhos (mgAM/L). *N.D. – Não Detectado.

Obs: SCME (Merlot-2005), SCCS (Cabernet Sauvignon-2004), SCTA (Tannat-2005), SVM (Merlot-2004), ALMeE(Merlot-2005), MJCS (Cabernet Sauvignon-2005), CSCS (Cabernet Sauvignon-2006, MJTA(Tannat-2006) e CSME (Merlot)

Os valores de Antocianinas Monoméricas para os extratos dos vinhos variou de N.D – Não Detectado a $6,32 \pm 0,14$ mg AM/L, sendo o maior valor encontrado para a amostra F2 (fração 2)-CSME(Francês) da variedade Merlot.

O teste *t* de student entre as frações, resultou em:

- Média: F1: $1,67 \pm 0,53$ X F2: $3,87 \pm 0,68$ mg AM/L, com $p=0,0206$;
- Média: F1: $1,67 \pm 0,53$ X F3: $0,71 \pm 0,37$ mg AM/L, com $p=0,1533$ e
- Média: F2: $3,87 \pm 0,68$ X F3: $0,71 \pm 0,37$ mg AM/L, com $p=0,0008$.

As frações 1 e 3 diferiram estatisticamente da fração 2, mas não diferiram entre si.

Comprando as frações dos vinhos do Rio Grande do Sul com as frações do Vale do São Francisco (LUCENA,2008) pelo teste *t* de student, temos:

- Média: F1RGS: $1,19 \pm 0,26$ X F1VSF : $1,06 \pm 0,25$ mg AM/L, com $p= 0,7210$;
- Média: F2RGS: $3,57 \pm 0,68$ X F2VSF : $0,68 \pm 0,19$ mg AM/L, com $p=0,0011$;
- Média: F3RG: $0,72 \pm 0,42$ X F3VSF : $0,11 \pm 0,09$ mg AM/L, com $p=0,1736$.

Resultados representador pelo gráfico 12.

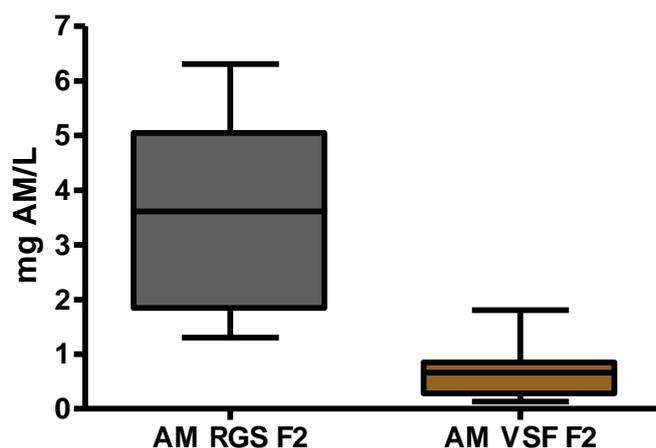


Gráfico 12 – Comparação entre a concentração de Antocianinas monoméricas da fração 2 do RGS e do VSF.

Nota-se que somente a fração 2 diferiu estatisticamente e com média superior aos vinhos do Vale do São Francisco, resultado que confirma o teste de Antocianinas monoméricas para vinhos inteiros, onde os vinhos do Rio Grande do Sul tiveram média bem superior aos do Vale do São Francisco.

5.3. Análise da Atividade Antioxidante

5.3.1. Avaliação da Atividade Sequestradora do Radical DPPH· dos Vinhos Tintos do Rio Grande do Sul e de suas Frações

A atividade antioxidante frente ao radical DPPH· foi determinada por CE_{50} (que é a concentração da amostra necessária para inibir 50% da atividade máxima do radical livre). Os valores das CE_{50} para os vinhos inteiros variou de $29,20 \pm 1,51$ a $94,44 \pm 1,78 \mu\text{g/mL}$ (Gráfico 13). A amostra mais ativa foi SCME com $CE_{50} = 29,20 \pm 1,51 \mu\text{g/mL}$, ou seja foi a amostra que precisou de um a menor concentração para inibir 50% da atividade radicalar, como mostra o gráfico abaixo:

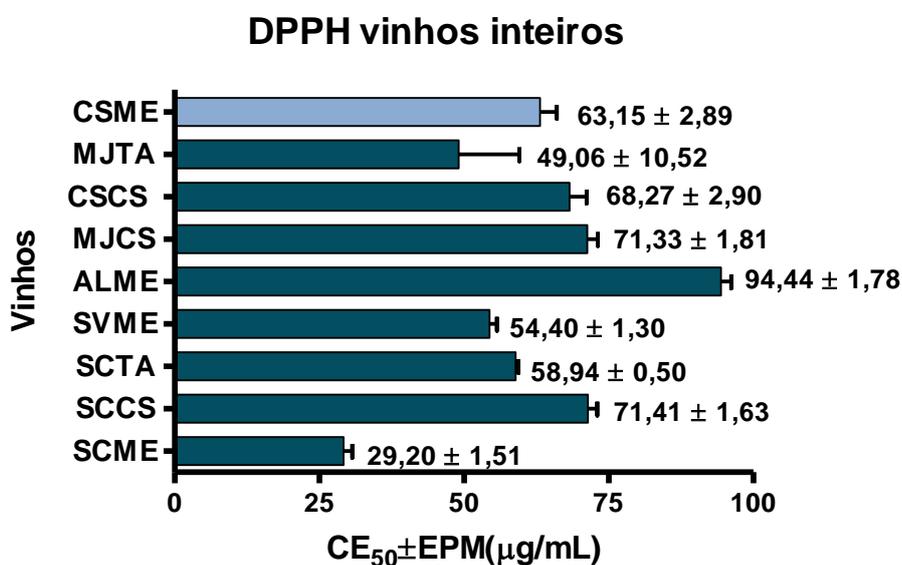


Gráfico 13 – CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) para teste antioxidante com radical DPPH, para vinhos inteiros do Rio Grande do Sul.

Obs: SCME (Merlot-2005), SCCS (Cabernet Sauvignon-2004), SCTA (Tannat-2005), SVME (Merlot-2004), ALMeE(Merlot-2005), MJCS (Cabernet Sauvignon-2005), CSCS (Cabernet Sauvignon-2006, MJTA(Tannat-2006) e CSME (Merlot)

Em 1922, Goldschmidt e Renn descobriram um radical livre estável de cor violeta, que agora é usado como reagente colorimétrico para processos de oxi-redução (IONITA, 2005). O DPPH pode ser mantido indefinidamente com pouca decomposição porque ele não reage com o oxigênio. O método provou ser bastante útil em uma série de investigações, tais como a determinação das propriedades antioxidantes de aminas, fenóis ou compostos naturais (vitaminas, extratos vegetais, medicamentos) e para inibir reações hemolíticas. O DPPH tem a cor violeta intensa como KMnO_4 e quando reduzido a seu homólogo 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPHH) se torna amarelo-alaranjado (IONITA, 2005).

O método do DPPH baseia-se na redução dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil ($\text{DPPH}\cdot$) através da doação de um átomo de hidrogênio pelo polifenol à molécula do radical (ARUOMA *et al.*, 1997). Para essa análise utiliza-se uma solução alcoólica de DPPH, que absorve no comprimento de onda próximo de 517 nm, e à medida que seu elétron deixa de ser desemparelhado, a absorção decresce e ocorre a mudança de coloração frente às moléculas antioxidantes testadas (DI MAMBRO; MARQUELE; FONSECA, 2005).

Ruberto *et al.* (2007) estudaram a atividade antioxidante de cinco cultivares de uvas tintas sicilianas frente ao radical livre $\text{DPPH}\cdot$ e obtiveram valores de CE_{50} que variavam de 14–39 $\mu\text{g/mL}$.

Arlorio *et al.* (2008) verificaram a atividade antioxidante dos extratos metanólicos de espécies de cacau de Gana, Costa do Marfim e Equador, frente ao radical livre $\text{DPPH}\cdot$. Foi observado que a CE_{50} destes extratos variou de 14.986 ± 1.348 a $30.100 \pm 2.417 \mu\text{g/mL}$.

Woraratphoka, Intarapichet e Indrapichate (2007) estudaram a atividade sequestradora do radical livre $\text{DPPH}\cdot$ para amostras de vinhos tintos tailandeses. Os valores obtidos neste estudo foram calculados em termos de CE_{50} e expressados como mg EAG/L. Os resultados variaram de 3.1 a 6.8 mg EAG/L.

Os resultados obtidos para a atividade anti-radicalar para as frações dos vinhos estudados, encontram-se apresentados no gráfico 14, e estão expressos em CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$).

DPPH frações

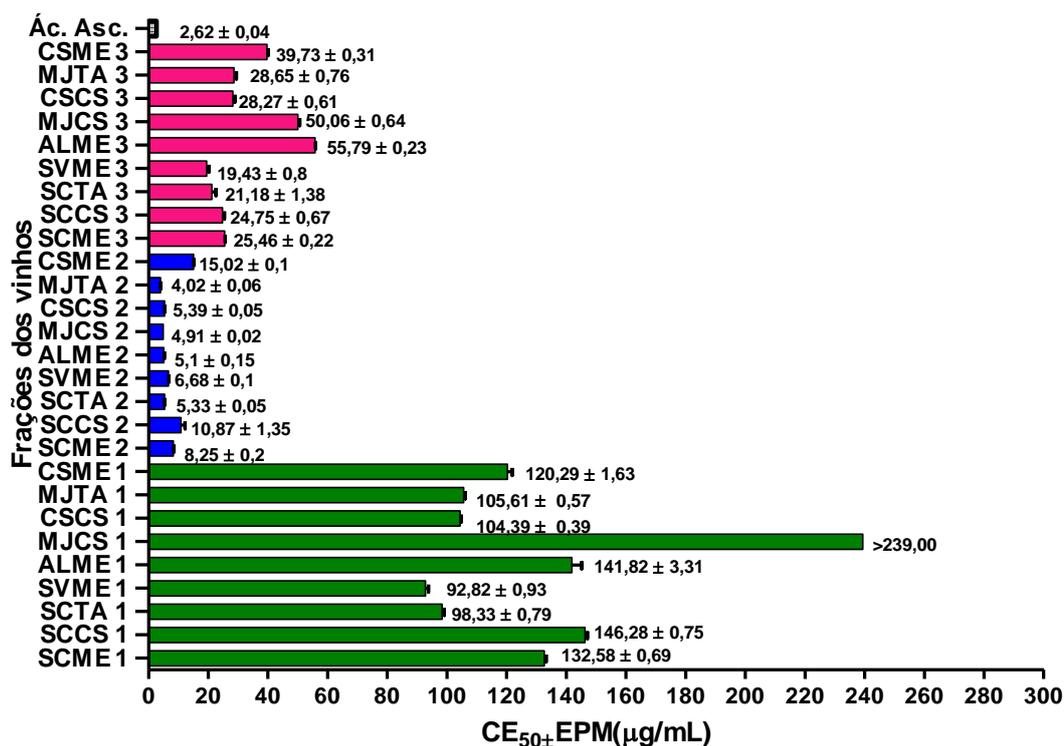


Gráfico 14 – Determinação da Atividade Anti-radicalar ao DPPH·, das 3 frações dos vinhos estudados. Ác. Asc.= Ácido Ascórbico.

Obs: SCME (Merlot-2005), SCCS (Cabernet Sauvignon-2004), SCTA (Tannat-2005), SVME (Merlot-2004), ALMeE(Merlot-2005), MJCS (Cabernet Sauvignon-2005), CSCS (Cabernet Sauvignon-2006, MJTA(Tannat-2006) e CSME (Merlot)

A maior atividade anti-radicalar foi das frações 2 em geral, resultado esperado, já que essa é a fração que tem maior teor de Fenólicos Totais. A variação das CE₅₀ ficou entre 4,02 ± 0,06 a >239,00 µg/mL, sendo a amostra mais ativa a F2 MJTA, da variedade Tannat.

Relacionando a fração 2 mais ativa com o padrão Ácido Ascórbico, podemos ver que esta tem atividade anti-radicalar semelhante ao padrão.

O teste *t* de student, mostra a relação de uma fração com a outra:

- Média: F1: 131,3 ± 14,94 X F2: 7,29 ± 1,19 µg/mL, com $p < 0,0001$;
- Médias: F1: 131,3 ± 14,94 X F3: 32,59 ± 4,32 µg/mL, com $p < 0,0001$ e
- Médias: F2: 7,29 ± 1,19 X F3: 32,59 ± 4,32 µg/mL, com $p < 0,0001$.

A fração 2 foi aproximadamente 4,5 e 18 vezes mais ativa que as frações 3 e 1 respectivamente.

Esses valores de CE₅₀ foram comparados em teste *t* de student, com CE₅₀ de extratos de vinhos do Vale do São Francisco, e mostrados a seguir:

- Fração 1: RGS X VSF:

Médias: F1RGS: $132,6 \pm 16,87$ e F1VSF : $67,22 \pm 10,17$ $\mu\text{g/mL}$, com $p=0,0050$;

- Fração 2 : RGS X VSF:

Médias: F2RGS: $6,32 \pm 0,79$ e F2VSF : $7,03 \pm 0,82$ $\mu\text{g/mL}$, com $p=0,5436$ e

- Fração 3 : RGS X VSF:

Médias: F3RGS: $31,70 \pm 4,79$ e F3VSF : $19,53 \pm 2,11$ $\mu\text{g/mL}$, com $p=0,0357$.

Os gráficos 15 e 16 apresentam o resultado da comparação anterior:

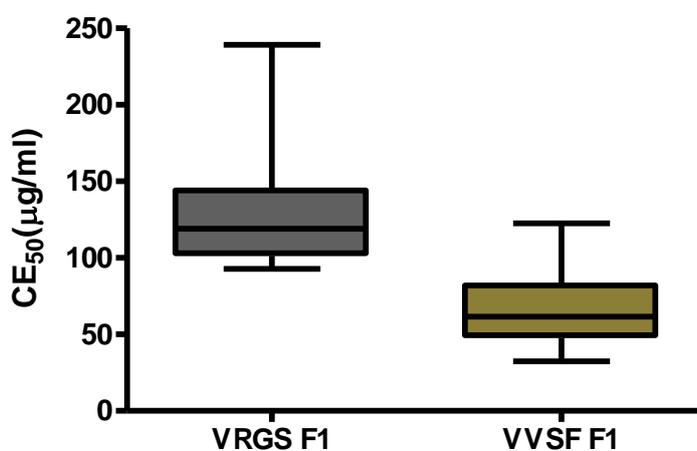


Gráfico 15 – Comparação entre a fração 1 de vinhos do RGS x VSF com relação a Atividade Anti-radicalar DPPH.

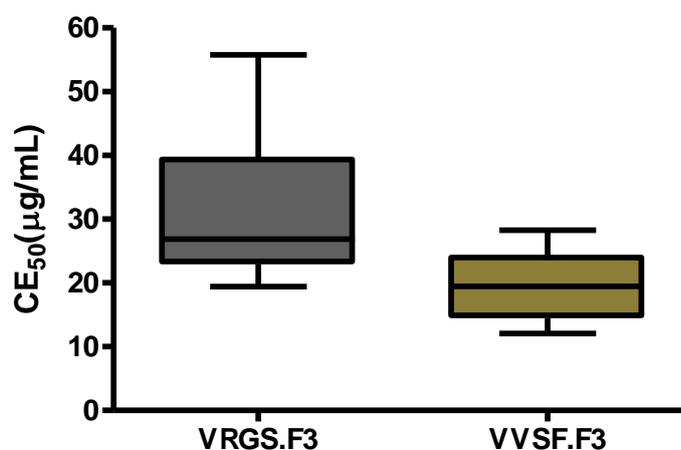


Gráfico 16 – Comparação entre a fração 3 de vinhos do RGS x VSF com relação a Atividade Anti-radicalar DPPH.

A atividade anti-radicalar está relacionada com a presença de Compostos Fenólicos nas amostras, e para avaliar esta relação foi realizada uma análise de correlação linear entre os valores de concentração de Fenólicos totais e os valores de CE_{50} obtidos no teste de DPPH· (Gráfico 17).

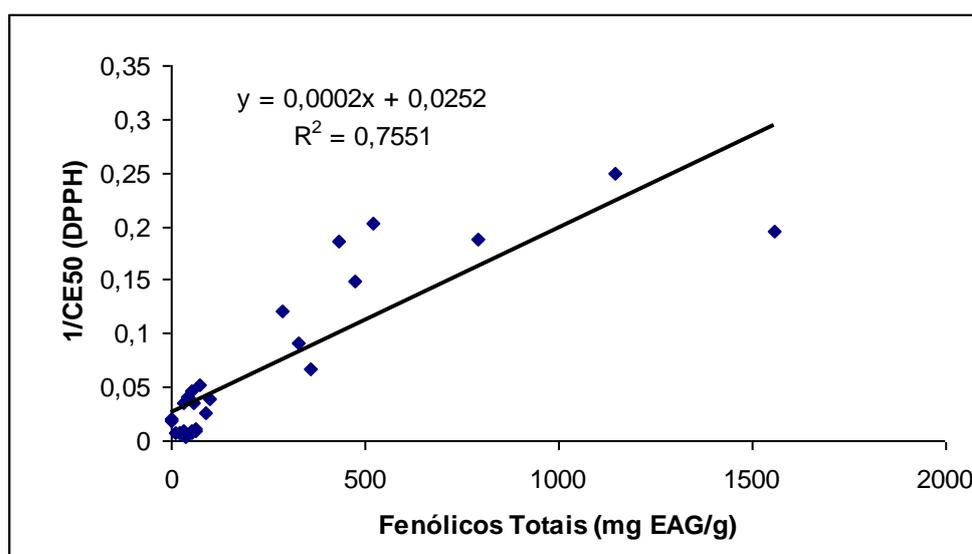


Gráfico 17 – Correlação linear entre o Teor de Fenólicos Totais e a Atividade Antioxidante frente ao radical DPPH·, das frações dos vinhos.

Observa-se pelo gráfico que existe uma razoável correlação linear entre a atividade anti-radicalar frente ao radical DPPH· e a concentração de Fenólicos Totais, visto que o coeficiente de correlação linear (R^2) encontrado foi de 0,7551, o que sugere que 75,5% da atividade anti-radicalar das amostras deve-se a contribuição dos Fenólicos Totais. Assim, conclui-se que existem substâncias não fenólicas presentes nas amostras com significativa atividade antioxidante.

Lucena (2008), estudando atividade antioxidante em vinhos do Vale do São Francisco relatou uma correlação linear (R^2) entre Fenólicos Totais e CE_{50} DPPH·, de 0,7252, semelhante ao resultado encontrado neste trabalho.

Vedana (2008), avaliando o efeito do processamento na atividade antioxidante da uva, encontrou uma correlação linear (R^2) entre Fenólicos Totais e CE_{50} DPPH· em amostras de suco de uva, de 0,5406.

5.3.2. Avaliação da Atividade Sequestradora do Radical ABTS^{•+} dos Vinhos Tintos do Rio Grande do Sul e de suas Frações

A capacidade sequestrante de radicais ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) de extratos de plantas medicinais, extratos antociânicos de frutas, vinhos e extratos de gramíneas foram avaliadas respectivamente por Pietta, Simonetti e Mauri (1998), Espín *et al.* (2000), Landrault *et al.* (2001) e Pukalskas *et al.* (2002). Este método é baseado na formação do radical ABTS^{•+} pelo radical ferrilmioglobina gerado pela reação entre a metahemoglobina e H₂O₂ na presença de peroxidase. Outros agentes oxidantes podem ser utilizados. Há, portanto, a formação de um radical cromóforo (ABTS^{•+}), onde a atividade antioxidante é avaliada pela supressão da cor do radical quando substâncias antioxidantes são adicionadas no meio.

Outro teste realizado neste trabalho foi a análise da atividade sequestradora do Radical ABTS^{•+} para vinhos inteiros e frações, como mostra o gráfico 18:

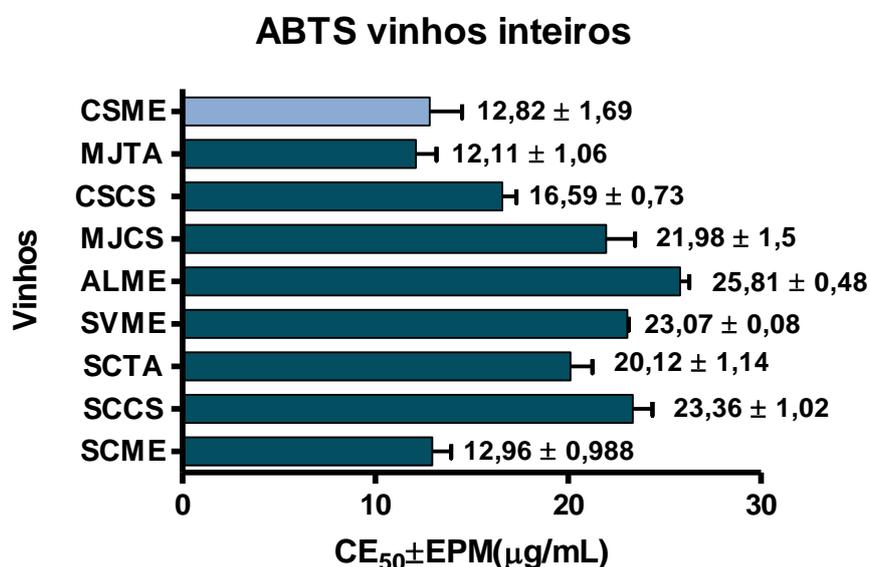


Gráfico 18 - CE₅₀ (µg/mL) para teste antioxidante radical ABTS^{•+}, para vinhos inteiros do Rio Grande do Sul.

Obs: SCME (Merlot-2005), SCCS (Cabernet Sauvignon-2004), SCTA (Tannat-2005), SVME (Merlot-2004), ALMeE(Merlot-2005), MJCS (Cabernet Sauvignon-2005), CSCS (Cabernet Sauvignon-2006, MJTA(Tannat-2006) e CSME (Merlot)

Os resultados foram expressos através da $CE_{50} \pm E.P.M.$ (PAYET *et al.*, 2006), que representa a concentração da amostra necessária para obter metade da inibição máxima do cátion radical $ABTS^{++}$.

Os valores de CE_{50} para os vinhos inteiros variaram entre $12,11 \pm 1,06$ a $25,81 \pm 0,48$ $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico12). A amostra mais ativa foi MJTA, da variedade Tannat, com $CE_{50} = 12,11$ $\mu\text{g/mL}$.

Paixão *et al.* (2007) realizaram o ensaio do $ABTS^{++}$ com 5 amostras de vinhos tintos portugueses e observaram que a porcentagem de inibição variou de $42,9 \pm 3,2$ % a $57,0 \pm 5,1$ % no sistema reacional com $ABTS^{++}$.

O gráfico 19 apresenta o resultado da CE_{50} para o ensaio $ABTS^{++}$, para as frações. Os valores variaram de: $<2,00$ a $41,89 \pm 0,75$ $\mu\text{g/mL}$

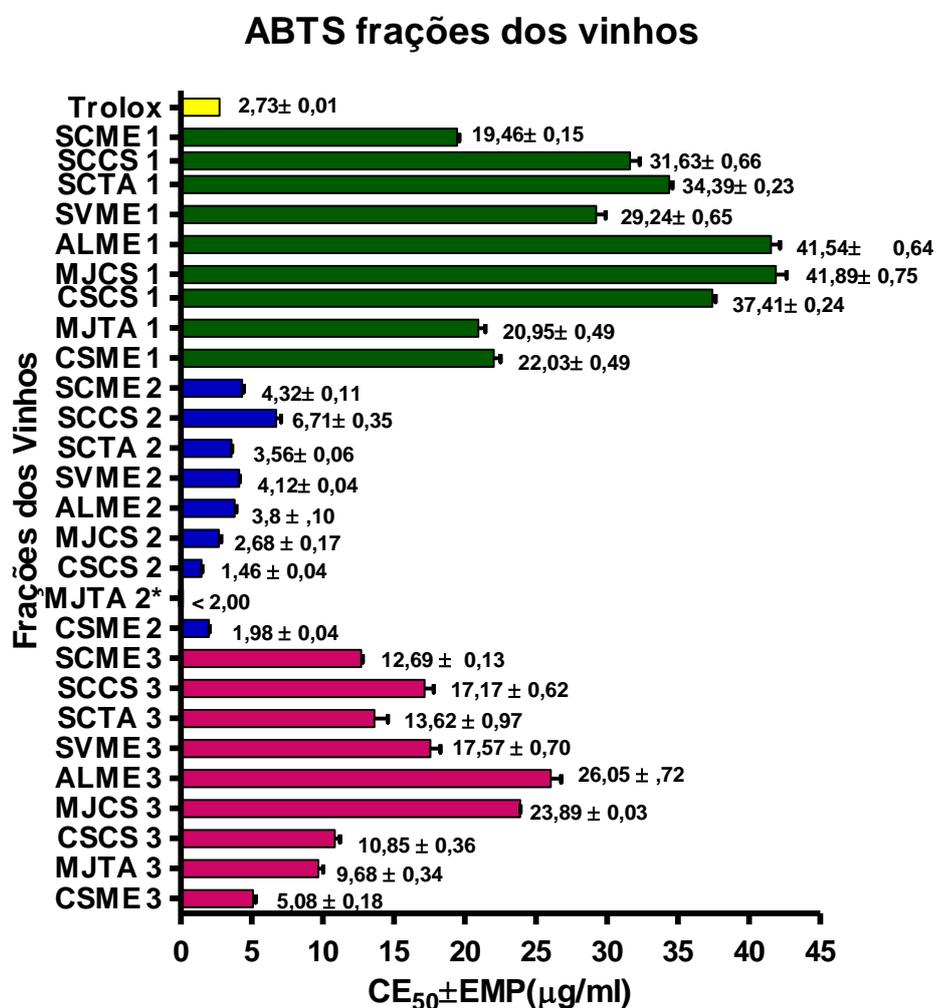


Gráfico 19 – Determinação da Atividade Anti-radicalar ao $ABTS^{++}$ das 3 frações dos vinhos estudados.

Obs: SCME (Merlot-2005), SCCS (Cabernet Sauvignon-2004), SCTA (Tannat-2005), SVME (Merlot-2004), ALME (Merlot-2005), MJCS (Cabernet Sauvignon-2005), CSCS (Cabernet Sauvignon-2006), MJTA (Tannat-2006) e CSME (Merlot)

As frações 2 (AcoEt pH 7.0) foram como grupo as mais ativas, e dentre estas a mais ativa foi a MJTA, da variedade Tannat.

O teste *t* de student, mostra a relação de uma fração com a outra:

- F1xF2: Média: F1: $30,95 \pm 2,89$ X $3,58 \pm 0,58$ $\mu\text{g/mL}$, com $p < 0,0001$;
- F1xF3: Média: F1: $30,95 \pm 2,89$ X F3: $15,18 \pm 2,25$ $\mu\text{g/mL}$, com $p = 0,0005$ e
- F2 x F3: Média: F2: $3,58 \pm 2,89$ X F3: $15,18 \pm 2,25$ $\mu\text{g/mL}$, $p = 0,0003$.

As frações diferiram estatisticamente umas das outras. Esses valores de CE_{50} foram comparados em teste *t* de student, com CE_{50} de extratos de vinhos dos Vale do São Francisco (LUCENA, 2008) e apresentados abaixo, como também pelo gráfico 20 :

- Fração 1: RGS x VSF: Médias: F1RGS: $32,06 \pm 3,02$ e F1VSF : $43,68 \pm 6,92$ $\mu\text{g/mL}$, com $p = 0,1472$;
- Fração 2 : RGS x VSF: Médias: F2RGS: $3,81 \pm 0,61$ e F2VSF : $2,27 \pm 0,19$ $\mu\text{g/mL}$, com $p = 0,0238$ e
- Fração 3 : RGS x VSF: Médias: F3RGS: $16,44 \pm 2,11$ e F3VSF : $11,45 \pm 1,08$ $\mu\text{g/mL}$, com $p = 0,0537$

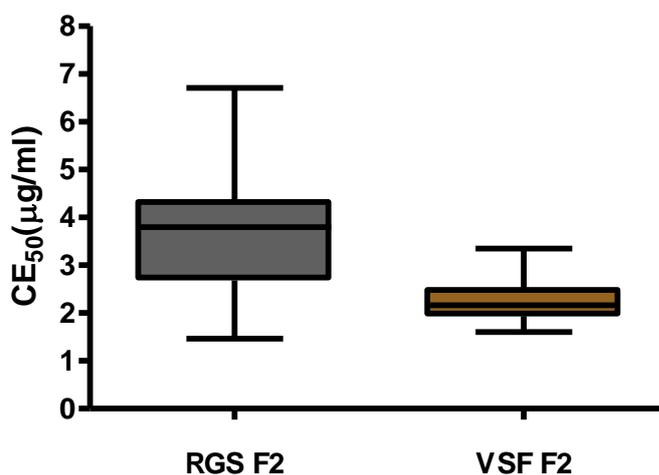


Gráfico 20 - Comparação entre a fração 2 de vinhos do RGS x VSF com relação a Atividade Anti-radicalar ABTS.

A fração 2 do Vale do São Francisco foi mais ativa que a fração 2 do Rio Grande do Sul, embora entre as outras frações não houve diferença significativa.

O resultado da correlação entre a CE_{50} ensaio ABTS e o teor de fenólicos totais é mostrados no gráfico 21, e apresenta um coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,4395, mostrando correlação bastante baixa, já que esse resultado sugere que apenas 44% da atividade anti-radicalar está relacionada com o teor de fenólicos totais.

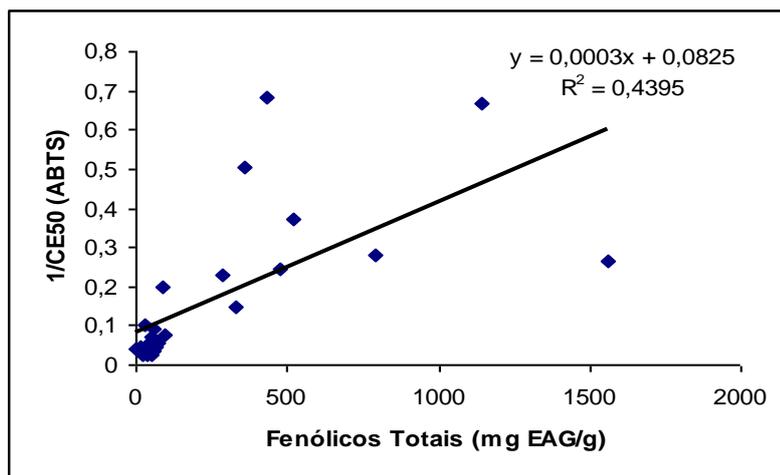


Gráfico 21 - Correlação Linear do Teor de Fenólicos Totais em função da Atividade Seqüestradora de Radicais $ABTS^{+\cdot}$ das Três Frações dos Vinhos Tintos Analisados.

Lucena (2008), estudando atividade antioxidante em vinhos do Vale do São Francisco encontrou uma correlação linear (R^2) entre Fenólicos Totais e CE_{50} $ABTS^{+\cdot}$ de 0,9345, resultado bem superior ao encontrado neste trabalho. Tal resultado pode sugerir que as diferenças de composição para compostos fenólicos encontradas nos vinhos do Rio Grande do Sul e no Vale do São Francisco sejam a causa desta falta de correlação.

Vedana (2008), avaliando efeito do processamento na atividade antioxidante da uva, encontrou uma correlação linear (R^2) entre Fenólicos Totais e CE_{50} $ABTS^{+\cdot}$ em amostras de suco de uva, de 0,7572.

A correlação linear entre os dois testes anti-radicalares ($ABTS^{+\cdot}$ e $DPPH\cdot$) também foi realizada, através de seus valores de CE_{50} e os resultados são visualizados no Gráfico 22 resultando em um coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,7389. Este resultado mostra que 74% das amostras se correlacionam entre os dois testes.

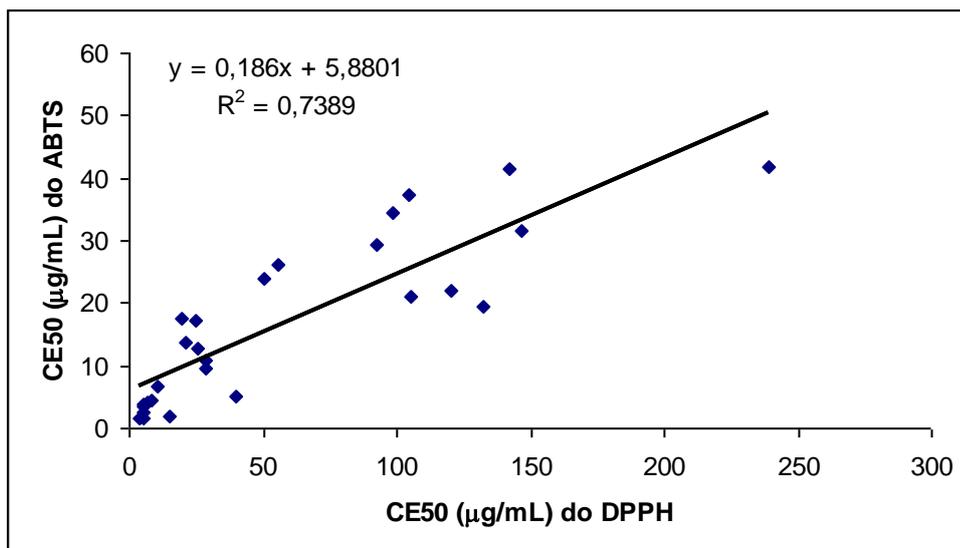


Gráfico 22 - Correlação Linear dos Valores de CE_{50} do Ensaio $ABTS^{+}$ em Função dos Valores de CE_{50} do Ensaio DPPH dos Extratos dos Vinhos Analisados.

Lucena (2008) também analisou o coeficiente de correlação linear entre os ensaios DPPH e ABTS, e encontrou $R^2 = 0,9775$. Vedana (2008) analisando a correlação linear entre os dois testes, relatou $R^2 = 0,8203$, para amostras de suco de uva.

Lachman, Sulc e Schilla (2007), em um estudo com vinhos da República Tcheca, verificaram um valor de correlação linear médio de $R^2 = 0,71560$ para ensaios de $ABTS^{+}$ e DPPH*, resultado muito próximo do encontrado neste trabalho.

A falta de uma correlação forte entre estes dois testes é comumente atribuída ao fato de que cada composto fenólico individualmente contido no vinho causa uma resposta diferente a cada radical específico utilizado no teste. Esses diferentes compostos fenólicos, em diferentes concentrações, dependem do processo tecnológico de seleção e duração de cada fase da produção (especialmente o período de fermentação e temperatura de armazenamento). Os radicais $ABTS^{+}$ e DPPH* têm estruturas estequiométricas diferentes e dão respostas diferentes de inativação após reagirem com o antioxidante.

5.4. Quantificação das Concentrações de *Cis*, *Trans*-Resveratrol e Quercetina nos Vinhos Tintos do Rio Grande do Sul

A concentração dos isômeros *cis* e *trans*-resveratrol e da quercetina nos vinhos do Rio Grande do Sul foi determinada, e os resultados estão apresentados na tabela 1:

Tabela 1: Concentração de *cis*, *trans* resveratrol e quercetina, expressos em µg/mL.

Amostras	<i>cis</i> -resveratrol*	<i>trans</i> -resveratrol	quercetina
SCME	3,44 ± 0,53	1,07 ± 0,02	4,71 ± 0,51
SCCS	6,10 ± 0,03	0,25 ± 0,01	4,01 ± 0,02
SCTA	3,23 ± 0,03	0,22 ± 0,01	0,91 ± 0,01
SVME	3,71 ± 0,02	0,57 ± 0,01	2,08 ± 0,10
ALME	2,89 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,59 ± 0,01
MJCS	3,65 ± 0,03	0,65 ± 0,01	1,63 ± 0,06
CSCS	10,73 ± 0,04	1,44 ± 0,02	0,27 ± 0,01
MJTA	2,85 ± 0,03	1,25 ± 0,02	3,97 ± 0,08
CSME	3,01 ± 0,01	1,46 ± 0,01	4,84 ± 0,03

* $p < 0,0001$ em relação ao *trans*-resveratrol

A concentração de *cis*-resveratrol variou entre 2,85 a 10,73 µg/mL já a concentração de *trans*-resveratrol variou de 0,22 a 1,46 73µg/mL e a concentração de quercetina ficou entre 0,27 a 4,84 73µg/mL para os vinhos analisados.

A quercetina possui atividade na inibição da COMT (catecolamina-O-metil transferase), inibindo a degradação de aminas vasoconstritoras, aumentando o tônus e a resistência periférica. Outra ação é a da diminuição da produção de histamina, por inibição as enzimas descarboxilase e fosfolipase. Outro mecanismo de diminuição da liberação da histamina se deve a estabilização das membranas dos mastócitos e basófilos, pela quercetina.

Segundo Frankel (1995), a média da concentração de resveratrol em vinhos tintos da Califórnia é de 1,5mg/L e de quercetina é de 8 mg/L. Comparando esse resultado com o apresentado neste trabalho, nota-se uma média bem inferior (2,6mg/L) com relação a quercetina, para os vinhos estudados.

O resveratrol é sintetizado naturalmente na planta sob duas formas isômeras: *trans*-resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e *cis*-resveratrol (*cis*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno). O isômero *trans*-resveratrol é convertido a *cis*-resveratrol em presença da luz visível, pois esta forma é mais estável.

O resveratrol tem atividade antioxidante através da inibição da atividade da lipoxigenase (ARICHI et al, 1982), pode também atuar de modo similar ao estrogênio e substituir parcialmente este estrogênio nos tratamentos pós-menopausa (RATNA,2002). Conforme Subbaramaiah *et al.* (1998) a atividade antiinflamatória do resveratrol é explicada pela inibição da transcrição e atividade da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), inibindo também a síntese de tromboxano, portanto atuando como anticoagulante (RATNA, 2002). O resveratrol atua sobre o câncer em diversas maneiras, uma destas é a inibição da cascata do ácido araquidônico, rota metabólica que pode induzir a gênese de tumores (SUBBARAMAIAH, 1998). Outra via é pela inibição da proteína quinase C, um mediador chave na promoção dos tumores, ação que poderia explicar o seu efeito quimiopreventivo (STEWART,2000). Estudos indicam que o resveratrol pode induzir a apoptose, morte programada de células, atuando como um agente antiproliferativo de alguns tipos de tumores (RATMA, 2002).

Spinelli (2006), encontrou para vinhos produzidos no Rio Grande do Sul variedade Merlot, uma concentração de 6,23 mg/L e 4,72 mg/L , para os isômeros *trans* e *cis* respectivamente, resultados bem diferentes dos encontrados neste trabalho para esta variedade de uva.

Stervbo (2007), em uma revisão sobre concentração de *trans*-resveratrol em vinhos de vários países, relatou concentrações que variaram de não-detectado (N. D.) a 14,3 mg/L. Para vinhos do Canadá a média de *trans*-resveratrol foi de 3,2 mg/L, vinhos da Grécia e Japão tiveram as menores médias de 1,0 mg/L para ambos. A concentração máxima foi de 14,3 mg/L, pra vinho da variedade Merlot safra 2002 da Hungria. Um Merlot Italiano teve média de *trans*-resveratrol de 3,4 mg/L, resultado semelhante ao correspondente brasileiro, que apresentou média de 4,0 mg/L para a mesma variedade, já para o Cabernet Sauvignon o resultado foi de 1,8 mg/L. Resultados bem superiores aos encontrados neste trabalho, já que a média de *trans*-resveratrol foi de 0,81 mg/L.

Vitrac (2005), estudou a concentração de *cis* e *trans*-resveratrol em vinhos brasileiros e relatou para vinhos da variedade Cabernet Sauvignon 2003 , valores entre não detectado para o isômero *trans* a 4,16 mg/L para o *cis*, para o Merlot 2003 as médias foram 1,77 e 23,33 mg/L para *trans* e *cis* respectivamente, e para a variedade

Tannat as concentrações foram de não detectado para *trans* e 1,91 mg/L para *cis*-resveratrol.

5.5. Determinação do Perfil Cromatográfico dos Vinhos

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a *fase móvel* e a *fase estacionária*. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação.

Inicialmente foram realizadas as corridas cromatográficas para as 09 (nove) amostras de vinhos tintos do Rio Grande do Sul e 1 (um) vinho Francês. Os cromatogramas obtidos nestas corridas estão ilustrados a seguir:

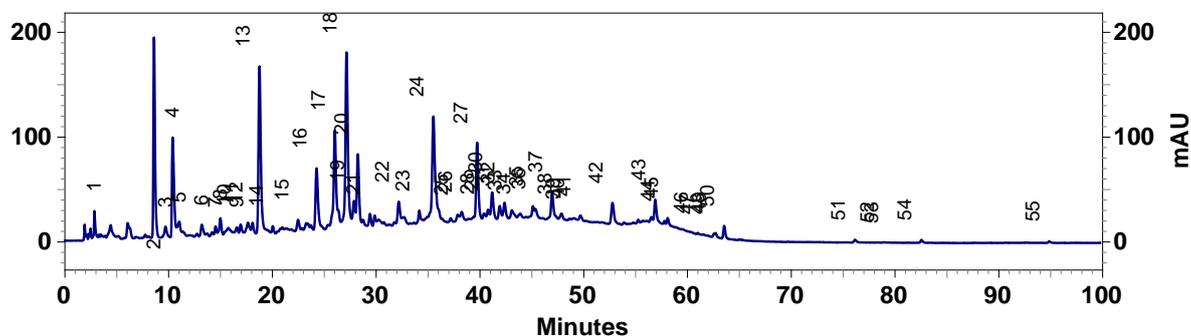


Figura 9 – Cromatograma do Vinho Tinto SCME

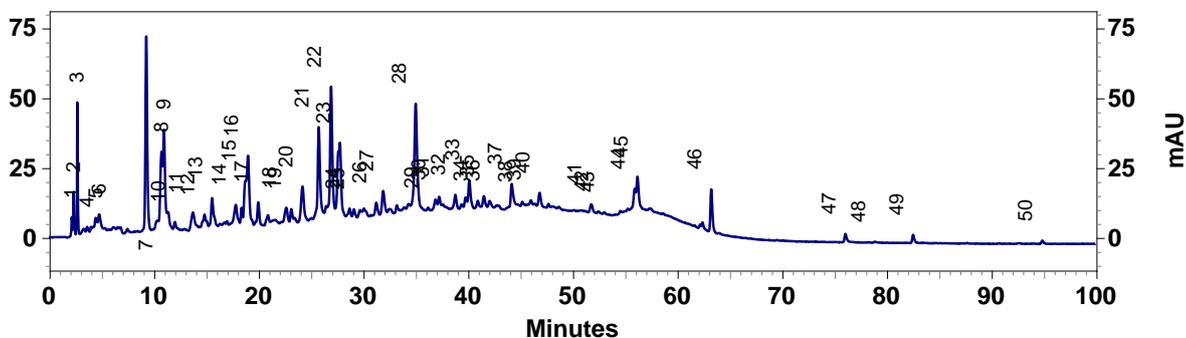


Figura 10 – Cromatograma do Vinho Tinto SCCS

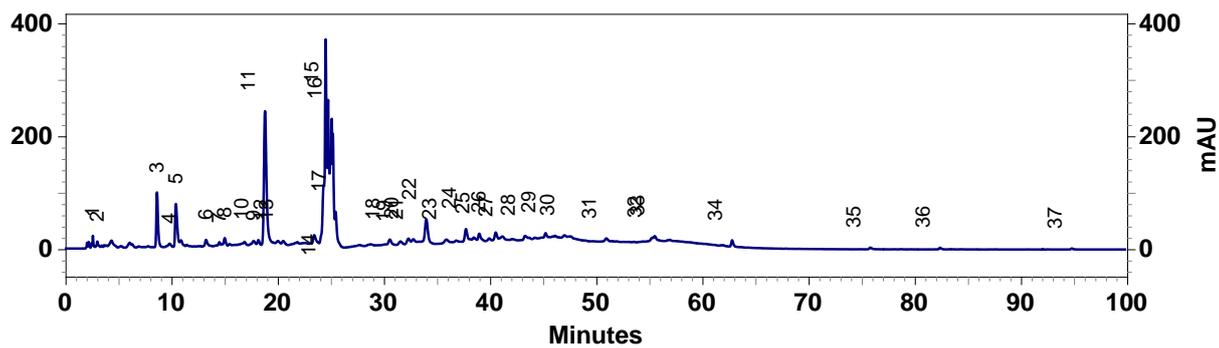


Figura 11 – Cromatograma do Vinho Tinto SCTA

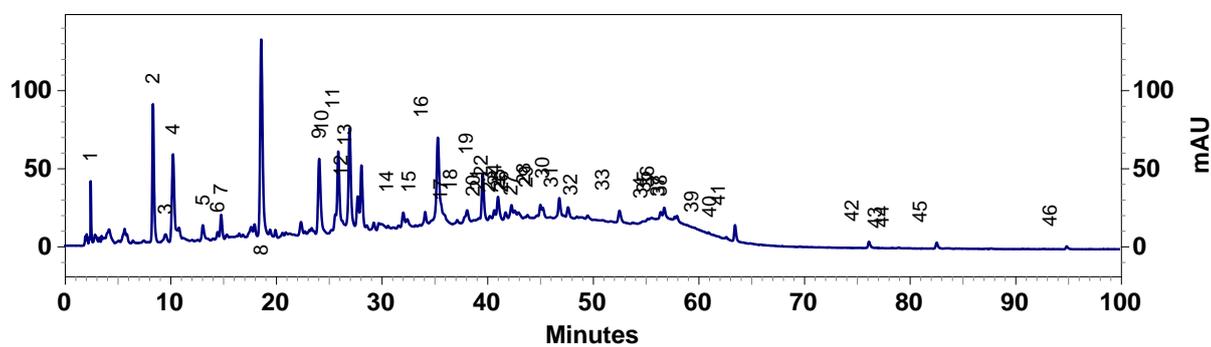


Figura 12 – Cromatograma do Vinho Tinto SVME

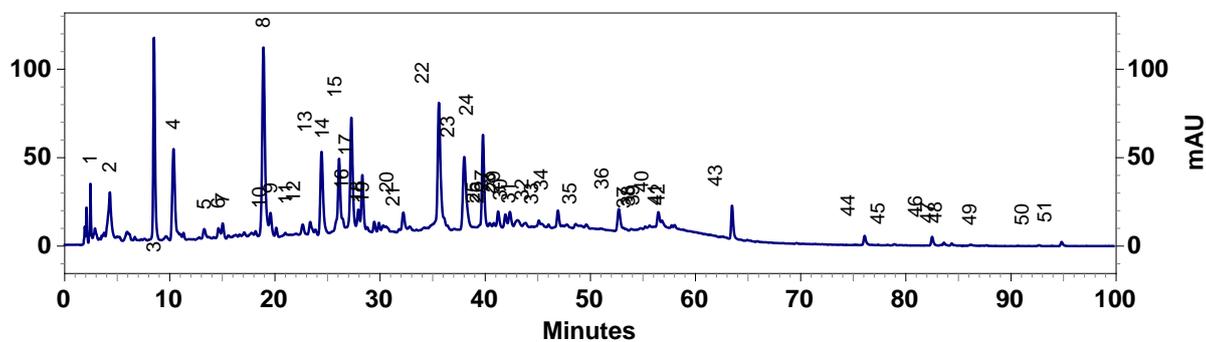


Figura 13 – Cromatograma do Vinho Tinto ALME

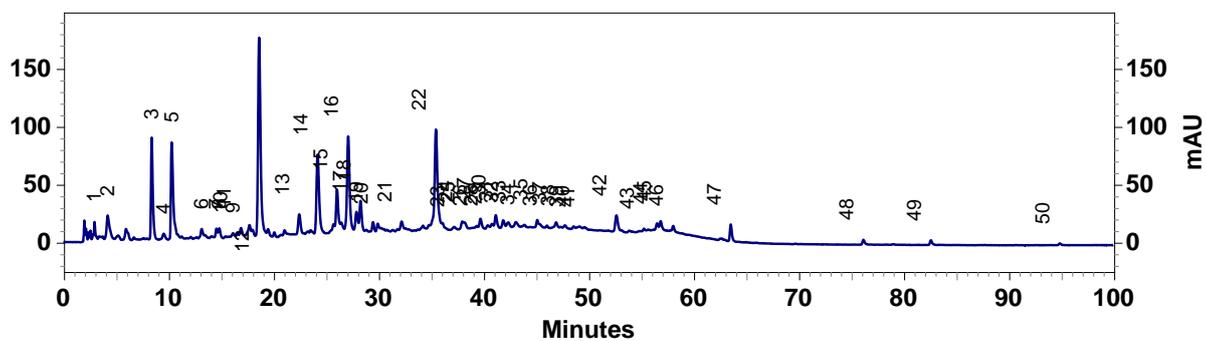


Figura 14 – Cromatograma do Vinho Tinto MJCS

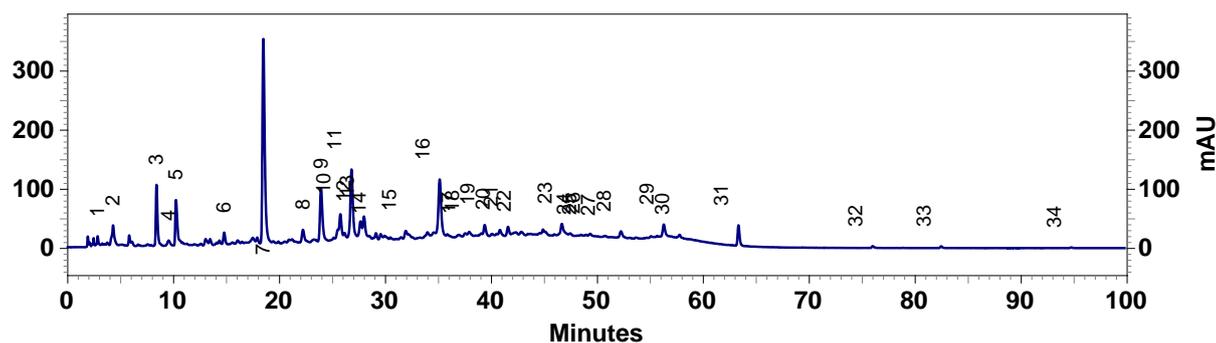


Figura 15 – Cromatograma do Vinho Tinto CSCS

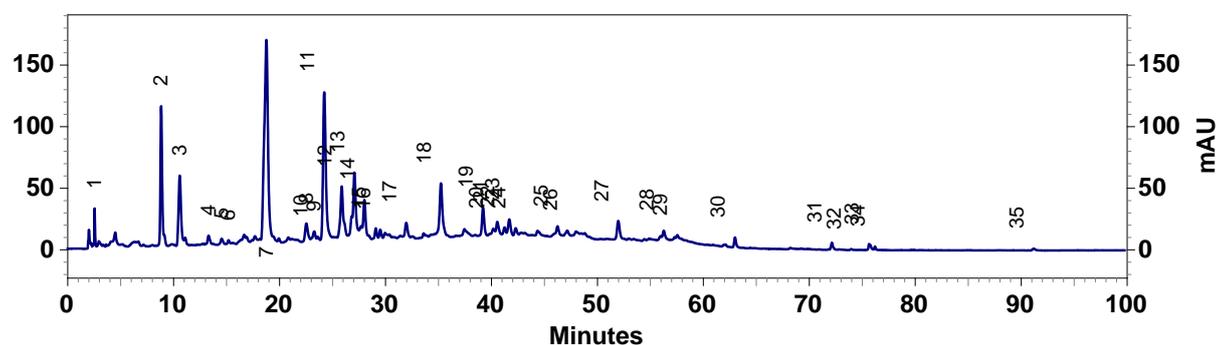


Figura 16 – Cromatograma do Vinho Tinto MJTA

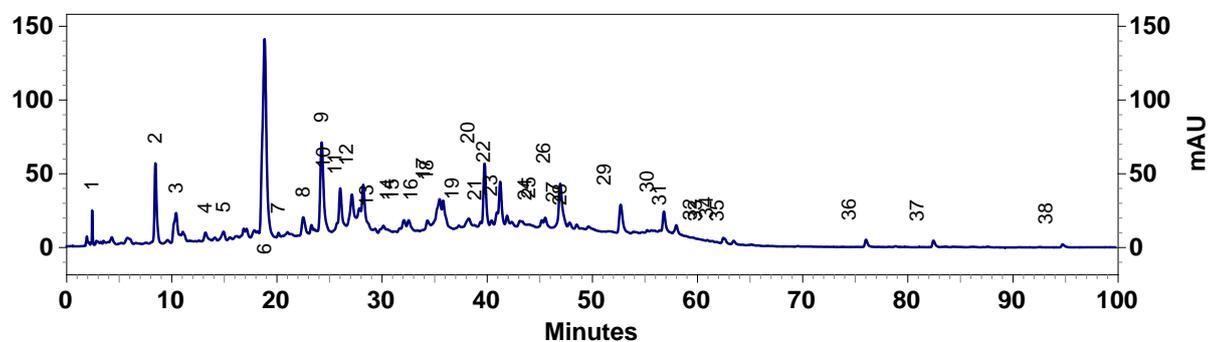


Figura 17 – Cromatograma do Vinho Tinto CSME

Após a realização das corridas cromatográficas e obtenção dos cromatogramas dos vinhos tintos estudados, foi feita uma seleção prévia dos picos mais representativos de cada cromatograma. Então foram realizadas comparações entre os tempos de retenção e espectros de ultravioleta desses picos. A área relativa (calculada apenas em relação aos componentes selecionados para cada vinho) de cada um dos picos selecionados foi calculada para cada cromatograma e utilizada para a análise de componentes principais e análise hierárquica de *clusters* (HCA), utilizando o software “*Statistica*” versão 6.0 (Statsoft Inc.).

Com a finalidade de caracterizar o vinho através do perfil cromatográfico de seus polifenóis utilizando técnicas de análise multivariada foram analisadas as áreas relativas de cada pico. Através da comparação dos tempos de retenção e espectros de ultravioleta de cada pico foi possível observar que muitos picos existiam em todas as amostras. Estes componentes, comuns aos diferentes vinhos estudados, constituíram as variáveis que foram selecionadas para os testes de análise multivariada (análise de componentes principais e análise hierárquica de *clusters*). Através de uma análise visual dos cromatogramas pode-se também observar claras diferenças na composição relativa dos diferentes picos entre as amostras de vinhos. Estas diferenças na composição relativa dos diversos componentes das amostras foram a base para a classificação dos vinhos pelas técnicas de análise multivariadas (LUCENA, 2008).

Após ter selecionado os componentes comuns aos cromatogramas das diferentes amostras (através da comparação do tempo de retenção e espectro de ultravioleta dos picos nas diferentes amostras), a área de cada pico foi utilizada para o cálculo da sua área relativa. A área relativa de cada componente foi calculada dividindo-se a área de cada pico pela área total. A área total foi obtida através da soma das áreas individuais de todos os picos selecionados. As áreas relativas dos diversos componentes de cada amostra foram então utilizadas para a análise de componentes principais.

O Gráfico 23 mostra os escores das amostras de vinhos estudadas nos dois primeiros componentes principais calculados (Fator 2, na abscissa e Fator 1 na ordenada). O gráfico mostra que a amostra de vinho Francês (CSME) se apresenta distantes das outras amostras, assim como a amostra de vinhos nacional da marca SC da variedade Cabernet Sauvignon, o que sugere que esse dois vinhos tenham uma composição relativa diferente das outras amostras.

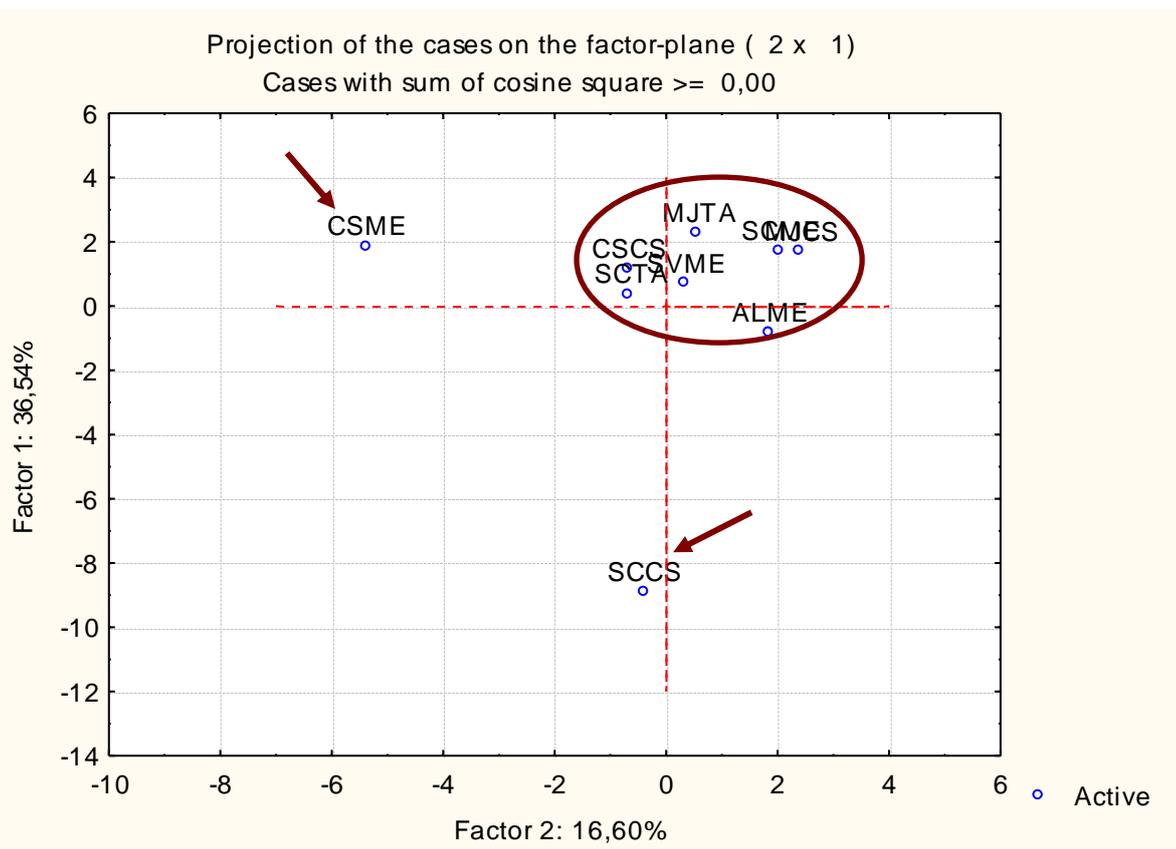


Gráfico 23 - Escores das Amostras SCME, SCCS, SCTA, SVME, ALME, MJCS, CSCS, MJTA e CSME de Vinhos Tintos do Rio Grande do Sul e 1(um Francês(CSME), nos Dois Primeiros Componentes Principais, Calculados com Base nas Áreas Relativas dos Picos Seleccionados.

O gráfico 23 mostra os valores de *loadings* que os diferentes picos seleccionados (variáveis) assumem nos dois componentes principais calculados (Fator 2 na abscissa e 1 na ordenada). Este Gráfico nos dá uma idéia de quais picos são mais importantes (têm maior peso) para o cálculo dos componentes principais (fatores). Assim, os picos com valores extremos de *loadings* (próximos a +1 ou -1) para um determinado fator, contribuem mais significativamente para a definição deste fator.

Assim, pode-se notar que os picos 4, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 19, 20, 22, 25, 26, 27, 28 e 29 assumem os valores mais positivos para o fator 1 enquanto que os picos 1, 2, 3, 7, 8, 11, 14, 18, 21, 23, 24, 30, 31, 32 e 33 assumem os valores mais negativos. Todos estes picos são assim importantes para o cálculo do primeiro componente principal. De forma análoga, os picos 2, 3, 4, 5, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27 e 30 (com valores de *loadings* positivos) e os picos 1, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 22, 23, 25, 26, 28, 31, 32 e 33 (com valores de *loadings* negativos) são importantes para a definição do fator 2.

O Gráfico 24, é extremamente útil na identificação de quais variáveis (picos no cromatograma) são responsáveis pelas diferenças em composição relativa entre as amostras dos diferentes vinhos. As variáveis, ou seja, os picos que mais variam entre amostras de vinhos diferentes contribuirão mais decisivamente para a definição dos fatores, enquanto que os picos que tiverem sua área relativa mais ou menos constante entre as diferentes amostras não contribuirão de forma decisiva para o cálculo dos fatores.

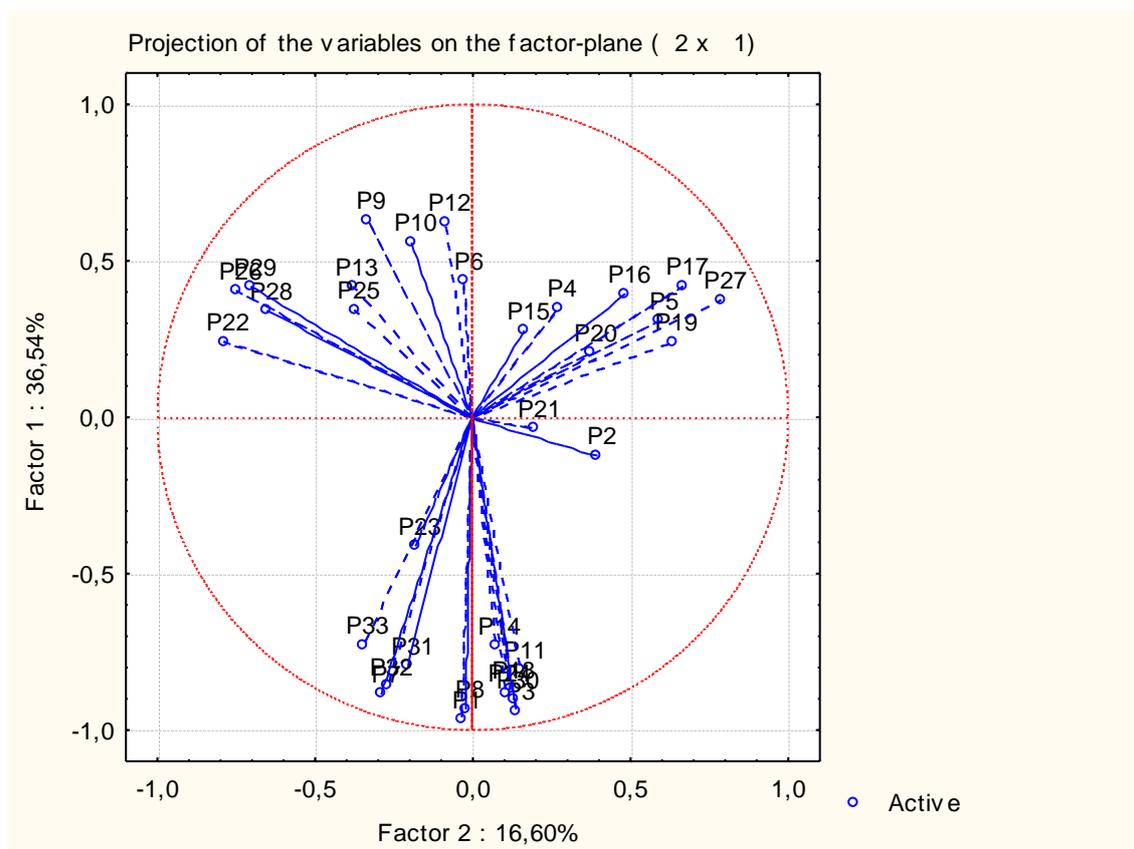


Gráfico 24 - Valores de *loadings* nos Dois Primeiros Componentes Principais Calculados dos Diferentes Componentes Seleccionados para as Amostras dos Vinhos Tintos Estudados.

A análise hierárquica de *clusters* (ou análise hierárquica de agrupamentos) é uma técnica que complementa a informação obtida através da análise de componentes principais e mostra de forma gráfica a relação de identidade entre as amostras. O Gráfico 25 mostra um dendrograma obtido a partir da análise hierárquica de agrupamentos dos dados das amostras dos vinhos tintos estudados. No dendrograma, o eixo da abcissa representa a distância euclidiana entre as amostras (uma medida da dessemelhança entre as amostras), e, portanto, amostras semelhantes em termos de sua

composição relativa tendem a se agrupar (ou seja, se unir, através das linhas verticais) próximas à extremidade esquerda, enquanto amostras muito diferentes tendem a se unir mais à direita no Gráfico.

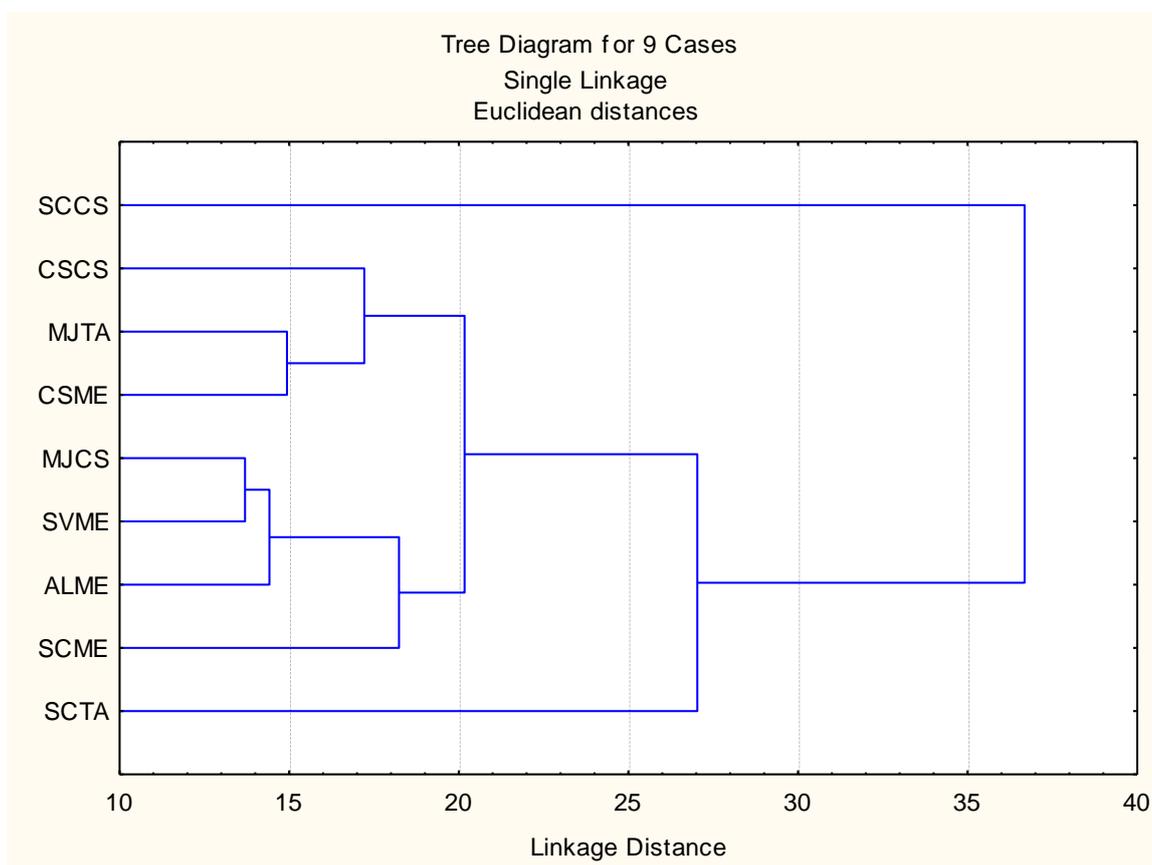


Gráfico 25 - Dendrograma Obtido a Partir da Análise Hierárquica de Agrupamentos dos Dados das Amostras dos Vinhos Tintos Estudados.

Pode-se observar que o vinho nacional da marca SC variedade Cabernet Sauvignon, aparece distante das outras amostras, assim como mostrado no gráfico 16, confirmando a variação na composição relativa desse vinho. Já o vinho CS Merlot, francês, está agrupado com o vinho MJ Tannat, mas esse agrupamento localiza-se ainda, distante da maioria das amostras.

Baseado nos cromatogramas obtidos nas corridas cromatográficas das 09 (nove) amostras de vinhos tintos do Rio Grande do Sul, nos picos mais representativos de cada cromatograma e nas áreas relativas de cada um desses picos, foi realizada a análise de componentes principais (PCA) e a análise hierárquica de *clusters* (HCA) na tentativa de determinar o tipo de vinho (variedade de uva) através do perfil cromatográfico de seus

polifenóis. Porém, tanto na análise de componentes principais quanto na análise hierárquica de *clusters*, observou-se que o perfil cromatográfico não foi capaz de separar as amostras, por variedade de uva ou marca do vinho. Na análise de componentes principais as amostras das marcas CS Merlot (francês) e SC Cabernet Sauvignon (nacional) formaram um agrupamento distinto, enquanto que o restante das amostras se agrupou. Na análise hierárquica de *clusters* pode-se observar que as amostras de vinho da variedade Merlot (nacional) são as mais próximas entre si, o que confirma o resultado obtido na análise de componentes principais, e sugere uma composição relativa parecida. A amostra de vinho da marca SC Cabernet Sauvignon é a última a se unir com as demais amostras de vinho estudadas, o que também confirma a tendência sugerida pela análise de componentes principais. Porém, não se pode classificar os vinhos pelo perfil cromatográfico.

6 – CONCLUSÕES

- A fração 2 (ACOEt pH 7.0), de todas as amostras estudadas e em todos os testes, foi a que apresentou maior atividade antioxidante e com maior concentração de fenólicos totais, um resultado semelhante aquele encontrado para os vinhos do Vale do São Francisco.
- O conteúdo de fenólicos totais dos vinhos inteiros foi comparável ao conteúdo relatado na literatura para vinhos tintos desta região, porém significativamente menor que aqueles encontrados para os vinhos do Vale do São Francisco.
- O conteúdo de antocianinas monoméricas para os vinhos estudados, foi bem superior ao dos vinhos do Vale do São Francisco, provavelmente pelo efeito de polimerização induzido pela exposição ao sol nos vinhos do Vale do São Francisco, o que levaria a uma diminuição das antocianinas monoméricas e aumento dos fenólicos totais para estes vinhos.
- As frações 1 e 3 dos vinhos estudados resultaram em uma concentração de fenólicos totais inferior às frações dos vinhos do Vale do São Francisco, o que sugere que esses vinhos tenham concentrações de antocianinas totais e ácidos fenólicos, maiores que os vinhos do Rio Grande do Sul.
- Os vinhos com maior concentrações de *cis* e *trans*-resveratrol e quercetina foram respectivamente CSCS (10,73µg/mL), CSME (1,46µg/mL) e CSME (4,71µg/mL). Nota-se uma concentração bem superior de *cis* à de *trans*-resveratrol em todos os vinhos estudados, um resultado que confirma estudos anteriores com vinhos da região Sul do país.
- Não houve diferença estatística entre o vinho importado e os correspondes brasileiros, em relação a fenólicos totais e testes antioxidantes.
- Não foi possível classificar os Vinhos em relação a sua variedade ou vinícola através do perfil cromatográfico utilizando técnicas de análise multivariada como a análise de componentes principais ou análise hierárquica de agrupamentos, sugerindo uma composição qualitativamente similar destes vinhos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCALDE-EON, C.; ESCRIBANO-BAILÓN, M. T.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing. A comprehensive study. **Analytica Chimistry**, Acta v.563, p. 238–254, 2006.

ALVES, A. O. Presença de trans-resveratrol em geléias de uva e sua relação com a radiação UV. 142 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, **Universidade Federal de Santa Maria**, Santa Maria, 2006.

AMARANTE, J. O. A. Vinhos e vinícolas do Brasil. **Summus Editorial**, São Paulo, 167p. 1986.

AMERINE, M. A.; OUGH, C. S. Methods for analysis of musts and wines. 2 edição, **Ed. Willy Interscience**, New York, 377p, 1980.

AMERINE, M. A.; BERG, H.W.; CRUESS, W. V. The technology of wine making. **AVI Publishing company**, Inc., Westport, 1967, 799p.

ANVISA.Res.nº899/2003.www.anvisa.gov.br/medicamentos/bioequivalencia.
Acessado em 28 de janeiro de 2009.

ARAPITSAS, P; ANTONOPOULOS, A.; STEFANO, E.; DOURTOGLOU, V. G. Artificial aging of wines using oak chips. **Food Chemistry**, v.86, p.563-570, 2004.

ARICHI, H.; KIMURA, Y.; OKUDA, H.; BABA, K.; KOZAWA, M.; ARICHI, S. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* on lipid metabolism. **Chemistry Biochemical Pharmacology. Bult** . v. 30, n. 5, p. 1766-1770, 1982.

ARLORIO, M.; LOCATELLI, M.; TRAVAGLIA, F.; COISSON, J. D.; DEL GROSSO, E.; MINASSI, A.; APPENDINO G. & MARTELLI, A. Roasting impact on the contents of clovamide (*N*-caffeoyl-*L*-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). **Food Chemistry**, v. 106, n.3, p. 967-975, 2008

ARUOMA, O. I. *et al.* Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations. **Food Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 149-156, 1997.

BAUR, J. A.; PEARSON, K. J.; PRICE, N. L.; JAMIESON, H. A. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**. Vol. 444, 2006.

BAHORUN, T.; LUXIMON-RAMMA, A.; CROZIER, A. & ARUOMA, O. I. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. **Journal of Science Food Agricultural** v.84, p.1553-1561, 2004.

BLASI, T. C. Análise do consumo e constituintes químicos de vinhos produzidos na Quarta Colônia de imigração italiana no Rio Grande do Sul e sua relação com as frações lipídicas sanguíneas. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. **Universidade Federal de Santa Maria**, RS. 2004.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F.; **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2004, 52, 5195.

BRAVO, A. E. Resveratrol in wine: contribution to potential cardiovascular protective activity. **Alimentaria**, v.269, p.71-72, 1996.

BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C. F. Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. **Food Chemistry**, Great Britain, v. 58, n.1-2, p. 103-109, 1997.

BROUILLARD, R.; DUBOIS, J. E. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 99, n. 5, p. 1359-1364. 1977.

CABRITA, L.; FOSSEN, T.; ANDERSEN, O. M. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. **Food Chemistry**, Great Britain, v. 63, n. 4. p. 435-440, 2000.

CALVI, J. P.; FRANCIS, F. J. Stability of concord grape (*V. labrusca*) anthocyanins in model systems. **Journal of Food Science**, [S. l.], v. 43, n. 5, p. 1448-1456. 1978.

CAMARGO, U. A. Tecnologia vitícola: novas variedades. In: ZANUS, M. C. et al. (eds.). **Congresso Brasileiro de Viticultura E Enologia**, 10, 2003, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. p. 127-128.

CAMPOS, M. G.; WEBBY, R. F.; MARKHAM, K. R.; MITCHELL, K. A. & DA CUNHA, A. P. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 742-745, 2003.

CANTOS, E.; ESPIN, J. C.; TOMÁS-BARBERAN, F. A. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivares studied by LC-DAD-MS-MS. **J. Agr. Food Chemistry**, v.50, p.5691-5696, 2002.

CATALUNÃ, E. As uvas e os vinhos. **Editora Globo**. 3 ed., 1991, 140p.

CATALUNÃ, E. As uvas e os vinhos. 2. ed. Rio de Janeiro: **Globo**, 1988. 207 p.

COUNET, C.; CALLEMIEN, D.; COLLIN, S. Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. **Food Chemistry**, v.98. p.649-657,2006.

CURRENT PROTOCOLS IN FOOD ANALYTICAL CHEMISTRY, **Editora: John Wiley and Sons, Inc.**, RONALD E. WROLSTAD (Editor in Chief), 2006.

DAUDT, C. E. Aspectos bioquímicos, sensoriais e aspectos ligados à saúde humana dos taninos do vinho. In Anais do Seminário Franco-Brasileiro de Viticultura enologia e gastronomia, **EMBRAPA CNPUV**, Bento Gonçalves,

p.103-106, 1998.

DAUDT, C. E. & POLENTA, G. Phenols from Cabernet sauvignon and Isabel musts submitted to several treatments. **Journal of Science and Technology Tonnellerie**, v.5, p.57-64, 1999.

DI MAMBRO, V. M.; MARQUELE, F. D.; FONSECA, M. J. V. Avaliação *in vitro* da ação antioxidante em formulações antienvhecimento. **Cosmetics & Toiletries** (edição em português), v. 17, n. 4, p. 74-78, 2005.

DIXON, J. B.; DIXON, M. E. & O'BRIEN, P. E. Reduced plasma homocysteine in obese red wine consumers: a potential contributor to reduced cardiovascular risk status. **Europe Journal of Clinical Nutrition**, v.56, p.608-614, 2002.

DOMINGUEZ, D.; GUILLÉN, D. A.; BARROSO, C.G. Automated solid-phase Extraction for sample preparation followed by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for analysis of resveratrol derivatives in wine. **Journal of Chromatography A**, v.918, p.303-310, 2001.

DONOVAN, J. L.; WATERHOUSE, A. L.; Bioavailability of flavanol monomers, in: Rice-Evans, C.; Packer, L.. *Flavonoids in Health and disease*, New York, **Marcel Dekker**, 2003, p.413-440.

DUEÑAS, M.; FULCRAND, H.; CHEYNIER, V. Formation of anthocyanin-flavanol adducts in model solutions. **Analytica Chimica Acta** v. 563 p.15-25, 2006.

ECHEVERRY, C.; FERREIRA, M.; REYES-PARADA, M.; ABIN-CARRIQUIRY, J.A.; BLASINA, F.; GONZÁLVEZ-NEVES, G.; DAJAS, F. Changes in antioxidant capacity of Tannat red wines during early maturation. **Journal of Food Engineering**. v.69, p.147-154, 2005.

EIGENBRODT, M. L.; FUCHS, F. D.; COUPER, D. J.; GOFF, D. C.; SANFORD, C.; HUTCHINSON, R. G.; BURSAC, Z. Changing drinking pattern does not influence health perception: a longitudinal study of the atherosclerosis risk in

communities study. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v.60, n.4, p.345-350, 2006.

EMBRAPA – UVA E VINHO: www.cnpuv.embrapa.br. Acessado em 28 de fevereiro de 2009.

ESPÍN, J. C. *et al.* Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 48, n. 5, p. 1588-1592, 2000.

ES-SAFI N-E.; CHEYNIER V.; MOUTOUNET M. Effect of copper on oxidation of (+)-catechin in a model solution system. **Journal of Food Science & Technology**. v.38, n.2, p.153-163, 2003.

ESTRUCH, R. Wine and cardiovascular disease. **Food Research International** . v.33, p.219-226, 2000.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A.; ALMELA, L.; MUÑOZ, J. A.; HIDALGO, V.; CARREÑO, J. Dependence between colour and individual anthocyanin content in ripening grapes. **Food Research International**, [S. l.], v.31, n.9, p. 667-672, 1998.

FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; VILLAÑO, D.; GARCÍA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. **Analytica Chimica ACTA.**, v.513, p.113-118,2004.

FRANKEL, E. N.; KANNER, J.; GERMAN, J. B.; PARKS, E. & KINSELLA, J. E. Inhibition of human low density lipoprotein by phenolic substances in red wine. **Lancet.**, v.341, p. 454-457, 1993.

FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L. & TEISSEDE, P. L. Principal phenolic phytochemical in selected California Wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 890-894, 1995.

FRANKEL, E.N.; BOSANEK, C.A.; MEYER, A.S.; SILLIMAN, K.; KIRK, L.L. Commercial grape juice inhibits the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 834-838, 1998.

FREITAS, D. M. Variação dos compostos fenólicos e cor dos vinhos de uvas(*vitis vinífera*) tintas em diferentes ambientes. Tese de doutorado em Agronomia da **Universidade Federal de Santa Maria/RS, 2006.**

GALVÃO, S. A cozinha e seus vinhos: receitas rápidas com muita classe. 2º Ed. **Editores SENAC: São Paulo, 1999.**

GAULEJAC, N. S. C.; GLORIES, Y. & VIVAS, N. Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines. **Food Research International**, v.32, p. 327-333, 1999.

GERMAN, J. B. & WALZEM, R. L. The health benefits of wine. **Annual Reviews of Nutrition**, n.20, p.561-593, 2000.

GHISELLI, A.; NARDINI, M. & SCACCINI, C. Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated from an Italian Red Wine. . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n.2, p. 361 -367, 1998.

GODOY, H.; Vinho nacional traz compostos que são benéficos à saúde. **Jornal da UNICAMP – 2007**

GOLDBERG, D. M.; KARUMANCHI, A.; TSANG, E; SOLEAS, G. J. - Catechin and epicatechin concentrations of red wines: regional and cultivar-related differences. **About American Journal of Enology and Viticulture**, 49: 23-33, 1998.

GOLDSCHMIDT, S.; RENN, K., **Chemische Berichte**, v. 55, p. 628-643, 1922.

GULCIN, I.; SAT, I. G.; BEYDEMIR, S.; ELMASTAS, M. & KUFREVIOGLU, O. I. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). **Food Chemistry**, v. 87, n. 3, p. 393-400, 2004.

HANSEN, J., NAZARENKO, L., RUEDY, R., WILLIS, A.: Earth's energy imbalance: Confirmation and implications. **Science**, 308, 1431-1435, 2005.

HILLIS, W. E. *et. al.*. Polyphenols of *Eucalyptus sideroxylon*. **Phytochemistry (Oxford)**, v. 13, n. 8, p. 1591-1595, 1974.

HOWITZ, K. T.; BITTERMAN, K. J.; COHEN, H. Y.; LAMMING, D. W. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature**. Vol. 425, p. 191-196, 2003.

IKAWA, M.; SCHAPER, T. D.; DOLLARD, C. A.; SASNER, J. J.; **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 2003, 51, 1811.

IONITA, P. Is DPPH Stable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen Active Species?. **Chemical Papers**, v. 59, n. 1, p. 11-16, 2005.

JACKMAN, R. L. e SMITH, J. L. **Anthocyanins and betalains**. In: HENDRY, G. A. F. e HOUGHTON, J. D. **Natural Food Colourants**. London: Academic Blackie. 1992, p. 183-241.

JACKSON, R. S. **Wine Science: principles and applications**. San Diego, Ed. Academic Press, Inc., 475, 1994.

JAVANMARDI, J.; STUSHNOFF, C.; LOCKE, E. & VIVANCO, J.M. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food Chemistry**, v. 83, n. 4, p. 547-550, 2003.

KOVAC V., ALONSO E., BOURZEIX M., REVILLA E. Effect of several enological practices on the content of catechins and proanthocyanidins of red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1992;40:1953-1957.

LACHMAN, J.; SULC, M. & SCHILLA, M. Comparison of the total antioxidant status of Bohemian wines during the wine-making process. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 802-807, 2007.

LANGCAKE, P.; PRYCE R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v9, p. 77-86, 1976.

LANDRAULT, N. *et al.* Antioxidant capacities and phenolics levels of french wines from different varieties and vintages. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 49, n. 7, p. 3341-3348, 2001.

LECAS, M. e BRILLOUET, J. M. Cell wall composition of grape berry skins. **Phytochemistry**, Great Britain, v.35, n. 5, p. 1241-1243, 1994.

LÓPEZ, M. , MARTÍNEZ, F.; DEL VALLE, C.; ORTE, C.; MIRO, M. Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.922, p.359–363, 2001.

LOPEZ-VELEZ, M., MARTINEZ-ARTINEZ, DELL VALLE-RIBES, C. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 43(3):233-244, 2003.

LUCENA, A. P. S. Determinação da Atividade Antioxidante de Vinhos Tintos da Região do Vale do São Francisco. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – **Universidade Federal da Paraíba**, 2008.

LUXIMON-RAMMA, A.; BAHORUN, T.; CROZIER, A.; ZBARSKY, V.; DALTA, K. P.; DEXTER, D. T.; ARUONA, O. I. Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas. **Food Research International**, v.38, n.4, p. 357-367, 2005.

MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S. & SALUNKHE, D. K. Food antioxidants: Technological, toxicological, and health perspectives. 10 edição, New York, **Ed. Marcel Dekker**, p. 490, 1996.

MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in foods. In: MARKAKIS, P. (Ed.) Anthocyanins as Food Colors. New York: **Academic Press**, 1982, p. 163-180.

MAZZA , G. e MINIATI, E.; Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. Boca Raton, Florida (USA): **CRC Press**. 1993, 362p.

MELLO, L. M. R. Produção e comercialização de uvas e vinhos em 2005. **Embrapa – Uva e vinho**, 2006.

MONAGAS, M.; BARTOLOMÉ, B.; GOMEZ-CORDOVÉZ, C. evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle. II. Non-anthocyanin phenolic compounds. **European Food Research and Technology**, v.220 p.331–340, 2005.

MULLINS, M. G.; BOUQUET, A.; WILLIAMS, L. E. Biology of the grape. Cambridge. **United Kingdon Cambridge e University Press**, 2002, 239p.

NACZK, M.; SHAHIDI, F.; **Journal of Chromatography A**, 2004, *1054*, 95.

NAISSIDES, M.; MAMO, J. C. L.; JAMES, A. P.; PAL, S. The effect of acute red wine polyphenol consumption on postprandial lipaemia in postmenopausal women. **Atherosclerosis**, v.177, p. 401-408, 2004.

NETZEL, M., STRASS, G., BITSCH, I., KÖNITZ, M., CHRISTMANN, M. BITSCH, R. - Effect of grape processing on selected antioxidant phenolics in red wine. **Journal of Food Engineering**,56:223-228, 2003.

NIGIDIKAR, S. V.; WILLIAMS, N. R.; GRIFFIN, B. A.; HOWARD, A. N. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. **Americam Journal of Clinical Nutrition**, v.68, p. 258-265, 1998.

ORRALO, F.; ALVAREZ, E.; CAMINA, M.; LEIRO, J. M.; GOMEZ, E. & FERNANDEZ, P. The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. **Molecular Pharmacology**, v.61, p.294-302, 2002.

PACHECO, A. O. & SILVA, S. H. Iniciação a Enologia. **Editora SENAC**. São Paulo, 1995.

PADILLA, E.; RUIZ, E.; REDONDO, S.; GORDILLO-MOSCOSO, A.; SLOWING, K. & TEJERINA, T. Relationship between vasodilation capacity and Phenolic Content Of Spanish wines. **European Journal of Pharmacology**, v.517, p.84-91, 2005.

PAIXÃO, N.; PERESTRELO, R.; MARQUES, J. C. & CÂMARA, J. S. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. **Food Chemistry** v. 105, p. 204–214, 2007.

PASSOS, R., et al. - A saúde vem embalada em garrafas de vinho. **Ciência Hoje 7** , 2001.

PAYET, B.; SING, A.S.C. & SMADJA, J. Comparison of the concentrations of phenolic constituents in cane sugar manufacturing products with their antioxidant activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7270-7276, 2006.

PIETTA, P; SIMONETTI, P; MAURI, P. Antioxidant activity of selected medicinal plants. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 46, n. 11, p. 4487-4490, 1998.

PORTER, M. Vantagens Competitivas. **Editora Campus**. Rio de Janeiro. 1989.

PORTER, M. Estratégias Competitivas. **Editora Campus**. Rio de Janeiro. 1986.

PRICE, S. F.; BREEN, P. J.; VALLADAO, M.; WATSON, B. T. Cluster sun exposure and quercetin in Pinot nois grapes and wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.46, p.187-194, 1995.

PROTAS, J. F. da S.; CAMARGO, U. A.; MELO, L. M. R. de. A viticultura brasileira: realidade e perspectivas.Referência internet <http://www.cnpuv.embrapa.br/vitivini.html>, acessado em 2002.

PUKALSKAS, A. *et al.* Identification of radical scavengers in sweet grass (*Hierochioeodorata*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. n. 50, p. 2914-2919, 2002.

RATNA, W. N.; SIMONELLI J. A. The action of dietary phytochemicals quercetin, catechin, resveratrol and na ringenin on estrogen-mediated gene expression. **Life Sciences**. V.70, p. 1577-1589, 2002.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M. & RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RENAUD, S. & LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary Herat disease. **Lancet.**, v. 339, p. 1523-1526, 1992.

RENAUD, S. C.; GUEGUEN, R.; SIEST, G. & SALAMON, R. Wine, beer and mortality in middle-aged men from eastern France. **Archives of Internal Medicine**, V. 159, p. 1865-1870, 1999.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y. La tipicizzazione dei vini rossi: caratteri chimici ed organolettici. **L'Enotecnico**, Milano, v.22, n.5, p.545-552, 1986.

RUBERTO, G.; RENDA, A.; DAQUINO, C.; AMICO, V. SPATAFORA, C.; TRINGALI, C. & DE TOMMASI, N. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 203-210, 2007.

SAUCIER, C.; LITTLE, D.; GLORIES, Y. First evidence of acetaldehyde-flavanol condensation products in red wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.48, p.369-373, 1997.

SAUTTER, C. K. et al. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 437-442, 2005.

SCALBERT, A. & WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols, **Journal of Nutrition**, v.130, p. 2073S-2085S, 2000.

SHAHID, F.; JANITHA, P. K. & WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.130, p.2073S-2085S, 1992.

SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; LINS, A. C. S.; BARBOSA, J. M.; SILVA, E. M. S.; FREITAS, B. M. & SANTOS, F. A. R. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6-7, p. 507-511, 2006.

SINGLETON, V.L. Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines and model systems: observations and practical implications. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 38, p. 69-77, 1987.

SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Resveratrol: A molecule whose time has come? And Gone? **Clinical Biochemistry**, v.30, n.2, p.91-113, 1997.

SOOBRAATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I. & BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research**, p. 579, 2005.

SOUTO, A. A.; CARNEIRO, M. C.; SEFERIN, M.; SENNA, M. J. H.; CONZ, A. & GOBBI, K. Determination of trans-resveratrol concentrations in Brazilian Red Wines by HPLC. **Journal of Food Composition And Analysis**, v.14, n. 4, p. 441-445, 2001.

STERVBO, U.; VANG, O.; BONNESEN, C. A review of the content of putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. **Food Chemistry**. 101(2007) 449-457.

STIVALA, L. A.; SAVIO, M.; CARAFOLI, F.; PERUCCA, P.; BIANCHI, L.; MAGA, G.; FORTI, L.; PAGNONI, U. M.; ALBINI, A.; PROSPERI, E.; VANNINI, V. Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. **Journal Biological Chemistry**, v.276, p.22586-22594, 2001.

STRINGHETA, P. C. Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocianinas extraídas da inflorescência de capim gordura (*Melinis minutiflora*, Pal de Beauv). 1991. 138f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, **Universidade Estadual de Campinas**, São Paulo.

STEWART, J. R.; CHRISTMAN, K. L.; O'BRIAN, C. A. Effects of resveratrol on the autophosphorylation of phorbol ester-responsive protein kinases: Inhibition of protein kinase D but not protein kinase C isozyme autophosphorylation. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, n. 9, p. 1355-1359, 2000.

TAPIERO, H.; TEW, K. D.; BA, G. N.; MATHÉ, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomedical Pharmacotherapy**.56(4): 200-7, 2002.

TEDESCO, I.; RUSSO, M.; RUSSO, P.; IACOMINO, G.; RUSSO, G. L.; CARRATURO, A.; FARUOLO, C.; MOIO, L. & PALUMBO, R. Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, p. 114- 119, 2000.

TEISSEDRE, P.L. & LANDRAULT, N. Wine phenolics: contribution to dietary intake and bioavailability. **Food Research International**, v. 33, p.461-467, 2000.

VEDANA, M. I. S. Efeito do processamento na atividade antioxidante da uva. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos da **Universidade Federal do Paraná/PR**, 2008.

VILLERS, A. de; MAJEK, P.; LYNEN, F.; CROUCH, A. LAUER, P. SANDRA, P. Classification of South African red and white wines according to grape variety

based on the non-colored phenolic content. **European Food Research and Technology**, v.221, p. 520-528, 2005.

VITRAC, X.; BORNET, A.; VANDERINDE, R.; VALLS, J. Determination of stilbenes in brazilian wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2005, 53(14), 5664-5669.

VIVAS, N. Maturação fenólica: adaptação da vinificação à composição fenólicas de uvas tintas finas. In Anais do Seminário Franco-Brasileiro de Viticultura enologia e gastronomia, **EMBRAPA CNPUV**, Bento Gonçalves, p.67-76, 1998.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. Major flavonoids in grape seeds and skins: Antioxidants capacity of catechin, epicatechin and gallic acid. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.52, p.255-260, 2004.

WORARATPHOKA, J.; INTARAPICHET, K. & INDRAPICHATE, K. Phenolic compounds and antioxidative properties of selected wines from the northeast of Thailand. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1485–1490, 2007.

WROLSTAD, R. E. **Colors and pigment analysis in fruit products**. Corvallis: Oregon Agricultural Experimental Station, 1976.

ZHAO, H.F.; DONG, J.J.; LU, J.; CHEN, J.; LI, Y.; SHAN, L.J.; LIN, Y.; FAN, W. & GU, G.X. Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7277-7286, 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)