

Eliana Fortes Gris

**Perfil fenólico e atividades antioxidante e hipolipemiante de vinhos
de variedades *Vitis vinifera* cultivadas em São Joaquim - SC - Brasil**

Florianópolis

2010

Eliana Fortes Gris

Perfil fenólico e atividades antioxidante e hipolipemiante de vinhos de variedades *Vitis vinifera* cultivadas em São Joaquim - SC - Brasil

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Marilde T. Bordignon Luiz

Co-orientadora: Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa

Florianópolis

2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

G869p Gris, Eliana Fortes
Perfil fenólico e atividades antioxidante e
hipolipemiante de vinhos de variedades Vitis
vinifera cultivadas em São Joaquim - SC - Brasil
[tese] / Eliana Fortes Gris; orientadora, Marilde
Terezinha Bordignon Luiz. - Florianópolis, SC, 2010.
157 p.: il., grafs., tabs., mapas

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos alimentos. 2. Uva - Cultivo - São
Joaquim (SC). 3. Vinhos. 4. Fenóis. 5.
Antioxidantes. 6. Atividade hipolipemiante. I. Luiz,
Marilde Terezinha Bordignon. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Ciência dos Alimentos. III. Título.

CDU 663

**Perfil fenólico e atividades antioxidante e hipolipemiante de
vinhos de variedades *Vitis vinifera* cultivadas em São Joaquim -
SC - Brasil**

Por

Eliana Fortes Gris

Tese aprovada como requisito final para a obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pela comissão formada por:

Presidente:

Profª. Dra. Marilde T. Bordignon Luiz (UFSC)

Membro:

Profª. Dra. Helena Teixeira Godoy (UNICAMP)

Membro:

Dr. Jean Pierre Rosier (Epagri)

Membro:

Dr. Celito Crivellaro Guerra (EMBRAPA)

Membro:

Profª. Dra. Rozangela Curi Pedrosa (UFSC)

Membro:

Prof. Dr. José Afonso Voltolini (UFSC)

Coordenadora:

Profª. Dra. Renata Dias de Mello Castanho Amboni (UFSC)

Florianópolis, 15 de julho de 2010.

À minha mãe e meu anjo, Leocy.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre.

À minha família, especialmente aos meus pais, Leocy e Servino, pela vida, pelo imenso amor e incansável apoio; aos meus irmãos, Cristiane, Maurício e Daniel, e à minha prima Elissandra, que sempre estiveram presentes, mesmo quando estavam distantes, pelo amor, amizade e apoio; e finalmente ao Eduardo, meu amor, meu amigo, meu companheiro, agradeço por tudo, por escolher fazer parte da minha vida, pelo inestimável apoio e principalmente pelo amor dedicado a mim.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marilde T. Bordignon Luiz, por ter me dado a oportunidade de iniciar, alguns anos atrás, a minha vida na pesquisa científica, por ter me orientado, acreditado e confiado em mim, por ter me dado a liberdade de escolhas e ainda por todos os ensinamentos nesses anos de convívio.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa, por ter me oferecido a oportunidade de desenvolver parte de meu projeto em seu laboratório, me proporcionando assim novos e preciosos conhecimentos; agradeço ainda pelos ensinamentos e pelo apoio em todos os momentos.

Ao Prof. Danilo Wilhem Filho pela disponibilização de seu laboratório para realização de parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva, pela amizade, disponibilidade e pelo apoio na realização deste trabalho.

Ao Dr. José Afonso Voltolini, agradeço imensamente por te me indicado ao Dr. Fulvio Mattivi, me proporcionando assim, uma experiência profissional e pessoal imensurável.

Ao Prof. Dr. Paulo Ogliari pelas preciosas ajudas nas análises estatísticas.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro no Brasil e na Itália.

À Universidade Federal de Santa Catarina e Fundação Edmund Mach - Instituto Agrário San Michelle all'Adige pela oportunidade concedida de aprimorar minha formação profissional.

À Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina – Epagri – pelo apoio técnico, em especial ao Pesquisador Emilio Brighenti, pela atenção e auxílio sempre dispensados a mim, e ao Dr. Hamilton JustinoVieira pela ajuda com os dados climáticos.

Aos componentes da banca examinadora pelas considerações e disponibilidade.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos: Ana Paula Falcão, Sabrina Sartor, Eduardo Chaves, Nei Carlos Santin, Isabelle Prudêncio, Cony Gauche, Thays Tomasi, Priscila Rossa, Nayla Lima, Lúdia Picini, Stefany Arcari, Estela de Sá, Isabella e Clara, obrigada pelos bons momentos e aprendizados compartilhados; em especial agradeço à Vívian Burin, por inúmeros motivos, mas sobretudo pela preciosa ajuda na realização de parte deste trabalho e pela disponibilidade sempre prestada a mim, e à Leila Falcão, por tudo, principalmente pelo apoio em todos os momentos deste trabalho.

Devo agradecer ainda aos colegas dos Laboratórios de Bioquímica Experimental que me acolheram com tanta presteza e simpatia: Eduardo Benedetti, Luiz Weise, Karina Felipe, Aline Pereira e Tânia Günther, e especialmente ao Eduardo Ferreira pelo incansável apoio e auxílio nas análises bioquímicas.

Às minhas amigas que adoro tanto, Ana Paula e Leila Falcão, agradeço de coração por tudo, por toda a ajuda, profissional e pessoal, pelo carinho, pela inestimável amizade, pelo companheirismo e por todos os momentos passados juntas.

Agradeço também a todos os amigos que me acompanham sempre, em especial às pessoas maravilhosas que eu encontrei neste período, Kétner Ribeiro, um dos meus anjos na Itália, que me proporcionou o privilégio de conhecer pessoas especiais como Ana Paula Nogueira, Hugo Vares e Patrícia Silveira, a todos vocês, meus amigos, muito obrigada pela amizade, pela acolhida, e pelos momentos maravilhosos passados no velho mundo. Agradeço imensamente à amiga Sabrina, em especial pelas suas preciosas indicações, que me possibilitaram conhecer essas pessoas ímpares.

Em especial agradeço também à Flávia Maia Moreira, pela ajuda indispensável dedicada a mim durante toda minha estada em San Michelle all'Adige, por estar disponível em todas as horas, o meu muito obrigada.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelos bons momentos juntos, pela cooperação e disponibilidade, em especial agradeço ao Sérgio, Carlos e Bento.

Desidero ringraziare tantissimo il dott. Fulvio Mattivi, per l'opportunità di svolgere il mio stage nel suo laboratorio, e soprattutto per avermi accolto in maniera così speciale, per la disponibilità, insegnamenti, attenzione, esempio di professionalità e per l'appoggio che mi ha dato in tutti i momenti. La mia sincera gratitudine e profondo rispetto.

Non posso fare a meno di ringraziare anche la dott.ssa Urska Vhrovsek di tutto, per gli insegnamenti, la dedicazione e pazienza, amicizia, affetto e sensibilità in tutti i momenti, e nondimeno per il suo dono di trasformare i momenti trascorsi insieme ancora più piacevoli con la sua immensa gioia e simpatia. Il mio speciale riconoscimento.

Vorrei ancora ringraziare tutti i colleghi italiani: Emanuela Betta, Silvia Lorenzi, Carla Sanchez, Silvia Carlin, Luana Bontempo, Eugenio Aprea e Pietro Franceschi, grazie per i momenti piacevoli trascorsi insieme e per la cordialità. A Domenico Masuero e Mattia Gasperotti, grazie principalmente per l'ausilio e disponibilità ad aiutarmi, sottolineando i momenti che mi hanno insegnato a lavorare con "la massa". Infine, un grazie speciale a Daniele Perenzoni, il mio grande e "costretto" insegnante d'italiano, anche a lui vorrei esprimere la mia sincera gratitudine per tutto, l'attenzione, la continua disponibilità e prontezza ad aiutarmi sempre, l'indimenticabile simpatia e per le tante risate fatte insieme.

Il mio pensiero va anche ad alcune care persone che ho incontrato durante questo soggiorno in Italia, Claudia Fontanari, Tiziana Gramazio, Roberta Butterini, Federico Huez, Serena, Franca Ghidoni e Marco Venturini, grazie per i bei momenti passati insieme, e ancora per i preziosi valori culturali trasmessi, così come "le ricche lezioni gastronomiche italiane".

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Neste estudo avaliou-se a adaptação das variedades Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese e Syrah, safras 2006 e 2007, implantadas em São Joaquim-SC - Brasil, uma nova região produtora de vinhos no sul do Brasil, através do monitoramento da fenologia das videiras e da maturação dos frutos. Realizou-se também a caracterização química dos principais compostos fenólicos, flavonóides (flavonóis, antocianinas, flavan-3-óis) e não flavonóides (ácidos hidroxicinâmicos, ácidos hidroxibenzóicos, estilbenos e tirosol), bem como a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* e hipolipemiante *in vivo* dos respectivos vinhos; e a correlação entre o conteúdo fenólico e as atividades biológicas. A fenologia foi avaliada através do monitoramento das principais fases fenológicas. A maturação das uvas foi avaliada através das análises de pH, acidez total, sólidos solúveis totais, antocianinas totais e polifenóis totais. A composição fenólica dos vinhos foi realizada através de HPLC-DAD e/ou HPLC-DAD-MS. A atividade antioxidante *in vitro* dos vinhos foi avaliada contra os radicais DPPH e ABTS, e pela inibição da peroxidação lipídica (TBARS). A atividade antioxidante e hipolipemiante *in vivo* foram avaliadas em camundongos após 30 dias de consumo de vinho. A partir do plasma foram verificados a capacidade antioxidante total do plasma (FRAP) e os níveis lipídicos e a partir do fígado avaliaram-se a peroxidação lipídica (TBARS), a carbonilação de proteínas (PC), os níveis de glutatona reduzida (GSH), e a atividade de enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx). O monitoramento da fenologia mostrou que o ciclo fenológico de brotação até a colheita ocorreu entre 191 e 219 dias exigindo um requerimento térmico entre 1.161 e 1.340 graus-dias. Os resultados do monitoramento da maturação mostraram que as variedades de uvas apresentaram características típicas de uma boa maturação. O conteúdo dos compostos fenólicos quantificados nos vinhos foi considerado adequado e de acordo com dados da literatura para vinhos finos de qualidade. O conteúdo de flavan-3-óis livres revelou que a catequina e epicatequina foram os dois principais monômeros, e a PA B1 o principal dímero; o grau médio de polimerização das PAs, percentagem de prodelfinidinas e de galoilação variaram entre 4,9-9,8; 30,5-41,3 e 1,4-2,4, respectivamente. Os principais flavonóis presentes nos vinhos foram a quercetina e a miricetina. Entre as antocianinas a malvidina foi a predominante, e, em geral, as aciladas apresentaram-se em maiores

concentrações que as cumáricas. Os ácidos hidroxicinâmicos conjugados foram predominantes nos vinhos e as maiores concentrações foram do ácido *trans*-caftárico. Em relação aos ácidos hidroxibenzóicos, o ácido gálico foi o majoritário, representando, em média 76% do total dos ácidos hidroxibenzóicos quantificados. As análises revelaram vinhos com significativos conteúdos de tirosol e estilbenos monômeros, predominando as formas glicosiladas, e dos isômeros *trans* sobre os *cis*. Os vinhos apresentaram efetiva ação contra os radicais DPPH e ABTS, como também inibiram a peroxidação lipídica *in vitro*. O monitoramento da atividade antioxidante *in vivo* revelou que o consumo de vinhos promoveu, de modo geral, um aumento na capacidade antioxidante nos animais, verificado pelo aumento nos níveis de FRAP, diminuição dos níveis dos índices de TBARS, PC, e da atividade das enzimas SOD, CAT e GPx. O consumo de vinhos reduziu significativamente a hipercolesterolemia, a hipertrigliceridemia, e o índice aterogênico e aumentou os valores de colesterol HDL. Significativas correlações foram verificadas entre os efeitos benéficos do consumo de vinhos e o conteúdo dos compostos fenólicos quantificados, demonstrando a importante atividade biológica desses compostos. Os resultados sugerem que São Joaquim possui potencial para a produção de vinhos finos de qualidade.

Palavras-chave: Uvas e vinhos *vitis vinifera*; compostos fenólicos, atividade antioxidante, atividade hipolipemiante.

ABSTRACT

This study investigated the adaptation of *Vitis vinifera* Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese and Syrah in two consecutive vintages (2006 and 2007) in São Joaquim, Santa Catarina State, Brazil, a new grape growing region at southern Brazil, by monitoring the phenology and ripening characteristics. Moreover, was carried out a chemical characterization of the main phenolic compounds of the respective wines, flavonoids (flavonols, anthocyanins, flavan-3-ols) and non-flavonoids (hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids, stilbenes and tirosol), as well the evaluation of antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* and the hypolipidemic activity *in vivo* of these wines, and the correlation between phenolic content and biological activities. The phenology was assessed by monitoring the main phases of development. In order to monitor the ripening levels of pH, total acidity, total soluble solids, total monomeric anthocyanins, total polyphenols index were analyzed. Phenolic composition was determined using HPLC-DAD and/or HPLC-DAD-MS analysis. The scavenger capacity of the wines was measured using DPPH and ABTS radicals and the lipid peroxidation by the TBARS method. The hypolipidemic and antioxidant activity *in vivo* were evaluated in mice after 30 days of wine consumption. From the plasma were checked total antioxidant capacity of plasma (FRAP) and lipid levels and from the liver were evaluated lipid peroxidation (TBARS), carbonyl protein (CP), reduced glutathione levels (GSH), and activity of antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx). The results show that the phenological cycle from budburst to harvest occurred within a frame time of 191 and 219 days and the heat summation requirements varied between 1,161 and 1,340 GDD. The results showed that these different grape varieties had typical characteristics at maturity. In general, wine phenolic content were in line with those reported in the literature from the most renowned regions of premium wine production. For flavan-3-ols, catechin and epicatechin were the two main monomers, and the proanthocyanidin (PA) B1 was the main dimer. The values for the mean degree of polymerization, and the prodelfhinidins and galloylation percentages ranged from 4.9-9.8; 30.5- 41.3, and 1.4-2.4, respectively. The main flavonols were quercetin and myricetin. Among the anthocyanins, malvidin was the predominant and, in general, the acylated were the derivatives predominant. The hydroxycinnamates (hydroxycinnamic acids conjugated) were predominant in wine samples

and the highest concentrations were obtained by *trans*-caftaric acid. Regarding hydroxybenzoic acid, gallic acid was the majority, representing on average 76% of total hydroxybenzoic acids quantified. Analyses revealed wines with significant content of stilbene monomers and tirosol; in respect to stilbenes was verified the predominance of glycosylated and *trans* forms. The wine samples demonstrated effective scavenging activity against DPPH and ABTS radicals and against lipid peroxidation *in vitro*. The wine consumption promoted a significant increasing of plasma antioxidant capacity, a decreasing in TBARS and CP levels, as well as a decreasing in CAT, SOD and GPx activities. It was also found that wine consumption reduced the hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia and atherogenic index and increased HDL cholesterol levels. In general, phenolic content of wines was positively correlated with the biological capacity promoted by wine consumption. These interesting results further support the potential of the region to produce high quality wines.

Keywords: *Vitis vinifera* grapes and wines, phenolic compounds, antioxidant activity, hypolipidemic activity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.1.** Vinhedos de variedades *Vitis vinifera* de São Joaquim-SC-Brasil. 7
- Figura 1.2.** Mapa do zoneamento agrícola da cultura de videiras *Vitis vinifera* para o Estado de Santa Catarina. 7
- Figura 1.3.** Uvas das variedades estudadas no ponto de colheita dos vinhedos de São Joaquim, SC-Brasil. 10
- Figura 1.4.** Fases do desenvolvimento da uva. 14
- Figura 1.5.** Mudanças físico-químicas durante a maturação de uvas. 16
- Figura 1.6.** Estrutura dos principais compostos flavonóides. 18
- Figura 1.7.** Estrutura dos principais compostos não-flavonóides. 19
- Figura 1.8.** Vias de geração de EROs e mecanismo de defesas enzimáticas. 29
- Figura 1.9.** Diagrama básico de um detector de diodos (DAD). 35
- Figura 1.10.** Diagrama de uma análise por espectrometria de massa. 36
- Figura 1.11.** Componentes básicos de um espectrômetro de massa. 37
- Figura 1.12.** Diagrama de um espectrômetro de massa com ionização por eletrospray (ESI). 38
- Figura 1.13.** Esquema de um analisador quadrupolo. 39

CAPÍTULO 2

- Figure 1.** Maximum, medium and minimum temperatures and the precipitation values during véraison to harvest, year 2006 and year 2007 46
- Figure 2.** Heat summation requirements (GDD: growing degree-days base 10 °C) from budburst to the main phenological periods for the varieties evaluated, vintages 2006 and 2007. 46
- Figure 3.** Number of days from budburst to the main phenological periods for the varieties evaluated, vintages 2006 and 2007. 47
-

Figure 4.	Total soluble solids (TSS - °Brix), titratable acidity (TA – g tartaric acid/100mL juice), pH, maturation index (MI = TSS/TA), total polyphenols index (TPI), total monomeric anthocyanins (TMA – mg malvidin 3-glucoside/100g grape skin) and color index (CI) evolution from véraison to harvest for Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese and Syrah grapes, for 2006 (A) and 2007 (B) vintages.	49
Figure 5.	Correspondence between TMA, TPI and CI values during grape ripening for the four varieties evaluated, for 2006 and 2007 vintages.	50
Figure 6.	Principal Components Analysis (PCA) of the analysis results of grape at harvest for 2006 (A) and 2007 vintages (B).....	52

CAPÍTULO 3

Figura 3.1.	Cromatogramas da análises de CLAE-DAD-MS dos flavan-3-óis (MS) e dos adutos floroglucinol (DAD)...	65
Figura 3.2.	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos vinhos Cabernet Franc (CF), Merlot (M), Sangiovese (Sa) e Syrah (Sy), safras 2006 (06) e 2007(07), contra os radicais DPPH, ABTS e a inibição da peroxidação lipídica (TBARS)..	72
Figura 3.3.	Análise de Componentes Principais dos flavan-3-óis livres, % P, % G, GMP, ABTS, DPPH e TBARS.....	74

CAPÍTULO 4

Figura 4.1.	Valores da capacidade antioxidante total do plasma (FRAP, TEAC μM); índice de peroxidação lipídica (TBARS; $\text{nmol mg proteína}^{-1}$), índice de carbonilação de proteínas (PC, $\text{nM mg proteína}^{-1}$) e concentração de GSH hepática ($\text{mmol mg proteína}^{-1}$) em fígados de camundongos.....	99
Figura 4.2.	Valores das atividades das enzimas catalase (CAT; $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg de prot}^{-1}$) e superóxido desmutase (SOD; $\text{U SOD mg proteína}^{-1}$) e glutatona peroxidase (GPx; $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg de prot}^{-1}$) em fígados de camundongos... ..	101

CAPÍTULO 5

Figura 5.1.	Valores da capacidade antioxidante total do plasma (FRAP, TEAC μM); índice de peroxidação lipídica (TBARS; $\text{nmol mg proteína}^{-1}$), índice de carbonilação de proteínas (PC, $\text{nM mg proteína}^{-1}$), concentração de GSH hepática ($\text{mmol mg proteína}^{-1}$) e atividade das enzimas catalase (CAT; $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg de proteína}^{-1}$) e superóxido desmutase (SOD; U SOD mg proteína^{-1}) em fígados de camundongo tratados com dieta normal e dieta hipercolesterolêmica.	123
--------------------	--	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Table 1.** Climatic parameters: minimum temperature (T_{\min}), maximum temperature (T_{\max}), medium temperature (T_{med}), thermal amplitude and temperature at 21 h (T_{21} h), wind strength (WS), photoperiod, insolation, precipitation (Precip) and evapotranspiration (ET_0) summation obtained from meteorological station at São Joaquim SC, during the budburst at harvest vintages 2006 and 2007 for varieties evaluated. 45
- Table 2.** Start dates for beginning of phenological events for the varieties evaluated (Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese and Syrah), for two consecutive vintages 2006 and 2007, in São Joaquim-SC. 47
- Table 3.** Results for berry weight (BW), total soluble solids (TSS or °Brix), titratable acidity (TA), pH, maturation index (MI), total monomeric anthocyanins (TMA), total polyphenols index (TPI), Abs 420nm, Abs 520nm, Abs 620nm, tonality (420/520 nm) and color index (CI) for grapevines at harvest for 2006 and 2007 vintages. 48

CAPÍTULO 3

- Tabela 3.1.** Regressão linear, R^2 , limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) obtidos para os padrões de flavan-3-óis livres e proantocianidinas (PAs) B1 e B2. 64
- Tabela 3.2.** Conteúdo de flavan-3-óis monômeros e dímeros, polifenóis totais (PT) e proantocianidinas totais (PROC) em amostras de vinhos. 66
- Tabela 3.3.** Composição das PAs em unidades terminais e de extensão (percentagem em mols), GMP, %P e %G das amostras de vinhos. 69

CAPÍTULO 4

- Tabela 4.1.** Conteúdo dos flavonóis determinados nas amostras de vinhos. 90
- Tabela 4.2.** Conteúdo das antocianinas e seus derivados acilados e *p*-cumáricos determinados nas amostras de vinhos. 92
-

Tabela 4.3.	Conteúdo dos ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos determinados nas amostras de vinhos.	95
--------------------	---	----

CAPÍTULO 5

Tabela 5.1.	Estilbenos monômeros e tirosol quantificados nas amostras de vinhos das diferentes variedades.....	119
Tabela 5.2.	Índices de determinação da análise de correlação linear entre o conteúdo de estilbenos e os marcadores do estresse oxidativo e os níveis lipídicos.	124
Tabela 5.3.	Valores de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL, triglicerídeos e índice aterogênico (CT/HDL) de camundongos tratados com as amostras de vinhos.....	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS= radical 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
ACP= análise de componentes principais
ANOVA= análise de variância
AT= acidez total titulável
CAT= enzima catalase
CLAE= cromatografia líquida de alta eficiência
DAD= detector de diodos
DPPH= radical 1,1- difenil-2-picrilhidrazila
ESI= ionização por eletrospray
FRAP= ferric reducing antioxidant potential
GD= graus-dias
GMP= grau médio de polimerização
GPx= enzima glutationa peroxidase
GSH= glutationa reduzida
HDL= colesterol de alta densidade
LDL= lipoproteína de baixa densidade
MDA= malonilaldeído.
MS= espectrometria de massa
PA= proantocianidinas
PC= proteína carbonilada
SC= Estado de Santa Catarina
SOD= enzima superóxido dismutase
SST= sólidos solúveis totais
TBARS= ácido tiobarbitúrico
UV= ultravioleta
VIS= visível
VLDL= lipoproteínas de ultra baixa densidade.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1	
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1.1 Importância econômica e cultural da uva e do vinho	5
1.2 A vitivinicultura no Brasil e no Estado de Santa Catarina	5
1.2.1 Região de São Joaquim	6
1.3 Aspectos botânicos de <i>Vitis vinifera</i> L.	8
1.3.1 Variedades avaliadas	9
1.4 Cultivo da videira	10
1.5 Fenologia da videira	11
1.6 A uva	12
1.6.1 Constituição da uva	12
1.6.2 Desenvolvimento da uva	13
1.6.3 Maturação das uvas	14
1.7 Compostos Fenólicos de uvas e vinhos	16
1.7.1 Compostos Flavonóides	20
<i>Flavonóis</i>	20
<i>Antocianinas</i>	21
<i>Flavan-3-óis</i>	21
1.7.2 Compostos não-Flavonóides	22
<i>Ácidos fenólicos</i>	23
<i>Estilbenos e Tirosol</i>	24
1.8 Transformações químicas dos compostos fenólicos nos vinhos	24
1.9 Efeitos benéficos do consumo de compostos fenólicos de uvas e vinhos	26
1.10 Radicais Livres, Capacidade Antioxidante e Hipolipemiante	27
1.10.1 Defesas Antioxidantes	28
1.11 Relação estrutura-atividade dos compostos fenólicos	30
1.12 Biodisponibilidade dos compostos fenólicos	32
1.13 Análises cromatográficas realizadas para caracterização dos compostos fenólicos	34
1.13.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	34
<i>Principais detectores utilizados na CLAE</i>	35
<i>Detector de Arranjos de Diodos (DAD)</i>	35
<i>Detector de Espectrometria de Massa (MS)</i>	36

CAPÍTULO 2

Phenology and ripening of <i>Vitis vinifera</i> grape varieties in São Joaquim, southern Brazil: a new South American wine growing region.....	40
ABSTRACT	41
INTRODUCTION.....	41
MATERIALS AND METHODS	42
<i>Characterization of São Joaquim – SC region</i>	42
<i>Climatic parameters</i>	43
<i>Plant material</i>	43
<i>Phenology</i>	43
<i>Grapes ripening analysis</i>	43
<i>Statistical analysis</i>	44
RESULTS AND DISCUSSION	44
<i>Climatic parameters</i>	44
<i>Phenology</i>	46
<i>Berry chemicals parameters</i>	48
CONCLUSIONS.....	52

CAPÍTULO 3

Perfil de proantocianidinas e capacidade antioxidante de vinhos <i>Vitis vinifera</i> brasileiros.....	56
RESUMO	57
1. INTRODUÇÃO	58
2 MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1 Padrões e reagentes	59
2.2 Amostras	60
2.3 Produção dos vinhos.....	60
2.4 Preparação das amostras.....	61
2.5 Composição das PAs.....	61
2.6 Análises cromatográficas	61
2.6.1 Validação do Método	62
2.7 Análises espectrofotométricas.....	62
2.8 Capacidade antioxidante in vitro.....	63
2.9 Análise Estatística	63
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.1 Validação do Método	63
3.2 Composição de flavan-3-óis livres	64
3.3 Composição das proantocianidinas (PAs).....	68

3.4 Capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	71
4 CONCLUSÃO	76

CAPÍTULO 4

Caracterização fenólica e atividade antioxidante <i>in vivo</i> de vinhos <i>Vitis vinifera</i> de São Joaquim - SC - Brazil	77
RESUMO	78
1. INTRODUÇÃO	79
2 MATERIAL E MÉTODOS	81
2.1 Padrões e reagentes	81
2.2 Caracterização da Região de São Joaquim	81
2.3 Amostras	81
2.4 Determinação dos compostos fenólicos	82
2.4.1 Flavonóis	82
<i>Análise CLAE-DAD</i>	83
2.4.2 Antocianinas	83
<i>Análise CLAE-DAD</i>	84
2.4.3 Ácidos hidroxicinâmicos	84
<i>Análise CLAE-DAD</i>	84
2.4.4 Ácidos hidroxibenzóicos	85
<i>Análise CLAE-DAD dos ácidos p-hidroxibenzóico, siríngico e vanílico</i>	85
<i>Análise CLAE-DAD-MS dos ácidos elágico, gálico e protocateico</i>	86
<i>Repetibilidade do método</i>	86
<i>Limites de detecção e quantificação</i>	86
2.5 Atividade antioxidante <i>in vivo</i>	87
2.5.1 Animais	87
2.5.2 Avaliação dos marcadores do estresse oxidativo	87
2.6 Análise Estatística	89
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
3.1 Análises químicas	89
3.1.1 Compostos fenólicos: Flavonóides	89
3.1.2 Compostos fenólicos: não Flavonóides	94
3.2 Atividade antioxidante <i>in vivo</i>	97
3.3 Relação entre a atividade antioxidante e a concentração de compostos fenólicos	102
4 CONCLUSÃO	105

CAPÍTULO 5

Estilbenos e tirosol como compostos alvo na avaliação das atividades antioxidante e hipolipemiante de vinhos <i>Vitis vinifera</i> de São Joaquim - SC, Brasil	106
RESUMO	107
1. INTRODUÇÃO	108
2 MATERIAL E MÉTODOS	110
2.1 Padrões e reagentes	110
2.2 Amostras	110
2.3 Produção dos vinhos.....	111
2.4 Análises cromatográficas	112
2.4.1 Validação do Método	112
<i>Preparação das amostras</i>	112
<i>Análise CLAE-DAD</i>	112
2.4.2 Tirosol	113
<i>Análise CLAE-DAD-MS</i>	113
<i>Repetibilidade do método e limites de detecção e quantificação</i>	113
2.5 Animais e dietas	114
2.6 Atividade antioxidante <i>in vivo</i>	114
2.7 Avaliações dos níveis lipídicos	116
2.8 Análise Estatística	116
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
3.1 Conteúdo de estilbenos e tirosol.....	117
3.2 Atividade antioxidante	120
3.3 Atividade hipolipemiante	126
4 CONCLUSÃO	131
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132

INTRODUÇÃO

A produção de uva e vinho na região Sul do Brasil é uma atividade consolidada. Em Santa Catarina a vitivinicultura apresenta expressão econômica principalmente na Região do Vale do Rio do Peixe e no Planalto Sul Catarinense, destacando-se a região de São Joaquim. Grande interesse tem surgido por essa região, onde a altitude dos vinhedos varia entre 1.200 e 1.400m, e, associada à respectiva influência climática, na latitude 28 ° S, confere um deslocamento de todo o ciclo produtivo da videira, retardando o início da brotação e o amadurecimento dos frutos, propiciando a colheita da uva em uma época com histórico de menor índice pluviométrico e uma melhor maturação fenólica (Falcão, 2007; Rosier, 2006). Devido a esse diferencial, nos últimos anos tem-se verificado um crescente interesse dos viticultores pela implementação de outras variedades viníferas nessa região, que a tradicional Cabernet Sauvignon, destacando-se a Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese e Syrah, buscando seguir as tendências mundiais de produção de vinhos finos.

Na introdução de novas variedades a fenologia desempenha importante função, pois permite a caracterização da duração das fases de desenvolvimento da videira em relação ao clima, além de ser utilizada para interpretar como as regiões climáticas interagem com a cultura (Jones e Davis, 2000; Leão e Silva, 2003; Morlat e Bodin, 2006). O monitoramento da maturação através de análises de pH, acidez total, e sólidos solúveis totais das uvas também é de suma importância para o controle do desenvolvimento e do amadurecimento dos frutos, como também o monitoramento da maturação fenólica (Goodwin e Mercer, 1983; Amorim et al., 2006; Falcão et al., 2008a). Essas análises além de orientarem na definição do melhor ponto de colheita para a elaboração de vinhos tintos de qualidade, também revelam a adaptação destas variedades ao local. Na implementação de novas variedades, o clima possui forte influência sobre a videira, sendo importante na definição das potencialidades das regiões, interagindo com os demais componentes do meio (Winkler et al., 1974; Tonietto e Carbonneau, 2004).

Dentre os fatores químicos que merecem destaque para o controle da qualidade e para a avaliação do potencial de uma região em produzir vinhos finos destaca-se a composição fenólica. A caracterização química dos compostos fenólicos de vinhos é importante por diversas razões

entre elas: pode ajudar na avaliação da autenticidade de produtos regionais, na predição de propriedades sensoriais dos vinhos e na avaliação da estabilidade oxidativa de vinhos (Mattivi et al., 2002; Lopes et al., 2006; Chira et al., 2009). Além disso, os compostos fenólicos são usados como marcadores do processamento tecnológico de vinificação e da idade de vinhos (Ribéreau-Gayon et al., 1998; Vrhovsek, 1998; Matejcek et al., 2005). Esses compostos têm merecido atenção não somente devido ao seu importante papel na Enologia, mas também devido aos seus comprovados efeitos benéficos à saúde, tais como a sua capacidade antioxidante, hipolipemiante, cardioprotetora (Frankel et al., 1995; Rossetto et al., 2004; Dudley et al., 2008; Nardini et al., 2009) entre outras. Verifica-se um crescente interesse pelas propriedades benéficas do vinho promovidas pela presença dos compostos fenólicos, e esse despertar ocorreu com a constatação do “paradoxo francês” que demonstrou que o consumo de vinho apresentou correlação negativa com aterosclerose e distúrbios coronários (Renauld e Lorgeril, 1992).

Considerando que praticamente não existem estudos sobre as variedades *Vitis vinifera* Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese e Syrah, implementadas na região de São Joaquim-SC-Brasil, que contemple a avaliação da fenologia da videira, a maturação dos frutos e avaliação da composição fenólica dos vinhos e de seu potencial biológico, como também da correlação desses últimos citados, fica evidente a necessidade de pesquisas que visem essas caracterizações para o reconhecimento do potencial dessa nova região vitícola no sul do Brasil. Além disso, esse conhecimento pode auxiliar na obtenção de certificados de procedência, mostrando a tipicidade de vinhos produzidos nessa região. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a adaptação dessas novas variedades implementadas em São Joaquim-SC-Brasil, durante duas safras consecutivas, 2006 e 2007, através do monitoramento da fenologia das videiras, da maturação dos frutos, como também da caracterização dos principais compostos fenólicos e da capacidade antioxidante *in vitro* e *in vivo* e da atividade hipolipemiante *in vivo* dos respectivos vinhos.

A presente tese é apresentada na forma de capítulos, onde o primeiro capítulo apresenta uma breve revisão bibliográfica e os demais foram elaborados no formato de artigos científicos que relatam os resultados desta pesquisa. As análises cromatográficas foram realizadas na Fondazione Edmund Mach, IASMA- Istituto Agrario San Michele all'Adige, TN, Itália e as análises antioxidantes no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brasil.

O Capítulo 1 apresenta uma revisão bibliográfica sobre a viticultura no Estado de Santa Catarina, a Região de São Joaquim, a fenologia da videira, a maturação da uva, os principais compostos fenólicos de uvas e vinhos. Além disso, essa revisão também contempla os efeitos benéficos do consumo de vinhos, destacando-se sua alta capacidade antioxidante, e as principais técnicas cromatográficas utilizadas para a determinação dos compostos fenólicos em vinhos.

O Capítulo 2 apresenta os resultados sobre o monitoramento da fenologia e maturação das variedades Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese e Syrah, safras 2006 e 2007, implantadas em São Joaquim-SC-Brasil.

O Capítulo 3 relata o perfil de flavan-3-óis livres e a composição das proantocianidinas após a floroglucinolise dos vinhos Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese e Syrah, safras 2006 e 2007, de São Joaquim-SC-Brasil. Também são descritos nesse capítulo a capacidade antioxidante *in vitro* dos vinhos e a sua correlação com o conteúdo de flavan-3-óis.

O Capítulo 4 apresenta o conteúdo dos principais compostos fenólicos presentes nos vinhos, flavonóides (flavonóis e antocianinas) e não flavonóides (ácidos hidroxicinâmicos, ácidos hidroxibenzóicos), e os resultados do efeito do consumo dos vinhos por camundongos sobre a atividade antioxidante *in vivo*, e a correlação existente entre o conteúdo desses compostos e a atividade antioxidante *in vivo* verificada.

O Capítulo 5 apresenta o conteúdo de estilbenos monômeros e tirosol nas amostras de vinhos estudadas, bem como a atividade antioxidante e hipolipemiante *in vivo* em camundongos tratados com os vinhos e submetidos à uma dieta hipercolesterolêmica. Além disso, uma correlação entre conteúdo de estilbenos monômeros e tirosol e as atividades biológicas verificadas foi estabelecida.

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Importância econômica e cultural da uva e do vinho

A uva (*Vitis vinifera* L.) é cultivada há cerca de 11.000 anos, na área conhecida como Crescente Fértil do Mediterrâneo oriental, em terras que hoje constituem o Líbano, Síria, Turquia, Irã, Jordânia, Iraque e Israel. Ao lado das outras espécies vegetais que começaram a ser cultivadas naquela época, como o trigo (*Triticum*), a cevada (*Hordeum vulgare*), lentilha (*Lens culinaris*), ervilha (*Pisum sativum*), grão de bico (*Cicer arietinum*), fava (*Vicia spp.*), oliveira (*Olea europaea*), tamareira (*Phoenix dactylifera*), romã (*Punica granatum*) e linho (*Linum usitatissimum*), encontrava-se a videira (ou parreira), como é conhecida a planta. Já naquela época tem-se o relato da elaboração de vinhos. Através da seleção de determinadas linhagens dessas plantas pelo homem, suas características foram se alterando gradualmente, tornando-se mais adequadas para o cultivo e para a fabricação de derivados (Raven et al., 2001).

A viticultura sempre foi simbólica na tradição ocidental. Para judeus e cristãos, a videira representa o povo (de quem Deus cuida, assim como o homem cuida da videira), e as uvas simbolizam as promessas de Deus. Nos tempos do Antigo Testamento, uvas e vinho eram levados ao altar na celebração das colheitas. Na Bíblia o vinho é símbolo de alegria e de plenitude de dádivas de Deus, sendo inclusive indicado “para alegrar a vida”. No Novo Testamento, o vinho adquiriu significado especial para a celebração e fé cristãs, nas parábolas de Jesus e nos textos de instituição da Santa Ceia.

A videira atingiu grande importância na cultura greco-romana, que a difundiu por toda a região da Ásia Menor e Europa. Na Idade Média surgiram na Europa importantes centros vinícolas que deram suas contribuições para o melhoramento das técnicas de cultivo da uva e produção de vinho. A viticultura foi posteriormente levada por imigrantes europeus para a América e demais continentes.

1.2 A viticultura no Brasil e no Estado de Santa Catarina

A viticultura brasileira teve início com a chegada dos colonizadores portugueses, no século XVI. Entretanto, somente a partir do início do século XX tornou-se uma atividade comercial, por iniciativa dos imigrantes italianos estabelecidos no sul do país a partir de 1875. A partir da década de 70 a viticultura brasileira apresentou

uma grande evolução, devido ao investimento de grandes empresas estrangeiras na produção de uvas e vinhos no Estado do Rio Grande do Sul. Esse fato proporcionou um significativo aumento da área cultivada com uvas viníferas e, também, a melhoria das tecnologias utilizadas na elaboração do vinho, melhorando assim a qualidade dos mesmos (Brighenti e Tonietto, 2004).

A região sul é o é o maior pólo vitivinícola do Brasil, sendo Estado do Rio Grande do Sul o principal produtor. No Estado de Santa Catarina a produção está concentrada na região do Vale do Rio do Peixe, que é responsável por cerca de 80 % da produção de uva e vinho no Estado. O cultivo apresenta um perfil semelhante com o da Serra Gaúcha; o clima é úmido com verões frescos, predominando os minifúndios onde os parreirais têm de dois a três hectares. As uvas são destinadas à elaboração de vinhos e de sucos, e uma pequena porcentagem vai para o consumo *in natura*. Outra região de destaque está localizada no Planalto Sul do Estado, também chamada região de altitude, que compreende as cidades do Planalto Serrano, onde se destaca a cidade de São Joaquim que tem investido substancialmente na produção de vinhos finos (Brighenti e Tonietto, 2004).

Mas a vitivinicultura também é desenvolvida em outros Estados do Brasil. São Paulo destaca-se pelo plantio de uvas de mesa finas e comuns e também à elaboração de vinhos comuns ou também denominados vinhos de mesa; no Paraná, predomina o cultivo de uvas finas de mesa, e em Minas Gerais, a produção de uvas finas de mesa e de vinhos comuns. Em Pernambuco e na Bahia, no Vale do São Francisco, está localizada a principal região vitícola tropical do Brasil, onde são cultivadas uvas finas de mesa e fabricados vinhos finos e espumantes.

1.2.1 Região de São Joaquim

A região de São Joaquim é localizada no Planalto Sul de Santa Catarina, em altitudes que variam de 800 a 1400 m, na latitude 28 ° S, com vinhedos implantados em altitudes entre 900 e 1400m, e caracteriza-se por apresentar as maiores altitudes da vitivinicultura brasileira. Nessa região as temperaturas médias mais baixas criam condições especiais para a vitivinicultura de variedades *Vitis vinifera* (Falcão et al., 2008a; Rosier, 2006). A Figura 1.1 ilustra vinhedos de variedades *Vitis vinifera* de São Joaquim-SC-Brasil.



Figura 1.1. Vinhedos de variedades *Vitis vinifera* de São Joaquim-SC-Brasil. Fonte: acervo do autor.

De acordo com o sistema de Classificação Climática Multicritério Geovitícola - Sistema CCM Geovitícola (Tonietto e Carbonneau, 2004) o clima vitícola da região de São Joaquim é classificado como “Frio, de Noites Frias e Úmido”: IH-2 IF+1 IS-2, Índice Heliotérmico-IH-2 de 1.714; Índice de Frio Noturno-IF de 12,1 °C; e Índice de Seca-IS 200 mm, úmido. Segundo o Zoneamento Agrícola realizado pela Epagri para o Estado de Santa Catarina, São Joaquim localiza-se na Zona Preferencial I, isto é, áreas onde o número de horas de frio invernal é igual ou superior a 600 horas, sendo estas áreas as que propiciam condições adequadas ao cultivo de *Vitis vinifera* (Figura 1.2).

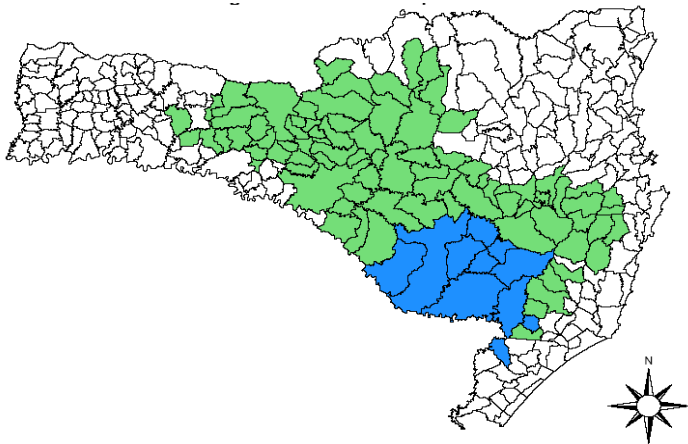


Figura 1.2. Mapa do zoneamento agrícola da cultura de videiras *Vitis vinifera* para o Estado de Santa Catarina. Azul= Zona Preferencial I; Verde= Zona Preferencial II. Fonte: Epagri/Ciram, 2007.

São Joaquim difere-se de outras regiões vinícolas do Brasil, sobretudo, por apresentar clima vitícola mais frio em relação às demais regiões brasileiras. Em consequência desse regime térmico, a duração do período que vai da brotação à colheita das uvas é maior em São Joaquim, quando comparado com outras regiões vitícolas brasileiras (Falcão, 2007; Brighenti e Tonietto, 2004). Isso ocorre porque a altitude elevada aliada à baixa latitude (28 °) proporciona um deslocamento do ciclo produtivo da videira. O que caracteriza duas situações distintas: a) as baixas temperaturas noturnas retardam o início da brotação, mas, devido à ocorrência de geadas tardias, podem muitas vezes, dependendo da localização do vinhedo e da precocidade das variedades, serem um fator limitante à produção; b) mas, durante a maturação, as temperaturas noturnas amenas retardam o amadurecimento dos frutos, reduzem o crescimento das plantas e influenciam no metabolismo, prolongando o ciclo e possibilitando a colheita em uma época na qual, historicamente, os índices de pluviosidade são bem menores que nos meses de colheita das regiões tradicionalmente produtoras no Brasil. Esse fato permite uma ótima maturação, principalmente fenólica (Falcão et al., 2008a; Rosier, 2006).

Trabalhos recentes relataram bons resultados sobre o perfil sensorial e a composição volátil de vinhos Cabernet Sauvignon produzidos nessa região (Falcão et al., 2007, Falcão et al., 2008b). Devido a todos esses fatores citados, a região de São Joaquim é tida como uma região promissora para a produção de vinhos finos de altitude com alta qualidade.

1.3 Aspectos botânicos de *Vitis vinifera* L.

A videira pertence à família *Vitaceae*. Essa família é constituída de 700 espécies, divididas em 12 gêneros e distribui-se nas regiões tropicais e subtropicais do planeta e em algumas áreas temperadas, como o vale do Reno, na Europa (Heywood, 1993). A maior parte dos membros dessa família são espécies trepadeiras, dotadas de gavinhas (brotos ou inflorescências modificadas, que podem ter ventosas na extremidade). Vários gêneros são ornamentais, como *Cissus*, *Parthenocissus* e *Vitis*. No gênero *Vitis*, as gavinhas crescem inserindo-se nas fendas da estrutura que a suporta, devido ao fototropismo negativo. Uma vez inseridas, estas intumescem e aderem-se ao suporte, mantendo a planta erguida.

O gênero *Vitis* é o principal representante dessa família, devido à importância econômica da uva, largamente consumida *in natura* ou empregada como matéria prima para a elaboração de sucos, vinhos, uvas passas, geléias, etc. A espécie mais cultivada é a *Vitis vinifera* originária da Europa. Outra espécie importante é a *Vitis labrusca* originária dos Estados Unidos.

A videira (*Vitis vinifera* L.) é uma planta trepadeira com gavinhas, lenhosa e de porte arbustivo, suas folhas são alternas, pecioladas, cordiformes, com cinco lóbulos sinuados dentados, glabras na parte superior e tomentosas na parte inferior. As flores são pequenas e de cor branco esverdeada, dispostas em ráculos. Os frutos são bagas reunidas em cachos, que contém as sementes, variando de cor de acordo com o tipo de uva (Raven et al., 2001).

1.3.1 Variedades avaliadas

A uva Cabernet Franc é originária da região de Bordeaux, França. A variedade apresenta normalmente uma precocidade mediana à tardia, médio vigor, produção alta e média sensibilidade ao míldio e à podridão. O destino da produção da uva Cabernet Franc é a elaboração de vinho tinto jovem no Estado do Rio Grande do Sul, embora apresente aptidão para envelhecer (Rizzon e Miele, 2001).

A uva Merlot é uma das principais responsáveis pelas características peculiares dos vinhos tintos de Saint Émillion, região de Bordeaux, França. Juntamente com outras do grupo das *Vitis vinifera*, essa cultivar marcou o início da produção de vinhos finos varietais brasileiros, e, atualmente, ocupa o segundo lugar em volume de produção entre as variedades *Vitis vinifera* L. tintas. A videira possui precocidade mediana, vigor médio, alta produção e elevada sensibilidade ao míldio (Rizzon e Miele, 2003).

A uva Sangiovese é uma das mais importantes da Itália. É uma variedade cultivada extensamente por toda Itália Central, e é considerada a espinha dorsal dos grandes vinhos da região de Toscana. Os famosos vinhos de “Chianti”, “Brunello” e “Vino Nobile di Montepulciano” têm a Sangiovese como a principal variedade (Bogoni et al., 1993; Scienza, 1993).

A uva Syrah é originária da região de Cotê-du-Rhone na França, onde é cultivada principalmente para a produção do vinho tinto desde os tempos romanos. A indústria de vinho australiana utiliza muito essa cultivar para a elaboração de vinhos, cerca de 40 % de toda a uva

cultivada na Austrália é Syrah. A variedade possui precocidade mediana, com alto vigor e elevada produção, tendo média sensibilidade ao míldio e elevada sensibilidade à podridão (Trowbridge et al., 1997).

A Figura 1.3 ilustra as variedades estudadas no ponto de colheita dos vinhedos de São Joaquim, SC-Brasil.

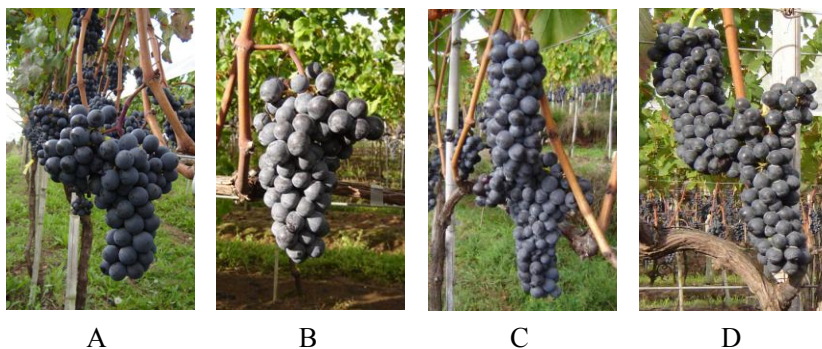


Figura 1.3. Uvas das variedades estudadas no ponto de colheita dos vinhedos de São Joaquim, SC-Brasil. A= Cabernet Franc; B= Merlot; C= Sangiovese; D= Syrah. Fonte: acervo do autor.

1.4 Cultivo da videira

Os limites de cultivo da videira, nas diversas regiões do mundo, estão condicionados à temperatura, radiação solar, umidade relativa do ar e disponibilidade hídrica no solo, que influenciam a produtividade e a qualidade da uva e conseqüentemente dos vinhos (Jones e Davis, 2000; Morlat e Bodin, 2006). Conforme Tonietto e Mandelli (2003), a viticultura mundial destinada à agroindústria está concentrada entre 30° e 50° de latitude Norte e entre 28° e 45° de latitude Sul. Os principais climas ocorrentes são do tipo temperado, tipo mediterrâneo e climas com diferentes níveis de aridez. No Brasil, os tipos de clima ocorrentes nas regiões vitivinícolas produtoras de vinhos finos com uma colheita anual são de tipo temperado e subtropical.

O clima ideal para videira é o que apresenta invernos frios e verões secos e quentes. Um clima úmido favorece doenças fúngicas para as quais a videira apresenta grande sensibilidade. A temperatura influencia diretamente no desenvolvimento da videira. Winkler et al. (1974) classificou as regiões da viticultura da Califórnia (Estados

Unidos) conforme a soma térmica, ou seja, soma de calor calculada a partir da soma das temperaturas médias mensais acima de 10 °C desde a brotação até a colheita. A altitude do local também é bastante considerada ao se escolher uma área para produção de uvas, uma vez que esse fator influencia diretamente nas características das uvas e vinhos (Falcão, 2007; Falcão et al., 2007). Segundo Tonietto e Mandelli (2003), o efeito mais importante da altitude para a viticultura é o térmico, pois 100 metros de elevação representam uma diminuição de aproximadamente 0,6 °C na temperatura média do ar. Em regiões de maior altitude, a maturação das uvas é mais tardia. Conforme Rizzon e Miele (2001, 2003) o clima influencia na relação açúcar/ácido, acidez total e conteúdo de compostos fenólicos das uvas, entre outros fatores, registrados no momento da colheita.

1.5 Fenologia da videira

A fenologia consiste no estudo dos fenômenos periódicos dos seres vivos e suas relações com o ambiente (Coombe e Dry, 1988). Compreender a fenologia de uma determinada planta é importante para determinar as potencialidades da região para o cultivo dessa planta, pois essa varia em função das condições climáticas de uma região, ou em uma mesma região devido às variações estacionais do clima ao longo do ano (Jones e Davis, 2000; Leão e Silva, 2003).

Na viticultura o estudo da fenologia tem como objetivo principal caracterizar a duração das fases de desenvolvimento da planta em relação ao clima. Essa caracterização da duração das fases do desenvolvimento fenológico da videira em relação ao ambiente serve como ferramenta para interpretação de como a região e as condições climáticas interagem com a cultura, pois o clima exerce forte influência sobre o desenvolvimento da videira (Jones e Davis, 2000).

O desenvolvimento fenológico também permite conhecer o comportamento peculiar de cada cultivar, além evidenciar as diferenças entre as cultivares a partir da data de ocorrência das fases fenológicas, a fenologia varia também em função do genótipo da planta (Richasse, 1999). Segundo Calò et al. (1996) a fenologia é a mais clara manifestação da interação genótipo-ambiente.

A videira apresenta mudanças morfológicas e fisiológicas que ocorrem anualmente em ordem cronológica. Os principais eventos de desenvolvimento que podem ser observados são: brotação, floração, frutificação e maturação. A duração de cada evento fenológico está

condicionada a fatores tais como a cultivar, o clima e a localização geográfica em que a videira se desenvolve (Jones e Davis, 2000; Morlat e Bodin, 2006).

Para a viticultura existe a necessidade de uma quantidade constante de energia para completar as diferentes fases de desenvolvimento da uva, desde a brotação até a colheita, sendo essa energia denominada de unidade térmica ou soma térmica. Essa quantidade de energia é expressa em graus-dias (GD) acumulados, que representa o acúmulo ou a soma de calor efetivo equivalente à soma das temperaturas médias diárias acima da temperatura-base para o período considerado (Winkler, 1974). A caracterização das exigências térmicas da videira mediante o conceito de graus-dia (GD) é utilizada por vários autores (Murakami et al., 2002; Leão e Silva, 2003; Ippolito, 2004; Jones et al., 2005; Silva et al., 2006) para classificar as diferentes regiões vitícolas no mundo.

1.6 A uva

1.6.1 Constituição da uva

A uva é constituída basicamente da casca, da polpa e das sementes. A casca de uvas representa entre 7 e 15 % (p/p) do peso fresco total da uva, e atua como uma barreira hidrofóbica de proteção contra danos mecânicos, desidratação, infecções fúngicas e radiação UV. A casca pode ser dividida em três camadas distintas: (1) a camada exterior, a cutícula, formada por ácidos graxos hidroxilados que compõem a cutina, e coberta por ceras hidrofóbicas; (2) a epiderme intermediária, composta por uma ou duas camadas de células mais ou menos compactadas, dependendo da cultivar; e (3) a camada interna, a hipoderme, constituída por várias camadas de células que contém a maior parte dos compostos fenólicos presentes na película (Lecas e Brillouet, 1994). As substâncias fenólicas presentes na casca correspondem a aproximadamente 30 % dos compostos fenólicos da uva e podem estar associadas aos polissacarídeos da parede celular, ou independentes destes, no vacúolo e no núcleo das células, destacando-se as antocianinas, responsáveis pela coloração de uvas tintas (Mazza e Miniati, 1993). Durante a maturação, os compostos fenólicos com maior relevância são as antocianinas e os taninos, e sua evolução durante a maturação é um dos fatores determinantes da qualidade das uvas.

Aproximadamente 80 % do peso fresco da uva corresponde a polpa da uva. Essa é composta basicamente de açúcares (10-30 %),

polissacarídeos (0,3-0,5 %), ácidos orgânicos (0,9-2,7 %), compostos nitrogenados (0,4-0,7 %), minerais (0,08-0,28 %), compostos fenólicos (0,05 %) e vestígios de compostos aromáticos (Watson, 2003).

A semente constitui apenas uma pequena parte (máximo 6 %) do peso fresco da uva, e é nela que encontra-se o embrião. O embrião corresponde a uma pequena proporção do volume das sementes, mas é cercado por um endosperma nutritivo, que constitui a maior parte das sementes. A semente de uva é composta basicamente de açúcares (34-36 %), compostos nitrogenados (4-6,5 %), minerais (2-4 %), lipídios - principalmente ácidos oléico e linoléico - (13-20 %) e compostos fenólicos (4-10 %), que correspondem a aproximadamente 60 % dos compostos fenólicos da uva. Os compostos fenólicos predominantes nas sementes são os flavan-3-óis: catequina, epicatequina, e seus polímeros de procianidinas (Prieur et al., 1994; Chira et al., 2009).

1.6.2 Desenvolvimento da uva

O desenvolvimento da uva começa com a polinização e prossegue até ao estado de maturação ou, eventualmente, de sobrematuração. Caracteriza-se por um crescimento em volume das bagas acompanhado de uma evolução de caracteres físicos (cor e firmeza) e da composição química (açúcares, ácidos e compostos fenólicos) (Reynier, 1986). O desenvolvimento da semente está associado à síntese de reguladores de crescimento vital para o crescimento dos frutos. Portanto, o tamanho dos frutos é normalmente uma função parcial do número de sementes formadas (Geny et al., 2003).

O crescimento da uva evolui de acordo com a curva sigmoideal dupla característica dos frutos não climatérios (Figura 1.4). O aumento de volume das bagas, desde o brotamento até a maturação, efetua-se em três fases (Coombe, 1973): a) fase I (crescimento rápido), com a duração de cinco a sete semanas, em que se verifica primeiramente a proliferação seguida pelo crescimento celular. Nesta fase ocorre uma intensa atividade metabólica, caracterizada por uma elevada intensidade respiratória e pela acumulação de solutos, como o ácido málico, ácido tartárico e taninos. Durante esse período a clorofila é o pigmento predominante; b) fase II (crescimento lento), que pode durar desde alguns dias até quatro semanas, dependendo da precocidade da variedade. É uma fase de transição, na qual não ocorrem modificações significativas no peso e no volume da baga. O final desta fase coincide

com o início da maturação, que é visível pela alteração da cor da baga, em variedades tintas, devido ao início da síntese de antocianinas, que corresponde à mudança de cor; c) fase III (crescimento rápido), durante a qual o crescimento acompanha a maturação. Nessa fase, o aumento de peso da baga deve-se essencialmente à acumulação de água e açúcares e o aumento de volume é devido ao crescimento celular.

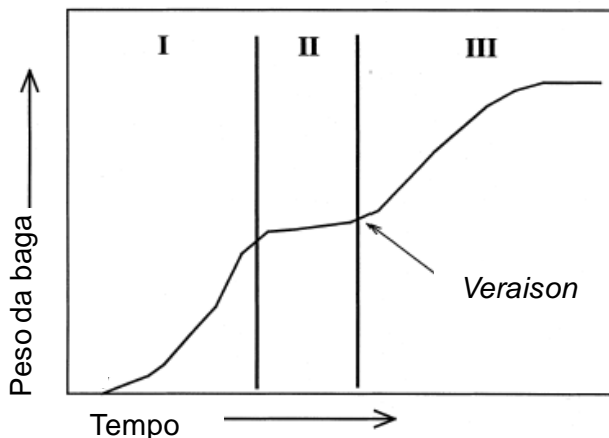


Figura 1.4. Fases do desenvolvimento da uva. Fonte: Coombe (1973).

1.6.3 Maturação das uvas

A fase de maturação das uvas abrange o período que vai da mudança de cor até a colheita, normalmente dura de 30 a 70 dias, dependendo da variedade e da região de cultivo (Amorim et al., 2006). As principais modificações que ocorrem nas bagas e, portanto, na composição da uva durante a maturação podem ser visualizadas na Figura 1.5 e são: o aumento do volume da baga, a variação hormonal, o acúmulo de açúcares, a diminuição da acidez, o aumento do pH, o desaparecimento da clorofila, além do acúmulo de pigmentos corantes na casca, o amolecimento das bagas, o aparecimento de pruína, a síntese de substâncias aromáticas e a modificação do sabor (Mota et al., 2006).

O aumento do volume da baga ocorre continuamente durante a maturação, e ao final, normalmente é percebida uma pequena diminuição de até 10 %, devido aos fenômenos de transpiração da uva (Bevilaqua, 1995; Rizzon e Miele, 2001). Este crescimento é decorrente principalmente do acúmulo de açúcar e água. A fase de maturação é

influenciada pela presença do ácido abscísico (ABA), inibidor do processo mitótico, que transforma a baga em um órgão senil e de acúmulo (Goodwin e Mercer, 1983). Um dos principais acúmulos que ocorre durante a maturação é o acúmulo de açúcares, que serve como parâmetro para a quantidade de álcool que dele deriva, como também de origem a outros compostos como os polifenóis. Os principais açúcares contidos na uva são representados principalmente pela glicose e frutose, além de pequenas quantidades de sacarose e algumas pentoses. Esses açúcares têm origem na própria planta (raízes e tronco), na atividade fotossintética e de transformação do ácido málico (Goodwin e Mercer, 1983; Rosier, 2006).

A diminuição da acidez durante a maturação ocorre devido à diminuição do conteúdo de tartaratos e malatos ocasionada pela migração das bases, pelos fenômenos de combustão respiratória e pelos fenômenos de diluição da baga. Juntamente com a diminuição da acidez ocorre o aumento do pH devido à formação de sais à custa do ácido livre (Borgogno et al., 1984).

O desaparecimento da clorofila e o acúmulo de pigmentos corantes na casca, que ocorre durante a maturação, caracterizam o amadurecimento da uva. Os pigmentos que colorem a casca são os polifenóis. Os flavonóides que se formam nas uvas brancas são as flavonas e nas tintas, as antocianinas (Mazza e Miniati, 1993). A síntese desses compostos ocorre a partir de açúcares, de modo que, as práticas culturais que estimulam o vigor da planta não são favoráveis ao acúmulo de substâncias corantes, uma vez que retardam o processo de maturação, dirigindo o produto da fotossíntese para a síntese protéica ao invés da síntese de açúcares (Amorim et al., 2006).

O amolecimento das bagas ocorre devido à hidrólise enzimática dos pectatos com a liberação do ácido pectico e de íons cálcio e magnésio, pois os pectatos têm como função a cimentação das paredes celulares. A uva dos híbridos euro-americanos (*Vitis labrusca*) possui maior quantidade de pectina que as uvas *Vitis vinifera*, por esta razão podem originar quantidade superiores de álcool metílico. Ao mesmo tempo em que ocorre o amolecimento das bagas durante a maturação, ocorre também o aparecimento de pruína, substância cerosa que protege a baga contra o ambiente externo através da proteção contra os raios UV, redução da transpiração e da respiração das bagas, agindo também como barreira a parasitas (Mota et al., 2006).

A síntese de substâncias aromáticas, durante a maturação, dá origem aos compostos aromáticos presentes na uva madura, e são

principalmente de origem genética. Os mais importantes são o moscatel, o foxado e o herbáceo, encontrando-se como moléculas odoríferas na forma livre ou combinada a açúcares. Durante a maturação, as uvas formam várias substâncias que dão a cada cultivar seu aroma característico, estando presentes principalmente nas cascas (Kotseridis et al., 2000).

Diversos fatores influem na maturação das uvas, os principais são: a) fatores permanentes: são constantes e não variam de um ano para outro, são eles a região, o solo, a variedade, o porta-enxerto; b) fatores variáveis: estão relacionados com o clima anual (temperatura, precipitação, luz e umidade) e estabelecem o ritmo do ciclo vegetativo da planta; c) fatores modificáveis: referem-se às práticas culturais tais como a adubação, a poda, a irrigação; d) os fatores acidentais: incidência de doenças e alterações climáticas como geadas, granizo e seca.

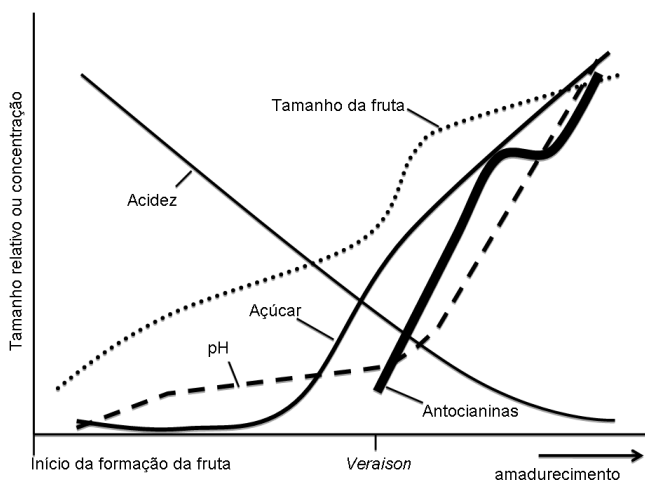


Figura 1.5. Mudanças físico-químicas durante a maturação de uvas. Fonte: Watson, (2003).

1.7 Compostos Fenólicos de uvas e vinhos

Os compostos fenólicos são constituintes fundamentais dos vegetais, presentes principalmente em plantas, raízes e frutas, onde sua natureza química apresenta-se diversificada e representada por centenas de estruturas químicas (Stafford, 1990; Mattivi et al., 2002). Assim

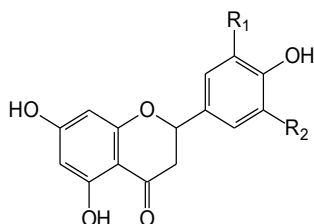
como os alcalóides, os terpenos, os polienos e os oliacetilenos, os compostos fenólicos são compostos naturais resultantes do metabolismo secundário das plantas (Mattivi et al., 2006) e intervêm diretamente na pigmentação, regulação do crescimento celular e na defesa contra agentes agressores (Deloire et al., 1998). Esses compostos são sintetizados a partir da via do ácido chiquímico (principal) e da via do ácido mevalônico, menos significativa em *Vitis vinifera*. Do ponto de vista químico, os compostos fenólicos são caracterizados por apresentar um núcleo benzênico, agrupado a um ou vários grupos hidroxilas. Também são considerados polifenóis os derivados de ésteres, metil ésteres e glicosídios, dentre outros, os quais resultam das substituições da estrutura de base (Stafford, 1990; Mattivi et al., 2002).

Na uva, os compostos fenólicos estão presentes principalmente na casca e na semente. (Amerine e Ough, 1986). Conforme Deloire et al. (1998) a videira sintetiza polifenóis como defesa a situações adversas ou ao estresse. Esta resposta metabólica ocorre quando a planta é submetida a um estresse do tipo biótico (ataque de fungos), ou a um estresse abiótico (déficit hídrico, radiação ultravioleta, variações de temperatura).

Nos vinhos, esses compostos constituem um parâmetro de qualidade devido à sua contribuição para as características organolépticas, particularmente para a cor (antocianinas), para as sensações gustativas, particularmente a adstringência e o amargor (ácidos fenólicos e flavan-3-óis) (Robichaud e Noble, 1990). Segundo Guerra (1997) esses compostos também tem importância fundamental na longevidade de vinhos tintos. A evolução dessas moléculas durante a vinificação influi diretamente ou indiretamente nas características dos vinhos, definindo grande parte de sua estrutura, sua cor, suas propriedades antioxidantes e seus efeitos benéficos para a saúde humana.

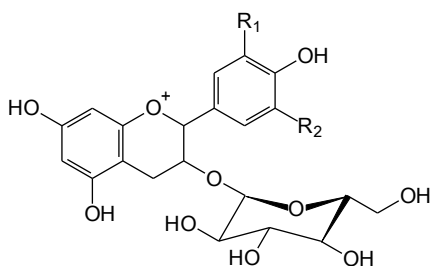
Além da importância que os compostos fenólicos possuem na enologia, existe um interesse cada vez maior nesses compostos devido ao seu potencial benéfico para a saúde humana (Soleas et al., 2002). Diversos efeitos fisiológicos são atribuídos aos compostos fenólicos, entre eles ação antioxidante, antibacteriana, antiviral, anticarcinogênica, anti-inflamatória, antialérgica, cardioprotetora e vasodiatadora (Renauld e Lorgeril, 1992; Frankel et al., 1995; Rossetto et al., 2004; Dudley et al., 2008; Nardini et al., 2009).

Flavonóis



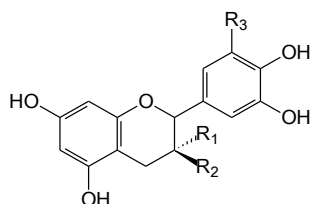
R₁ = H R₂ = H Campferol
 R₁ = OH R₂ = H Quercetina
 R₁ = OH R₂ = OH Miricetina

Antocianinas



R₁ = OH R₂ = H Cianidina
 R₁ = OH R₂ = OH Delfinidina
 R₁ = OCH₃ R₂ = H Peonidina
 R₁ = OH R₂ = OCH₃ Petunidina
 R₁ = OCH₃ R₂ = OCH₃ Malvidina

Flavan-3-óis

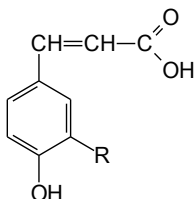


Procianidinas Unidade monomérica
 R₁ = OH R₂ = H R₃ = H (+) - Catequina
 R₁ = H R₂ = OH R₃ = H (-) - Epicatequina

Prodelfinidinas
 R₁ = OH R₂ = H R₃ = OH (+) - Galocatequina
 R₁ = H R₂ = OH R₃ = OH (-) - Epigalocatequina

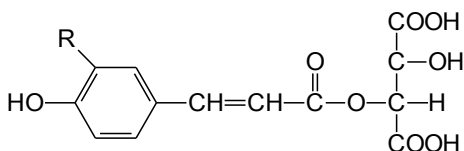
Figura 1.6. Estrutura dos principais compostos flavonóides.

Ácidos hidroxicinâmicos



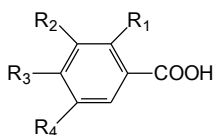
R = H Ác. *p*-cumárico
 R = OH Ác. cafeico
 R = OMe Ác. ferrúlico

Ácidos hidroxicinâmicos (hidroxicinamatos)

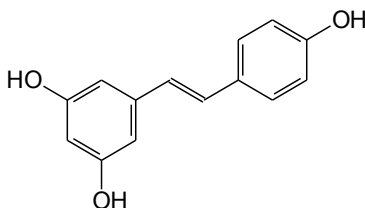


R = H Ác. cutárico
 R = OH Ác. caftárico
 R = OMe Ác. fertárico

Ácidos hidroxibenzóicos



R₁ = H R₂ = H R₃ = OH R₄ = H Ác. *p*-hidroxibenzóico
 R₁ = H R₂ = OH R₃ = OH R₄ = H Ác. protocateico
 R₁ = H R₂ = OH R₃ = OH R₄ = OH Ác. gálico
 R₁ = H R₂ = OCH₃ R₃ = OH R₄ = OCH₃ Ác. siringico
 R₁ = H R₂ = OCH₃ R₃ = OH R₄ = H Ác. vanílico

Trans-resveratrol

Tirosol

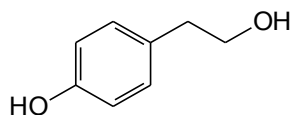


Figura 1.7. Estrutura dos principais compostos não-flavonóides.

Os compostos fenólicos apresentam uma grande diversidade e podem ser subdivididos em dois grandes grupos em razão da similaridade de suas cadeias de átomos de carbono: flavonóides e não-flavonóides. Os flavonóides representam o maior grupo de polifenóis encontrados nos alimentos, e os que se destacam em vinhos dividem-se em três grupos: flavonóis, flavan-3-óis e antocianinas. Ao grupo de compostos fenólicos não-flavonóides pertencem os ácidos fenólicos (derivados do ácido hidroxibenzoico, e os derivados do ácido hidroxicinâmico) e outros derivados fenólicos como os estilbenos (resveratrol *cis* e *trans*) e o tirosol. As estruturas químicas dos principais compostos citados são apresentadas nas Figuras 1.6 e 1.7.

1.7.1 Compostos Flavonóides

Os flavonóides são compostos fenólicos que se caracterizam por um esqueleto básico e comum C6-C3-C6. A estrutura base consiste em dois anéis aromáticos ligados por um anel pirano. Essa classe de compostos fenólicos pode ser dividida em subclasses as quais se distinguem pelo grau de oxidação do anel pirano (Stafford; 1990; Zoecklein et al., 1995). Os flavonóides, baseados na estrutura 2-fenil benzopirona, estão principalmente representados na uva pelos flavonóis, enquanto que os flavonóides, em seu sentido amplo, compreendem igualmente as antocianinas e os flavan-3-óis (Riberéau-Gayon et al., 1998; Mattivi et al., 2002).

Flavonóis

Os flavonóis são compostos caracterizados pela presença de uma insaturação no anel heterocíclico e um grupamento hidroxila na posição 3, e estão presentes nas cascas de uvas brancas e tintas. Os principais flavonóis da uva são a quercetina e a miricetina e podem ser encontradas na forma livre ou conjugada (Mattivi et al., 2006; Bautista-Ortín et al., 2007). Outros importantes flavonóides presentes em uvas e vinhos são o campferol, a isorhamnetina, a laricitrina e a siringetina (Mattivi et al., 2006). A proporção de flavonóis livres varia entre 20 a 50 % do total. A síntese de flavonóis ocorre praticamente durante todo o crescimento da baga e, da mesma forma que as fitoalexinas, seu conteúdo varia conforme a resposta a condições restritivas ou de estresse (Deloire et al., 1998). Alguns trabalhos demonstram que o conteúdo de flavonóis é dependente da exposição ao sol das uvas, da fertilização nitrogenada, do estado hídrico da planta e da cultivar (Price et al. 1995; Cantos et al.,

2000). Embora seja uma família minoritária nas uvas, os flavonóis podem ter um papel importante na evolução da cor dos vinhos tintos através de processos de co-pigmentação com as antocianinas (Boulton, 2001; Zafrilla et al., 2003).

Antocianinas

Estruturalmente, as antocianinas são glicosídios do cátiun flavílium polihidroxi e/ou polimetoxilados. São baseadas em cinco agliconas, que diferem entre si pelos radicais de substituição no anel B. As antocianinas do gênero *Vitis* são a cianidina, a delfinidina, a peonidina, a petunidina e a malvidina. As suas concentrações relativas variam com a cultivar, mas a malvidina é sempre majoritária (Mazza e Miniati, 1993). É característico nas uvas de variedade *Vitis vinifera* uma molécula de glicose ligada na posição 3. Os fragmentos glicosídicos podem apresentar-se livres ou esterificados na posição 6 com alguns ácidos, particularmente com o ácido acético (derivados acilados) e o ácido *p*-cumárico (derivados *p*-cumáricos) (Ribéreau-Gayon e Stenestreet, 1965; Ribéreau-Gayon et al., 1998).

As antocianinas representam uma parte muito importante, quer quantitativamente quer qualitativamente, dos flavonóides das uvas das variedades tintas. São os pigmentos responsáveis pela cor de uvas e vinhos tintos. Elas localizam-se na casca e nas três ou quatro primeiras camadas da hipoderme. Esses compostos são sintetizados a partir do início da coloração das cascas de forma contínua, e a quantidade formada é influenciada pelas condições de vigor e insolação da plantas e dos cachos (Mazza e Miniati, 1993; Ribéreau-Gayon et al., 1998). As antocianinas são compostos que, com o envelhecimento do vinho tendem a formar complexos com outros compostos fenólicos dando a estabilidade de cor desejável ao vinho (Timberlake e 1976; Boulton, 2001).

Flavan-3-óis

Os flavan-3-óis e os seus derivados estruturais, as proantocianidinas ou taninos condensados, são constituídos por um núcleo flavânico que é formado por dois anéis aromáticos (A e B) e por um anel heterocíclico pirânico C, ao qual se encontra ligado a um grupo hidroxil na posição 3. Podem ser classificados como catequinas e galocatequinas. As catequinas ((+)-catequina e (-)-epicatequina) encontram-se hidroxilados nas posições 3', 4' do anel B, enquanto que

as galocatequinas ((+)-galocatequinas e (-)-epigalocatequinas) se encontram hidroxiladas nas posições 3', 4' e 5' do anel B (Figura 1.6) (Timberlake e Bridle, 1976; Prieur et al., 1994).

Em uvas, e consequentemente em vinhos, os principais flavan-3-óis monômeros são a catequina, a epicatequina, a galocatequina e a epigalocatequina, tendo a catequina como o composto mais abundante (Souquet et al., 1996). As proantocianidinas representam, nas cascas, de 3 % a 6 % do conteúdo fenólico total e, nas sementes, de 60 a 70 %. Esses compostos são sintetizados durante a primeira etapa do crescimento da baga ou “período herbáceo” e sua síntese termina pouco depois do início da coloração das cascas (Prieur et al., 1994; Saint-Cricq de Gaulejac et al., 1998).

As proantocianidinas ou taninos condensados são derivados estruturais dos flavan-3-óis e, dependendo do número de vezes que essa unidade se repete, elas podem ser classificadas como dímeros, trímeros, oligômeros ou polímeros de proantocianidinas. De acordo com a natureza da unidade fundamental, as proantocianidinas podem dividir-se em dois grupos: as procianidinas que são polímeros da catequina e epicatequina, e as prodelfinidinas que são contituídas por unidades de galocatequinas e epigalocatequinas (Prieur et al., 1994; Souquet et al., 1996).

As proantocianidinas estão associadas à adstringência dos vinhos, sobretudo as procianidinas (Renauld e Lorgeril, 1992; Chira et al., 2009). Entretanto, com um alto grau de polimerização, esta atividade adstringente é diminuída. Conforme Ojeda (1999), o grau de polimerização dos taninos pode ser significativamente aumentado com uma restrição hídrica no vinhedo. Esses compostos podem ainda influenciar a cor de vinhos, devido à sua associação com as antocianinas durante a maturação dos vinhos (Prieur et al., 1994; Souquet et al., 2006; Drinkini et al., 2007).

1.7.2 Compostos não-Flavonóides

Os compostos não-flavonóides correspondem aos compostos fenólicos mais simples, tais como os ácidos fenólicos: ácidos hidroxibenzóicos (C6-C1) e ácidos hidroxicinâmicos (C6-C3) e seus derivados, além de outros derivados fenólicos de grande importância como os estilbenos (Somers et al., 1987; Monagas et al., 2005; Vitrac et al., 2005). A determinação de compostos não-flavonóides também é importante em vinhos, pois a partir dessa determinação pode-se

caracterizar variações nos vinhos, como também nas diferenças dos processos de vinificação e nas diferentes formas de maturação desses produtos (Vrhovsek, 1998; Matejcek et al., 2005).

Ácidos fenólicos

Na uva os ácidos fenólicos encontram-se nos vacúolos das células da casca e da polpa. Sua concentração diminui durante o desenvolvimento da baga e se estabiliza na maturação (Romeyer et al., 1983). Os ácidos fenólicos podem ser divididos em ácidos benzóicos e em ácidos cinâmicos de acordo com o número de átomos de carbono (Figura 1.7).

Nas uvas, os ácidos hidroxicinâmicos são os principais ácidos fenólicos e se encontram nos vacúolos das células das cascas e polpas, sob a forma de ésteres tartáricos, também denominados de hidroxicinamatos (ácidos caftárico, fertárico e cutárico) (Ribéreau-Gayon, 1965). Nos vinhos, devido à hidrólise dos derivados tartáricos também se encontram as formas livres (ácidos cafeico, ferrúlico, e *p*-cumárico) (Vrhovsek, 1998; Cartoni et al., 1991). Esses compostos desempenham um papel importante nas oxidações que conduzem ao acastanhamento dos mostos e dos vinhos (Singleton, 1987) uma vez que são as primeiras substâncias fenólicas a serem oxidadas. Embora não exerçam uma influência direta no gosto dos vinhos, os ácidos hidroxicinâmicos estão envolvidos no aparecimento de fenóis voláteis com consequentes alterações aromáticas (Cartoni et al., 1991; Vrhovsek, 1998). São os compostos fenólicos mais importantes nos vinhos brancos por se encontrarem principalmente na polpa das uvas (Vrhovsek, 1998).

Dos ácidos derivados do ácido hidroxibenzóico, em uvas e vinhos, os mais importantes são os ácidos vanílico, siringico e salicílico, que aparecem ligados às paredes celulares e, principalmente, o ácido gálico que se encontra sob a forma de éster de flavan-3-óis. Em vinhos tintos o ácido gálico é um dos compostos monoméricos mais abundantes (Frankel et al., 1995; Silva et al., 2005). Outros ácidos benzóicos existentes em menor quantidade são o protocateico, e o *p*-hidroxibenzóico. Estes ácidos encontram-se nas uvas na forma de ésteres e no decurso da elaboração e conservação do vinho, vão sofrendo uma hidrólise lenta e assim, no vinho encontram-se estes compostos quer livres quer combinados (Ribéreau-Gayon, 1965; Singleton, 1987).

Estilbenos e Tirosol

Dentre os estilbenos, em uvas e vinhos, destacam-se os seus monômeros: *cis* e *trans*-resveratrol e *cis* e *trans*-piceid. Esses compostos são fitoalexinas, isto é, componentes sintetizados pela videira em resposta a uma situação de estresse. Em resposta ao estresse, o vegetal produz os estilbenos monômeros, precursores dos oligômeros viníferos. Resveratrol e seus derivados concentram-se nas cascas de uva, por isso seu teor é maior nos vinhos tintos (Mattivi et al., 1993a; Vitrac et al., 2005). O *trans*-resveratrol (*trans*-3,5,4-trihidroxiestilbeno) é o mais estudado devido a seu potencial benéfico para a saúde humana e é encontrado nos vinhos tintos em concentrações muito variadas (Goldberg et al., 1995b; Soleas et al., 1995). Segundo alguns autores (Mattivi et al., 1995; Soleas et al., 1995; Roggero, 1996) o isômero *cis* é formado a partir da isomerização do *trans*-resveratrol ou a partir da quebra de polímeros de resveratrol durante a fermentação do vinho, já que esse composto não é detectado nas cascas de uvas. As formas glicosiladas (piceid) do resveratrol são constituintes naturais de uvas e vinhos tintos (Lamuela-Raventós et al., 1995; Gatto et al., 2008) e geralmente encontram-se em concentrações superiores à suas formas livres correspondentes (Roggero e Archie, 1994).

O tirosol (2-(4-hidroxifenil)etil álcool) é um composto presente no vinho produzido partir da tirosina (4-hidroxifenil)-L-fenilalanina pelas leveduras durante a fermentação do mosto, e é o único composto fenólico produzido em quantidades significativas a partir de precursores não fenólicos. Esse composto influencia o flavour, contribuindo no bouquet de mel de alguns vinhos (Jackson, 2000; Bertelli et al., 2002; Covas et al., 2003).

1.8 Transformações químicas dos compostos fenólicos nos vinhos

Durante a maturação e o envelhecimento dos vinhos os compostos fenólicos estão sujeitos a diversas transformações químicas devido às reações de oxidação-redução, condensação, polimerização e complexação com outros compostos tais como proteínas, polissacarídeos ou metais (Haslam, 1980; Ricardo da Silva et al., 1991). Todas estas modificações são inevitáveis devido à reatividade dos compostos fenólicos, e ocorrem mais rapidamente durante o primeiro ano de guarda (Somers e Evans, 1986). Entre os compostos mais reativos destacam-se as antocianinas e os flavan-3-óis. Esses compostos vão sendo progressivamente transformados em pigmentos oligoméricos

e poliméricos mais estáveis e com características físico-químicas distintas dos seus precursores contribuindo dessa forma para a alteração das características organolépticas como a cor e o sabor do vinho (Robichaud e Noble, 1990; Monagas et al., 2005; Lopes et al., 2006; Chira et al., 2009).

A concentração de antocianinas, copigmentos, acetaldeído e outros metabólitos das leveduras, assim como o pH, a temperatura e a presença de luz, de oxigênio e de dióxido de enxofre são fatores que afetam as reações químicas durante o envelhecimento dos vinhos (Dallas et al., 1995; Somers e Evans, 1986; Romero e Bakker, 1999; Romero e Bakker, 2000).

Entre os diversos mecanismos que são propostos para a formação destes novos pigmentos podemos citar as reações de condensação direta entre antocianina-flavanol (Somers, 1971) ou mediada pelo acetaldeído (Timberlake e Bridle, 1976); as reações de condensação das antocianinas e/ou flavan-3-óis com moléculas tais como o ácido pirúvico, levando à formação de piranoantocianinas (Bakker e Timberlake, 1997; Schwarz et al., 2003) e a polimerização das próprias antocianinas (Franchia-Arichia et al., 1997).

Essas reações promovem modificações consideráveis que se refletem principalmente nas características de cor dos vinhos. Essas transformações químicas conduzem, numa primeira fase, a um aumento da intensidade da cor dos vinhos e a uma alteração da tonalidade, de vermelho vivo à vermelho violeta (Somers, 1971; Francia-Aricha et al., 1997). Durante o envelhecimento em barricas outras reações de oxidação e polimerização são responsáveis pelo aparecimento da coloração vermelho-alaranjada (Somers, 1971; Timberlake e Bridle, 1976). Após o engarrafamento do vinho as transformações que ocorrem são determinadas principalmente por reações não-oxidativas (Ribéreau-Gayon et al., 1998), embora pesquisas recentes afirmam que os vinhos também são sujeitos à reações oxidativas (Lopes et al., 2006).

Essas transformações, além de promoverem alterações na cor do vinho, também são responsáveis por mudanças nas características organolépticas do produto. O vinho torna-se menos adstringente durante o envelhecimento já que, além de possuir uma menor quantidade de proantocianidinas, as que permanecem no meio estão em sua grande maioria polimerizadas e portanto, têm menor capacidade de reagir com as glicoproteínas da saliva, diminuindo desta forma a sensação de adstringência (Somers, 1971; Robichaud e Noble, 1990; Chira et al., 2009).

1.9 Efeitos benéficos do consumo de compostos fenólicos de uvas e vinhos

Muitas pesquisas são realizadas com o objetivo de avaliar os efeitos antioxidantes dos compostos fenólicos presentes no vinho. Os benefícios à saúde relacionados ao consumo moderado de vinho incluem diferentes mecanismos, nos quais estão envolvidos, tanto o etanol, quanto os diversos tipos de compostos fenólicos que constituem o vinho (Brand-Miller et al., 2007; Opie e Lecour, 2007).

De uma forma muito particular, a uva e o vinho tinto possuem alta concentração de polifenóis e estudos apontam que o consumo moderado de vinho tinto diminui a incidência e a letalidade de doenças cardiovasculares devido ao alto potencial antioxidante do mesmo (Sato et al., 2001; Lopez-Velez et al., 2003; Avellone et al., 2006). Em especial, o chamado “paradoxo francês” despertou interesse da comunidade internacional por, paradoxalmente, perceber a baixa incidência de acidentes cardiovasculares na população francesa que apresentava alto consumo de gordura saturada e de vinho tinto. Esse fenômeno foi explicado pelos altos níveis de compostos fenólicos existentes na uva e no vinho (Renauld e Lorigeril, 1992).

O potencial benéfico dos componentes fenólicos presentes nos vinhos esteve primeiramente relacionado à sua capacidade em seqüestrar espécies reativas de oxigênio (EROs) nos sistemas biológicos. No entanto, várias pesquisas realizadas com esses compostos apontando além da atividade antioxidante, outros inúmeros efeitos biológicos, tais como: ação vasodilatadora, antiinflamatória, moduladora do sistema P450, inibição da oxidação da LDL e da agregação plaquetária (Frankel et al., 1995; Orellana et al., 2002; Lopez-Velez et al., 2003). Esses efeitos biológicos estão associados à diminuição de vários fatores de risco de doenças cardiovasculares, como diminuição da pressão arterial e dos níveis lipídicos (Ranaivo et al., 2004; Avellone et al., 2006). Existem evidências claras de que consumo de vinho exerce efeitos protetores endoteliais tanto nas lesões iniciais da doença arterial coronariana como nas avançadas (Flechtner-Mors et al., 2004; Ranaivo et al., 2004; Avellone et al., 2006), além de apresentarem atividades farmacológicas como a prevenção do estresse oxidativo celular (Roychowdhury et al., 2001), efeitos antitumoral (Saito et al., 1998) e cardioprotetor (Sato et al., 2001; Karatzi et al., 2005).

Os compostos fenólicos flavonóides presentes nos vinhos tintos que mais se destacam considerando a sua alta capacidade antioxidante

são os flavan-3-óis, as antocianinas e os flavonóis (Rigo et al., 2000; Mattivi et al., 2002; Rossetto et al., 2004; Lee et al., 2008). O composto não-favonóide que mais se destaca é o resveratrol (Frankel et al., 1995; Murcia e Martínez-Tomé, 2001). Recentemente estudos têm apontado o tirosol, composto fenólico não-flavonóide, formado durante a fermentação a partir de precursores não-fenólicos, como um potente agente biológico com significativa atividade cardioprotetora (Covas et al., 2003; Dudley et al., 2008).

1.10 Radicais livres, capacidade antioxidante e hipolipemiante

Os efeitos dos radicais livres sobre os sistemas biológicos estão em evidência nos últimos anos, especialmente nas doenças relacionadas com o aumento dessas espécies reativas nos organismos aeróbios, e com o envelhecimento precoce. Várias pesquisas têm demonstrado a participação dos radicais livres na etiologia de algumas patologias de elevada incidência na população ocidental. Deste modo, substâncias que demonstrem ter a capacidade de neutralizar esses radicais, tornam-se um alvo farmacológico importante, pois poderão prevenir ou amenizar os problemas causados pelo excesso de espécies reativas no organismo, o chamado estresse oxidativo.

Com exceção dos animais que são especialmente adaptados a viver sob condições anaeróbicas, todos os animais e plantas requerem oxigênio para uma produção eficiente de energia. Entretanto, esse mesmo oxigênio pode levar a formação de espécies altamente reativas, denominadas de espécies reativas de oxigênio (EROs), de grande importância na bioquímica do “estresse oxidativo” que também conta com as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Relações entre a produção de EROs e ERNs com os sistemas de defesas antioxidantes estão aproximadamente em equilíbrio. Entretanto, esse equilíbrio nem sempre é perfeito. O estresse oxidativo ocorre como um desequilíbrio entre o balanço pró-oxidante/antioxidante, em favor da situação pró-oxidante, promovendo um dano potencial (Sies, 1993; Halliwell e Gutteridge, 1999).

Segundo alguns autores, o nível de oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) em ox-LDL no tecido subendotelial, o qual ocorre através da ação de agentes oxidantes na forma de radical livre (Giroux, 1993), está proporcionalmente correlacionado à formação e à evolução de doença aterosclerótica (Holvoet, 1998). A aterosclerose é a

principal causa de doença arterial coronariana (DAC) na população dos países ocidentais. A hipercolesterolemia associada a valores plasmáticos elevados da LDL são fatores primários de risco para a DAC (Kadár e Glasz, 2001; Ranaivo et al., 2004). A redução e/ou a prevenção do aumento da concentração plasmática de colesterol reduzem o risco dos eventos e da mortalidade por causas cardiovasculares (Grundy, 2002; Sever et al., 2003; Avellone et al., 2006).

Para minimizar os efeitos desse desequilíbrio ocasionado pela produção desordenada de radicais livres, os organismos aeróbicos foram dotados, ao longo do tempo evolutivo, de distintas defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo esses serem enzimáticos (ex.: superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) ou não enzimáticos (ex.: α -tocoferol, β -caroteno, ascorbato, e GSH) (Halliwell e Gutteridge, 1999).

1.10.1 Defesas Antioxidantes

O principal sistema de defesa antioxidante enzimático celular é composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), que constitui a primeira defesa endógena de neutralização das EROs (Figura 1.8). Secundariamente, a glutathione redutase (GR) e a glutathione S-transferase (GST) auxiliam na regeneração da glutathione reduzida (GSH) e na conjugação de metabólitos reativos. Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do $O_2^{\bullet -}$ e de H_2O_2 , evitando assim, a formação do $\bullet OH$, que, embora de vida curta, na fração de milionésimos de segundos e, mesmo em concentrações bastante reduzidas ($\sim 10^{-18}$ M), é extremamente reativo e danoso às células (Boveris e Cadenas, 1997).

Considerada uma das mais importantes defesas antioxidantes na neutralização das EROs, a SOD está presente praticamente em todos os organismos eucarióticos, sendo responsável pela conversão do $O_2^{\bullet -}$ em H_2O_2 e O_2 (Figura 1.8) (Halliwell e Gutteridge, 1999).

As células também exibem antioxidantes não-enzimáticos que incluem compostos endógenos como, principalmente, a GSH, o ácido úrico, o ubiquinol 10 e alguns hormônios, além de outros exógenos como a vitamina E, C e A (e outros carotenóides como o licopeno e o β -caroteno), flavonóides e outras pequenas moléculas derivadas de fonte vegetais (Scandalios, 1997). Os antioxidantes não enzimáticos podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas

concentrações comparadas com o substrato oxidável, são capazes de retardar ou inibir a oxidação deste substrato (Halliwell e Gutteridge, 1999).

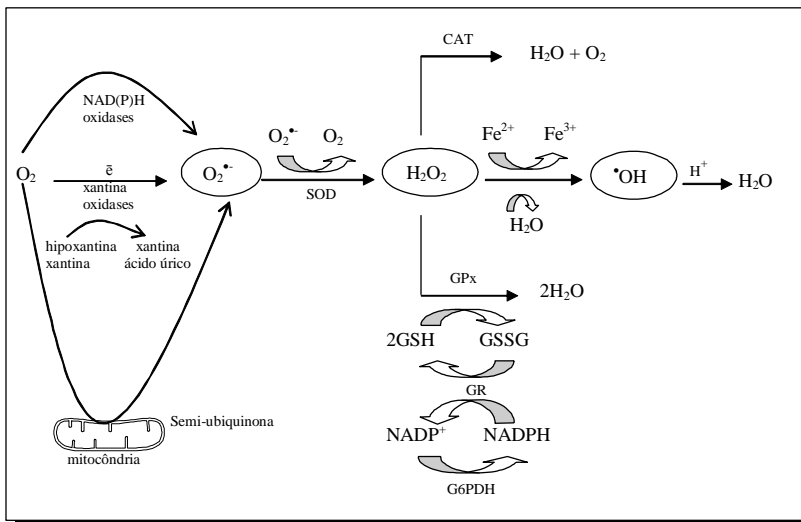


Figura 1.8. Vias de geração de EROs e mecanismos de defesa enzimáticos. Fonte: Droge (2002).

A GSH, um tripeptídeo composto de glutamato, cisteína e glicina, é o principal tiol celular não protéico, abundante em células eucariotas e desempenha um importante papel em muitos tipos de reações de biorredução e conjugação, como a síntese de proteína e de DNA, transporte de aminoácidos, “scavenger” de EROs, cofator de enzimas essenciais e defesa contra moléculas oxidantes e xenobióticos potencialmente tóxicos (Peña et al., 2000).

Além dos antioxidantes clássicos presentes em concentrações consideradas relativamente baixas, existem compostos que possuem atividade antioxidante em concentrações relativamente altas, e podem contribuir para capacidade antioxidante total, dentre eles destacam-se os compostos fenólicos (Droge, 2002). Pois esses compostos podem atuar em conjunto com as defesas antioxidantes endógenas e mecanismos fisiológicos específicos do organismo, contribuindo para o controle da formação e atuação danosa dos radicais livres.

1.11 Relação estrutura-atividade dos compostos fenólicos

Acredita-se que a capacidade antioxidante de vinhos e de seus compostos fenólicos seja a principal responsável pelos efeitos benéficos comprovados pelo consumo moderado de vinho (Renaud e Lorgeril, 1992; Rodrigo et al., 2005). Embora estudos demonstrem que esses efeitos são devido ao sinergismo dos compostos fenólicos presentes em vinhos, existem grupos de compostos fenólicos, bem como compostos individuais, que atuam de forma mais efetiva na atividade antioxidante promovida pelo consumo de vinhos. Isso ocorre, provavelmente, devido às diferenças de estrutura desses compostos.

Para os compostos flavonóides, o número e a posição dos grupos metil e hidroxil do anel B afetam diretamente a sua estabilidade e reatividade. Em geral, uma maior capacidade antioxidante é verificada em compostos que possuem a estrutura *orto*-dihidroxi no anel B, pois esses compostos são eficientes doadores de hidrogênio (Rice-Evans et al., 1996). De acordo com esses autores a alta atividade antioxidante das antocianinas pode estar relacionada com o poder redutor da estrutura *orto*-dihidroxi no anel B, enquanto a trihidroxilação do anel B da cianidina, como na delphinidina, nem aumenta nem diminui a sua atividade antioxidante *in vitro*. O mesmo já não é observado com os flavonóis miricetina e quercetina, onde a trihidroxilação da quercetina, como na meracetina, diminuiu a atividade antioxidante no mesmo meio. Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que a glicosilação de flavonóides também influencia a atividade antioxidante desses compostos, geralmente diminuindo sua atividade (Rice-Evans et al., 1996; Wang et al., 1997).

A catequina e a epicatequina (flavan-3-óis com substituições *orto*-dihidroxi no anel B) possuem alta capacidade de captura de radicais livres. Acredita-se que o grau de polimerização desses compostos também influencia na atividade antioxidante das proantocianidinas (Rossetto et al., 2004). Essa hipótese é suportada pelo fato de que a atividade antioxidante das proantocianidinas é em particular ditada pelo comprimento da cadeia de oligômeros. Monômeros e dímeros de flavan-3-óis foram mais efetivos na prevenção de oxidação da LDL que seus trímeros, tetrâmeros (Plumb et al., 1998) e hexâmeros (Lotito et al., 2000). Entretanto Saint-Cricq de Gaulejac et al. (1999) verificaram que a inibição do O_2^- aumentou com o grau de polimerização. Segundo alguns autores a presença de prodelfinidinas aumentam a capacidade antioxidante das proantocianidinas devido ao aumento no número de hidroxilas reativas (Rice Evans et al., 1996). A esterificação da posição

3 com ácido gálico (derivados galatos) é outro importante fator que afeta positivamente a capacidade de captura de radicais livres de proantocianidinas de uvas (Ricardo da Silva et al., 1991).

A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e de seus ésteres também depende do número e da posição dos grupos hidroxil na molécula (Grootveld e Halliwell, 1986; Rice-Evans et al., 1996). A capacidade de captura de elétrons dos grupos carboxilatos nos ácidos hidroxibenzóicos tem uma influência negativa sobre a sua capacidade de doar hidrogênio pelos grupos benzoatos. Assim, teoricamente os ácidos hidroxicinâmicos hidroxilados são mais efetivos que seus respectivos benzoatos (Grootveld e Halliwell, 1986). De acordo com Rice-Evans et al. (1996), análises *in vitro* demonstraram que derivados do ácido dihidroxibenzóico mostram uma resposta antioxidante em função da posição relativa dos grupos hidroxil no anel. Por exemplo, a dihidroxilação nas posições *orto* e *meta* do grupo carboxilato (2,3-dihidroxi ácido benzóico) parece ser mais eficaz quando comparada à dihidroxilação nas posições *meta* e *para* (3,4-dihidroxi ácido benzóico - ácido protocateico) e também quando comparada com os substituintes hidroxil ambos na posição *orto* do grupo carboxilato (2,5-diidroxi ácido benzóico). Assim, a proximidade do radical COOH para os substituintes orto-difenólicos aparentemente influencia a disponibilidade dos hidrogênios tendo como mais efetiva a posição *meta*. A mesma análise *in vitro* demonstrou que a esterificação do grupo carboxilado do ácido gálico reduziu a eficiência desse composto.

A atividade antioxidante dos ácidos hidroxicinâmicos também é influenciada por seus substituintes e posições na estrutura (Grootveld e Halliwell, 1986). Os difenólicos hidroxicinâmicos, como o ácido cafeico, aparentemente têm uma maior capacidade de captura de radicais livres que os monofenólicos, como o ácido *p*-cumárico, concordando com os critérios químicos aplicados aos flavonóides difenólicos (Bors et al., 1990). A metoxilação do grupo hidroxil na posição *orto* dos difenólicos, como no ácido ferrúlico, resulta em uma diminuição na capacidade de captura de radicais, enquanto que a hidroxilação, como no ácido cafeico, no lugar de metoxilação é substancialmente mais eficaz (Rice-Evans et al. 1996).

Estilbenos, como o resveratrol, e biofenóis, como o tirosol, também tem sua atividade antioxidante influenciada pela sua estrutura. Assim como os outros compostos fenólicos, a atividade antioxidante desses compostos também depende do número e da posição dos grupos hidroxil na molécula. Assim, é esperado que o hidroxitirosol seja mais

eficiente do que tirosol na captura de radicais livres (Di Benedetto et al., 2007). Estudos *in vitro* demonstraram que o *trans*-resveratrol é um potente agente antioxidante *in vitro* e *in vivo* (Frankel et al., 1995; Murcia e Martínez-Tomé, 2001). Algumas pesquisas afirmam que seus isômeros *cis* possuem menor atividade biológica que seus isômeros *trans* (Ribeiro de Lima et al., 1999; Vitrac et al., 2002).

Cabe ressaltar que, embora a atividade antioxidante de vinhos seja um dos principais mecanismos aceitos para a comprovada atividade biológica dos compostos fenólicos, outros mecanismos biológicos têm sido propostos, incluindo o vasorelaxamento mediado pelo óxido nítrico (Diebolt et al., 2001; Dell'Agli et al., 2005), a atividade estrogênica (Klinge et al., 2003), a inibição da agregação plaquetária (Demrow et al., 1995) e a modulação do metabolismo lipídico (Frankel et al., 1993).

1.12 Biodisponibilidade dos compostos fenólicos

Os efeitos benéficos ao organismo promovidos pelo consumo de compostos fenólicos, especialmente de vinhos, são relatados em vários estudos (Cartron et al., 2003; Pignatelli et al., 2006). Entretanto, são poucos os dados sobre o mecanismo de absorção e de biodisponibilidade dos compostos fenólicos no organismo, uma vez que o destino metabólico desses compostos em sistemas biológicos é altamente complexo e dependente de um grande número de processos. Alguns compostos fenólicos, tais como alguns ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóico, quercetina, campferol e malvidina-3-glucosídeo já foram detectados e quantificados em fluídos biológicos após ingestão de vinho (Cartron et al., 2003; Pignatelli et al., 2006; Nardini et al., 2009). Após a ingestão do vinho, aparentemente, os compostos fenólicos apresentam um metabolismo rápido e extenso que resulta em apenas traços desses compostos em sua forma inalterada na circulação sistêmica. A maioria dos compostos fenólicos absorvidos está presente no plasma e na urina em suas formas conjugadas (metilada, glucuronada e sulfatada). Esse fato indica um extenso metabolismo de primeira passagem intestinal/hepática das formas primárias dos compostos fenólicos ingeridos (Cartron et al., 2003; Pignatelli et al., 2006; Vanzo et al., 2007; Nardini et al., 2009), assim, a atividade biológica dos compostos fenólicos pode ser atribuída, em grande parte, à seus metabólitos.

Os primeiros estudos sobre a absorção e a biodisponibilidade de flavonóides suportavam a hipótese de que apenas os flavonóides livres

(agliconas) seriam capazes de passar à parede intestinal e serem absorvidos (Griffiths, 1982). No entanto, estudos mais recentes contradizem essa hipótese. Chang et al. (2005) verificaram que a quercetina-3-O-glucosídeo foi rapidamente absorvida e transformada em quercetina-glucuronídeo. De acordo com estudos em animais e humanos as antocianinas são absorvidas em sua forma glicosilada após o consumo oral (Matsumoto et al., 2001; Nielsen et al., 2003), e o estômago parece ser um dos locais de absorção desses compostos (Passamonti et al., 2003). Estudos realizados com flavan-3-óis demonstraram que 1 hora após a ingestão via oral de procianidinas essas se encontravam na corrente sanguínea, e que nas 6 horas seguintes ocorreu uma distribuição dessas espécies por todo o organismo, com zonas preferenciais de localização como a aorta, o duodeno e o fígado (Dédrez, 1999). Acredita-se que os compostos polifenólicos de baixo peso molecular, como as catequinas, são capazes de atravessar diretamente a barreira intestinal, e que as formas mais condensadas são metabolizadas previamente pela microflora intestinal por processos de desidroxilação, metilação ou ligação a grupos sulfato (Jimenez-Ramsey et al., 1994).

Estudos recentes demonstraram que os ácidos hidroxicinâmicos de vinho branco são absorvidos pelo trato gastrointestinal humano e circulam no sangue depois de terem sido amplamente metabolizados para as formas conjugadas glucuronada e sulfatada (Nardini et al., 2009). Vanzo et al. (2007) relataram que o ácido *trans*-caftarico é rapidamente absorvido pelo estômago, passa pelo fígado, pode atingir o cérebro, e é absorvido, metabolizado e excretado como ácido *trans*-fertárico pelos rins.

Alguns estudos com o *trans*-resveratrol revelam que esse composto é bem absorvido por via oral, amplamente distribuído no corpo, metabolizado nas formas sulfatada e glucuronada (Saiko et al., 2008, Williams et al., 2009) e é detectado na corrente sanguínea em média, aproximadamente 15 minutos depois de sua ingestão. Após o consumo moderado de vinho, os níveis séricos de *trans*-resveratrol são detectados em concentrações bastante baixas (micromolar). Em contrapartida, seus metabólitos, que podem ser os princípios ativos, são detectados em elevadas concentrações e circulam no sangue por até 9 horas (Saiko et al., 2008). A conversão dos principais metabólitos, dihidro-resveratrol e di-piceatannol, é provavelmente mediada pela fermentação microbiana do *trans*-resveratrol no trato gastrointestinal, através da conjugação sistêmica e/ou pré-sistêmica com o ácido

glucurônico e /ou sulfato, que ocorre no intestino e fígado (Williams et al., 2009).

1.13 Análises cromatográficas realizadas para caracterização dos compostos fenólicos

1.13.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia é uma técnica analítica que engloba métodos físicos utilizados para separar e/ou analisar misturas complexas. Nas técnicas cromatográficas os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: uma fase estacionária e uma fase móvel que percola a fase estacionária. Assim o processo cromatográfico consiste na partição dos componentes de uma mistura entre essas duas fases.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um tipo de cromatografia que separa compostos que estão dissolvidos em uma solução. Para isso, essa técnica emprega uma fase móvel líquida e uma fase estacionária finamente dividida e opera a pressões elevadas. A utilização de pressões elevadas permite uma redução no diâmetro das partículas da fase estacionária, localizada no interior da coluna cromatográfica, que resulta em uma área superficial e sítios de adsorção maiores, o que promove uma separação mais eficiente dos componentes da amostra. Nessa técnica os diferentes componentes da mistura passam através da coluna de separação a diferentes velocidades devido às diferenças em seus comportamentos de partição entre a fase móvel líquida e a fase estacionária (Ciola, 1998).

Os componentes essenciais da CLAE são: bomba de alta pressão; sistema de injeção da amostra; coluna de separação, detector e registrador de dados. Dentre as principais características e vantagens do método CLAE estão: alta resolução; análise não destrutiva; velocidade de separação; monitoração contínua do efluente da coluna; medição quantitativa exata; análises repetitivas e reprodutivas com a mesma coluna; automação do procedimento analítico e do tratamento dos dados (Neto e Nunes, 2003).

Principais detectores utilizados na CLAE

Os detectores são de fato transdutores, isto é, dispositivos capazes de transformar as moléculas que chegam ao seu interior em sinal elétrico (Neto e Nunes, 2003), que poderá ser registrado por um processador de

dados ou por um registrador conveniente. A interpretação desse registro produz dados qualitativos e quantitativos sobre a amostra e seus constituintes. Entre os detectores mais empregados na CLAE para a detecção de compostos fenólicos destacam-se o detector de Arranjos de Diodos (DAD) e o detector de Espectrometria de Massa (MS).

Detector de Arranjos de Diodos (DAD)

Os detectores de arranjo de diodos (DAD/PDA) são detectores espectrofotométricos de alta sensibilidade que monitoram a resposta de eluição de compostos em diversos comprimentos de onda em todo o espectro visível e ultra-violeta (UV). Esses diodos, seletivos a determinados comprimentos de onda, fornecem o espectro de compostos durante a eluição.

Um detector DAD consiste em um circuito integrado único que possui um sensor de radiação, um elemento de armazenamento de carga e um elemento de leitura. O arranjo de diodos é fabricado em um único cristal de silício, onde os diodos foto sensíveis são colocados lado a lado e isolados uns dos outros, na forma de um sanduiche de várias camadas. Cada diodo atua simultaneamente como transdutor de intensidade luminosa/carga elétrica e como elemento de armazenamento de carga (Raimundo e Pasquini, 1997).

Os detectores DAD empregam um sistema de óptica reversa, isto é, a rede de difração é colocada entre a amostra e o detector e não entre a fonte de radiação e a amostra. Assim, no DAD a radiação policromática incide sobre a amostra e é, então, dispersa em um monocromador fixo em diferentes comprimentos de onda que são monitorados simultaneamente pelos diodos do arranjo (Figura 1.9) (Busch e Busch, 1990).

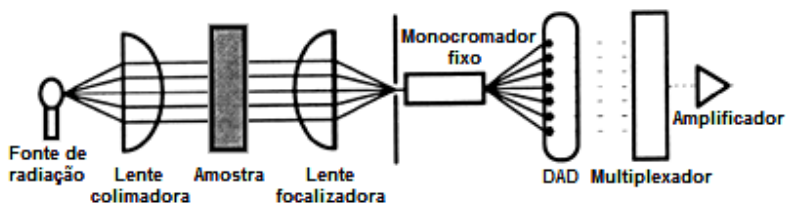


Figura 1.9. Diagrama básico de um detector de diodos (DAD). Fonte: Busch e Busch (1990).

Detector de Espectrometria de Massa (MS)

A espectrometria de massa (MS – Mass Spectrometry) é uma técnica microanalítica utilizada para obter informação do peso molecular e de características estruturais da amostra. A espectrometria de massa é capaz de fornecer informação sobre: a) a composição elementar de amostras; b) a estrutura molecular; c) a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas; d) a estrutura e a composição de superfícies sólidas e as proporções isotópicas de átomos em amostras (Chiaradia et al., 2008).

Um resumo do processo integral de análise pela espectrometria de massa clássica, culminando num espectro de massa típico frequentemente encontrado na literatura é mostrado na Figura 1.10, onde M representa as moléculas de um composto puro na fase gasosa. Após um processo de ionização, M^+ se decompõe, criando íons de massas menores que, detectados, geram o espectro de massa (Ardrey, 2003).

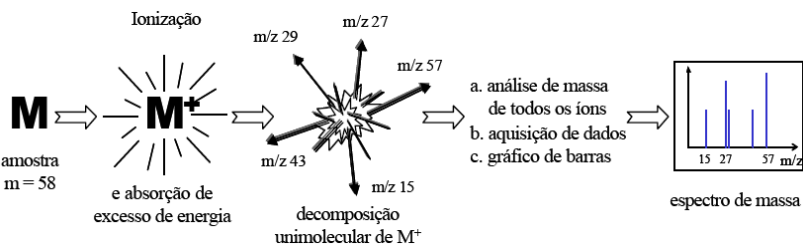


Figura 1.10. Diagrama de uma análise por espectrometria de massa. Fonte: Ardrey (2003).

Os componentes principais de um espectrômetro de massa são: uma fonte de íons, o analisador de massa, o detector e o processador (Figura 1.11). Na fonte de íons, os componentes de uma amostra são convertidos em íons, pela ação de um agente ionizante, os íons positivos ou negativos são imediatamente acelerados em direção ao analisador de massa. A função do analisador de massa é separar tais íons de acordo com a sua relação massa-carga (m/z). Finalmente um detector recebe os íons que foram separados pelo analisador, transformando a corrente de íons em sinais elétricos que são então processados e assim geram o espectro de massa (Ardrey, 2003).

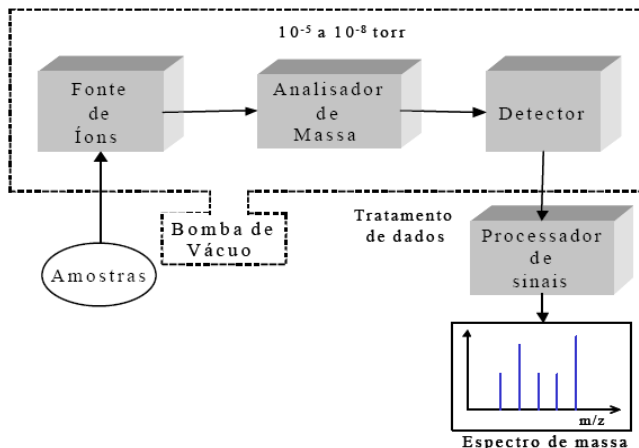


Figura 1.11. Componentes básicos de um espectrômetro de massa. Fonte: Ardrey (2003).

Como na espectrometria de massa alguma forma de energia é transferida à amostra para causar a sua ionização, o requisito básico para uma análise por espectrometria de massa é a formação de íons livres em fase gasosa. Assim, o alcance e a utilidade do método de espectrometria de massa são ditados pelo processo de ionização (Colnago et al., 2002). Diferentes processos de ionização são utilizados, incluindo bombardeamento rápido de átomos (FAB), ionização química a pressão atmosférica (APCI) e ionização por eletrospray (ESI).

A ESI é uma técnica de ionização a pressão atmosférica (API), sendo um método de geração de um aerossol diminuto através do acúmulo de carga eletrostática. Essa técnica se baseia na geração, em solução, de íons dos analitos antes que eles cheguem ao espectrômetro de massas (Kearle e Tang, 2009). A Figura 1.12 ilustra um diagrama de um espectrômetro de massa com ionização por eletrospray (ESI). Resumidamente podemos dizer que a amostra em solução (amostra-solvente) é pulverizada dentro de uma câmara sob pressão atmosférica na presença de um forte campo eletrostático e de um gás aquecido, normalmente nitrogênio, que promove a evaporação do solvente. O campo eletrostático formado é forte o suficiente para extrair íons isolados das microgotas e esses são então transportados ao analisador de massas através de uma série de estágios de vácuo e elementos iônicos que focam o caminho. O tempo que cada íon leva para atingir o detector depende de sua massa molecular (m) e carga (z), sendo proporcional à

razão m/z , sendo assim possível determinar a massa molecular do composto (Colnago et al., 2002; Kebarle e Tang, 2009).

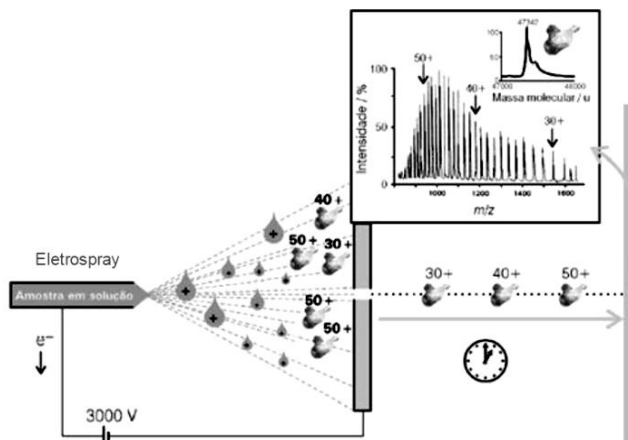


Figura 1.12. Diagrama de um espectrômetro de massa com ionização por eletrospray (ESI). Fonte: Colnago et al. (2002).

Entre as principais características da ESI podemos citar: a) capacidade para produzir íons multiplamente carregados, com número de cargas elevado, reduzindo, assim a razão m/z , de tal modo que seja possível analisar compostos de elevada massa molecular em praticamente todo o tipo de analisadores; b) as amostras analisadas devem ser introduzidas em solução, o que faz com que seja possível o acoplamento com muitas técnicas de separação; c) é uma técnica de ionização suave que permite com que as interações não covalentes entre moléculas que existem em solução sejam preservadas na fase gasosa (Kebarle e Tang, 2009).

Os espectrômetros de massa podem ser classificados em várias categorias dependendo da natureza do analisador de massa. O quadrupolo é um tipo de analisador de massas, e é o mais utilizado em espectrometria de massas. Um analisador de massas quadrupolo consiste de quatro cilindros metálicos paralelos (Figura 1.13). Os pares opostos desses cilindros são conectados eletricamente e um potencial de radiofrequência (RF) alternante é aplicado entre eles. Os íons produzidos na fonte de ionização do instrumento são focalizados ao centro da região entre os quatro cilindros e atravessam o quadrupolo axialmente. Suas trajetórias serão dependentes ao campo elétrico

produzido onde apenas os íons de uma determinada razão m/z terão uma trajetória estável e chegarão ao detector. A RF é variada para que íons de diferente razão m/z obtenham uma trajetória estável ao longo do quadrupolo chegando ao detector, gerando assim um espectro de massas. A trajetória dos íons é um pouco complexa, mas simplificada segue uma trajetória helicoidal (Ardrey, 2003).

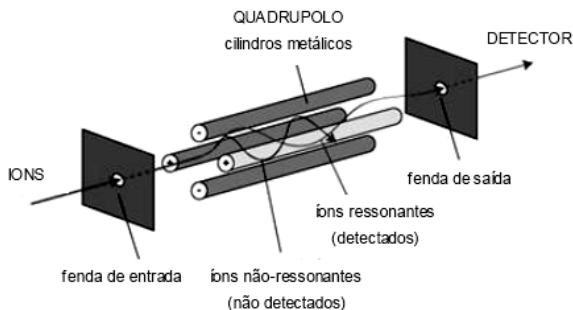


Figura 1.13. Esquema de um analisador quadrupolo. Fonte: Site da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas. (<http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunt-o.asp?-codcapitulo=8&codassunto=17&numero=3>).

CAPÍTULO 2

Phenology and ripening of *Vitis vinifera* grape varieties in São Joaquim, southern Brazil: a new South American wine growing region*

**Eliana Fortes Gris¹, Vívian Maria Burin¹, Emilio Brighenti²,
Hamilton Vieira², Marilde T. Bordignon-Luiz¹**

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos CAL; Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil.

² Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina (EPAGRI-SC), Brazil.

* Artigo publicado na Revista Ciencia e Investigación Agraria, volume 37, número 2, páginas 61-75, 2010. (ISSN 0304-5609).



Phenology and ripening of *Vitis vinifera* L. grape varieties in São Joaquim, southern Brazil: a new South American wine growing region

Eliana F. Gris¹, Vivian M. Burin¹, Emilio Brighenti², Hamilton Vieira², and Marilde T. Bordignon-Luiz¹

¹Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos CAL/CCA; Universidade Federal de Santa Catarina. Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC, Brazil.

²EPAGRI Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina. Rodovia SC 438, Km 70. São Joaquim-SC, Brazil.

Abstract

E.F. Gris, V.M. Burin, E. Brighenti, H. Vieira, and M.T. Bordignon-Luiz. 2010. Phenology and ripening of *Vitis vinifera* L. grape varieties in São Joaquim, southern Brazil: a new South American wine growing region. Cien. Inv. Agr. 37(2): 61-75. This study investigated the phenology and the ripening characteristics of *Vitis vinifera* grapes Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese and Syrah in two consecutive vintages (2006 and 2007) in order to evaluate the adaptation of these recently cultivated varieties in São Joaquim, Santa Catarina State, Brazil. The phenological data observed, budburst, blooming, setting, véraison and harvest were monitored. In order to monitor the ripening levels of pH, total acidity, total soluble solids, maturation index, total monomeric anthocyanins, total polyphenols index and color index were analyzed. The results show that the phenological cycle from budburst to harvest occurred within a frame time of 191 and 219 days and the heat summation requirements varied between 1,161 and 1,340 GDD. The summing of the GDD results during the phenological cycle of the grapevines (budburst - harvest) characterizes São Joaquim-SC as "Region I" (< 1,389 GDD), that is, a "cold region" in terms of the Winkler Regions. The climatic parameters influenced the grapevine phenology and the grape ripening. The results showed that these different grape varieties had typical characteristics at maturity and indicated that they have potential for the production of fine wines, suggesting that São Joaquim-SC is suitable for *Vitis vinifera* grape growing.

Key words: *Vitis vinifera* L., climatic parameters, grapes, phenology, ripening.

Introduction

The French term 'terroir' is used to describe the ambience created by the soil and its immediate environment. Topographical, geographical, morphological, and agro-pedological factors, if

it is maintained, influence quality and can define boundaries of appellations recognized as producing superior wines. While the precise contribution of each factor may not be known, experience indicates that a good terroir will encourage slow, but complete, maturation of appropriate grape cultivars. In general, a good terroir is one which limits the climatic extremes that may occur from year to year. Recent research in São Joaquim Region, Santa Catarina State, Brazil, has attempted to assess the poten-

Received June 26, 2009. Accepted July 31, 2009.

Corresponding author: elianagris@yahoo.com.br

tial of this region in terms of grape production and wine quality (Gris *et al.*, 2007; Falcão *et al.*, 2007; Falcão *et al.*, 2008a).

São Joaquim-SC is a new wine growing region located in the high plains of Santa Catarina State. It is known in Brazil as the coldest place in the country, and has a later budbreak and ripening in relation to other viticulture regions in Brazil (Gris *et al.*, 2008). The altitude (800 – 1400 m), is a factor which can strongly affect the climatic conditions, since it directly influences the temperature, humidity and other environmental factors which affect the grapevine phenology and the grape maturation (Mateus *et al.*, 2002).

Phenology is the study of the individual physiological events or growth stages of plants or animals that recur seasonally in response to the climate. Understanding the phenology of a given plant system is important for determining the ability of a region to produce a crop within the confines of its climatic regime (Morlat and Bodin, 2006; Webb *et al.*, 2007).

Vitis vinifera grapevines are a phenologically distinct crop with the most important development stages being budburst, blooming (flowering), setting (fruit set), véraison (color change and beginning maturation) and harvest (grape maturity). The time between these phenological stages varies greatly with grapevine variety, climate, and geographical location (Bodin and Morlat, 2006; Webb *et al.*, 2007). Timing of these developmental stages is also related to the ability of the vine to yield fruit, with early and fully expressed phenological events usually resulting in larger yields (Davies and Jones, 1998; Leewen *et al.*, 2004). Grape ripening encompasses the period that starts with the color change and ends at harvest, and varies according to the variety and the region. The main modifications that occur in the berries and, therefore, in the composition of the grape during the ripening are: an increase of the berry volume, hormonal variation, sugar accumulation, acidity reduction, pH increase, disappearance of chlorophyll and pigment accumulation in the skin, softening of the berries, synthesis of aromatic substances and flavor modification (Jackson and

Lombard, 1993; Serrano-Megias *et al.*, 2005; Mota *et al.*, 2006).

Many factors influence the grape ripening, the main ones being: a) the permanent factors which are constant and do not vary from one year to the next, that is, the region, the soil, the variety, and the rootstock; b) changeable factors which are related to the annual climate (temperature, precipitation, light and humidity) and establish the rhythm of the vegetative cycle of the plant; c) modifiable factors relating to cultivation practices, such as the fertilizer application, the pruning, the irrigation; d) the accidental factors including incidence of disease and climatic alterations such as frost, hail and drought (Smart, 1985; Bodin and Morlat, 2006).

The monitoring of ripening through classic analysis of pH, total acidity and total soluble solids, as well as the evaluation of phenolic compounds (anthocyanins and polyphenols) is very important to control the berry development and maturation. When introducing new grape varieties, the phenology and ripening monitoring is important in determining the ability of a region to produce a crop within the confines of its climate regime. In this study the phenology and ripening of the *V. vinifera* varieties Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese and Syrah, recently cultivated in São Joaquim-SC, were monitored, in order to characterize their adaptation to this new grape growing region.

Materials and methods

Characterization of São Joaquim – SC region

The region of São Joaquim is located in Santa Catarina State at altitudes of 800 - 1400 m, coordinates 28° lat. and 49° long., and these are the highest altitudes of vineyards in Brazil. The soil of this region is of the type Humic Aluminic Cambisol (with a medium clay texture) It is a well drained soil with a soft friable consistency, a high capacity for water retention and an absence of stones (Falcão *et al.* 2008a). According to the Geoviticulture Multicriteria Climatic Classification System (Tonietto and Carbonneau, 2004) the

weather of the São Joaquim-SC region is classified as “Cool, Cool nights and Humid”: Huglin’s heliothermal index-HI: 1,714; cool night index: 12.1 °C (index developed as an indicator of night temperature conditions during maturation); and dryness index-DI: 200 mm, humid (index corresponding to the potential water balance of the soil of Riou’s index, adapted using precise conditions to calculate it, as an indicator of the level of presence-absence of dryness).

Climatic parameters

Climatic data were obtained from a meteorological weather station located at 1000 m (EPAGRI - CIRAM (Agricultural Research Agency), Santa Catarina State, Brazil). The data comprise daily observations of maximum (T_{max}), minimum (T_{min}) and medium (T_{med}) temperatures, insolation, precipitation, wind strength and photoperiod. These general climatic parameters were used to derive other variables used in viticulture studies, including thermal amplitude (cumulative daily air temperature difference – maximum minus minimum), estimated potential evapotranspiration (ET_0 - Thornthwaite method) and heat summation requirements, were observed for a growing degree-days base of 10 °C ($GDD = \sum (T_{>10^{\circ C}} - 10^{\circ C})$) (Winkler, 1980).

Plant material

This experiment was conducted during two consecutive vintages (2006 and 2007) in a commercial vineyard at 28° 15' lat., 49° 50' long. and 1,290 m altitude. The vines of the varieties Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese and Syrah were planted in 2003, and the clones used were 986, 181, VCR23 and VCR1, respectively. The rootstock used was Paulsen 1103 (*V. berlandieri* Planch x *V. rupestris* Scheele); the vertical shoot positioning trellis system training was used; the row and vine spacing was 3.0 x 1.2 m and the vineyard yield was between 6 and 7 t/ha.

Phenology

Data on the occurrence of budburst, blooming, setting, véraison and harvest dates for the varieties Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese and Syrah, 2006 and 2007 vintages, were noted. The budburst, blooming, setting and véraison events are considered to occur when, for a given varietal, 50% of the plants exhibit the physiological response. Harvest date is recorded as the point at which, owing to optimal sugar levels, the first day of grape harvest commences for a given varietal.

Grapes ripening analysis

The whole study during the two consecutive vintages was conducted carefully with the same procedure, aiming to ensure sample homogeneity. The monitoring of the ripening of *V. vinifera* Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese and Syrah grapes began at the véraison when approximately 50 % of the berry had turned red. The samples were collected at intervals of 10 days. Each sample consisted of a total of 240 berries, with 8 berries per vine. The berry weight (BW) was determined through the average weight of 100 berries.

For the grapes ripening analysis, juice was squeezed from a fresh 30 berry, randomly selected, in triplicate. The samples were analyzed according to OIV (1990) procedures for pH (pH meter - MP 220 meter, Metler, Toledo), titratable acidity (TA) (titration with 0.1 M NaOH), total soluble solids (TSS, °Brix), using an Abbe refractometer at 25°C (AusJena, model 265085). Maturation index (MI) was obtained from the TSS/TA ratio.

For quantification of the grapes phenolic content the extract used was obtained as follows: grape skins were carefully removed from 90 berries and used for the extraction process of the phenolic ripening analysis. A precisely weigh amount of skins was homogenized in extraction solvent in order to obtain a proportion of 100 g of skins in 400 mL extraction solvent

(methanol:HCl ratio of 99:1). The homogenate was allowed to stand at 4 ± 1 °C in the dark for 24 h. The methanolic extract obtained was filtered through a nylon filter and the remains of the skins were washed with 100 mL of extraction solvent (Lees and Francis, 1972). Vacuum filtration was carried out using Whatman no. 2 filter papers in a Büchner funnel. Quantification of total monomeric anthocyanins (TMA) was carried out applying the pH-differential method according to Giusti and Wrolstad (2001), using $\epsilon = 28000$ and $MW = 529$ (Amerine and Ough, 1976). The total polyphenols index (TPI) was determined at 280 nm according to Ribéreau-Gayon (1970). The color intensity was determined by optical density measuring at three wavelengths, 420, 520 and 620 nm, using a 1 mm-pathlength cuvette. The intensity was the sum of the three absorbance values and the tonality was obtained at 420/520 nm (Glories, 1984). These analyses were carried out by spectrophotometric methods using a Hitachi U2010 spectrophotometer (CA, USA).

Statistical analysis

All analysis was carried out with two repetitions in triplicate. Linear regression, analysis of variance (ANOVA), principal components analysis (PCA) and the Tukey HSD Test were performed using Statistica 6 (2001) (Statsoft, Tulsa, OK, USA) and Origin (2001). The probability level used was $p \leq 0.05$.

Results and discussion

Climatic parameters

The climate is one of the basic aspects in the grape culture and, consequently, for the viticulture. Viticulture for the wine production is developed in many types of climate and soil in the different continents (Tonietto and Carbonneau, 2004). A survey of world viticultural areas can indicate relationship between climate and quality (Jackson and Lombard, 1993). Thus, the monitoring of the

climatic parameters are important because these influence both grape and wine quality.

The values for climatic parameters obtained during 2006 and 2007 vintages are shown in Table 1. In general, it was verified that these parameters were appropriate for the required phenological development of the grapevines and the grape ripening during the two vintages evaluated. The photoperiods were similar for the two vintages (3,170 in 2006 and 3,194 in 2007).

The temperature influences many parameters, including acidity level, pH, flavor and aromatic components, sugar and polyphenols; warmer temperatures almost invariably result in grapes with higher total soluble solids content (Jackson and Lombard, 1993). Thermal amplitude (cumulative daily air temperature difference between maximum and minimum) is the most reliable indicator for the time between bloom and maturity; it seems to successfully incorporate a number of different environmental circumstances (McIntyre *et al.*, 1982). The thermal amplitude verified is consistent with that recommended by Brighenti and Tonieto (2004) who reported that around 10 °C can be considered an excellent thermal amplitude. In general, the temperature values observed in our study were suitable for the phenology and ripening of the grapes. For the 2007 vintage this value was higher than for the 2006 vintage.

The insolation values were appropriate for the grapevine phenology and grape ripening (1200 - 1400 hours during the phenological cycle) (Manica and Pommer, 2006). For the 2006 vintage this value was higher than for the vintage 2007. The monitoring of this parameter is important because insolation influences the photosynthetic activity, and consequently, the satisfactory development of the fruit (Calò *et al.*, 1996). Many authors affirm that the insolation also stimulates berry anthocyanin accumulation (Smart, 1985; Keller and Hrazdina, 1998; Leewen *et al.*, 2004).

The precipitation values observed during the two vintages (Figure 1, Table 1) can be considered normal for the stages of budburst and blooming, in terms of promoting adequate inflorescence differentiation and berry set (Jones

Table 1. Climatic parameters: minimum temperature (T_{\min}), maximum temperature (T_{\max}), medium temperature (T_{med}), thermal amplitude and temperature at 21 h ($T_{21\text{h}}$), wind strength (WS), photoperiod, insolation, precipitation (Precip) and evapotranspiration (ET_0) summation obtained from meteorological station at São Joaquim SC, during the budburst at harvest vintages 2006 and 2007 for varieties evaluated. Data are average values for the phenological period.

Climatic Parameters	Burdburst/ Blooming		Blooming/ Setting		Setting/ Véraison		Véraison/ Harvest		Burdburst/ Harvest	
	Vintages		Vintages		Vintages		Vintages		Vintages	
	2006	2007	2006	2007	2006	2007	2006	2007	2006	2007
T min. (°C)	8.6	9.5	10.3	11.1	12.1	12.5	12.1	13.8	10.9	12.1
T max. (°C)	17.3	19.4	20.4	21.2	22.1	22.4	21.3	22.3	20.3	21.5
T med. (°C)	12.3	13.7	14.6	15.4	16.2	16.7	15.6	17.2	14.7	16.0
Amplitude (°C)	8.8	10.0	10.1	10.2	10.0	9.8	9.2	8.5	9.4	9.3
T 21 h (°C)	11.6	12.7	13.5	14.2	15.1	15.6	14.8	16.2	13.8	15.0
WS (km/h)	2.53	2.86	2.14	2.53	1.98	2.35	1.85	2.02	2.13	2.32
Photoper. (hours)	917	848	950	889	1,633	1,620	937	919	3,170	3,194
Insolation (hours)	477	524	443	410	759	706	448	399	1,400	1,375
Precip. (mm)	611	418	254	278	415	561	92	449	1,004	1,137
ET_0 (mm)	203	208	242	179	348	314	224	229	637	668

and Davies, 2000). However, during the ripening of the 2007 vintage the frequency and amount of precipitation were atypically high for the period (Figure 1B), due to the presence of cold front weather systems (data not shown). High precipitation values are not recommended because rainfall, when associated with adverse weather, may aggravate moisture-related problems (Calò *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 2005).

Water use is often estimated from the evapotranspiration (Esteban *et al.*, 2002; Dragoni *et al.*, 2006). Jones and Davies (2000) affirm that evapotranspiration influences the acidity levels in the grapevine. In our study the values were 637 and 668 mm for the 2006 and 2006/2007 vintages, respectively, the 2007 vintage having slightly higher water consumption than the preceding vintage. This probably occurred due to high precipitation values recorded for this vintage (Table 1). The values obtained in this study are consistent with those of Bodin and Morlat (2006)

who evaluated the potential evapotranspiration in the Anjou vineyard (France), and with other researches. Intrigliolo and Castel (2008) found that the vine water consumption is variable and influenced by climatic conditions, seasons and sites.

The Winkler index is calculated for the period of budburst through to harvest by summing each day's average temperature above a base value of 10 °C, the minimum temperature at which vine growth occurs (Winkler, 1980). It is widely used as a guide for the selection of appropriate grape varieties and for determining the suitability of a given area to produce quality wine grapes (Jones *et al.*, 2005). Although it is limited because it only considers the temperature, it is widely used because the temperature is a determining factor in the phenology (Jones and Davies, 2000; Spellman, 1999). The summed GDD results during the phenological cycle (budburst - harvest) of the grapevines characterized São Joaquim-SC as "Region I"

(< 1,389 GDD), that is a “cold region” in terms of the Winkler Regions (Figure 2). Similar results were verified by Jones *et al.* (2005) for the regions of Puget Sound (U.S.A.).

Phenology

For the two evaluated vintages, the grapevine budburst period began in winter, between 30/08 and 30/09. For the 2006 vintage it was observed that the budburst began earlier than for the 2007 vintage, and the interval between budburst/blooming was longer (Table 2). The Sangiovese cultivar was the most precocious and Cabernet Franc the latest. The heat summation requirements of the varieties during the period between budburst and blooming varied from 96 to 271 GDD, the Cabernet Franc variety requiring the greatest number of days and the greatest heat summation for this period (Figure 2 and 3).

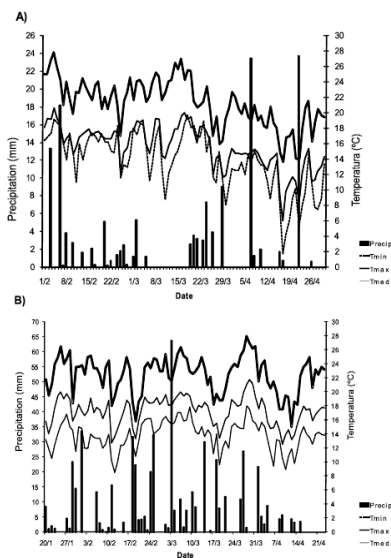


Figure 1. Maximum, medium and minimum temperatures and the precipitation values during véraison to harvest, year 2006 (vintage 2006) (A) and year 2007 (vintage 2007) (B).

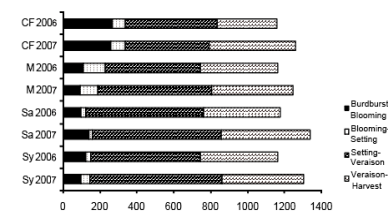


Figure 2. Heat summation requirements (GDD: growing degree-days base 10 °C) from budburst to the main phenological periods for the varieties evaluated, vintages 2006 and 2007. CF= Cabernet Franc, M= Merlot, Sa= Sangiovese, Sy= Syrah.

The blooming phenological phase occurred between 18/10 and 30/11 for the two evaluated vintages, i.e., in the spring (Table 2). The blooming/setting interval showed mean temperatures of around 14.6 - 15.5 °C, and precipitation in the range of 254 - 278 mm. This period presented the lowest heat summation requirements, between 15 and 93 GDD, and shortest time, between 8 and 29 days (Figures 2 and 3). The Sangiovese blooming/setting period was significantly shorter when compared with the other varieties evaluated, and consequently there was a lower heat requirement. Merlot had the longest blooming/setting period compared with the other varieties. The varieties Cabernet Franc and Merlot showed the greatest heat summation requirements. Following the trend from the beginning of budburst, the most precocious variety was Sangiovese and the least Cabernet Franc for both vintages.

Setting/véraison was the phenological period with the longest duration (51 - 103 days) and greatest heat summation requirements (453 -717 GDD). This occurred between 27/10 and 21/02. For the 2007 vintage this phenological interval had a greater duration and heat summation requirements when compared with the previous vintage, except for the Cabernet Franc variety.

Table 2. Start dates for beginning of phenological events for the varieties evaluated (Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese and Syrah), for two consecutive vintages 2006 and 2007, in São Joaquim-SC.

Phenological events	Vintages	Cabernet Franc	Merlot	Sangiovese	Syrah
Budburst	2006	20/09	15/09	30/08	15/09
	2007	30/09	20/09	06/09	25/09
Blooming	2006	30/11	25/10	19/10	28/10
	2007	28/11	21/10	18/10	24/10
Setting	2006	24/12	23/11	31/10	13/11
	2007	19/12	20/11	27/10	09/11
Véraison	2006	19/02	06/02	07/02	18/02
	2007	07/02	08/02	06/02	18/02
Harvest	2006	22/04	19/04	21/04	20/04
	2007	09/04	11/04	18/04	21/04

The beginning of the ripening occurred between 06/02 and 21/02, i.e., in the summer. The véraison/harvest period was from 58 to 73 days and required heat summation ranged from 325 - 482 GDD. The harvest occurred between 03/04 and 20/04 (autumn), a period historically with a low precipitation index, which is considered very desirable for the health of the grapes and production of quality fine wines. Atypically, during the previous period of ripening of the 2007 vintage (véraison-harvest) the frequency and amount of precipitation could be considered high for the period (Figures 1B, Table 1).

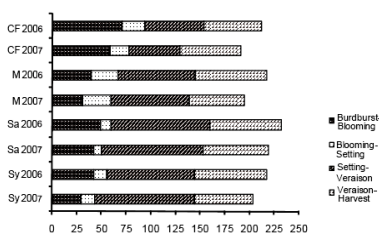


Figure 3. Number of days from budburst to the main phenological periods for the varieties evaluated, vintages 2006 and 2007. CF= Cabernet Franc, M= Merlot, Sa= Sangiovese, Sy= Syrah.

The phenological cycles (budburst/harvest) were from 191 to 219 days and required heat summation of 1,161 - 1,340 GDD; the most precocious variety with the longest phenological cycle (days) was Sangiovese and the latest variety with the shortest phenological cycle (days)

was Cabernet Franc, for both vintages. The heat summation requirement for the varieties evaluated characterizes São Joaquim-SC town as “Region I” (< 1,389 GDD), that is a “cold region” on the Winkler scale.

The phenological cycle (Table 1 and 2, Figure 2) of the 2006 vintage had a longer duration, but lower heat summation requirement. The greater heat summation requirement of the 2007 vintage was probably due to the higher average temperatures compared with the previous vintage which generally causes an anticipation of the occurrence of the phenological events, as was observed for all phenological events, except budburst. The same results have been reported by other researchers (Bindi *et al.*, 1996; Van Leeuwen *et al.*, 2004; Roberto *et al.*, 2005). Jones *et al.* (2005) reported what Sangiovese cultivated in the Conegliano region, Italy, between 1964 and 2004, had a heat summation requirement of 1,803 GDD and phenological cycle of the 163 days. Falcão *et al.* (2007) observed that the heat summation requirement ranged from approximately 1,400 to 2,000 GDD for Cabernet Sauvignon grapes, depending on the growing region.

Differences can be observed between the climatic data of the two vintages (Table 1, Figures 1 A and B). The maturation period of the 2007 vintage had higher precipitation values, atypical of the region, and also higher temperature values in relation to the other vintage, resulting in higher GDD values. The values for temperature, thermal amplitude, and insolation hours

were suitable during maturity, which is important for the adequate growth of the grapes. The temperature and insolation hours directly influenced the sugar concentration and the phenolic maturity (Smart, 1985; Mota *et al.*, 2006).

Berry chemicals parameters

The total soluble solids (TSS) of the varieties for the 2006 and 2007 vintages are shown in Figure 4. The TSS values differed for the two vintages, except for the Cabernet Franc (Table 3). Among the varieties analyzed Syrah was differentiated from the others ($p=0.005$), with lower TSS values (20.4 and 19.0 °Brix) for both vintages. All the varieties show TSS values suitable for the production of quality wine, be-

tween 19.0 and 25.0 °Brix. Positive correlation ($R=0.62$) was observed between the °Brix values and photoperiod during the grape maturity for the two vintages evaluated, indicating that an increase in hours of natural light stimulates the production of sugars in the grape. This happens because photoperiod influences the photosyntheses directly and consequently the sugar production in the grapes (Manica and Pommer, 2006).

According to the OIV (1990), the Cabernet Franc, Merlot and Syrah grapes can be considered 'small berry' (< 2.0 g), and the Sangiovese grapes 'intermediate berry' (2.0-2.5 g) for the 2006 vintage and 'large berry' (2.5- 3.5 g) for the 2007 vintage (Table 3), due to the higher precipitation for this vintage.

Table 3. Results for berry weight (BW), total soluble solids (TSS or °Brix), titratable acidity (TA), pH, maturation index (MI), total monomeric anthocyanins (TMA), total polyphenols index (TPI), Abs 420 nm, Abs 520 nm, Abs 620 nm, tonality (420/520 nm) and color index (CI) for grapevines at harvest for 2006 and 2007 vintages.

	Cabernet Franc	Merlot	Sangiovese	Syrah
Vintage 2006				
BW (g)	1.40 ± 0.05 a	1.53 ± 0.09 b	2.19 ± 0.08 c	1.53 ± 0.11 b
SST (° Brix)	23.8 ± 0.35 a	24.2 ± 0.21 a	24.2 ± 0.1 a	20.4 ± 0.11 b
TA*	0.59 ± 0.03 a	0.57 ± 0.02 a	0.81 ± 0.03 b	0.65 ± 0.01 c
pH	3.46 ± 0.04 a	3.53 ± 0.01 a	3.31 ± 0.03 b	3.41 ± 0.06 b
MI	40.5 ± 0.2 a	42.4 ± 0.15 b	29.9 ± 0.06 c	31.6 ± 0.6 d
TMA**	426.7 ± 1.8 a	677 ± 2.6 b	369.7 ± 2.9 c	615.8 ± 3.5 d
TPI	51.6 ± 1.15 a	84.9 ± 0.5 b	45.5 ± 1.3 c	91.1 ± 0.5 d
Abs 420 nm***	6.51 ± 0.2 a	16.95 ± 0.3 b	5.89 ± 0.1 c	13.29 ± 0.3 c
Abs 520 nm***	26.56 ± 0.3 a	50.54 ± 0.4 b	13.98 ± 0.2 c	33.76 ± 0.4 c
Abs 620 nm***	4.23 ± 0.1 a	2.08 ± 0.1 b	0.83 ± 0.03 c	3.13 ± 0.09 c
Tonality	0.24 ± 0.01 a	0.33 ± 0.02 b	0.42 ± 0.01 c	0.39 ± 0.01 c
CI***	37.3 ± 2.6 a	69.5 ± 2.4 b	20.7 ± 1.2 c	50.2 ± 2.0 d
Vintage 2007				
BW (g)	1.55 ± 0.20 a	1.92 ± 0.10 b	3.05 ± 0.20 c	1.78 ± 0.15 d
SST (° Brix)	23.3 ± 0.28 a	22.5 ± 0.1 b	21.3 ± 0.3 c	19.1 ± 0.12 d
TA*	0.63 ± 0.01 a	0.64 ± 0.01 a	0.75 ± 0.01 b	0.63 ± 0.01 a
pH	3.58 ± 0.04 a	3.56 ± 0.02 a	3.5 ± 0.02 a	3.52 ± 0.03 a
MI	36.4 ± 0.11 a	34.6 ± 0.09 b	28.11 ± 0.1 c	30.25 ± 0.3 d
TMA**	860 ± 30.9 a	567.9 ± 2.2 b	352.1 ± 7.4 c	864.6 ± 7.3 a
TPI	119.3 ± 0.7 a	78.2 ± 1.2 b	57.3 ± 1.5 c	126.1 ± 3.1 d
Abs 420 nm***	21.04 ± 0.18 a	14.34 ± 0.1 b	9.35 ± 0.09 c	22.34 ± 0.17 a
Abs 520 nm***	57.23 ± 0.45 a	39.67 ± 0.26 b	22.83 ± 0.16 c	58.85 ± 0.42 a
Abs 620 nm***	3.43 ± 0.02 a	1.82 ± 0.11 b	1.09 ± 0.05 c	4.34 ± 0.02 d
Tonality	0.37 ± 0.01 a	0.36 ± 0.01 a	0.39 ± 0.02 a	0.37 ± 0.01 a
CI***	81.7 ± 3.6 a	55.9 ± 2.1 b	33.3 ± 1.9 c	85.5 ± 2.9 a

*mg tartaric acid/100 mL juice, **mg malvidin 3-glucoside/100g grape skin, ***absorbance values. The values correspond to mean ± SD obtained from three repetitions.

Different letters on the same line represent statistically significant differences ($p<0.05$) according to the Tukey Test.

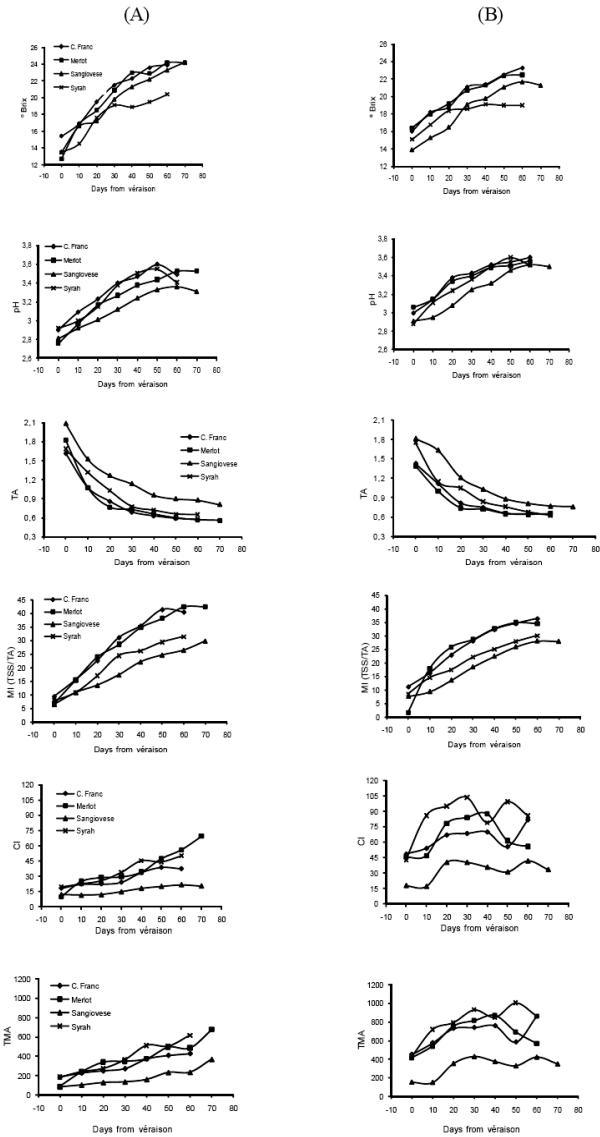


Figure 4. Total soluble solids (TSS - °Brix), titratable acidity (TA – mg tartaric acid/100mL juice), pH, maturation index (MI = TSS/TA), total polyphenols index (TPI), total monomeric anthocyanins (TMA – mg malvidin 3-glucoside/100g grape skin) and color index (CI) evolution from véraison to harvest for Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese and Syrah grapes, for 2006 (A) and 2007 (B) vintages.

As can be seen in Figure 4, the total acidity (TA) decreased during maturation. The different varieties showed different TA values for the two vintages. However, there was no significant difference between the vintages for the variety Cabernet Franc and Syrah. The Sangiovese showed significant differences to the others ($p=0.007$), the values being higher (Table 3). All the values observed are suitable for the production of quality wine (less than 1.0 mg tartaric acid 100 mL⁻¹ of juice). Similar values are reported by Falcão *et al.* (2008b) in Cabernet Sauvignon grapes cultivated in Santa Catarina State, Brazil.

The pH values during the ripening are shown for the different varieties (Figure 4) and were consistent to the aforementioned TA values evolution. The pH values for the 2006 vintage at the end of the ripening were lower than for the 2007 vintage ($p=0.008$). Significant differences were observed between Sangiovese and the others samples for the 2006 vintage. According to Rizzon and Miele (2003) pH values below 3.30 can be negative in terms of the quality of the wine. Amerine and Ough (1976) reported that pH values above 3.60 also negatively affect the quality of wine. The pH of the varieties evaluated in our (this) study were in the range recommended for quality wine (3.30 - 3.60) (Table 3).

The maturity index (MI) is the ratio between the TSS (° Brix) and TA (mg tartaric acid 100 mL⁻¹ juice), which represents a balance between sugar and acid, conferring a taste equilibrium to the

wine, important to the general quality (Mota *et al.*, 2006). Figure 4 shows that the MI values of the grapes for the 2006 vintage were higher than those for the other vintage. Sangiovese and Syrah showed significant differences ($p=0.003$) compared with the other varieties. For all varieties the MI was satisfactory, indicating a good maturity of the grapes. According to Gallander (1983), Rizzon and Miele (2003) and Falcão *et al.* (2008b) MI values between 30 and 32 are appropriate for wine production. Riu-Aumatell *et al.* (2002) evaluated the MI of Merlot, Sangiovese and Syrah grapes and found the values to be above 43, which they considered to be satisfactory.

Anthocyanins and others polyphenols are important compounds for the production of quality wine, and they are responsible for wine characteristics such as color, flavor and astringency. Their levels are variable and oscillate according to the climatic conditions (Mateus *et al.* 2002; Falcão *et al.*, 2008b). The evolution of TMA, TPI and CI values during the maturity of the grapes are shown in Figure 4 for the 2006 (A) and 2007 (B) vintages. Similar behaviors were observed for these phenolics compounds during the ripening. This correlation between phenolic compounds was confirmed by the regression analysis (Figure 5), and demonstrated that TMA, TPI and CI values are strongly correlated among themselves. According to Mazza *et al.* (1999) this is because the anthocyanins directly influence the polyphenol concentration and color intensity, they are the main polyphenols present

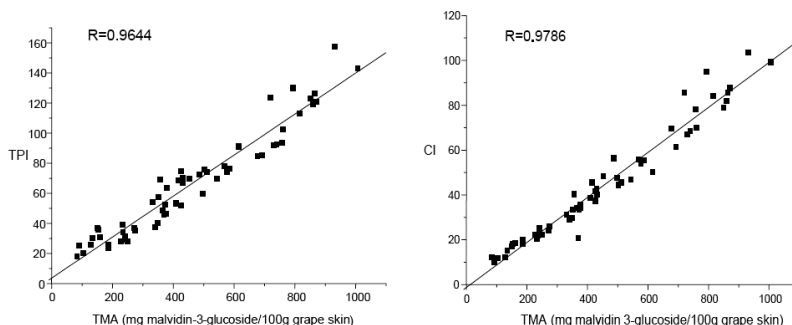


Figure 5. Correspondence between TMA, TPI and CI values during grape ripening for the four varieties evaluated, for 2006 and 2007 vintages. TMA = total monomeric anthocyanins totais, TPI= total polyphenol index, CI= color index.

in the grape skin and are responsible for their red color.

During the ripening period the TMA, TPI and CI values showed an increasing for the 2006 vintage and oscillated during of the 2007 vintage. This is probably due the higher precipitation recorded for this vintage. The precipitation is an important climatic factor in terms of the formation of phenolic compounds in the skin of the grapes (Jones and Davies, 2000). For the 2007 vintage, in general, the anthocyanin content of the grapes increased during ripening but the concentration decreased a few days before harvest.

The differences observed at the end of ripening probably occur due to the different climatic conditions. Significant differences in the phenolic content of grapes from different vintages have been reported (Mazza *et al.*, 1999; González-Neves *et al.*, 2004; Rizzon and Miele 2001) since variations in the climatic parameters, such as radiation, pluviometric index and temperature, influence the anthocyanin synthesis (González-Neves *et al.*, 2007).

Significant differences among the four varieties analyzed were observed in relation to the TMA, TPI and CI values which have been reported by many researches (Mazza *et al.*, 1999; Serano-Megías *et al.*, 2005; Orak, 2006; Ortega-Regules *et al.*, 2007; Pérez-Lamela *et al.*, 2007). This occurs because, although the environmental conditions under which the grapes were grown have a great influence on the synthesis of polyphenolic compounds, the nature and the different percentages of these compounds follow the determinant genetics of each cultivar (Calò *et al.*, 1996).

The TMA, TPI and CI values observed in our study are consistent with or higher than the results reported by other researchers (Mazza *et al.*, 1999; González-Neves *et al.*, 2004; González-Neves *et al.*, 2007; Romani *et al.*, 1996). This shows a good phenolic ripening, confirming the adaptation of these varieties to the cultivation location, and reflecting good interaction between the cultivars, the climatic conditions and the geographic region. Mateus

et al. (2002) reported that the climatic conditions observed at the higher vineyard sites appeared to be advantageous, resulting in a greater accumulation of anthocyanins in the grape skin. According to Rosier (2006) on comparing the viticultural regions in Brazil, in regions of higher altitude and lower latitude (28°), such as São Joaquim-SC, the harvest, which is normally carried out in February, occurs in April, a period with low a pluviometric index and classified as 'cold nights' (9.8 °C). This results in a satisfactory ripening of the grape, favoring an increase in the phenolic concentration of the grapes skin and seed. This leads to an increase in the potential of the grapes in terms of coloration and the aromatic characteristics (Brighenti and Tonietto, 2004) because lower temperatures (10 – 15 °C) during the ripening also positively influence the anthocyanin synthesis (Mazza and Miniati, 1993; Mori *et al.*, 2005). Some authors consider that for some varieties the optimal temperatures for anthocyanin accumulation in grape berries are in the range of 15 - 25 °C during the day and 10 - 20 °C at night (Mori *et al.*, 2005; Kliever, 1970), which was also verified in our study. Many authors have reported that polyphenol composition is due not only to the type of cultivar but also to the location where the grapes are grown and environmental and management practices, as well as the growing season (Mateus *et al.*, 2002; Jackson and Lombard, 1993; Jones and Davies, 2000).

Application of PCA was carried out on data for all varieties (Figure 6). The analysis explained 85.41 and 96.56 % of the data variability for vintages 2006 and 2007, respectively.

The first axis (Factor 1), in both vintages, was strongly positively correlated with the parameters of coloration (TMA, TPI, CI, Abs 420, Abs 520, Abs 620), MI and pH. This same factor axis showed negative correlated with tonality, TA and BW. For the 2006 vintage (Figure 6A) the tonality and TPI were positively correlated with the second axis (Factor 2), but the Abs 620, °Brix and MI parameters were negatively correlated with the same factor axis. For the vintage 2007 (Figure 6B), Second axis (Factor 2) was strongly positive correlated with °Brix, IM and

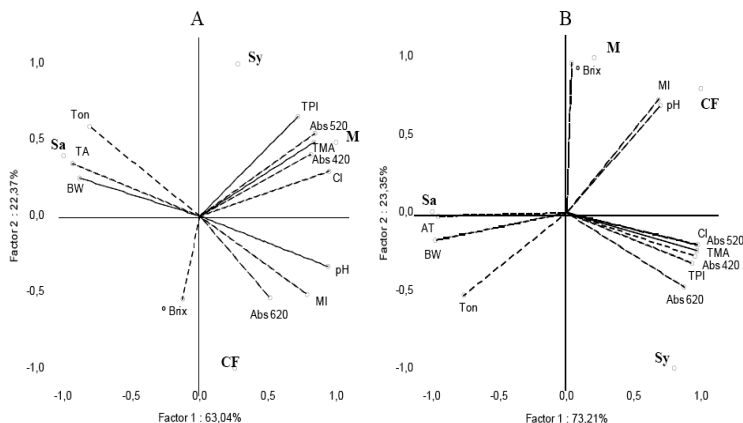


Figure 6. Principal Components Analysis (PCA) of the analysis results of grape at harvest for 2006 (A) and 2007 vintages (B).

pH and negatively with Abs 620 and tonality.

The variable TPI and TMA and the parameters of coloration, CI, Abs 420 and Abs 520 were strongly positively correlated, since the anthocyanins directly influence the polyphenol values and the red grape coloration. Strong positive correlations were also found between the parameters MI and pH, and these parameters showed strong negative correlations with TA, BW and tonality.

The variety Cabernet Franc was associated with the parameters ° Brix, MI and pH for the two vintages; for the 2007 vintage these variety also associated with the coloration Abs 620. Merlot variety showed strong association with the TPI, TMA and the coloration parameters in 2006 vintage and for the other vintage were associated with the °Brix, MI and pH parameters. This shows that these two varieties were probably influenced by climatic differences during the two vintages. For Sangiovese observed association with the TA, BW and tonality parameters, and Syrah variety was associated between TA, TPI and the parameters of coloration for the two vintages.

Conclusions

In general, the results showed that these different grapevine varieties offer satisfactory and typical phenological characteristics during growth and at maturity, in relation to the classical wine growing regions of the world, showing a good adaptation to the cultivation location, São Joaquim-SC. This indicates that Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese and Syrah grape varieties show good potential for the production of fine wines, ranking São Joaquim-SC as a suitable region for *Vitis vinifera* grape growing.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil, for financial support, the EPAGRI Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina, Brazil, for technical assistance on the climate data and the assistance with the grape sample collections, and the Villa Francioni Winery for the use of its vineyards and for technical assistance.

Resumen

E.F. Gris, V.M. Burin, E. Brighenti, H. Vieira y M.T. Bordignon-Luiz. 2010. Fenología y maduración de las variedades de *Vitis vinifera* L. de uva en São Joaquim, sur de Brasil: una nueva región de cultivo de la vid en América del Sur. *Cien. Inv. Agr.* 37(2): 61-75. Se estudio la fenología y las características de maduración de uvas *Vitis vinifera* Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese y Syrah en dos vendimias consecutivas (2006 y 2007), con el fin de evaluar la adaptación de estas variedades cultivadas recientemente en San Joaquim, Santa Catarina (Brasil). Las características fenológicas observadas fueron: brotación, floración, cuajado, envero y vendimia. Se analizaron los niveles de maduración de pH, acidez total, sólidos solubles totales, índice de maduración, el total de antocianos, índice de los polifenoles totales y el índice de color. Los resultados muestran que el ciclo fenológico desde la brotación hasta la vendimia se produjo entre 191 y 219 días y con requerimientos de acumulación de calor de 1.161 y 1.340 grados día. El resumen de los resultados de suma térmica durante el ciclo fenológico de la vid (brotación - cosecha) caracteriza a São Joaquim-SC como "Región I" (<1.389 grados día), es decir, una "zona fría", en términos de las Regiones Winkler. Los parámetros climáticos influyeron en la fenología de la vid y la maduración de la uva. Los resultados mostraron que estas variedades de uva tenían características típicas en la madurez y que ellos tienen un potencial para la producción de vinos finos, lo que sugiere que San Joaquim-SC es adecuado para el crecimiento de uvas *Vitis vinifera*.

Palabras clave: *Vitis vinifera* L., adaptación, fenología, maduración, parametros climáticos.

References

- Amerine, M.A., and C.S. Ough. 1976. Análisis de vinos y mostos. Zaragoza, Acribia. 158 pp.
- Bindi, M., F. Miglietta, B. Gozzini, S. Orlandini, and L.A. Seghi. 1996. Simple model for simulation of growth and development in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis* 36: 67-61.
- Bodin, F., and R. Morlat. 2006. Characterization of viticultural terroirs using a simple field model I. Validation of the water supply regime, phenology and vine vigour in Anjou vineyard (France). *Plant and Soil* 281:37-54.
- Brighenti, E., and J. Tonietto. 2004. O clima de São Joaquim para a viticultura de vinhos finos: classificação pelo sistema CCM geovítica. In Congresso Brasileiro de Fruticultura, Florianópolis, Brasil (Abstract).
- Calò, A., D. Tomasi, and R. Di Stefano. 1996. Relationship between environmental factors and the dynamics of growth and composition of the grapevine. *Proceedings of the Workshop Strategies to Optimize Wine Grape Quality. Acta Horticult.* 427:217-231.
- Davies, R.E., and G.V. Jones. 1998. Climatic factors influencing grapevine phenology in Bordeaux, France. In: Conference on Agricultural and Forest Meteorology of the American Meteorological Society, 23rd edition, New Mexico. p. 62-65.
- Dragoni, D., A.N. Lakso, R.M. Piccioni, and J.M. Tarara. 2006. Transpiration of Grapevines in the Humid Northeastern United States. *Am. J. Enol. Vitic.* 57:460-467.
- Esteban M.A., M.J. Villanueva, and J.R. Lissarrague. 2002. Relationships between different berry components in Tempranillo (*Vitis vinifera* L) grapes from irrigated and non-irrigated vines during ripening. *J. Sci. Food Agric.* 82:1136-1146.
- Falcão, L.D., E.F. Gris, V.M. Burin, E.S. Chaves, V. Bonin, J.P. Rosier, and M.T. Bordignon-Luiz. 2007. Ripening and phenology of Cabernet Sauvignon grapes from young vineyards in Santa Catarina State, Brazil. In 8ème Symposium International d'ologie de Bordeaux, Proceedings of 8ème Symposium International d'ologie. Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux. p. 8-12.
- Falcão, L. D., G. De Revel, M.C. Perello, L. Riquier, J.P. Rosier, A. Uberti, and M.T. Bordignon-Luiz.

- 2008a. Volatile profile characterization of young Cabernet Sauvignon wines from a new grape growing region in Brazil. *J. Int. Sci. Vigne Vin*. 42:133-144.
- Falcão, L.D., E.S. Chaves, V.M. Burin, A.P. Falcão, E.F. Gris, V. Bonin, and M.T. Bordignon-Luiz. 2008b. Maturity Cabernet Sauvignon berries from grapevines grown with two different training systems in a new grape growing region in Brazil. *Cien. Inv. Agr.* 35:321-332.
- Gallander, J.F. 1983. Effect of grape maturity on the composition and quality of Ohio Vidal blanc wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 34:139-141.
- Giusti, M.M., and R.E. Wrolstad. 2001. Anthocyanins: characterization and measurement with uv-visible spectroscopy. In *Current protocols in food analytical chemistry*, John Wiley & Sons, New York. p.1-13.
- Glories, Y. 1984. La couleur des vins rouges. 2ème partie. Mesure, origine et interpretation. *Connais. Vigne Vin*. 18:253-271.
- González-Neves, G., D. Charamelo, J. Balado, L. Barreiro, R. Bochicchio, G. Gatto, G. Gil, A. Tessore, A. Carbonneau, and M. Moutounet. 2004. Phenolic potential of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition. *Anal. Chim. Acta* 513:191-196.
- González-Neves, G., J. Franco, L. Barreiro, G. Gil, M. Moutounet, and A. Carbonneau. 2007. Varietal differentiation of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and wines according to their anthocyanic composition. *Eur. Food Res. Technol.* 225:111-117.
- Gris, E.F., V.M. Burin, L.D. Falcão, E. Brighenti, and M.T. Bordignon-Luiz. 2007. Monitoramento da maturação fenólica de novas cultivares viníferas em São Joaquim-SC-Brasil. In *XI Congresso Latinoamericano de Viticultura y Enología*, Proceedings of XI Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología, Mendoza, Argentina (Abstract).
- Gris, E.F., V.M. Burin, L.D. Falcão, E. Brighenti, and M.T. Bordignon-Luiz. 2008. Ripening of *Vitis vinifera* varieties in São Joaquim, a new wine growing region, southern Brazil. In *VII Congrès International des Terroirs Viticoles*, Proceedings of VII Congrès International des Terroirs Viticoles, Agroscope Changins-Wädenswil, Nyon. p. 325-330.
- Intrigliolo D.S., and J.R. Castel. 2008. Effects of Irrigation on the Performance of Grapevine cv. Tempranillo in Requena, Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* 59:30-38.
- Jackson, D.I., and P.B. Lombard. 1993. Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality. A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 44:409-430.
- Jones, G.V., and R.E. Davis. 2000. Using a synoptic climatological approach to understand climate viticulture relationships. *Int. J. Climatol.* 20:813-837.
- Jones, G.V., E. Duchene, D. Tomasi, J. Yuste, O. Braslavksa, H. Schultz, C. Martinez, S. Boso, F. Langellier, C. Perruchot, and G. Guimberteau. 2005. Changes in European Winegrape Phenology and Relationships with Climate. In *XIV Internationales Weinbau-Symposium*, Geisenheim.
- Keller, M., and G. Hrazdina. 1998. Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during véraison. II. Effects on anthocyanin and phenolic development during grape ripening. *Am. J. Enol. Vitic.* 49:341-349.
- Kliewer, W.M. 1970. Effect of day temperature and light intensity on coloration of *Vitis vinifera* L. grapes. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 95:693-697.
- Lees D.H., and F.G. Francis. 1972. Standardization of pigment analysis in cranberries. *Hortsc.* 7:83-84.
- Manica, I., and C.V. Pommer. 2006. Uva: do plantio a produção pós-colheita e mercado. *Cinco Continentes*, Porto Alegre. 185 pp.
- Mateus, N., J.M. Machado, and V. Freitas. 2002. Development changes of anthocyanins in *Vitis vinifera* grapes grown in the Douro Valley and concentration in respective wines. *J. Scie. Food Agric.* 82:1689-1695.
- Mazza, G., and E. Miniati. 1993. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. Boca Raton: CRC Press Inc. 362 pp.
- Mazza, G.L., P. Fukumoto, B. Delaquis, Girard, and B. Ewert. 1999. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *J. Agric. Food Chem.* 47:4009-4017.
- McIntyre, G.N., L.A. Lider, and N.L. Ferrari. 1982. The chronological classification of grapevine phenology. *Am. J. Enol. Vitic.* 33:80-85.
- Mori, K., S. Sugaya, and H. Genma. 2005. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Sci. Hortic.* 105:319-330.
- Morlat, R., and F. Bodin. 2006. Characterization of viticultural terroirs using a simple field model based on soil depth - II. Validation of the grape

- yield and berry quality in the Anjou vineyard (France). *Plant and Soil* 281:55-69.
- Mota, R.V., M.A. Regina, D.A. Amorim, and A.C. Fávoro. 2006. Fatores que afetam a maturação e a qualidade da uva para vinificação. *Inf. Agrop.* 27:56-64.
- OIV - Office International de la Vigne et di Vin. 1990. Codes des caractères descriptifs des variétés et espèces de Vitis, Office International de la Vigne et du Vin, Paris. 152 pp.
- Ortega-Regules, S.A., J.M. Ros-García, A.B. Bautista-Ortín, J.M. López-Roca, and E. Gómez-Plaza. 2007. Changes in skin cell wall composition during the maturation of four premium wine grape varieties. *J. Sci. Food Agric.* 8: 420–428.
- Pérez-Lamela, C., M.S. García-Falcón, J. Simal-Gándara, and I. Orriols-Fernández. 2007. Influence of grape variety, vine system and enological treatments on the colour stability of young red wines. *Food Chem.* 101:601–606.
- Riberáu-Gayon, P. 1970. Le dosage des composés phénoliques totaux dan les vins rouges. *Chim. Anal.* 52:627-631.
- Riu-Aumatell, M., M. López-Barajas, E. López-Tamames, and S. Buxaderas 2002. Influence of yield and maturation index on polysaccharides and other compounds of grape juice. *J. Agric. Food Chem.* 50:4604-4607.
- Rizzon, L.A., and A. Miele. 2001. Avaliação da cv. Cabernet Franc para elaboração de vinho tinto. *Cienc. Tecnol. Alim.* 21:249-255.
- Rizzon, L.A., and A. Miele. 2003. Avaliação da cv. Merlot para elaboração de vinho tinto. *Cienc. Tecnol. Alim.* 23:156-161.
- Roberto, S.R., A.J. Sato, E.A. Brenner, B.S. Jubileu, C.E. Santos, and W. Genta. 2005. Caracterização fenológica e exigência térmica (graus-dias) para a uvas “Cabernet Sauvignon” em zona subtropical. *Acta Scient. Agron.* 27:183-187.
- Romani, A., P. Mancini, S. Tatti, and F.F. Vincieri. 1996. Polyphenols and Polysaccharides in Tuscan Grapes and Wine. *J. Italian Food Sci.* 1:13–25.
- Rosier, J.P. 2006. Vinhos de altitude: característica e potencial na produção de vinhos finos brasileiros. *Inf. Agrop.* 27:105-110.
- Serrano-Megías, M., E. Núñez-Delicado, A.J. Pérez-López, and J.M. López-Nicolás. 2005. Study of the effect of ripening stages and climatic conditions on the physicochemical and sensorial parameters of two varieties of *Vitis vinifera* L. by principal component analysis: influence on enzymatic browning. *J. Sci. Food Agric.* 86:592-599.
- Smart, R.E. 1985. Principles of grapevine canopy management microclimate manipulation with implications for yield and quality. A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36:230-239.
- Spellman, G. 1999. Wine, weather and climate. *Weather* 54: 230-239.
- Tonietto, J., and A. Carboneau. 2004. A multicriteria climatic classification system for grape-growing regions worldwide. *Agric. Meteorol.* 124: 81-97.
- Van Leeuwen, C., P. Friant, X. Choné, O. Tregooat, S. Koundouras, and D. Dubourdiu. 2004. Influence of Climate, Soil, and Cultivar on Terroir. *Am. J. Enol. Vitic* 55:207-217.
- Webb, L.B., P.H. Whetton, and E.W.R. Barlow. 2007. Modelled impact of future climate change on the phenology of winegrapes in Australia. *Aust. J. Grape Wine Res.* 13:165–175.
- Winkler, A. 1980. *Viticultura*, Companhia Editorial Continental S. A., México. 792 pp.

CAPÍTULO 3

Perfil de proantocianidinas e capacidade antioxidante de vinhos de variedades *Vitis vinifera* brasileiros

**Eliana Fortes Gris¹, Fulvio Mattivi³, Eduardo Antonio Ferreira²,
Urska Vrhovsek³, Rozangela Curi Pedrosa² and Marilde T.
Bordignon-Luiz¹**

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos CAL; Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil.

²Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Bioquímica, BQA, Campus Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

³Fondazione Edmund Mach, IASMA- Istituto Agrario San Michele all'Adige, Centro Ricerca e Innovazione, Area Qualità Alimentare e Nutrizione, Via E Mach 1, 38010, San Michele all'Adige, TN, Italia.

RESUMO

O perfil de proantocianidinas (PA), de flavan-3-óis livres e a capacidade antioxidante de vinhos *Vitis vinifera* L, safras 2006 e 2007, de São Joaquim, uma nova região vitícola do sul do Brasil, são relatados neste estudo. O perfil de PA e flavan-3-óis livres foram realizados por análise de CLAE-DAD-MS, como também a determinação da composição das PAs, após a hidrólise ácida na presença de floroglucinol (floroglucinólise). A capacidade antioxidante *in vitro* dos vinhos foi realizada através da medida da captura dos radicais DPPH e ABTS e da inibição da peroxidação (TBARS). Os resultados revelaram que a catequina e a epicatequina foram os dois principais monômeros encontrados nas amostras de vinho, seguidos pela galocatequina e epigalocatequina, e a PA B1 foi o principal dímero. As unidades terminais das PAs foram constituídas majoritariamente por catequina, com a co-presença de epicatequina, galocatequina, epigalocatequina e traços de epicatequina galato. O grau médio de polimerização das PAs, porcentagem de prodelfinidinas e de galoilação das amostras variaram entre 4,9 - 9,8; 30,5 - 41,3 e 1,4 - 2,4, respectivamente. As amostras de vinho apresentaram-se eficaz na captura dos radicais livres DPPH e ABTS e também na inibição da peroxidação lipídica *in vitro*. Correlação positiva foi encontrada entre o teor de flavan-3-óis e a capacidade antioxidante *in vitro*.

Palavras-chave: vinhos *Vitis vinifera* brasileiros, proantocianidinas, capacidade antioxidante *in vitro*.

1. INTRODUÇÃO

As proantocianidinas (PAs), também designadas de taninos condensados são oligômeros e polímeros de flavan-3-óis, são amplamente distribuídas no reino vegetal. Em particular, as procianidinas são constituídas por unidades de catequina [(+)-catequina e (-)-epicatequina] e as prodelfinidinas são baseadas em unidades de galocatequina [(+)-galocatequina e (-)-epigalocatequina] (Timberlake e Bridle, 1976; Prieur et al., 1994). Embora os flavan-3-óis representem um grupo de compostos fenólicos presente em inúmeras plantas, ainda são escassos os estudos químicos sobre esse grupo, provavelmente devido às dificuldades associadas com a determinação de taninos, dada a sua natureza polimérica e a grande diversidade estrutural.

Em vinhos, os flavan-3-óis são uma das principais classes de flavonóides. Eles são encontrados nas cascas e sementes de uvas, a partir das quais são extraídos para o mosto durante a vinificação (Souquet et al., 1996; Sun et al., 1999). Esses compostos são particularmente importantes, pois contribuem ativamente nas características sensoriais dos vinhos como o amargor e a adstringência (Robichaud e Noble, 1990; Chira et al., 2009), como resultado de suas propriedades tânicas, as quais dependem de sua estrutura e do grau de polimerização (Souquet et al., 1996).

Proantocianidinas possuem alta capacidade antioxidante *in vitro* (Rigo et al., 2000; Mattivi et al., 2002; Raza e John, 2007) e *in vivo* (Cirico e Omaye, 2006; Lee et al., 2008). Unidades monoméricas de catequinas, tais como a catequina, epicatequina, galocatequina, e seus ésteres galatos, por exemplo, mostraram habilidade de aumentar a capacidade antioxidante do plasma e também aumentaram a resistência das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) à oxidação (Frankel et al., 1995). Extratos de flavan-3-óis de semente de uva com alto grau de polimerização demonstraram atividade antitumoral (Saito et al., 1998), além disso, as PAs apresentam comprovados efeitos anti-inflamatórios (Hou et al., 2007) e antimicrobianos (Cushnie e Lamb, 2005).

A região de São Joaquim é uma nova região vitícola do sul do Brasil, localizada no Planalto Sul de Santa Catarina, em altitudes que variam de 800 a 1400 m, com vinhedos implantados em altitudes entre 900 e 1400 m, e caracteriza-se por apresentar as maiores altitudes da vitivinicultura brasileira. De acordo com o sistema de Classificação Climática Multicritério Geovíticola - Sistema CCM Geovíticola (Tonietto e Carbonneau, 2004) o clima vitícola da região de São

Joaquim é classificado como “Frio, de Noites Frias e Úmido”: IH-2 IF+1 IS-2, Índice Heliotérmico-IH-2 de 1.714; Índice de Frio Noturno-IF de 12,1 °C; e Índice de Seca-IS 200 mm, úmido. O resultado da soma dos requerimentos térmicos caracteriza São Joaquim como “Região I” na escala de Winkler (Gris et al., 2008). Acredita-se que as características peculiares dessa região (climáticas, orográficas) sejam favoráveis para o cultivo de videiras e conseqüentemente para a produção de vinhos finos de alta qualidade. Falcão et al. (2008b, c) reafirmam essas expectativas, através dos bons resultados obtidos sobre a composição volátil de vinhos Cabernet Sauvignon produzidos nessa região.

Neste estudo um método de CLAE-DAD-MS foi adaptado para caracterizar e quantificar os principais flavan-3-óis livres, monômeros (catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina e epicatequina galato), e dímeros (B1 e B2) de PAs, como também os adutos da floroglucínólise, nos vinhos Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese e Syrah, safras 2006 e 2007, provenientes de São Joaquim-SC, Brasil. A capacidade antioxidante de captura dos radicais DPPH e ABTS e a inibição da peroxidação lipídica *in vitro* (TBARS) também foram avaliados, bem como sua correlação com a composição de flavan-3-óis.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Padrões e reagentes

Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC e foram adquiridos da Carlo Erba (Rodano, Itália). (+)-catequina (C), (-)-epicatequina (EC), (-)-galocatequina (GC), (-)-epigalocatequina (EGC) and (-)-epicatequina galato (ECG) foram obtidas da Sigma (Steinheim, Alemanha). As PAs B1 [(-)-epicatequina-(4 β -8)-(+)-catequina] e B2 [(-)-epicatequina-(4 β -8)-(-)-epicatequina] foram adquiridas da Extrasynthèse (Genay, França). Floroglucinol foi obtido da Aldrich (Steinheim, Alemanha). Reagente Folin-Ciocalteu, vanilina, ácido tiobarbitúrico (TBA), 1,1- difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), 2,2-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato) (ABTS), ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), hidroxitolueno butilado (BHT) e TROLOX foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co.

2.2 Amostras

Foram analisados os vinhos das variedades Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese e Syrah, safras 2006 e 2007, provenientes de São Joaquim, Santa Catarina- SC, Brasil. Os vinhedos estão localizados a 28° 15' lat. S, 49° 50' long. W e a 1.290 m de altitude e o solo da região foi classificado como Inceptisol (USDA, Falcão et al., 2008a). As videiras das variedades estudadas foram plantadas em 2003 e os clones são Cabernet Franc 986, Merlot 181, Sangiovese VCR23 e Syrah VCR1. O porta-enxerto usado foi o Paulsen 1103 (*V. berlandieri* Planch x *V. rupestris* Scheele) e o sistema de condução foi o tipo espaldeira, com espaçamento 3,0 x 1,2 m. Durante o período dos ensaios, todos os tratamentos culturais necessários foram realizados, de acordo com as recomendações para a cultura. Os rendimentos médios das quatro variedades variaram entre 7 e 6 t.ha⁻¹.

2.3 Produção dos vinhos

Todos os vinhos foram produzidos sob as mesmas condições. As uvas foram separadas dos engaços, esmagadas, e mantidas em cubas de aço inoxidável. O período de maceração foi de 15 dias, com uma ou duas remontagens diárias e temperatura entre 22°C e 28°C. Antes de iniciar a fermentação alcoólica, foram adicionadas ao mosto: metabissulfito de potássio (12 g 100 kg⁻¹ de mosto, correspondente a 60 mg L⁻¹ de SO₂ livre) (Noxitan, Pascal Biotech, Paris) *Saccharomyces cerevisiae* (20 g 100 kg⁻¹) (Fermol Rouge, Pascal Biotech, Paris), e as enzimas comerciais com atividade pectinolítica (2–4 g hL⁻¹) (Pectinex SPL/Ultra, Pascal Biotech, Paris). O mosto foi separado das partes sólidas e transferido para outras cubas de aço inoxidável. O consumo do ácido málico pelas bactérias lácticas ocorreu espontaneamente entre 60 - 75 dias. Terminadas as fermentações alcoólica e malolática os vinhos foram transferidos para barris de carvalho francês onde permaneceram por aproximadamente 1 ano. Antes do engarrafamento foi adicionado Noxitan (35 mg L⁻¹ de SO₂ livre, em média). As amostras de vinhos provenientes das safras 2006 e 2007 foram analisadas após 1 e 2 anos de guarda em garrafa, respectivamente, e foram mantidas a 10 °C antes das análises.

2.4 Preparação das amostras

O vinho foi purificado e concentrado utilizando o método descrito por Pastor del Rio e Kennedy (2006) com as seguintes adaptações. Uma amostra de 10,0 mL de vinho foi desalcolizado sob pressão reduzida em rotaevaporador a 30 °C (~7,0 mL), e depois a amostra desalcolizada foi aplicada em cartucho C18-SPE (1g, Waters, Milford, MA), previamente ativado com 4,0 mL de metanol seguido por 10,0 mL de água. O cartucho foi lavado com 50,0 mL de água, e os flavan-3-óis foram então eluídos com 40,0 mL de metanol. A fração obtida foi então evaporada sob pressão reduzida em rotaevaporador a 30 °C, e redissolvida em 2,0 mL de metanol. A preparação da amostra e análise foram realizadas em triplicata para cada vinho.

2.5 Composição das PAs

A composição das subunidades de PAs, a percentagem de galoilação (% G), a percentagem de prodelfinidicas (% P), e o grau médio de polimerização (GMP), foram determinados após a catálise ácida em presença de excesso de floroglucinol (floroglucinólise) (Kennedy e Jones, 2001). A solução de floroglucinólise (100 g L⁻¹) foi preparada em HCl 0,2 N em metanol, contendo 20 g L⁻¹ de ácido ascórbico. A amostra de vinho (100 µL) previamente concentrada e purificada (item 2.3) foi reagida com 100 µL da solução de floroglucinol a 50 °C por 20 min., e então foi adicionado 1000 µL de solução aquosa de acetato de sódio 40 mM para interromper a reação. A solução final foi então filtrada em cartucho 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA) e imediatamente injetada no sistema em CLAE-DAD-MS. A preparação das amostras e análises foram realizadas em triplicata para cada vinho.

2.6 Análises cromatográficas

As análises foram realizadas no sistema CLAE Waters 2690 (Waters, Milford, MA, E.U.A.) equipado com DAD Waters 996 e Micromassa ZQ com analisador quadrupolo e fonte de ionização por eletrospray- espectrometria de massa (ESI-MS) em modo negativo, os compostos foram separados em coluna Atlantis C18 (5.0 µm, 4.6 x 250 mm; Waters, Manchester, UK) protegida pela coluna de guarda do mesmo material. O fluxo utilizado foi 0,9 mL min⁻¹, o volume de injeção foi de 10 µL. A fase móvel consistiu de uma solução de ácido acético 2,5 % em água (A) e de metanol (B). A separação (Figura 3.1)

foi realizada a 40 °C em 47 minutos, sob as seguintes condições: gradiente linear começando com 5 % do solvente B, atingindo 6 % do solvente B em 5 min., 18 % do solvente B em 25 min., 30 % do solvente B em 1 minuto e finalmente 100 % do solvente B em 16 minutos. A coluna foi então lavada com 100 % de B por 1 minuto e reequilibrada por 7 minutos. A detecção foi realizada a 280 nm. O detector de MS foi operado a uma voltagem de capilaridade de 3000 V, tensão do extrator de 6 V, temperatura da fonte de 150 ° C, temperatura do gás de dessolvatação de 500 °C, fluxo de gás para a dessolvatação do cone (N₂) de 50 L h⁻¹ e um fluxo de gás de dessolvatação para a amostra de (N₂) 1200 L h⁻¹. ESI-MS variou de *m/z* 100-1500 com um tempo de permanência de 0,1 s.

A quantificação dos flavan-3-óis livres e dos dímeros de PAs foi realizada por MS com base nos seus tempos de retenção, de seu íon molecular e fragmento principal dado pelo MS através da comparação com os respectivos padrões externos. Os íons moleculares (M-H)⁻ utilizados foram: *m/z* 289,3 para catequina e epicatequina, *m/z* 305,3 para galocatequina e epigalocatequina, *m/z* 441,4 para epicatequina galato e *m/z* 577,5 para os dímeros B1 e B2. A voltagem do cone para todos os íons foi 30 V. Os adutos do floroglucinol foram identificados com base em seus tempos de retenção, de seus íons moleculares (*m/z* 413,3 para C e CE-floroglucinol; *m/z* 429,3 para EGC-floroglucinol e *m/z* 565,5 ECG-floroglucinol) e no fragmento principal dado pelo MS. Sua quantificação, expressa como equivalentes de seu correspondente flavan-3-ol livre (método do padrão externo), foi obtida pelo sinal de UV a 280 nm, admitindo a mesma absorvidade molar entre cada flavan-3-ol livre e seu aduto floroglucinol correspondente.

2.6.1 Validação do Método

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para o método CLAE-DAD-MS foram estimados em uma relação sinal-ruído de 3 e 10, respectivamente. A repetibilidade do método foi baseada em doze determinações consecutivas a partir de doze purificações e concentrações (item 2.3) aplicadas para o mesmo vinho.

2.7 Análises espectrofotométricas

O índice de polifenóis totais (PT) foi realizado pelo método descrito por Singleton e Rossi (1965) utilizando o reagente Folin-

Cioalteau e as concentrações foram determinadas utilizando-se uma curva de calibração com ácido gálico (mg L^{-1} de vinho). As catequinas e PAs reativas à vanilina (PROC) foram analisadas de acordo com Broadhurst e Jones (1978) expressas em catequina por mg L^{-1} de vinho. As análises espectrofotométricas foram realizadas em triplicata para cada vinho.

2.8 Capacidade antioxidante *in vitro*

A avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* dos vinhos foi realizada através da avaliação da captura do radicais livres DPPH e ABTS de acordo com Brand-Williams et al. (1995) e Re et al. (1999), respectivamente. A inibição da peroxidação lipídica foi determinada pelo método de TBARS, como descrito por Chen e Tappel (1996). Os resultados foram expressos como equivalentes de TROLOX (mM TEAC) As análises foram realizadas em triplicata.

2.9 Análise Estatística

Análise de variância (ANOVA), Teste de Tukey HSD e Análise de Componentes Principais (ACP) foram realizadas utilizando o programa Statistica 7 (2006) (StatSoft Inc., Tulsa, OK), admitindo um nível de significância de 5 %.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Validação do Método

A regressão linear, o coeficiente de regressão linear (linearidade) e os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) obtidos a partir dos dados de calibração dos padrões catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, epicatequina galato, PA B1 e PA B2 são apresentados na Tabela 3.1.

Os Coeficientes de Variação (CV%) obtidos a partir das doze repetições foram os seguintes: a) para os flavan-3-óis livres: catequina, 3,80 %; epicatequina, 3,78 %; galocatequina, 4,04 %; epigalocatechin, 2,87 %; PA B1, 3,86 % e B2 PA, 3,56 %; b) para unidades terminais de PAs: catequina, 4,71 %; epicatequina, 4,07 %; galocatequina, 4,03 %; epigalocatequina, 3,06 % e epicatequina galato, 4,57 %; c) e para as unidades de extensão de PAs: catequina, 6,75 %; epicatequina, 3,17 %; epigalocatequina, 1,87 % e epicatequina galato, 6,26 %. Todos os resultados foram considerados adequados.

Tabela 3.1. Regressão linear, R^2 , limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) obtidos para os padrões de flavan-3-óis livres e proantocianidinas (PAs) B1 e B2.

<i>Compostos</i>	<i>Regressão linear</i> $y = ax + b$	R^2	<i>LOD</i> (mg L^{-1})	<i>LOQ</i> (mg L^{-1})
Catequina	$y = 905500x - 88100$	0,9962	0,11	0,36
Epicatequina	$y = 89300x + 169000$	0,9951	0,08	0,27
Galocatequina	$y = 111000x + 21800$	0,9956	0,27	0,93
Epigalocatequina	$y = 106000x + 39800$	0,9932	0,32	1,06
Epicatequina galato	$y = 109000x + 199000$	0,9937	0,03	0,10
PA B1	$y = 43600x + 26400$	0,9965	0,15	0,49
PA B2	$y = 40700x + 8440$	0,9948	0,17	0,58

3.2 Composição de flavan-3-óis livres

Os flavan-3-óis monômeros, catequina (C), epicatequina (EC), galocatequina (GC) e epigalocatequina (EGC) e dímeros B1 e B2 foram identificados e quantificados nas amostras de vinhos Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese e Syrah, safras 2006 e 2007, provenientes de São Joaquim, SC, Brasil (Figura 3.1, Tabela 3.2). Os principais monômeros determinados foram a catequina e a epicatequina, resultados que estão de acordo com a literatura, uma vez que esses são os principais flavan-3-óis monômeros de cascas e sementes de uvas (Prieur et al., 1994; Chira et al., 2009; Mattivi et al., 2009) e conseqüentemente de vinhos (Sun et al., 1999). A catequina foi o principal monômero nos vinhos avaliados, apresentando as maiores concentrações em todas as amostras analisadas, contribuindo em média com 60 % do total de monômeros, como já observado por outras pesquisas (Sun et al., 1998; Monagas et al., 2003). As maiores concentrações de catequina foram observadas nas amostras dos vinhos Merlot 2007 e Syrah 2006. A epicatequina representou aproximadamente 25 % dos monômeros quantificados nas amostras, com concentrações que variaram entre 4 e 16 mg L^{-1} , sendo a Merlot e a Syrah as variedades com as maiores concentrações. Observou-se que as concentrações de catequina nas variedades Cabernet Franc e Merlot foram superiores na safra 2007 quando comparadas à safra anterior; e o contrário foi verificado para as variedades Sangiovese e Syrah. A mesma tendência também foi observada para a epicatequina.

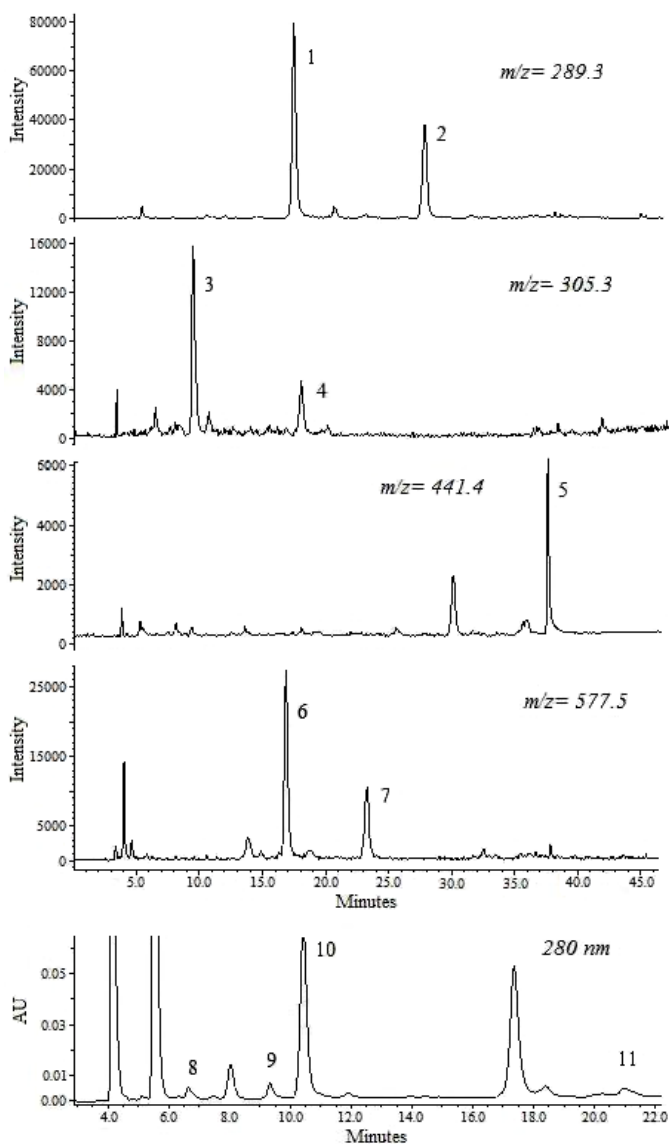


Figura 3.1. Cromatogramas das análises de CLAE-DAD-MS dos flavan-3-óis (MS) e dos adutos floroglucinol (DAD). Numeração dos picos: 1, catequina; 2, epicatequina; 3, galocatequina; 4, epigalocatequina; 5, epicatequina gallate; 6, B1; 7, B2; 8, epigalocatequina-floroglucinol, 9, catequina-floroglucinol; 10, epicatequina-floroglucinol; 11, epicatequina galato-floroglucinol.

Tabela 3.2. Conteúdo de flavan-3-óis monômeros e dímeros, polifenóis totais (PT) e proantocianidinas totais (PROC) em amostras de vinhos.

Safras	2006				2007			
	<i>Cabernet Franc</i>	<i>Merlot</i>	<i>Sangiovese</i>	<i>Syrah</i>	<i>Cabernet Franc</i>	<i>Merlot</i>	<i>Sangiovese</i>	<i>Syrah</i>
Catequina	12,25±0,09 ^a	25,03±0,37 ^b	20,38±0,41 ^c	29,72±0,78 ^d	22,03±0,57 ^c	34,71±0,28 ^e	13,72±0,06 ^a	19,54±0,54 ^c
Epicatequina	4,64±0,19 ^a	10,44±0,29 ^b	8,23±0,18 ^c	11,89±0,44 ^d	5,69±0,18 ^a	16,08±0,63 ^e	4,06±0,09 ^a	9,14±0,10 ^c
Galocatequina	3,59±0,064 ^a	3,64±0,04 ^a	2,91±0,06 ^b	3,28±0,07 ^c	4,59±0,09 ^d	4,07±0,05 ^e	6,26±0,06 ^f	1,92±0,05 ^g
Epigalocatequina	1,47±0,06 ^a	2,35±0,05 ^b	1,91±0,03 ^c	2,06±0,02 ^c	1,89±0,056 ^c	2,53±0,03 ^{b,d}	2,65±0,01 ^d	1,87±0,07 ^e
PA B1	6,38±0,14 ^a	17,19±0,31 ^b	10,76±0,23 ^c	20,64±0,69 ^d	12,75±0,33 ^c	35,47±0,42 ^e	10,33±0,38 ^c	24,30±0,34 ^f
PA B2	2,37±0,04 ^a	8,02±0,14 ^{b,d}	5,63±0,09 ^c	9,86±0,25 ^b	7,29±0,12 ^{c,d}	25,87±0,37 ^e	5,58±1,52 ^c	12,20±0,11 ^f
Total monômeros	21,95 ^a	41,46 ^b	33,44 ^c	46,95 ^d	34,20 ^c	57,40 ^e	26,71 ^f	32,47 ^c
Total dímeros	8,75 ^a	25,20 ^b	16,40 ^c	30,49 ^d	20,04 ^b	61,34 ^e	14,92 ^c	36,5 ^f
PT	2680,4±12,4 ^a	2692,1±40,3 ^a	2287,6±31,1 ^b	2732,2±37,2 ^a	2691,4±26,2 ^a	2813,7±16,2 ^c	2732,1±27,9 ^a	2790,5±34,2 ^a
PROC	828,2±11,8 ^a	894,9±10,9 ^b	725,6±19,2 ^c	860,6±14,2 ^b	808,3±16,3 ^a	1073,9±31,1 ^d	867,9±25,2 ^b	872,1±24,3 ^b

Valores expressos em mg L⁻¹ ± desvio padrão. Diferentes letras em uma mesma coluna são diferentes significativamente (Teste de Tukey, $p < 0,05$). PA = proantocianidina.

Concordando com a literatura (Prieur et al., 1994), galocatequina e epigalocatequina foram quantificadas em menores concentrações. A galocatequina contribuiu com percentagens que variaram de 6 a 23 % do total de flavan-3-óis monômeros. Dentre as amostras estudadas o vinho Sangiovese 2007 e a variedade Cabernet Franc (2006 e 2007) apresentaram significativos conteúdos de galocatequina, que variaram entre 23 e 15 % do total de flavan-3-óis monômeros. A epigalocatequina foi responsável por ~ 6 % do total de flavan-3-óis monômeros quantificados.

Entre os oligômeros de PAs, os dímeros B1 e B2 estão presentes em maior abundância em uvas e conseqüentemente em vinhos (Ricardo da Silva et al., 1992; Saint-Cricq de Gaulejac et al., 1998). A PA B1 foi o dímero quantificado em maiores concentrações nas amostras, contribuindo com mais de 60 % do total de dímeros, como já reportado em outras pesquisas (Cosme et al., 2009). A PA B1 é o principal dímero em cascas de uvas e durante a fermentação do mosto esses são mais facilmente extraídos que o B2, presentes em altas concentrações nas sementes. Assim, para as variedades estudadas, os flavan-3-óis provenientes das cascas de uvas contribuíram de forma mais determinante na composição dos vinhos, como já reportado por outras pesquisas (Sun et al., 1999; Fernández et al., 2007).

Os vinhos Merlot e Syrah apresentaram os valores mais elevados de flavan-3-óis totais (monômeros e dímeros), especialmente o vinho Merlot 2007 (118 mg L⁻¹). Em relação à distribuição em percentagem, os vinhos Cabernet Franc e Syrah, safra 2006, foram os apresentaram as maiores proporções de monômeros, seguidos pelos vinhos Sangiovese e Cabernet Franc, safra 2007, Merlot e Syrah, safra 2006, e Merlot e Syrah, safra 2007. As maiores proporções de dímeros foram verificadas nos vinhos Cabernet Franc e Merlot safra 2007 (acima de 51 %), o que já foi observado em vinhos espanhóis Tempranillo, Graciano e Cabernet Sauvignon por Monagas et al. (2003). É interessante notar que ambos, safra e variedade, influenciaram a composição de flavan-3-óis dos vinhos ($p < 0,05$), mas verificando-se diferentes comportamentos de acordo com a safra. O mesmo também foi observado por Chira et al. (2009) que avaliou durante duas safras a composição de taninos de cascas e sementes de uvas Merlot e Cabernet Sauvignon da região de Bordeaux, França.

3.3 Composição das proantocianidinas (PAs)

As PAs de uvas e vinhos são formadas por diversos oligômeros e polímeros com uma estrutura molecular bastante complexa. A floroglucinólise, despolimerização das PAs em meio ácido na presença de floroglucinol, tem revelado importantes informações sobre a composição de PAs (Kennedy and Jones, 2001). Os dados sobre a composição estrutural de PAs das amostras de vinhos são apresentados na Tabela 3.3. Estruturalmente, as PAs presentes nas amostras de vinhos foram compostas de catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina e epicatequina galato como unidades terminais e de extensão, sendo que entre esses compostos somente a galocatequina não foi detectada como unidade de extensão (Tabela 3.3). Assim, as PAs dos vinhos analisados consistiram de uma mistura de procianidinas e prodelfinidinas. As unidades terminais das amostras de vinhos foram basicamente constituídas de catequina (55 a 66 %), como também verificado em outras pesquisas tanto para cascas como para sementes de uvas (Pastor del Rio e Kennedy, 2003; Mattivi et al., 2009). Merlot 2007 e Syrah (safras 2006 e 2007) foram os vinhos que apresentaram as maiores concentrações da unidade terminal catequina, seguidos pelos vinhos Cabernet Franc e Sangiovese. A unidade terminal epicatequina apresentou as maiores concentrações e proporções (entre 22 e 41 %) depois da catequina. O vinho Merlot 2007 apresentou as maiores concentrações e proporções dessa unidade terminal (41 %), seguido pelos vinhos Cabernet Franc e Syrah 2007.

A maior proporção de unidades terminais de galocatequina foi verificada no vinho Sangiovese 2007 (11 %), seguido pelos vinhos Syrah nas duas safras (2,5 %), enquanto que as menores foram encontradas no vinho Merlot (0,6 %). As percentagens mais elevadas de epigalocatequina, como unidade terminal também foi verificada no vinho Sangiovese 2007 (8 %). O único derivado galato verificado nas unidades terminais foi a epicatequina galato, e apenas nas amostras da safra 2007; que corresponderam, em média, a 0,15 % das unidades terminais. Comumente as concentrações dos compostos galatos como unidades terminais em vinhos são baixas, sendo muitas vezes não detectados (Monagas et al., 2003; Fernández et al., 2007). O mesmo também é observado em cascas de uvas (Chira et al., 2009; Mattivi et al., 2009).

Tabela 3.3. Composição das PAs em unidades terminais e de extensão (percentagem em mols), GMP, %P e %G das amostras de vinhos.

Safrá	2006				2007			
	<i>Cabernet Franc</i>	<i>Merlot</i>	<i>Sangiovese</i>	<i>Syrah</i>	<i>Cabernet Franc</i>	<i>Merlot</i>	<i>Sangiovese</i>	<i>Syrah</i>
Unidades Terminais								
Catequina	66,1 ^a	66,0 ^a	65,4 ^a	66 ^a	57,1 ^b	54,3 ^c	59,1 ^b	64,1 ^d
Epicatequina	27,9 ^a	28,1 ^a	28,2 ^a	26,1 ^b	36,1 ^c	40,8 ^d	22,1 ^e	32,4 ^f
Gallocatequina	1,2 ^{a,c}	0,6 ^b	1,0 ^c	2,5 ^d	1,2 ^{a,c}	1,4 ^a	10,4 ^e	2,6 ^d
Epigallocatequina	4,8 ^a	5,3 ^a	5,4 ^a	5,4 ^a	5,4 ^a	3,4 ^b	8,2 ^c	1,0 ^d
Epicatequina galato	nd	nd	nd	nd	0,15 ^a	0,13 ^a	0,19 ^a	0,11 ^a
Unidades de extensão								
Catequina	0,6 ^a	0,8 ^b	0,7 ^a	0,8 ^b	0,5 ^c	1,0 ^d	0,4 ^c	0,6 ^a
Epicatequina	52,8 ^a	55,3 ^{b,c}	54,9 ^b	56,1 ^c	51,4 ^a	61,2 ^d	52,8 ^a	44,9 ^e
Epigallocatequina	44,6 ^a	42,0 ^b	41,6 ^b	41,1 ^{b,e}	46,4 ^c	36,0 ^d	44,9 ^c	38,8 ^e
Epicatequina galato	2,0	1,9	2,9	2,1	1,7	1,8	1,9	2,3
Total unidades terminais*	67,6 ^a	49,0 ^b	48,1 ^b	76,7 ^c	71,2 ^{a,c}	94,6 ^d	64,3 ^a	73,2 ^{a,c}
Total unidades de extensão*	261,0 ^a	284,9 ^a	215,9 ^b	326,3 ^c	349,7 ^c	461,0 ^d	568,3 ^e	423,8 ^d
GMP	4,9 ^a	6,9 ^b	5,5 ^c	5,2 ^c	5,9 ^d	5,8 ^d	9,8 ^e	6,8 ^b
% P	36,6 ^a	36,7 ^a	35,1 ^b	34,8 ^b	39,7 ^c	30,5 ^d	41,3 ^c	33,7 ^e
% G	1,5 ^{a,c}	1,6 ^{a,b}	2,4 ^d	1,7 ^{b,c}	1,4 ^e	1,5 ^{a,c,e}	1,6 ^{a,c}	2,0 ^f

* Valores expressos em mg L⁻¹ ± desvio padrão.; PAs = Proantocianidinas; GMP, grau médio de polimerização; %P, percentagem de prodelfinidina (soma das unidades terminais e de extensão); %G, percentagem de galoilação (soma das unidades terminais e de extensão); nd, não detectado. Diferentes letras em uma mesma coluna são diferentes significativamente (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

As unidades de extensão presentes em menores concentrações foram a catequina e a epicatequina galato (Tabela 3.3). A unidade de extensão catequina representou até 1 % do total das unidades de extensão e a epicatequina galato até 3 %. As unidades de extensão foram caracterizadas pela presença de epicatequina e epigalocatequina, com predominância da epicatequina, a qual representou mais de 44 % das unidades de extensão das amostras de vinhos. Um perfil similar foi observado por outros pesquisadores (Prieur et al., 1994; Pastor del Rio e Kennedy, 2006) com pequenas variações entre as variedades, como também verificamos em nosso estudo. A epicatequina representou de 45 a 61 % das unidades de extensão, enquanto que a epigalocatequina representou de 36 a 45 %, sugerindo uma alta contribuição das proantocianidinas provenientes das cascas de uvas nas amostras dos vinhos avaliados.

Comparando as duas safras verificou-se que o total de PAs e de unidades de extensão das amostras da safra 2006 foi significativamente menor que o da safra 2007 ($p < 0,05$). Dentre outras possibilidades, isso pode ter ocorrido devido às diferenças climáticas observadas entre as duas safras avaliadas. Na safra 2007 foram verificados valores de requerimentos térmicos (graus-dia-GD) e de temperaturas médias superiores à safra anterior (dados apresentados no Capítulo 2). Autores afirmam que a exposição ao sol, a temperatura e os GD influenciam positivamente a concentração de proantocianidinas (Pastor del Rio e Kennedy, 2006). Uma hipótese alternativa, que é o envolvimento das PAs nas reações de polimerização gerando - em vinhos com maior tempo de guarda, novas estruturas que são menos hidrolisáveis pela floroglucínólise.

A percentagem de galoilação (% G) das amostras analisadas nesse estudo (1,5 - 2,5 %) está de acordo com algumas publicações (Fernández et al., 2007), embora também sejam reportados valores superiores aos verificados em nosso estudo (Cosme et al., 2009). A % G é relativamente pequena em vinhos provavelmente porque, em geral, as maiores concentrações dos derivados galatos estão presentes nas sementes das uvas (Prieur et al., 1994; Mattivi et al., 2009), assim a extração desses compostos para o vinho é mais difícil quando comparadas com as PAs presentes nas cascas. Além disso, segundo Di Stefano et al. (1990) as PAs de sementes de uvas são fonte de ácido gálico do vinho, o que também gera a diminuição da concentração de derivados galatos de PAs nesses derivados.

ANOVA (*two-way*) revelou que ambos os fatores, safra e variedade influenciaram a composição de flavan-3-óis ($p < 0,05$), o que é comumente reportado. Segundo Mattivi et al. (2009) a biossíntese de flavan-3-óis e de PAs em uvas parece ser fortemente regulada em nível de variedade. É interessante observar que a composição de flavan-3-óis além de variar significativamente com a variedade da uva e com a safra, também pode ser influenciada pelas condições ambientais (Mattivi et al., 2002). Além disso, a composição dos vinhos está em constante evolução durante a vinificação, o armazenamento em barricas e o envelhecimento em garrafas. De acordo com Ribereau-Gayon et al. (1998) uma vez que o vinho é engarrafado as transformações químicas que ocorrem são basicamente reações não oxidativas. Entretanto, Lopes et al. (2006) afirmam que os vinhos estão sujeitos à várias reações oxidativas depois de seu engarrafamento uma vez que as rolhas permitem a entrada de oxigênio. Assim, todas essas transformações influenciam a composição fenólica do vinho e conseqüentemente dos flavan-3-óis, o que torna bastante complexo o estudo desses compostos em vinhos.

As concentrações de flavan-3-óis livres e das PAs observadas nas amostras dessa nova região produtora de vinhos finos no sul do Brasil estão de acordo com várias pesquisas (Monagas et al., 2003; Pastor Del Rio e Kennedy, 2006; Cosme et al., 2009). Isso é de grande importância, pois as PAs influenciam substancialmente a qualidade do vinho (Saint-Cricq de Gaulejac et al., 1998), influenciando, na cor dos vinhos através da condensação com antocianinas (Boulton et al., 2001) e também nas propriedades sensoriais (Chira et al., 2009), além de possuírem efeitos benéficos à saúde, destacando-se sua potencial atividade antioxidante o que também é essencial para garantir a estabilidade química frente à oxidação em vinhos tintos (Rigo et al., 2000; Mattivi et al., 2002).

3.4 Capacidade antioxidante *in vitro*

A capacidade antioxidante total *in vitro* dos vinhos Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese e Syrah, safras 2006 e 2007 foram avaliados através dos radicais DPPH e ABTS. Os resultados estão evidenciados na Figura 3.2 onde se pode observar expressiva atividade antioxidante das amostras testadas contra esses dois radicais, que variou de 11,2 a 23,17 mM TEAC. Verificou-se ainda que as amostras provenientes da safra 2007 demonstraram-se mais efetivas, e que essa atividade foi maior contra o radical ABTS. A capacidade antioxidante de vinhos e de seus compostos fenólicos é bastante estudada, e acredita-se que seja a

principal responsável pelos efeitos benéficos comprovados pelo consumo moderado de vinho (Frankel et al., 1995).

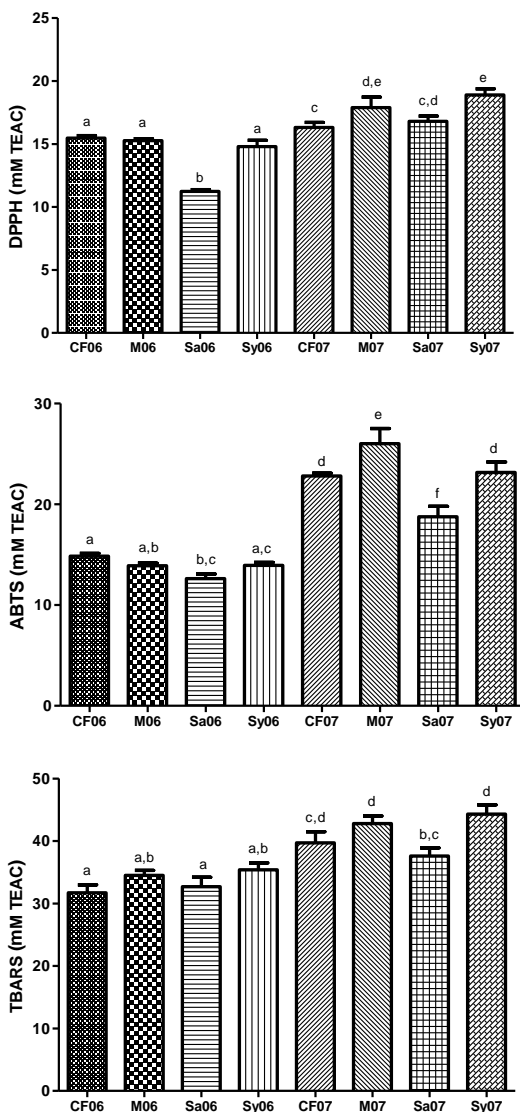


Figura 3.2. Atividade antioxidante *in vitro* dos vinhos Cabernet Franc (CF), Merlot (M), Sangiovese (Sa) e Syrah (Sy), safras 2006 (06) e 2007(07), contra os radicais DPPH, ABTS e a inibição da peroxidação lipídica (TBARS).

Um dos mais severos danos causados pelo excesso de radicais livres no organismo é a peroxidação lipídica. O malonaldeído (MDA) é o principal aldeído reativo resultante da peroxidação de membranas biológica. O aumento da acumulação de MDA e de dienos conjugados na célula pode resultar na degradação celular, mudanças funcionais e bioquímicas eventualmente levando à morte celular (Winrow et al., 1993). MDA é um produto secundário da peroxidação lipídica usado como um indicador de dano tecidual por uma série de reações em cadeia (Ohkawa et al., 1979). Nesse estudo nós avaliamos o potencial dos vinhos na inibição da peroxidação lipídica *in vitro* através da quantificação dos derivados de MDA pelo método de TBARS. A Figura 3.2 mostra a capacidade das amostras de vinhos na inibição da peroxidação lipídica. Os valores mais significativos foram verificados pelas amostras Cabernet Franc, Merlot e Syrah provenientes da safra 2007. A capacidade de inibição da oxidação lipídica por vinhos já foi verificada por outras pesquisas (Rigo et al., 2000; Frankel et al., 1995) e pode ser explicado devido à capacidade antioxidante dos mesmos, já que uma vez que a peroxidação lipídica é um processo mediado por radicais livres.

Embora seja de conhecimento que o vinho é uma mistura complexa de compostos fenólicos, que esses atuam de forma sinérgica e que são os responsáveis pelas propriedades antioxidantes dos mesmos (Cirico e Omaye, 2006); também é conhecido que existem grupos que se destacam por atuarem de forma mais efetiva como agentes antioxidantes; dentre esses se destacam as proantocianidinas. Acredita-se que o potencial antioxidante de vinhos tintos é devido, em grande parte, ao seu conteúdo de flavan-3-óis e PAs (Rice-Evans et al., 1996; Rigo et al., 2000). Nesse contexto, a influência da composição de flavan-3-ol e PA sobre as atividades antioxidantes *in vitro* das amostras de vinhos foi avaliada através da análise dos componentes principais (Figura 3.3).

Os três primeiros componentes principais explicaram 82,02 % do total de variância dos dados. Na Figura 3.3 também pode-se observar que o Fator 1 separou as amostras de vinhos em dois grupos distintos, relativos a cada safra. Os vinhos da safra 2006 foram todos posicionados ao lado direito e negativo desse fator, e os vinhos da safra 2007 no lado positivo, verificando-se que os vinhos dessa safra foram associados com a maioria das análises quantitativas e antioxidantes realizadas. Isso ocorreu, provavelmente, devido às maiores concentrações dos compostos avaliados observados na safra 2007 em relação à safra

anterior, o que também promoveu, de modo geral, uma maior atividade antioxidante desses vinhos. O vinho Sangiovese 2006 foi posicionado no quadrante superior e separado dos outros vinhos da mesma safra por influência da sua maior % G. Os vinhos da safra 2007, Merlot e Syrah foram associados aos valores de PT e PROC e com as análises de FRAP, ABTS e DPPH; já as variedades Cabernet Franc e Sangiovese foram associadas aos valores de % P, C, EC, EGC, GMP, B1 e B2.

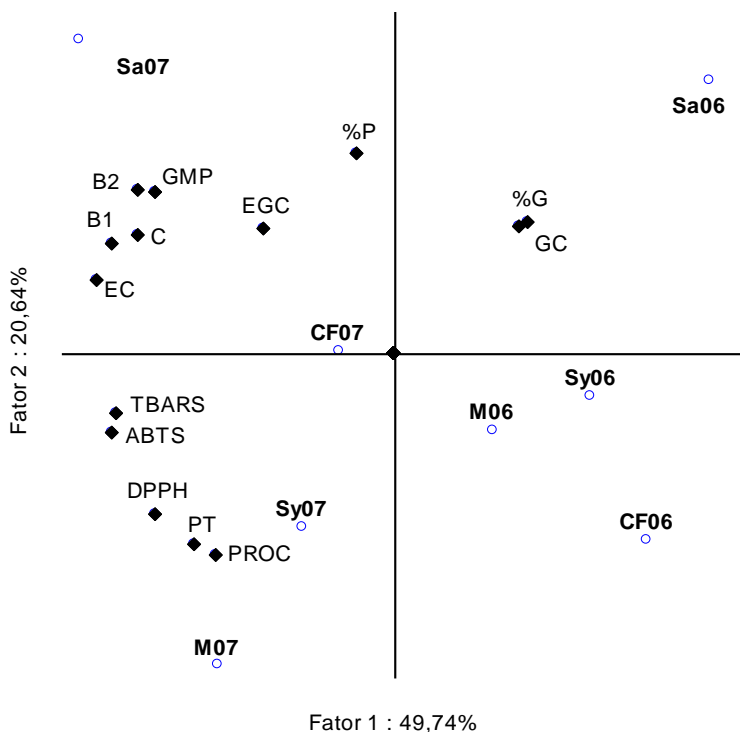


Figura 3.3. Análise de Componentes Principais dos flavan-3-óis livres, % P, % G, GMP, ABTS, DPPH e TBARS.

A alta correlação entre os valores de PT e PROC e a atividade antioxidante *in vitro* de vinhos já foi verificada por outros autores (Rossetto et al., 2004). A ação antioxidante dos flavan-3-óis é devido, provavelmente, à estrutura desses compostos. De acordo com Rice-Evans et al (1996) os polifenóis com substituições di-hidroxi na posição *orto* no anel B possuem altas capacidade de antioxidante. O grau de

polimerização também influencia na atividade antioxidante das PAs (Rossetto et al., 2004), e em nosso trabalho nós verificamos que esse foi positivamente correlacionado com ABTS e TBARS. Essa hipótese é suportada pelo fato de que a atividade antioxidante das PAs é, em parte, ditada pelo comprimento da cadeia de oligômeros. Monômeros e dímeros de flavan-3-óis foram mais efetivos na prevenção de oxidação da LDL que seus trímeros, tetrâmeros (Plumb et al., 1998) e hexâmeros (Lotito et al., 2000).

A presença de prodelphinidinas aumenta a capacidade antioxidante de PAs devido ao aumento no número de hidroxilas reativas (Rice-Evans et al., 1996). Em nosso estudo verificou-se bons resultados em relação à % P o que provavelmente contribuiu para a capacidade antioxidante verificada nesse estudo, embora esse parâmetro não tenha sido associado diretamente às análises antioxidantes realizadas. A esterificação da posição 3 com ácido gálico é outro importante fator que afeta positivamente a capacidade antioxidante de PAs de uvas (Rice-Evans et al., 1996). Essa correlação provavelmente não foi verificada em nosso estudo devido às baixas concentrações de % G e GC observadas nos vinhos analisados.

O estudo dos flavan-3-óis como compostos alvo nas pesquisas que envolvem a atividade antioxidante em vinhos é justificado porque se acredita que esses compostos possam reagir com biomoléculas e assim alterar seu metabolismo e suas funções (Galati et al., 2006). Segundo alguns autores a principal função das catequinas como agentes antioxidantes no organismo é possuir a capacidade de captura das espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) (Plumb et al., 1998), o que pode promover o aumento da capacidade antioxidante total do organismo e, como consequência, dos sistemas de defesas antioxidantes, como pode também diminuir os danos gerados por essas espécies reativas. Raza e John (2007) sugerem que a catequina e alguns derivados podem afetar o metabolismo da glutathiona reduzida (GSH) *in vitro*, através da conjugação desses com a GSH e inibição de enzimas como a glutathiona S-transferase (GST) e a glutathiona peroxidase (GPx). Recentes pesquisas sugerem a conjugação da epigalocatequina gálata com a GSH em condições *in vitro* (Galati et al., 2006).

4 CONCLUSÃO

Esse trabalho apresentou a composição em flavan-3-óis livres, de PAs e a capacidade antioxidante *in vitro* de vinhos Cabernet Franc, Sangiovese e Syrah, safras 2006 e 2007, provenientes de uma nova região produtora de vinhos finos nos sul do Brasil. As concentrações de flavan-3-óis e PAs observadas em nosso estudo estão de acordo com dados relatados na literatura em vinhos de regiões vitícolas renomadas. Observaram-se correlações positivas entre o conteúdo dos compostos quantificados e a atividade antioxidante *in vitro* verificada nos vinhos, como também se verificou diferenças entre as variedades e as safras estudadas. Uma vez que a composição em PAs é de suma importância na qualidade de vinhos, esses são dados interessantes e que demonstram o potencial da região em produzir vinhos de qualidade.

CAPÍTULO 4

Caracterização fenólica e atividade antioxidante *in vivo* de vinhos de variedades *Vitis vinifera* de São Joaquim- SC- Brasil

**Eliana Fortes Gris¹, Fulvio Mattivi⁴, Eduardo Antonio Ferreira²,
Urska Vrhovsek⁴, Danilo Wilhelm Filho³, Rozangela Curi Pedrosa²,
Marilde T. Bordignon-Luiz¹**

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos CAL; Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil.

²Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Bioquímica, BQA, Campus Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

³Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ecologia e Zoologia Bioquímica, Campus Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

⁴Fondazione Edmund Mach, IASMA- Istituto Agrario San Michele all'Adige, Centro Ricerca e Innovazione, Area Qualità Alimentare e Nutrizione, Via E Mach 1, 38010, San Michele all'Adige, TN, Italia.

RESUMO

Neste estudo, os vinhos das variedades *Vitis vinifera* L. Cabernet Franc, Merlot, Syrah e Sangiovese, safras 2006 e 2007, provenientes de São Joaquim, uma nova região produtora de vinho no sul do Brasil, foram caracterizados quanto aos aspectos de composição fenólica e atividade antioxidante *in vivo*. Além disso, a correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante foi estabelecida. São reportados aqui os conteúdos dos principais, flavonóides, antocianinas, ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos e também a atividade antioxidante *in vivo* desses vinhos. A composição fenólica foi determinada por CLAE-DAD e CLAE-DAD-MS. Após o consumo dos vinhos por camundongos durante 30 dias foi determinada no plasma a capacidade antioxidante total através do método de redução do ferro (FRAP) e a partir do fígado a peroxidação lipídica (TBARS); a carbonilação de proteínas (PC); os níveis de glutatona reduzida (GSH); e a atividade de enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx). O conteúdo dos compostos fenólicos encontrados nos vinhos foi considerado adequado e estão de acordo com aqueles observados em outros estudos em regiões reconhecidamente produtoras de vinhos tintos finos de qualidade. Verificou-se também que o consumo de vinho promoveu um aumento significativo da capacidade antioxidante do plasma, uma diminuição na peroxidação lipídica e nos níveis de proteína de carboxilação, assim como uma diminuição na atividade das enzimas o CAT, SOD e GPX. Além disso, o conteúdo dos compostos fenólicos foi positivamente correlacionado com a atividade antioxidante *in vivo* promovida pelo consumo de vinho.

Palavras-chave: vinhos *Vitis vinifera*, compostos fenólicos, atividade antioxidante *in vivo*.

1. INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos demonstram a correlação entre uma dieta não equilibrada e doenças coronárias, alguns tipos de câncer e diabetes. Alguns epidemiologistas observaram que uma dieta rica em compostos fenólicos pode proporcionar um efeito positivo à saúde devido às suas propriedades antioxidantes (Renauld e Lorgeril, 1992; Frankel et al., 1995; Hertog et al., 1993). O vinho é um componente importante na tradicional “dieta mediterrânea” porque é uma bebida rica em compostos antioxidantes. Estes compostos têm um papel funcional importante, pois agem como antioxidantes contra os radicais livres, e assim, aumentam a capacidade antioxidante no organismo humano após o consumo de vinho tinto (Renauld e Lorgeril, 1992; Serafini et al., 1998). Além disso, os compostos fenólicos constituem um dos mais importantes parâmetros de qualidade dos vinhos, uma vez que contribuem com suas principais características organolépticas, tais como cor, adstringência e amargor (Vrhovsek, 1998; Mattivi et al., 2002).

Os compostos fenólicos dos vinhos podem ser divididos em duas classes de componentes, os compostos flavonóides e os não-flavonóides, e a composição desses depende da variedade da uva, do local de cultivo, das práticas utilizadas no cultivo da videira, das condições climáticas, do tipo de solo, do sistema de cultivo, do processo de produção e envelhecimento do vinho (Stafford, 1990; Mattivi et al., 2002).

Os compostos flavonóides incluem os flavonóis, as antocianinas e os flavan-3-óis. Os flavonóis primários são a miricetina, a quercetina e o campferol. Geralmente, estes compostos estão presentes nas células vegetais em suas formas glicosiladas e durante o processo de fermentação do vinho os flavonóis livres (agliconas) são liberados, sendo que o vinho é uma riquíssima fonte de flavonóides livres na dieta (Stafford; 1990; Mattivi et al., 2006). As antocianinas são os principais compostos fenólicos envolvidos na cor de vinhos tintos e são efetivos agentes antioxidantes (Rice-Evans et al., 1996; Rossetto et al., 2004). As antocianinas de uvas *Vitis vinifera* são antocianidinas glicosiladas com glucose ligada na posição 3, as quais podem ser esterificadas por diferentes ácidos orgânicos (Mazza, 1995; Rice-Evans et al., 1996).

Os principais compostos não-flavonóides presentes em vinhos são os ácidos fenólicos, derivados dos ácidos cinâmico e benzóico. Esses compostos desempenham um papel primordial nas características sensoriais do vinho (Somers et al., 1987; Vrhovsek, 1998), sendo responsáveis por alguns aromas típicos de produtos envelhecidos em

carvalho, além de serem responsáveis, em grande parte, pela adstringência e amargor dos vinhos jovens (Monagas et al., 2005). Os ácidos hidroxicinâmicos (ácidos cafeico, ferrúlico, e *p*-cumárico) e seus ésteres tartáricos (ácidos caftárico, fertárico e cutárico) são a principal classe de compostos fenólicos não-flavonóides nos vinhos tintos e são a principal classe de compostos fenólicos em vinhos brancos (Cartoni et al., 1991). Esses ácidos estão envolvidos nas reações de escurecimento do mosto e do vinho, e são precursores de fenóis voláteis (Vrhovsek, 1998), além de atuarem também como copigmentos de antocianinas e participar das reações de estabilização da cor do vinho tinto (Boulton, 2001). O principal ácido hidroxibenzóico presente no vinho tinto é o ácido gálico, que é formado principalmente pela hidrólise de flavonóides galatos. Em vinhos envelhecidos em carvalho verificam-se, normalmente, níveis elevados de derivados do ácido hidroxibenzóico, principalmente de ácido elágico (Cartoni et al., 1991).

A caracterização química dos compostos fenólicos de vinhos é importante por diversas razões entre elas: pode ajudar na avaliação da autenticidade de produtos regionais, na predição de propriedades sensoriais dos vinhos e na avaliação a estabilidade oxidativa de vinhos (Mattivi et al., 2002; Lopes et al., 2006; Chira et al., 2009). Além disso, os compostos fenólicos são usados como marcadores do processamento tecnológico de vinificação e da idade de vinhos (Ribéreau-Gayon et al., 1998; Vrhovsek, 1998; Matejicek et al., 2005).

Situada no planalto do Estado de Santa Catarina, São Joaquim é uma nova região vitícola localizada no sul do Brasil, com vinhedos localizados em altitudes que variam de 1.200 a 1.400 m. Trabalhos recentes relataram o perfil sensorial e a composição volátil de vinhos *Vitis vinifera* dessa região (Falcão et al., 2007; Falcão et al., 2008b; Falcão et al., 2008c). No entanto, dados sobre a composição fenólica detalhada e a capacidade antioxidante *in vivo* de vinhos *Vitis vinifera* dessa região ainda não foram relatados. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar os principais compostos fenólicos presentes em vinhos Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese e Syrah de São Joaquim, Santa Catarina, Brasil, safras 2006 e 2007, através de análises de CLAE-DAD e CLAE-DAD-MS, e avaliar o efeito do consumo desses vinhos sobre a capacidade antioxidante *in vivo* em camundongos. Verificou-se também a correlação entre a capacidade antioxidante *in vivo* e o conteúdo dos compostos fenólicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Padrões e reagentes

Todos os solventes utilizados para a determinação dos compostos fenólicos foram de grau HPLC, obtidos da Carlo Erba (Rodano, Italy). Os padrões miricetina, quercetina, laricitrina, campferol, isorhamnetina, siringetina e malvidina-3-glucosídeo foram adquiridos da Extrasynthèse (Genay, França); os ácidos elágico, gálico, protocateico, *p*-hidroxibenzóico, siríngico, *trans*-cafeico, *trans*-ferrúlico, vanílico e *trans*-cumárico foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (Steinheim, Alemanha); os ácidos *trans*-caftárico, *trans*-cutárico e fertárico foram isolados de uvas Grenache, como previamente descrito por Vrhovsek et al. (1997). Ácido trifluoroacético (TCA), 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH); 5,5'-ditiobis (2-Ácido nitrobenzóico) (DTNB); ácido tiobarbitúrico (TBA), peróxido de hidrogênio; 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ); hidroxitolueno butilado (BHT); terc-butil.hidroperóxido; TROLOX; glutationa reduzida (GSH); glutationa redutase (GR) e epinefrina foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).

2.2 Caracterização da Região de São Joaquim

São Joaquim está localizada na região do planalto de Santa Catarina, com vinhedos em altitudes que variam entre 900 e 1.400 m. O solo da região é do tipo Inceptisol de acordo com a classificação do USDA (Falcão et al., 2008a) e o clima de São Joaquim é classificado como "Frio, com noites frias e úmido", segundo o Sistema de Classificação Climática Multicritério Geovitélica (Tonietto e Carbonneau, 2004) e como "Região I" (<1389 GDD), uma região "fria" em relação às Regiões de Winkler (Gris et al., 2008). De acordo com os bons resultados da avaliação de uvas de maturação (Gris et al., 2008; Falcão et al., 2008a) e da composição volátil do vinho (Falcão et al. 2007; Falcão et al. 2008c) produzidos nessa região, espera-se que esta região se torne uma região produtora de vinhos de alta qualidade.

2.3 Amostras

Os vinhos foram elaborados a partir de uvas Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese e Syrah, safras 2006 e 2007. Os vinhedos estão localizados a 28° 15' lat. S, 49° 50' long. W e a 1.290 m de altitude. As videiras foram plantadas em 2003 e os clones utilizados foram Cabernet

Franc 986, Merlot 181, Sangiovese VCR23 e Syrah VCR1. O porta-enxerto usado foi o Paulsen 1103 (*V. berlandieri* Planch x *V. rupestris* Scheele) e o sistema de condução foi o tipo espaldeira, com espaçamento 3,0 x 1,2 m. Durante o período dos ensaios, todos os tratamentos culturais necessários foram realizados, de acordo com as recomendações para a cultura. Os rendimentos médios das quatro variedades variaram entre 6,0 e 7,0 t.ha⁻¹.

Todos os vinhos foram produzidos sob as mesmas condições, em uma vinícola de São Joaquim-SC. As uvas foram separadas das hastes, esmagadas, e mantidas em cubas de aço inoxidável. O período de maceração foi de 15 dias, com uma ou duas remontagens diárias e temperatura entre 22°C e 28°C. Antes de iniciar a fermentação alcoólica, foram adicionadas ao mosto: metabissulfito de potássio (12 g 100 kg⁻¹ de mosto, correspondente a 60 mg L⁻¹ de SO₂ livre) (Noxitan, Pascal Biotech, Paris) *Saccharomyces cerevisiae* (20 g 100 kg⁻¹) (Fermol Rouge, Pascal Biotech, Paris), e as enzimas comerciais com atividade pectinolítica (2–4 g h L⁻¹) (Pectinex SPL/Ultra, Pascal Biotech, Paris). O mosto foi separado das partes sólidas e transferido para outras cubas de aço inoxidável. O consumo do ácido málico pelas bactérias lácticas ocorreu espontaneamente entre 60-75 dias. Terminada a fermentação alcoólica e malolática os vinhos foram transferidos para barris de carvalho francês onde permaneceram por aproximadamente 1 ano. Antes do engarrafamento foi adicionado Noxitan (35 mg L⁻¹ de SO₂ livre, em média). As amostras de vinhos provenientes das safras 2006 e 2007 foram analisadas após 1 e 2 anos de guarda em garrafa, respectivamente, e foram mantidas a 10 °C antes das análises.

2.4 Determinação dos compostos fenólicos

2.4.1 Flavonóis

O conteúdo dos flavonóis (miricetina, quercetina, laricitrina, campferol, isorhamnetina e siringetina) das amostras de vinhos foi determinado utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), após a hidrólise ácida dos flavonóis conjugados, de acordo com Mattivi et al. (2006). Uma alíquota de 10,0 mL de vinho foi evaporada até à secura sob pressão reduzida em rotaevaporador à 50-55 ° C. A amostra seca foi dissolvida com 5,0 mL de ácido trifluoroacético (2M em água) e 5 mL de metanol e então a amostra foi colocada em um banho de água fervente, com condensador, por 120 min. A mistura foi resfriada, evaporada sob pressão reduzida em rotaevaporador a 50-55

°C, dissolvida em 40,0 mL de tampão fosfato pH 7,00 e transferida para um funil de separação onde adicionou-se 80,0 mL de acetato de etila para extração. A extração foi realizada duas vezes (agitação por 5 min), com um total de 160,0 mL de acetato de etila. Os extratos combinados foram neutralizados com sulfato de sódio anidro, secos em rotaevaporador (50-55 °C) e redissolvidos em 1,0 mL de metanol. A amostra final foi então filtrada (0,22 μm , Millipore, Bedford, MA) e injetada no sistema CLAE-DAD.

Análise CLAE-DAD

A separação e quantificação dos flavonóis foi realizada utilizando CLAE de acordo com Mattivi et al. (2006), utilizando o sistema de CLAE Waters 2695 equipado com DAD Waters 2996 (Waters, Milford, MA), utilizando uma coluna de fase reversa Purospher RP18, 250 mm x 4 mm (5 mm), munida de uma pré-coluna (Merck, Alemanha). Os solventes utilizados foram: solvente A: HClO_4 0,3 % em água, e solvente B: metanol. O seguinte gradiente linear foi utilizado: de 40 a 90 % de B em 30 min. A coluna foi reequilibrada por 5 min. antes de cada análise. O fluxo foi de 0,45 mL min^{-1} , e o volume de injeção foi de 5 μL . Os compostos foram identificados e quantificado a 370 nm e a concentração foi expressa em mg L^{-1} , e realizada por curvas de calibração externas para cada composto.

2.4.2 Antocianinas

A preparação das amostras para a determinação das principais antocianinas livres nas amostras de vinhos foi realizada de acordo com Rossetto et al. (2004). Uma alíquota de 10 mL de vinho foi diluída cinco vezes com água, aplicada em um cartucho C18-SPE (1g, Waters, Milford, MA), previamente ativado com metanol (5,0 mL) e água (10,0 mL). O cartucho foi lavado com 6 mL de HClO_4 (0,3 % em água destilada) seguido de 8 mL de água destilada e, após a lavagem as antocianinas foram eluídas com 10,0 mL de metanol. O eluído foi evaporado sob pressão reduzida a 35 °C e reconstituído em 1,0 mL de solução de metanol diluída (27 % em água e 0,3 % HClO_4). A solução final foi filtrada (0,22 μm , Millipore, Bedford, MA) e injetadas imediatamente no sistema CLAE.

Análise CLAE-DAD

A separação das 15 principais antocianinas livres em vinhos foi realizada no mesmo sistema CLAE-DAD, utilizando a mesma coluna, temperatura e eluentes utilizados na análise de determinação de flavonóis. O volume de injeção foi de 10,0 μL , com um fluxo de 0,45 mL min^{-1} . O seguinte gradiente binário foi aplicado: de 27,5 a 44,5 % de B em 32 min., e de 44,5 a 67,5 % de B em 13 min., em seguida chegando a 100 % de B em 2 min, e mantendo 100 % de B por 3 min para a lavagem da coluna (Mattivi et al., 2006). As antocianinas delphinidina-3-glucosídeo, cianidina-3-glucosídeo, petunidina-3-glucosídeo, peonidina-3-glucosídeo, malvidina-3-glicosídeo e seus relevantes acilados e *p*-cumáricos foram identificados de acordo com Castia et al. (1992), quantificados a 520 nm com uma curva de calibração do padrão malvidina-3-glucosídeo e expressos em mg L^{-1} equivalente de malvidina-3-glucosídeo.

2.4.3 Ácidos hidroxicinâmicos

A preparação das amostras foi realizada de acordo com Vrhovsek et al. (2004). Para remover o álcool do vinho, uma alíquota de 10,0 mL de vinho foi evaporado até cerca de um terço do volume (~ 7,0 mL) em um evaporador rotativo sob pressão reduzida a 35 °C. A amostra foi completada com até seu volume inicial (10,0 mL) com o solvente A utilizado no sistema de CLAE (0,5 % de ácido fórmico em água), filtrada (0,22 μm , Millipore, Bedford, MA) e injetada no sistema CLAE.

Análise CLAE-DAD

A análise cromatográfica dos ácidos hidroxicinâmicos foi de acordo com Vrhovsek et al. (2004) com algumas modificações. O mesmo sistema CLAE-DAD e a mesma coluna utilizados na análise de flavonóis foram utilizados para as determinações dos ácidos hidroxicinâmicos. Os solventes utilizados foram: solvente A: 0,5 % de ácido fórmico em água, e solvente B: 2 % de ácido fórmico em metanol. O seguinte gradiente foi utilizado: de 16 % a 19 % de B em 7 min., de 19 % a 53 % de B em 12 min., e de 53 % a 100 % de B em 0,1 min., solvente B 100 % por 5 min., e retorno a 16 % de B em 0,1 min. A coluna foi reequilibrada durante 7 min. antes de cada análise. A vazão foi de 0,4 mL min^{-1} , o volume de injeção foi de 10 mL. A detecção foi realizada a 320 nm. Cada composto foi quantificado em mg mL^{-1} por meio de curvas de calibração externas. Os Coeficientes de Variação (CV

%) obtidos experimentalmente a partir de seis determinações consecutivas do mesmo vinho foram os seguintes: ácido *cis*-caftárico, 0,89 %; ácido *trans*-caftárico, 0,64 %; ácido *cis*-cutárico, 0,57 %; ácido *trans*-cutárico, 0,32 %; ácido fertárico, 0,43 %; ácido *trans*-cafeico, 0,64 %; ácido *trans*-*p*-cumárico, 0,53 %; e ácido *trans*-ferrúlico, 0,82 %.

2.4.4 Ácidos hidroxibenzóicos

A preparação das amostras para a determinação dos ácidos *p*-hidroxibenzóico, vanílico e siríngico foi realizada como segue: uma alíquota de 10,0 mL de vinho e 1,0 mL de padrão interno (ácido 2,5-dihidroxibenzóico, 100 mg L⁻¹) foi concentrada até aproximadamente 7,0 mL em rotaevaporador sob pressão reduzida a 35 °C. Após a concentração, o valor do pH da solução foi ajustado para 8,0 com NaOH, e a amostra diluída até 10 mL com água destilada. Uma alíquota de 5,0 mL dessa solução foi aplicada em cartucho C18-SPE (1 g, Waters, Milford, MA), previamente ativado com metanol (5,0 mL) e água (10,0 mL). O eluído foi então coletado, seu valor de pH foi ajustado para 2,7 com ácido fórmico e o volume foi completado para 10,0 mL com água destilada. A solução final foi então filtrada (0,22 μm, Millipore, Bedford, MA) e injetada no sistema CLAE.

Análise CLAE-DAD dos ácidos p-hidroxibenzóico, siríngico e vanílico

O sistema de CLAE consistiu de um sistema CLAE Waters 2695 equipado com DAD Waters 2996 (Waters, Milford, MA). Os espectros UV-VIS foram registrados entre 210-400 nm, com detecção em 280 nm. As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna Gemini RP18 (Phenomenex) (250 × 2,0 mm, 5 mm), protegido por uma pré-coluna. O solvente A foi 1 % de ácido fórmico em água e o solvente B foi acetonitrila. O seguinte gradiente linear foi utilizado: de 0 a 20 % de B em 40 min., de 20 a 100 % de B em 0, 1 min., 100 % de B durante 2 minutos, e retorno à 0 % de B em 0,1 min. O tempo de equilíbrio da coluna foi de 5 min., o volume de injeção foi de 10 mL e o fluxo de 0,4 mL min⁻¹. A temperatura da coluna foi de 40 °C. Os compostos identificados foram detectados a 280 nm, quantificados por meio do método do padrão externo (os resultados foram corrigidos com base na recuperação do padrão interno) e expressos em mg L⁻¹.

Análise CLAE-DAD-MS dos ácidos elágico, gálico e protocateico

As amostras de vinho foram filtradas em filtro de 0,22 μm (PTFE, Millipore, Bedford, MA) antes da injeção no sistema CLAE Waters 2690 (Waters, Milford, MA, E.U.A.) equipado com DAD Waters 996 e Micromassa ZQ com analisador quadrupolo e fonte de ionização por eletrospray- espectrometria de massa (ESI-MS). O detector de MS foi operado a uma voltagem de capilaridade de 3000 V, tensão do extrator de 3 V, temperatura da fonte de 105 ° C, temperatura do gás de dessolvatação de 200 °C, fluxo de gás de dessolvatação do cone (N_2) de 61 L h^{-1} e um fluxo de gás de dessolvatação para a amostra (N_2) de 460 L h^{-1} . ESI-MS variou de m/z 100-1500 com um tempo de permanência de 0,1 s.

As mesmas condições de separação cromatográficas utilizadas para os ácidos *p*-hidroxibenzóico, siríngico e vanílico foram utilizadas para as determinações dos ácidos elágico, gálico e protocateico. A identificação foi realizada com base nos seus tempos de retenção, de seu íon molecular e fragmento principal dado pelo MS através da comparação com os respectivos dos padrões externos. A voltagem do cone (CV) para todos os íons foi 20. Os íons moleculares (M-H^-) dos ácidos elágico (m/z 301,19) e (M+H^+) dos ácidos gálico (m/z 169,12) e protocateico (m/z 153,12) foram usados para a quantificação dos compostos a partir de curvas externas dos respectivos padrões.

Repetibilidade do método

A repetibilidade do método foi baseada em seis determinações diretas consecutivas para os ácidos elágico, gálico e protocateico, e a partir de seis preparações das amostras com SPE para os ácidos *p*-hidroxibenzóico, vanílico e siríngico, aplicadas ao mesmo vinho. Os Coeficientes de Variação (CV %) obtidos foram os seguintes: para o ácido elágico: 6,75 %, ácido gálico: 1,26 %, ácido protocatecuico: 1,61 %; ácido *p*-hidroxibenzóico: 4,32 %, ácido siríngico: 3,23 %, e ácido vanílico: 4,76 %.

Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para o método CLAE-DAD-MS foram estimados em uma relação sinal-ruído de 3 e 10, respectivamente, e foram os seguintes: ácido elágico: 0,031 e 0,098 mg L^{-1} ($R^2 = 0,9956$), ácido gálico: 0,172 e 0,568 mg L^{-1} ($R^2 = 0,9945$); ácido protocateico: 0,148 e 0,490 mg L^{-1} ($R^2 = 0,9953$); ácido

p-hidroxibenzoico: 0,039 e 0,130 mg L⁻¹ (R² = 0,9993), ácido siríngico: 0,027 e 0,084 mg L⁻¹ (R² = 0,9989) e ácido vanílico, 0,034 e 0,113 mg L⁻¹ (R² = 0,9986). Todos os resultados foram considerados adequados.

2.5 Atividade antioxidante *in vivo*

2.5.1 Animais

Para realização dos experimentos *in vivo* foram utilizados camundongos Balb-c lisogênicos, machos (22 ± 2 g de peso), provenientes do Biotério do Laboratório de Bioquímica Experimental, Departamento de Bioquímica (BQA), Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas sob condições controladas (ciclo claro-escuro de 12 h, temperatura 25 ± 2 °C, ~ 60 % umidade do ar), recebendo ração comercial e água *ad libitum* para adaptação. Os camundongos foram aleatoriamente divididos em 10 grupos (n= 6): dois grupos controle, um tratado com água (C) e outro tratado com etanol 12 % (Cet) por 30 dias, e oito grupos teste: Cabernet Franc (CF06 e CF07), Merlot (M06 e M07), Sangiovese (Sa06 e Sa07) e Syrah (Sy06 e Sy07) tratados com os respectivos vinhos, safras 2006 (06) e 2007 (07), por 30 dias (7,0 mL kg⁻¹, ~ 20 mg polifenóis Kg⁻¹ dia⁻¹) diariamente por gavagem. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal da UFSC (CEUA- PP00542).

2.5.2 Avaliação dos marcadores do estresse oxidativo

A partir do plasma foi realizada a análise da capacidade antioxidante total do plasma (FRAP); e a partir do fígado dos animais foram realizadas as análises de avaliação da peroxidação lipídica endógena (TBARS); avaliação do dano oxidativo às proteínas por carbonilação (PC); avaliação da glutatona reduzida (GSH) e atividade das enzimas superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx).

A avaliação da capacidade antioxidante total do plasma (FRAP) foi determinada através do potencial antioxidante redutor férrico (Benzie e Strain, 1996). Essa análise avaliou a capacidade do plasma em reduzir o complexo de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe(III) a Fe(II)-TPT. A capacidade antioxidante total do plasma foi expressa como equivalente de TROLOX (TEAC μM).

A avaliação da peroxidação lipídica endógena (TBARS) foi realizada pela detecção dos seus derivados lipoperóxidos, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (Ohkawa et al., 1979). Para o branco foi substituído a solução de TBA por HCl. Os resultados foram expressos como índice de peroxidação lipídica por g de proteína (TBARS – nM g proteína⁻¹).

Avaliação do dano oxidativo às proteínas por carbonilação (PC), quantificada pelo conteúdo de proteína carbonilada, foi realizada conforme descrito por Levine e Stadtman (1990). Os valores finais das proteínas carboniladas foram quantificados utilizando o coeficiente de extinção molar de 22 mM e os resultados foram expressos como índice de carbonilação de proteínas (nM g proteína⁻¹).

A avaliação da glutatona reduzida (GSH) foi realizada através do monitoramento da concentração de pequenos tióis após a obtenção dos extratos ácidos hepáticos (Anderson, 1995). Os valores foram expressos em mM g proteína⁻¹.

A atividade da enzima catalase (CAT) foi verificada através do monitoramento da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), medido a 240 nm (Aebi, 1984). Os valores foram expressos em mM de H₂O₂ consumido min.g proteína⁻¹ (nM min.⁻¹g proteína⁻¹).

A atividade da enzima superóxido desmutase (SOD) foi determinada espectrofotometricamente a 480 nm pela medida da inibição da oxidação da epinefrina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0) que produz o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo (Misra and Fridovich, 1972). Quando a amostra é adicionada, a enzima (SOD) presente nesta alíquota retardava sua formação. Os valores da SOD (U SOD g proteína⁻¹) foram expressos em termos de atividade da enzima, definida como a quantidade de enzima necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo.

Para a determinação da enzima glutatona peroxidase (GPx) foi utilizado o método de Flohé e Gunzler (1984). O método baseia-se em dismutar o hidroperóxido (tBuOOH) pela oxidação de GSH e formação de GSSG, catalisado pela GPx. Os valores foram expressos em μmol min⁻¹ mL⁻¹.

O teor de proteína foi determinado pelo método de Lowry et al. (1993), utilizando albumina bovina como padrão.

2.6 Análise Estatística

Todas as análises químicas e biológicas foram realizadas em triplicata. ANOVA (two-way), Análise de Correlação e Teste Tukey HSD foram realizados no programa STATISTICA 7 (2006) e ORIGIN (2001) admitindo nível de significância de 5 %.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises químicas

3.1.1 Compostos fenólicos: Flavonóides

A Tabela 4.1 apresenta o conteúdo dos flavonóis miricetina, quercetina, laricitrina, campferol, isorhamnetina e siringetina nas amostras dos vinhos analisados. Os seis flavonóis quantificados em nosso estudo, após hidrólise ácida, incluíram todas as agliconas esperadas com base no diagrama da biossíntese de flavonóides nas uvas proposto por Mattivi et al. (2006). Em geral, os principais flavonóis presentes nas amostras de vinho foram a quercetina e a miricetina, como verificado por outros autores (Mattivi et al., 2006; Bautista-Ortín et al., 2007). A quercetina apresentou o conteúdo que variou entre 34 % a mais de 63 % dos flavonóis totais, com conteúdo médio de $17,94 \text{ mg L}^{-1}$ (variando entre $7,49$ e $27,44 \text{ mg L}^{-1}$). O composto miricetina apresentou uma concentração que variou entre $9,33$ e $16,47 \text{ mg L}^{-1}$ (média de $12,75 \text{ mg L}^{-1}$), o que correspondeu a 29 – 40 % do conteúdo total de flavonóis. Esses compostos foram especialmente elevados nos vinhos Sangiovese 2007 (quercetina) e Syrah 2007 (miricetina).

Em menores concentrações foram quantificados os flavonóis laricitrina ($1,47$ - $3,41 \text{ mg L}^{-1}$), campferol ($0,23$ - $1,65 \text{ mg L}^{-1}$), isorhamnetina ($0,48$ - $3,28 \text{ mg L}^{-1}$) e siringetina ($0,60$ - $2,29 \text{ mg L}^{-1}$). Embora em concentrações menores, a identificação e quantificação desses compostos são importantes uma vez que nos possibilita uma melhor caracterização dessa família de compostos dos vinhos. Além disso, de acordo com Mattivi et al. (2006) todos esses flavonóis, e não apenas os principais, são necessários para uma classificação mais detalhada das variedades de uvas com base em seu perfil de flavonóis. Os teores de flavonóis totais nas amostras de vinho variaram entre $20,81$ e $46,79 \text{ mg L}^{-1}$, e foram semelhantes quando comparados com dados de renomadas regiões produtoras de vinho de qualidade (Hertog et al., 1993; Simonetti et al., 1997).

Tabela 4.1. Conteúdo dos flavonóis determinados nas amostras de vinhos.

Safra	2006				2007			
	<i>Cabernet Franc</i>	<i>Merlot</i>	<i>Sangiovese</i>	<i>Syrah</i>	<i>Cabernet Franc</i>	<i>Merlot</i>	<i>Sangiovese</i>	<i>Syrah</i>
Miricetina	14,49±0,18	11,59±0,23	9,33±0,13	10,42±0,06	13,83±0,13	14,04±0,10	11,83±0,21	16,47±0,14
Quercetina	22,59±0,23	19,01±0,23	7,49±0,20	14,82±0,19	17,80±0,17	20,50±0,23	27,44±0,22	13,88±0,16
Laricitrina	3,39±0,14	2,40±0,12	1,47±0,12	2,32±0,10	2,86±0,11	2,50±0,09	1,67±0,08	3,41±0,13
Campferol	1,65±0,08	1,25±0,06	0,23±0,05	0,43±0,05	0,38±0,08	0,76±0,04	0,74±0,07	0,69±0,05
Isorhamnetina	2,72±0,04	2,02±0,06	0,74±0,02	2,12±0,07	2,00±0,08	2,00±0,07	0,48±0,08	3,28±0,10
Siringetina	1,94±0,08	2,06±0,04	1,57±0,09	1,73±0,04	2,29±0,09	1,99±0,06	0,60±0,05	2,21±0,08
Flavonóis totais	46,79 ^a	38,32 ^b	20,81	31,85	39,15 ^b	41,79 ^{b,c}	42,76 ^{a,c}	39,93 ^{b,c}

Valores expressos em mg L⁻¹ ± desvio padrão. Diferentes letras em uma mesma coluna são diferentes significativamente (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Os conteúdos das antocianinas: delfinidina-3-glucosídeo, cianidina-3-glucosídeo, petunidina-3-glucosídeo, peonidina-3-glucosídeo, malvidina-3-glicosídeo e seus respectivos derivados acilados e p-cumáricos, quantificadas nas amostras de vinhos, são apresentados na Tabela 4.2. A média do conteúdo de antocianinas totais nas amostras de vinhos foi de 47,43 mg L⁻¹, e variou entre 12,94 e 125,60 mg L⁻¹. Entre as antocianinas avaliadas, a malvidina-3-glucosídeo apresentou as maiores concentrações (antocianina majoritária em uvas e vinhos *Vitis vinifera*), e a quantidade relativa dessa antocianina nos vinhos das diferentes variedades analisadas variou entre 33,4 % (Cabernet Franc 2006) e 47 % (Syrah 2007). Entre as antocianinas monoméricas, a cianidina apresentou as menores concentrações, o que já foi verificado por outras pesquisas (Ribéreau-Gayon e Stenestreet, 1965; Kosir et al., 2004). Em geral, as antocianinas aciladas foram os derivados antociânicos presentes em maiores concentrações nas duas safras avaliadas, com conteúdo médio total de 8,97 mg L⁻¹ (2,76 e 22,83 mg L⁻¹), e quantidade relativa que variou entre 17 % a 25 % do conteúdo de antocianinas totais, sendo que os maiores valores foram verificados no vinho Cabernet Franc 2007 (22,83 mg L⁻¹). Os derivados cumáricos apresentaram conteúdo total que variou entre 1,19 e 7,96 mg L⁻¹, o que correspondeu a 4,3 e 11,0 % das antocianinas totais, respectivamente.

Verificou-se que o conteúdo de antocianinas e flavonóis totais foram influenciados pelos fatores variedade e safra (ANOVA two-way; $p < 0,05$), o que é relatado por várias pesquisas para uvas e outras frutas (Vrhovsek et al., 2004; Falcão et al., 2008a; Gris et al., 2008) e também para vinhos (Kosir et al., 2004; Rossetto et al., 2004).

As vias biossintéticas envolvidas na produção de flavonóides nos tecidos vegetais são influenciadas por muitos fatores climáticos como a exposição solar, temperatura e exposição à radiação UV (Cantos et al., 2000; Spayd et al., 2002). Assim, as diferenças verificadas entre as duas safras, quanto ao conteúdo dos flavonóides quantificados, podem ser devido às diferenças significativas observadas entre as condições climáticas das duas safras avaliadas (dados apresentados no Capítulo 2). Uma hipótese alternativa, que também pode explicar as diferenças observadas no conteúdo desses compostos fenólicos entre as safras avaliadas é o tempo de envelhecimento do vinho na garrafa. Uma vez que a composição do vinho está em constante evolução, o envelhecimento em garrafa também contribui com as mudanças do conteúdo de flavonóides em vinhos, por meio da interação dos flavonóides com os outros compostos (Zafrilla et al., 2003).

Tabela 4.2. Conteúdo das antocianinas e seus derivados acilados e *p*-cumáricos determinados nas amostras de vinhos.

Safrá	2006				2007			
	<i>Cabernet Franc</i>	<i>Merlot</i>	<i>Sangiovese</i>	<i>Syrah</i>	<i>Cabernet Franc</i>	<i>Merlot</i>	<i>Sangiovese</i>	<i>Syrah</i>
Df-3-glucosídeo	1,77±0,07	2,16±0,06	1,50±0,06	2,01±0,06	14,83±0,34	11,23±0,29	2,69±0,16	7,51±0,06
Cy-3-glucosídeo	0,49±0,07	0,69±0,05	0,46±0,05	0,55±0,03	2,74±0,05	2,72±0,04	2,76±0,03	1,07±0,06
Pt-3-glucosídeo	1,48±0,05	1,74±0,06	1,24±0,05	1,94±0,03	13,26±0,25	8,49±0,18	3,30±0,08	9,52±0,25
Pn-3-glucosídeo	1,32±0,03	1,49±0,08	1,12±0,08	1,71±0,06	10,50±0,10	6,61±0,08	2,58±0,06	6,91±0,06
Mv-3-glucosídeo	5,58±0,06	6,02±0,08	4,53±0,07	7,62±0,08	53,48±1,01	25,25±0,78	8,45±0,47	41,54±1,02
Df-3-glucosídeo-acilada	0,38±0,04	0,34±0,04	0,16±0,02	0,34±0,01	2,39±0,05	2,07±0,06	0,21±0,03	1,35±0,05
Cy-3-glucosídeo-acilada	0,12±0,03	0,17±0,06	0,07±0,014	0,09±0,02	0,84±0,03	0,74±0,03	0,16±0,03	0,26±0,04
Pt-3- glucosídeo-acilada	0,17±0,06	0,35±0,03	0,17±0,03	0,22±0,02	2,52±0,13	1,48±0,08	0,22±0,03	1,40±0,03
Pn-3-glucosídeo-acilada	0,74±0,03	0,72±0,03	0,47±0,03	0,58±0,06	3,39±0,09	1,52±0,04	1,78±0,08	2,20±0,03
Mv-3-glucosídeo-acilada	2,82±0,05	2,37±0,06	1,89±0,10	2,73±0,07	13,68±0,49	6,27±0,18	4,62±0,21	9,74±0,24
Df-3-glucosídeo- <i>p</i> -cumarata	0,19±0,03	0,06±0,02	0,17±0,04	0,16±0,03	0,68±0,06	0,41±0,03	0,35±0,05	0,51±0,06
Cy-3-glucosídeo- <i>p</i> -cumarata	0,42±0,03	0,27±0,04	0,20±0,04	0,37±0,06	1,07±0,08	0,73±0,05	n.d.	0,97±0,06
Pt-3-glucosídeo- <i>p</i> -cumarata	0,06±0,02	0,05±0,01	0,04±0,01	0,11±0,02	0,46±0,03	0,33±0,03	0,07±0,01	0,38±0,04
Pn-3- glucosídeo- <i>p</i> -cumarata	0,32±0,02	0,29±0,04	0,23±0,05	0,29±0,03	1,57±0,06	0,31±0,03	0,30±0,02	1,81±0,06
Mv-3- glucosídeo- <i>p</i> -cumarata	0,85±0,07	0,85±0,06	0,68±0,05	1,01±0,08	4,17±0,12	2,41±0,06	0,46±0,06	3,18±0,03
Antocianinas glucosiladas totais	10,65 ^a	12,09 ^a	8,85 ^a	13,84 ^a	94,81 ^b	54,31 ^c	19,78 ^d	66,54 ^e
Antocianinas aciladas totais	4,23 ^a	3,96 ^a	2,76 ^a	3,97 ^a	22,83 ^b	12,09 ^c	6,99 ^d	14,95 ^e
Antocianinas <i>p</i> -cumaratas totais	1,83 ^a	1,51 ^a	1,33 ^a	1,94 ^a	7,96 ^b	4,19 ^c	1,19 ^a	6,86 ^d
Antocianinas totais	16,71 ^{a,b}	17,56 ^{a,b}	12,94 ^b	19,75 ^a	125,60 ^c	70,58 ^d	27,96 ^e	88,35 ^f

Valores equivalentes de malvidina-3-glucosídeo, expressos em mg L⁻¹ ± desvio padrão. Diferentes letras em uma mesma coluna são diferentes significativamente (Teste de Tukey, *p* < 0,05). Df=delfinidina; Cy= cianidina, Pt= petunidina; Pn= peonidina; Mv= malvidina.

Verificou-se que o efeito safra foi significativamente mais pronunciado nas antocianinas que nos flavonóides, onde se verificou que as concentrações das antocianinas na safra 2006 foram significativamente menores para todas as variedades analisadas quando comparadas à safra posterior ($p < 0,05$). Isso pode ser explicado pelo fato de que, embora as condições climáticas tenha forte influência na concentração de antocianinas, de acordo com o Monagas et al. (2005), as antocianinas são um grupo de compostos que apresentaram as maiores perdas durante o envelhecimento em garrafa, e essa perda é atribuída à sua participação em numerosas reações químicas que, em geral, levam ao desaparecimento de antocianinas monoméricas e à formação de pigmentos poliméricos mais estáveis (Somers, 1971; Somers e Evans, 1986). Além disso, Rossetto et al. (2004) também afirmam que o processo de polimerização verificado durante o envelhecimento do vinho promove o desaparecimento das formas livres das antocianinas e também levam à uma diminuição do conteúdo de antocianinas totais devido à perda parcial do cátion flavílium em produtos da condensação. Após o engarrafamento do vinho as transformações que ocorrem são determinadas principalmente por reações não-oxidativas (Ribéreau-Gayon et al., 1998), porém pesquisas recentes afirmam que os vinhos também são sujeitos à reações oxidativas (Lopes et al., 2006). Considerando as condições não-oxidativas presentes na garrafa, a condensação direta de antocianinas com outros compostos fenólicos, em conjunto com as reações de hidrólise e degradação (Somers e Evans, 1986) são as principais responsáveis pela diminuição da concentração de antocianinas monoméricas durante o envelhecimento de vinhos engarrafados. Assim, todas essas mudanças influenciam a composição fenólica de vinhos e, conseqüentemente, das antocianinas e flavonóis.

Com relação às significativas diferenças verificadas entre as variedades quanto ao conteúdo de flavonóides, sabe-se que, embora as características ambientais sob as quais ocorre o desenvolvimento da fruta têm grande influência na síntese dos compostos polifenólicos, a natureza e as diferentes percentagens relativas destes compostos obedecem a um determinante genético, próprio de cada variedade (Mazza, 1995). Mattivi et al. (2002) também afirma que a variedade de uva desempenha um papel fundamental na determinação da quantidade absoluta dos flavonóis. Além disso, devido ao seu rigoroso controle genético, acredita-se que o perfil de antocianinas (Mazza, 1995) e de

flavonóis (Mattivi et al., 2006) pode ser utilizado como um parâmetro quimiotaxonômico para a classificação de uvas *Vitis vinifera*.

3.1.2 Compostos fenólicos: não Flavonóides

Os resultados da determinação dos ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos nas amostras de vinho são apresentados na Tabela 4.3. O conteúdo dos ácidos hidroxicinâmicos totais variou de 108,78 (Sangiovese 2006) à 214,48 mg L⁻¹ (Cabernet Franc 2007) com conteúdo médio de 143,04 mg L⁻¹. Entre esses ácidos fenólicos, o *trans*-caftárico foi o ácido predominante (90,14 mg L⁻¹, 63,0 %), seguido pelos ácidos *trans*-cutárico (23,28 mg L⁻¹, 16,3 %), *trans*-cafeico (8,49 mg L⁻¹, 5,9 %), *cis*-cutárico (7,24 mg L⁻¹, 5,1 %), *trans-p*-cumárico (5,84 mg L⁻¹, 4,1 %), fertárico (3,35 mg L⁻¹, 2,3 %), *trans*-ferrúlico (2,56 mg L⁻¹, 1,8 %) e *cis*-caftárico (2,12 mg L⁻¹, 1,5 %). Em geral, os percentuais e os conteúdos desses ácidos verificado em nosso estudo, estão de acordo com outras pesquisas (Gambelli e Santaroni, 2004; Silva et al., 2005).

Em vinhos, os ácidos hidroxicinâmicos são encontrados mais abundantemente em sua forma conjugada (ésteres tartáricos – hidroxicinamatos), como verificamos em nosso estudo (Table 3). A presença das formas livres desses ácidos em vinhos (ácidos cafeico, ferrúlico e cumárico), uma vez que não estão presentes em uvas (Vrhovsek, 1998), é principalmente devido à hidrólise dos seus ésteres tartáricos (ácidos caftárico, fertárico e cutárico) pelas enzimas cinamoil esterases (Somers et al., 1987).

Realizou-se ANOVA (*two-way*) considerando os fatores: variedade e safra, e essa análise revelou que esses dois fatores influenciaram significativamente o teor dos ácidos hidroxicinâmicos totais ($p < 0,05$). Em relação às variedades, como podemos verificar na Tabela 4.3, a Cabernet Franc foi a variedade que apresentou as maiores concentrações dos ácidos hidroxicinâmicos totais, nas duas safras avaliadas ($p < 0,05$).

Exceto para a variedade Syrah, verificou-se que o conteúdo total dos ácidos hidroxicinâmicos foi mais elevado na safra 2007 ($p < 0,05$). Diferenças entre o conteúdo de ácidos fenólicos provenientes de diferentes safras são relatadas (Anastasiadi et al., 2009). Além disso, os ácidos hidroxicinâmicos também são bastante susceptíveis às diferentes técnicas de vinificação (Vrhovsek, 1998), e também às mudanças durante o tempo de envelhecimento em garrafas (Zaffrila et al., 2003; Gómez-Plaza et al., 2000).

Tabela 4.3. Conteúdo dos ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos determinados nas amostras de vinhos.

Safrá	2006				2007			
	<i>Cabernet Franc</i>	<i>Merlot</i>	<i>Sangiovese</i>	<i>Syrah</i>	<i>Cabernet Franc</i>	<i>Merlot</i>	<i>Sangiovese</i>	<i>Syrah</i>
Ácido <i>cis</i> -caftárico	2,00±0,03	2,37±0,01	1,84±0,02	2,05±0,01	2,14±0,01	2,36±0,02	1,41±0,021	2,80±0,01
Ácido <i>trans</i> - caftárico	92,16±3,17	73,59±3,20	68,68±1,48	73,82±2,19	150,97±4,79	92,30±2,97	99,85±3,61	69,76±3,11
Ácido <i>cis</i> -cutárico	4,21±0,18	3,61±0,29	3,61±0,23	4,54±0,21	6,61±0,23	5,79±0,14	17,89±1,50	11,67±1,04
Ácido <i>trans</i> -cutárico	20,94±1,87	17,58±0,95	14,69±1,01	19,11±0,90	32,49±1,80	18,66±0,93	35,28±1,51	27,49±1,49
Ácido fertárico	3,39±0,11	3,09±0,15	2,97±0,09	3,03±0,12	5,21±0,15	3,61±0,13	4,04±0,10	1,46±0,10
Ácido <i>trans</i> -cafeico	9,47±0,32	8,55±0,30	8,09±0,25	9,20±0,23	8,66±0,13	9,16±0,21	4,32±0,12	10,48±0,12
Ácido <i>trans-p</i> -cumárico	6,61±0,11	7,73±0,23	6,54±0,11	6,30±0,20	5,59±0,13	5,31±0,12	2,73±0,06	5,86±0,19
Ácido <i>trans</i> -ferrúlico	2,60±0,03	2,78±0,11	2,32±0,07	2,61±0,10	2,75±0,11	2,96±0,08	2,06±0,08	2,39±0,09
Ácido gálico	40,48±1,31	41,60±1,61	34,53±0,49	39,94±0,54	45,03±1,41	54,44±1,19	32,85±0,83	39,33±0,79
Ácido protocateico	0,87±0,08	1,43±0,08	1,91±0,06	2,92±0,09	9,73±0,22	5,74±0,17	12,66±0,13	10,12±0,25
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	n.d.	1,26±0,06	0,59±0,08	0,86±0,09	n.d.	n.d.	1,71±0,08	2,10±0,11
Ácido vanílico	3,48±0,070	2,13±0,04	1,66±0,08	3,67±0,05a	3,50±0,11	3,78±0,10	2,98±0,07	3,22±0,08
Ácido siríngico	1,48±0,06	1,23±0,08	1,15±0,05	3,53±0,08	4,11±0,08	0,99±0,17	1,56±0,09	4,22±0,11
Ácido elágico	0,93±0,08 ^a	0,89±0,07 ^a	0,76±0,09 ^{a,b}	0,50±0,08 ^b	3,19±0,06	0,13±0,04 ^c	3,86±0,07	0,11±0,02 ^c
Ácidos hidroxicinâmicos totais	141,40 ^a	119,32 ^{b,c}	108,78 ^b	120,63 ^{b,c}	214,48 ^c	140,27 ^{a,d}	167,57 ^f	131,86 ^{a,c,d}
Ácidos hidroxibenzóicos totais	47,23 ^a	48,55 ^a	40,59 ^b	51,41 ^a	65,56 ^{c,d}	65,08 ^c	55,62 ^a	50,10 ^d

Valores expressos em mg L⁻¹ ± desvio padrão. Diferentes letras em uma mesma coluna são diferentes significativamente (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Em geral verificou-se que os valores dos ácidos *trans*-caftárico, *cis* e *trans*-cutárico nos vinhos provenientes da safra 2006 foram inferiores aos valores encontrados nos vinhos da safra 2007, sendo que o contrário foi observado no conteúdo dos ácidos *trans*-caféico e *trans*-*p*-cumárico. Uma hipótese que pode explicar esta observação é a constante evolução da composição do vinho e as inúmeras reações que ocorrem durante a vinificação, o armazenamento em barricas e o envelhecimento em garrafa. Essa tendência também foi verificada por Monagas et al. (2005) e por Gómez-Plaza et al. (2000). Monagas et al. (2005) afirmam que o aumento dos ácidos livres em vinhos pode ser não só originário da hidrólise de seus respectivos ésteres tartáricos (Somers et al., 1987), mas também devido à hidrólise de antocianinas aciladas e *p*-cumaratas durante o envelhecimento em garrafa, e que o desaparecimento de antocianinas aciladas durante o envelhecimento do vinho é, em parte devido à hidrólise dos grupos acilados. Isso também poderia explicar as menores concentrações desses derivados antociânicos verificadas nos vinhos da safra 2006 em relação aos vinhos da safra 2007 (Tabela 4.1).

A concentração dos ácidos hidroxibenzóicos: gálico, protocateico, *p*-hidroxibenzóico, vanílico, siríngico e elágico é apresentada na Tabela 4.3. O ácido gálico foi o predominante, representando, em média 76 % do total dos ácidos hidroxibenzóicos quantificados, e apresentou conteúdo que variou entre 32,85 e 54,44 mg L⁻¹. A presença de quantidades elevadas desse ácido em vinhos tintos é devido principalmente, à hidrólise de ésteres de flavonóides galatos. Seguindo o ácido gálico, o ácido protocateico apresentou conteúdos que variaram entre 0,87 e 12,67 mg L⁻¹, e o ácido *p*-hidroxibenzóico conteúdos que variaram entre 0,59 a 2,09, não sendo detectado em 3 amostras. O conteúdo dos ácidos vanílico, siríngico e elágico variou entre 1,66 e 3,78 mg L⁻¹, entre 0,98 e 4,22 mg L⁻¹ e entre 0,11 e 0,93 mg L⁻¹, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com outras pesquisas (Silva et al., 2005; Minussi et al, 2003).

Os dois fatores, variedade e safra, influenciaram significativamente o conteúdo dos ácidos hidroxibenzóicos (ANOVA *two-way*; $p < 0,05$). Verificou-se que o conteúdo de ácidos hidroxibenzóicos totais da safra 2007 foi superior aos da safra anterior ($p < 0,05$) para todas as variedades, exceto para a Syrah 2007. Segundo Revilla e González-San José (2003) e Monagas et al. (2005) embora os ácidos hidroxibenzóicos sejam susceptíveis às práticas enológicas evidências sugerem que o perfil de evolução desses compostos durante o envelhecimento em garrafas não varia significativamente.

3.2 Atividade antioxidante *in vivo*

Uma vez verificada a atividade antioxidante total *in vitro* dos vinhos Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese e Syrah, safras 2006 e 2007, contra os radicais DPPH e ABTS e à peroxidação lipídica (dados apresentados no Capítulo 3), a atividade antioxidante *in vivo* desses vinhos foi avaliada em camundongos. Avaliou-se a influência do consumo de vinhos sobre a capacidade antioxidante total do plasma (FRAP); os níveis de glutatona reduzida (GSH); a proteção ao dano oxidativo de lipídios e de proteínas, através da avaliação dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e carbonilação de proteínas (PC); como também o monitoramento do principal sistema de defesa antioxidante enzimático, através das análises das atividades das enzimas catalase (CAT), superóxido desmutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx). Os resultados dessas análises são apresentados nas Figuras 4.1 e 4.2.

Em nosso estudo nós verificamos que o grupo controle tratado com etanol (Cet) não diferiu significativamente do grupo controle tratado com água (C), o que significa que o consumo de etanol não modificou significativamente os parâmetros de atividade antioxidante *in vivo* analisados nesse estudo (Figuras 4.1 e 4.2). Resultados similares aos encontrados em nossa pesquisa foram reportados por outros pesquisadores (Rodrigo et al., 2005). O efeito do etanol no organismo é ainda bastante contraditório. Evidências epidemiológicas sugerem que o consumo moderado de bebidas alcoólicas (20-30 g de álcool por dia) é associado com uma redução do risco de morte por doença cardiovascular (Renaud et al., 1998). Entretanto, outras pesquisas afirmam que o consumo crônico de etanol promove efeitos tóxicos ao organismo, tais como a geração de espécies de radicais livres que por sua vez podem danificar vários tecidos (Mantle e Preedy, 1999), diminuir os níveis de GSH (Scott et al., 2000) e comprometer a atividade de enzimas antioxidantes (Rodrigo et al., 2002).

Os valores da capacidade antioxidante total do plasma, verificada através do FRAP ($\mu\text{M TEAC}$) são apresentados na Figura 4.1. Quando comparados com os grupos controle, os valores de FRAP aumentaram significativamente com o consumo das amostras de vinhos, exceto o grupo tratado com o vinho Sangiovese 2006 ($p < 0,05$). O aumento da capacidade antioxidante do plasma gerado pelo consumo de vinhos variou de 17,8 % a 70,7 %, verificando-se diferença entre as variedades, mas não entre as safras (ANOVA *two-way*; $p < 0,05$). Entre os vinhos da safra 2006 a variedade Merlot obteve os maiores valores de FRAP, seguida pela Syrah e Cabernet Franc. Enquanto que, entre os vinhos da

safras 2007, àqueles provenientes das variedades Cabernet Franc e Merlot promoveram os maiores aumentos nos valores de FRAP.

A influência do consumo de vinhos sobre a proteção ao dano lipídico foi avaliada pelo método de TBARS (Figura 4.1), através do monitoramento dos níveis de malonaldeído (MDA), um aldeído usado como indicador de danos teciduais que é formado a partir da peroxidação de membranas biológicas. A peroxidação lipídica é um processo mediado por radicais livres e envolve a formação de radicais lipídicos, um rearranjo dos lipídios insaturados que resulta em uma variedade de produtos de degradação que, eventualmente, promovem danos às células (Ohkawa et al., 1979). Verificou-se que o consumo dos vinhos promoveu uma diminuição significativa nos níveis do índice de peroxidação lipídica quando comparados aos grupos controle ($p < 0,05$), que variou de 6,3 a 34,1 %, demonstrando o efeito protetor do consumo de vinhos sobre a prevenção da lipoperoxidação. ANOVA *two-way* revelou que os dois fatores, variedade e safra, influenciaram significativamente os valores de TBARS ($p < 0,05$). As mais significativas diminuições foram verificadas pelas amostras Sy (43,2 %) e M (27,6 %) provenientes da safra 2007.

O aumento do estresse oxidativo também promove danos às proteínas, como a carbonilação dessas moléculas (Esterbauer et al., 1991). Verificamos no presente estudo uma diminuição significativa nos níveis dos índices de carbonilação de proteínas (PC) promovida pelo consumo dos vinhos (Figura 4.1) quando comparados aos grupos controle ($p < 0,05$), como também se verificou diferenças significativas entre as safras e as variedades estudadas (ANOVA *two-way*; $p < 0,05$). As variedades Cabernet Franc e Syrah foram as mais efetivas na diminuição da PC nas duas safras avaliadas, promovendo uma inibição que variou de 30,5 a 42,9 %.

O aumento da capacidade antioxidante do plasma devido ao consumo de vinhos também foi verificado por outros autores, tanto em animais (Orellana et al., 2002; Rodrigo et al., 2005) como em humanos (Akçay et al., 2004) e acredita-se que este aumento protege os órgãos contra os danos oxidativos causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs). Rodrigo et al. (2005) sugerem que o aumento da capacidade antioxidante do plasma induzida pelo consumo de vinho contribui com os sistemas de defesa antioxidante de órgãos como rins, fígado e pulmão, devido à sua alta taxa de perfusão. Acredita-se que o aumento da capacidade antioxidante do plasma, da inibição da oxidação lipídica e da carbonilação proteica promovidos pelo consumo de vinhos ocorra

devido à alta capacidade que os compostos fenólicos presentes nos vinhos possuem de atuar contra os radicais livres no organismo (Renaud e Lorgeril, 1992; Frankel et al., 1995).

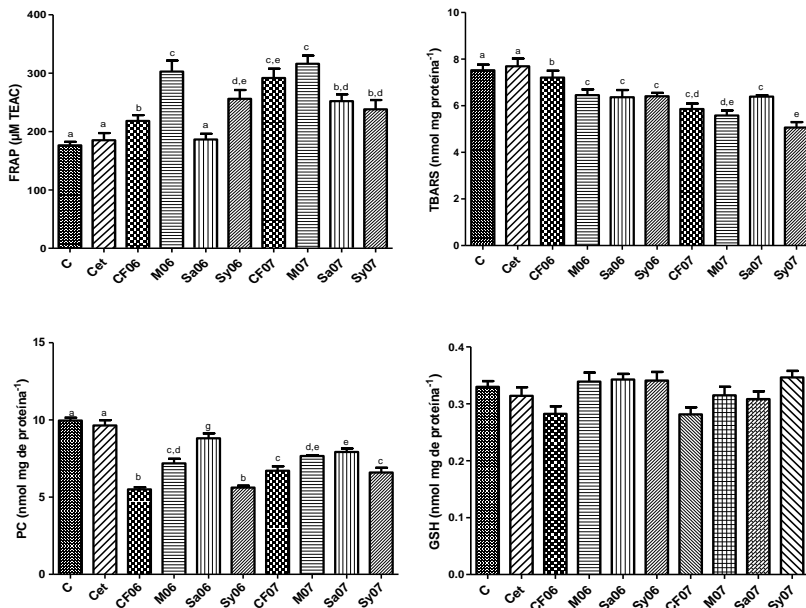


Figura 4.1. Valores da capacidade antioxidante total do plasma (FRAP, TEAC μM); índice de peroxidação lipídica (TBARS; $\text{nmol mg proteína}^{-1}$), índice de carbonilação de proteínas (PC, $\text{nM mg proteína}^{-1}$) e concentração de GSH hepática ($\text{mmol mg proteína}^{-1}$) em fígados de camundongos. C= grupo controle tratado com água; Cet= grupo controle tratado com etanol 12 %; CF06= grupo teste tratado com vinho Cabernet Franc 2006; M06= grupo teste tratado com vinho Merlot 2006; Sa06= grupo teste tratado com vinho Sangiovese 2006; Sy06= grupo teste tratado com vinho Syrah 2006; CF07= grupo teste tratado com vinho Cabernet Franc 2007; M07= grupo teste tratado com vinho Merlot 2007; Sa07= grupo teste tratado com vinho Sangiovese 2007; Sy07= grupo teste tratado com vinho Syrah 2007. Letras diferentes significam diferença estatística (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Os níveis de GSH monitorados nos grupos controle e teste são apresentados na Figura 4.1. No presente estudo verificou-se que não houve uma diferença significativa dos níveis de GSH hepático entre os grupos controle e teste ($p < 0,05$), o que sugere que o consumo de vinhos não afetou a homeostase do organismo dos animais. A GSH age como um antioxidante intra e extracelular em conjunto com vários processos enzimáticos em várias funções intracelulares, incluindo a detoxicação de intermediários das EROs e a redução de tióis de baixo peso molecular (Ookhtens e Kaplowitz, , 1998). Durante a condição de estresse oxidativo a GSH é convertida em glutationa oxidada (GSSG) e, conseqüentemente, a GSH pode ser reduzida (Doroshov et al., 1990). Um aumento dos níveis de GSH também pode sugerir uma resposta antioxidante do organismo ao aumento de agentes estressores.

A atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx são apresentadas na Figura 4.2. Em nosso estudo nós verificamos que o consumo dos vinhos diminuiu significativamente a expressão dessas enzimas antioxidantes ($p < 0,05$) em relação ao grupos controle (Figura 4.2). A SOD é uma enzima que possui a capacidade de inibir a produção de radicais hidroxila e reagir com radicais superóxidos e convertê-los em H_2O_2 ; uma quantidade excessiva destes metabólitos pode iniciar uma reação em cadeia letal que oxida e desativa estruturas que são necessárias para a integridade e sobrevivência da célula (Ray e Husian, 2002). A enzima CAT cataliza a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Ray e Husian, 2002) enquanto que a GPx converte o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos em água e lipídios alcoólicos, respectivamente (Doroshov et al., 1990).

ANOVA (*two-way*) revelou que o fator safra influenciou na atividade das enzimas SOD e CAT, o que não foi verificado para GPx; enquanto que o fator variedade influenciou somente a atividade da GPx ($p < 0,05$).

Verificou-se que a atividade da enzima SOD foi suprimida em média 15 % pelos vinhos da safra 2006, onde o mais efetivo foi o vinho Syrah ($p < 0,05$). Já na safra 2007 essa supressão foi significativamente maior, em média 43 %, não se verificando diferença entre as variedades ($p < 0,05$). O consumo dos vinhos promoveu uma diminuição da atividade da CAT que variou entre 12,1 e 36,0 %, obtidos pelos vinhos Merlot 2006 e Merlot 2007, respectivamente. Os vinhos Cabernet Franc e Merlot provenientes da safra 2007 se mostraram mais efetivos na diminuição da atividade da CAT quando comparados com os provenientes da safra 2006 ($p < 0,05$); o contrário foi observado para a

variedade Syrah ($p < 0,05$). A supressão da atividade da enzima GPx causada pelo consumo dos vinhos avaliados variou de 34,7 a 65,4 %. Verificou-se que as variedades Syrah (2006 e 2007) e Sangiovese (2007) apresentaram as mais significativas diminuições da atividade da GPx (62,4 e 65,4 %). A diminuição da atividade dessas enzimas promovida pelo consumo de vinho é possivelmente devido à supressão de EROs mediadas à nível de transcrição, segundo Nielsen et al. (1999).

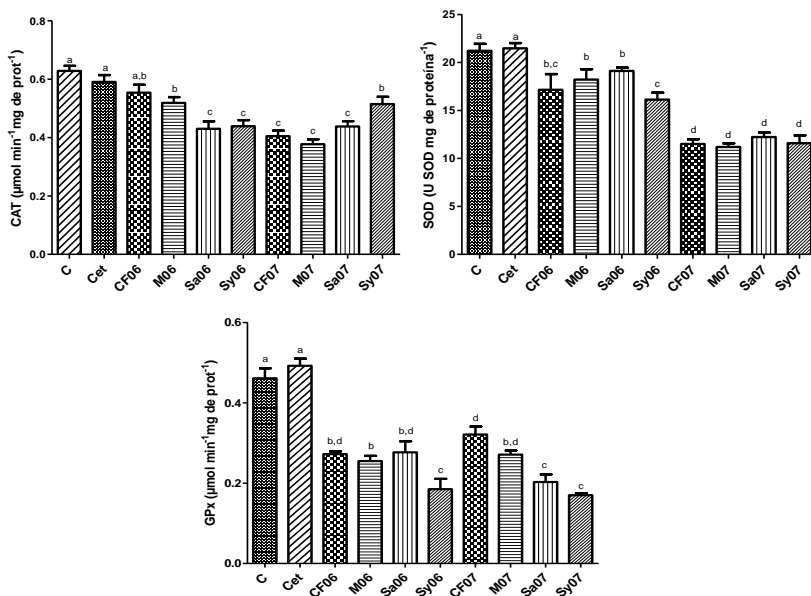


Figura 4.2. Valores das atividades das enzimas catalase (CAT; $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg de prot}^{-1}$) e superóxido desmutase (SOD; U SOD mg proteína $^{-1}$) e glutaciona peroxidase (GPx; $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg de prot}^{-1}$) em fígados de camundongos. C= grupo controle tratado com água; Cet= grupo controle tratado com etanol 12 %; CF06= grupo teste tratado com vinho Cabernet Franc 2006; M06= grupo teste tratado com vinho Merlot 2006; Sa06= grupo teste tratado com vinho Sangiovese 2006; Sy06= grupo teste tratado com vinho Syrah 2006; CF07= grupo teste tratado com vinho Cabernet Franc 2007; M07= grupo teste tratado com vinho Merlot 2007; Sa07= grupo teste tratado com vinho Sangiovese 2007; Sy07= grupo teste tratado com vinho Syrah 2007. Letras diferentes significam diferença estatística (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

3.3 Relação entre a atividade antioxidante e a concentração de compostos fenólicos

Em condições fisiológicas, as EROs são eliminadas por sistemas de defesa antioxidante enzimáticos e não enzimáticos. Scavenging das EROs, ligação de íons metálicos (envolvidos na reação de Fenton) e degradação de peróxidos são os mecanismos comuns para prevenir a propagação dos danos induzidos pelas EROs (Halliwell e Gutteridge, 1981). Um aumento na produção de EROs e um comprometimento da capacidade antioxidante pode causar sérios danos e estresse oxidativo celular e pode promover o desenvolvimento de diversas doenças. Neste contexto, o consumo de vinho tinto é alvo de muitos estudos e representa uma área de intensa pesquisa na prevenção de transtornos relacionados ao estresse oxidativo (Stanner et al., 2003). Uma vez que o potencial antioxidante de vinhos tintos é atribuído ao seu teor de compostos fenólicos, a influência dos compostos fenólicos quantificados nas amostras de vinho sobre a atividade antioxidante *in vivo* promovida pelo consumo de vinhos foi analisada através da análise de correlação ($p < 0,05$).

Verificou-se que a capacidade antioxidante total do plasma (FRAP) foi diretamente correlacionada com o conteúdo das antocianinas delphinidina-3-glucosídeo ($R = 0,53$), cianidina-3-glucosídeo ($R = 0,54$) e seus correspondentes acilados ($R = 0,54$ e $0,61$, respectivamente). Correlação positiva também foi verificada entre FRAP e as concentrações dos ácidos ferrúlico ($R = 0,59$) e gálico ($R = 0,65$) como também com o conteúdo total de ácidos hidroxibenzóicos ($R = 0,62$).

A proteção à peroxidação lipídica verificada em nosso estudo apresentou alta correlação com o conteúdo de todas as antocianinas livres quantificadas ($R = 0,57$ a $0,78$), como também com o conteúdo total de antocianinas glucosiladas ($R = 0,70$), aciladas ($R = 0,65$), cumáricas ($R = 0,70$) e antocianinas totais livres ($R = 0,69$). Entre os flavonóides quantificados, a miricetina foi o único que apresentou correlação com a diminuição da lipoperoxidação ($R = 0,48$). O conteúdo dos ácidos *cis*-caftárico ($R = 0,58$), protocateico ($R = 0,63$), bem como o total de ácidos hidroxibenzóicos ($R = 0,71$) se mostraram correlacionados com a proteção à lipoperoxidação.

Verificou-se que a proteção à carbonilação de proteínas foi correlacionada positivamente com o conteúdo de flavonóides totais ($R = 0,50$), destacando-se a alta correlação com o conteúdo de laricitrina ($R = 0,74$) e isohramnetina ($R = 0,72$). Entre os ácidos hidroxicinâmicos, o

trans-caftárico também contribuiu com a proteção ao dano as proteínas (R= 0,51), como também os ácidos hidroxibenzóicos vanílico (R= 0,65) e siríngico (R= 0,50).

Correlação positiva também foi verificada entre a inibição da enzima CAT e o conteúdo das antocianinas delphinidina-3-glucosídeo (R= 0,50) e cianidina-3-glucosídeo (R= 0,63), bem como com os seus derivados acilados (R= 0,46 e 0,58, respectivamente). O conteúdo de hidroxibenzóicos totais também foi positivamente correlacionado com a inibição dessa enzima (R= 0,45). O mesmo foi verificado para o ácido fertárico (R= 0,51).

De forma geral verificou-se que a inibição da SOD apresentou correlação positiva com os conteúdos totais de todos os compostos fenólicos quantificados. Correlação foi verificada entre a inibição dessa enzima e o conteúdo de flavonóides totais (R= 0,50) e para o composto miricetina (R= 0,62). Correlação positiva também foi verificada com as antocianinas totais (R= 0,76), antocianinas glucosídeos totais (R= 0,76), antocianinas aciladas totais (R= 0,78), antocianinas cumaratas totais (R= 0,68), bem como com todas as antocianinas individuais quantificadas nesse estudo (R= 0,58 a 0,86). O mesmo foi verificado para os ácidos hidroxicinâmicos totais (R= 0,65), e para os ácidos *trans*-caftárico (R= 0,52), *cis*-cutárico (R= 0,60) e *trans*-cutárico. O conteúdo total de HBA (R= 0,89) e os ácidos protocateico (R= 0,87) e vanílico (R= 0,64) também foram altamente correlacionados com a inibição da SOD. A inibição da enzima GPx foi correlacionada significativamente apenas com o conteúdo do ácido hidroxibenzóico (R=0,78).

A partir desses resultados pode se afirmar que, embora os efeitos benéficos do consumo de vinhos sejam devido ao sinergismo dos compostos fenólicos presentes nos mesmos, existem grupos de compostos fenólicos, bem como compostos individuais, que atuam de forma mais efetiva na atividade antioxidante promovida pelo consumo de vinhos. Provavelmente isso ocorre devido às diferenças de estrutura desses compostos. Para flavonóides, sabe-se que *in vitro* o número e a posição dos grupos metil e hidroxil do anel B afetam diretamente a sua estabilidade e reatividade. Em geral, uma maior capacidade antioxidante é verificada em compostos que possuem a estrutura *orto*-dihidroxi no anel B, pois esses compostos são eficientes doadores de hidrogênio (Rice-Evans et al. 1996). A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e de seus ésteres também depende do número e da posição dos grupos hidroxil na molécula (Grootveld and Halliwell, 1986; Rice-Evans et al. 1996). A capacidade de captura de elétrons dos grupos carboxilatos nos

ácidos hidroxibenzóicos tem uma influência negativa sobre a sua capacidade de doar hidrogênio pelos grupos benzoatos. Assim, teoricamente os ácidos hidroxicinâmicos hidroxilados são mais efetivos que seus respectivos benzoatos.

Os efeitos benéficos ao organismo promovidos pelo consumo de compostos fenólicos, especialmente de vinhos, como foi verificado no presente estudo, são relatados por outras pesquisas (Cartron et al., 2003; Pignatelli et al., 2006). Mas explicar esses efeitos sobre o organismo e como esse compostos desempenham essas funções biológicas não é simples, pois são poucos os dados sobre o mecanismo de absorção e de biodisponibilidade dos compostos fenólicos no organismo, uma vez que o destino metabólico desses compostos em sistemas biológicos é altamente complexo e dependente de um grande número de processos. Compostos fenólicos, tais como alguns ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóico, quercetina, campferol e malvidina-3-glucosídeo já foram detectados e quantificados em fluídos biológicos após ingestão de vinho (Cartron et al., 2003; Pignatelli et al., 2006; Nardini et al., 2009). Aparentemente, após a ingestão do vinho, os polifenóis apresentam um metabolismo rápido e extenso que resulta em apenas traços desses compostos em sua forma inalterada na circulação sistêmica. A maioria dos polifenóis absorvidos está presente no plasma e na urina em suas formas conjugadas: metilada, glucuronada e sulfatadas. Esse fato indica um extenso metabolismo de primeira passagem intestinal/hepática das formas primárias de compostos fenólicos ingeridos (Cartron et al., 2003; Pignatelli et al., 2006; Vanzo et al., 2007; Nardini et al. 2009), assim, a atividade biológica dos polifenóis pode também ser atribuída à seus metabólitos.

Os primeiros trabalhos realizados sobre a absorção e a biodisponibilidade desses compostos apresentaram evidências de que apenas os flavonóides livres (agliconas), seriam capazes de passar a parede intestinal e serem absorvidos (Griffiths, 1982). No entanto, estudos mais recentes contradizem esta hipótese. Chang et al. (2005) verificaram que a quercetina-3- *O*-glucosídeo foi rapidamente absorvida e transformada em quercetina-glucuronida. De acordo com estudos em animais e humanos as antocianinas são absorvidas em sua forma glicosilada após o consumo oral (Matsumoto et al., 2001, Nielsen et al., 2003), e o estômago parece ser um dos locais de absorção desses compostos (Passamonti et al., 2003). Estudos recentes demonstraram que os ácidos hidroxicinâmicos de vinho branco são absorvidos pelo trato gastrointestinal humano e circulam no sangue depois de serem

amplamente metabolizados para as formas conjugadas glicuronada e sulfatada (Nardini et al., 2009). Vanzo et al. (2007) relataram que o ácido *trans*-caftárico é rapidamente absorvido pelo estômago, passa pelo fígado, pode atingir o cérebro, e é absorvido, metabolizado e excretado como ácido *trans*-fertárico pelos rins.

Deve-se ressaltar que, embora a atividade antioxidante de vinhos é um dos principais mecanismos biológicos aceitos para a comprovada atividade biológica dos compostos fenólicos, outros mecanismos biológicos são propostos, incluindo o vaso relaxamento mediado pelo óxido nítrico (Diebolt et al., 2001; Dell'Agli et al., 2005), a atividade estrogênica (Klinge et al., 2003), a inibição da agregação plaquetária (Demrow et al., 1995) e a modulação do metabolismo lipídico (Frankel et al., 1993a).

4 CONCLUSÃO

De modo geral, as concentrações dos compostos fenólicos quantificados nesse estudo são adequadas para vinhos finos de qualidade o que demonstra o potencial da região para a produção de vinhos finos. Verificamos também nesse estudo que o consumo desses vinhos promoveu aumento na atividade antioxidante *in vivo* de camundongos, verificadas pelo aumento dos níveis de FRAP, diminuição dos níveis de TBARS e PC, e supressão da atividade das enzimas CAT, SOD e GPx. Além disso, a atividade antioxidante promovida pelo consumo de vinho foi correlacionada com os principais compostos fenólicos quantificados. Observaram-se diferenças significativas entre essas correlações, o que sugere uma diferença na atividade biológica desses compostos. Nossos resultados sugerem a importante atividade biológica dos compostos fenólicos sobre a atividade antioxidante promovida pelo consumo de vinhos, como também o benefício do consumo moderado e contínuo de vinhos.

CAPÍTULO 5

Estilbenos e tirosol como compostos alvo na avaliação das atividades antioxidante e hipolipemiante de vinhos de variedades *Vitis vinifera* de São Joaquim– SC, Brasil.

**Eliana Fortes Gris¹, Fulvio Mattivi⁴, Eduardo Antonio Ferreira²,
Urska Vrhovsek⁴, Danilo Wilhelm Filho³, Rozangela Curi Pedrosa²,
Marilde T. Bordignon-Luiz¹**

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos CAL; Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil.

²Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Bioquímica, BQA, Campus Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

³Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ecologia e Zoologia Bioquímica, Campus Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

⁴Fondazione Edmund Mach, IASMA- Istituto Agrario San Michele all'Adige, Centro Ricerca e Innovazione, Area Qualità Alimentare e Nutrizione, Via E Mach 1, 38010, San Michele all'Adige, TN, Italia.

RESUMO

A determinação do conteúdo dos estilbenos *cis*-resveratrol, *trans*-resveratrol, *cis*-piceid, *trans*-piceid e do tirosol foi realizada em vinhos tintos provenientes da região de São Joaquim, uma nova região vitícola localizada no Estado de Santa Catarina, sul do Brasil. O efeito do consumo crônico desses vinhos sobre as atividades antioxidante e hipolipemiante foram verificados em camundongos C57BL6 *knockout* para o receptor de LDL submetidos à dieta hipercolesterolêmica, através do biomonitoramento de marcadores do estresse oxidativo e dos níveis lipídicos nos animais. Os resultados revelaram vinhos com significativos conteúdos de estilbenos e tirosol. A soma dos estilbenos quantificados variou entre 12,74 e 52,81 mg L⁻¹, com média de 27,42 mg L⁻¹. Verificou-se também a predominância das formas glicosiladas (média= 10,1 mg L⁻¹) sobre as livres (média= 3,6 mg L⁻¹) e dos isômeros *trans* (média= 8,3 mg L⁻¹) sobre os *cis* (média= 5,4 mg L⁻¹). A concentração média de tirosol quantificada nas amostras de vinhos foi de 37,0 mg L⁻¹, variando de 23,40 a 47,85 mg L⁻¹. O biomonitoramento da atividade antioxidante e hipolipemiante *in vivo* revelaram que o consumo de vinhos promoveu um aumento na capacidade antioxidante nos animais, verificado pelo aumento nos níveis de atividade antioxidante total do plasma (FRAP), e no fígado, pela diminuição dos níveis dos índices de peroxidação lipídica e carbonilação protéica, e pela diminuição da atividade das enzimas superóxido desmutase e catalase. O consumo de vinhos reduziu significativamente a hipercolesterolemia e a hipertrigliceridemia promovidas pela dieta hipercolesterolêmica, como também diminuiu o índice aterogênico e aumentou significativamente os valores de colesterol de alta densidade (HDL). Significativas correlações foram verificadas entre os efeitos benéficos do consumo de vinhos e o conteúdo dos estilbenos e tirosol quantificados, demonstrando a importante atividade biológica desses compostos.

Palavras-chave: vinhos *Vitis vinifera*, estilbenos, tirosol, atividade antioxidante, atividade hipolipemiante.

1. INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos demonstram que o consumo moderado de bebidas alcoólicas está associado à redução da mortalidade e do risco de doenças cardiovasculares (Goldberg et al., 1995a). Entre essas bebidas, destaca-se o vinho tinto, principalmente após a divulgação do estudo epidemiológico conhecido como “Paradoxo francês”, o qual confirma os efeitos benéficos do consumo de vinhos tintos sobre a diminuição do risco de desenvolvimento de doenças cardíacas (Renaud e Lorgeril, 1992). Além disso, o consumo de vinhos também está associado com a inibição de tumores iniciais (Clifford et al., 1996; Delmas et al., 2006) além de possuir elevada atividade antioxidante (Paganga et al., 1999; Kirimlioglu et al., 2006). Esses benefícios, associados ao consumo de vinhos, são atribuídos aos compostos fenólicos presentes em elevadas concentrações em vinhos tintos (Burns et al., 2000).

Dentre os compostos fenólicos, o grupo dos estilbenos é um dos que mais se destacam, sendo o resveratrol (3,5,4-trihidroxiestilbeno) um dos principais representantes em vinhos. Entre os monômeros de estilbenos, o *trans*-resveratrol, o primeiro estilbeno detectado em vinhos, é a fitoalexina da videira mais amplamente estudada, devido à sua importância para a saúde humana, embora esteja presente em baixas concentrações em vinhos (1-5 mg L⁻¹) (Lamuela-Raventós et al., 1995; Ribeiro de Lima et al., 1999). Além do isômero *trans*, outras formas deste trihidroxiestilbeno foram encontradas. O *cis*-resveratrol foi o segundo estilbeno detectado em vinhos (Goldberg et al., 1995c; Soleas et al., 1995), e é normalmente encontrado em menores concentrações que a forma *trans*, e segundo algumas pesquisas, é menos ativo biologicamente que a sua forma *trans* (Ribeiro de Lima et al., 1999; Varache-Lembège et al., 2000; Vitrac et al., 2002). Uma vez que o *cis*-resveratrol comumente não é detectado nas cascas de uva e nem em sucos, ou detectado em baixas concentrações, acredita-se que ele seja formado a partir da isomerização do *trans*-resveratrol ou a partir da quebra de polímeros de resveratrol durante a fermentação do vinho (Mattivi et al., 1995; Soleas et al., 1995; Roggero, 1996; Gatto et al., 2008). A forma glicosilada (3-β-glicosídeo) do *trans*-resveratrol (piceid) também foi identificada em vinhos (Jeandet et al., 1994; Roggero e Archie, 1994), e sua presença foi confirmada em uvas (Waterhouse e Lamuela-Raventós, 1994). Os glicosídeos de ambos os isômeros são relatados como constituintes naturais de uvas e vinhos tintos (Lamuela-

Raventós et al., 1995; Gatto et al., 2008), embora ainda sejam ainda pouco estudados.

O crescente interesse no resveratrol é baseado, principalmente, em evidências que afirmam que esse composto age ativamente na prevenção de doenças cardíacas coronarianas (Seigneur et al., 1990; Siemann e Creasy, 1992; Gülçin, 2010). Esse efeito pode ser devido ao seu potencial antioxidante (Frankel et al., 1995; Murcia e Martínez-Tomé, 2001; Queiroz et al., 2009), à sua capacidade de inibir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (Frankel et al., 1993a) e a síntese de eicosanóides (Pace-Asciak et al., 1995; Ruf, 1999) e também bloquear a agregação plaquetária (Bertelli et al., 1995; Pace-Asciak et al., 1995). Além disso, o resveratrol possui propriedades antiinflamatórias e anticancerígenas (Fremont et al., 2000; Jang et al., 2000). Diplock et al. (1999) afirmam que vinhos com elevado teor de resveratrol podem ser considerados “vinhos funcionais” devido aos efeitos benéficos do resveratrol sobre a saúde, uma vez que o resveratrol é um dos mais importantes princípios ativos do vinho tinto.

Estudos mais recentes demonstram que outro composto fenólico presente em vinhos, o tirosol, também possui importante efeito cardioprotetor sendo um dos principais compostos presentes na Dieta do Mediterrâneo e também correlacionado com o “Paradoxo francês” (Dudley et al., 2008). O tirosol (2-(4-hidroxifenol)etil álcool) é um composto presente no vinho produzido partir da tirosina (4-hidroxifenil)-L-fenilalanina) pelas leveduras durante a fermentação do mosto, e é o único composto fenólico produzido em quantidades significativas a partir de precursores não fenólicos. Esse composto influencia o flavour, contribuindo no bouquet de mel de alguns vinhos (Jackson, 2000). Estudos afirmam que esse composto possui propriedades antioxidantes tais como: inibir a oxidação de LDL (Di Benedetto et al., 2007) e capturar espécies reativas como NOO^{\cdot} e $\text{O}_2^{\cdot-}$, (Bertelli et al., 2002; Covas et al., 2003). Evidências mostram que o tirosol também possui capacidade de modular os níveis de LDL em humanos (Covas et al., 2006), além de possuir ação cardioprotetora (Dudley et al., 2008) e neuroprotetora (Bu et al., 2008). Bastante conhecido como um dos compostos biologicamente mais ativos presente no azeite de oliva, e um dos principais responsáveis pelo efeito cardioprotetor desse produto (Di Benedetto et al., 2007), em vinhos, o tirosol, embora encontrado em concentrações significativas, ainda é pouco estudado, e pesquisas sobre o efeito desse composto bem como

qual a sua contribuição para os efeitos benéficos promovidos pelo consumo de vinhos ainda são escassas.

A literatura destaca resultados sobre a atividade biológica do monômero *trans*-resveratrol, porém são poucos os dados sobre as outras formas monoméricas desses estilbenos. Também são descritos estudos sobre a atividade biológica do tirosol proveniente do azeite de oliva, porém, embora esse biofenol esteja presente em concentrações significativas em vinhos tintos e em vinhos brancos poucos dados sobre a sua contribuição na atividade biológica desses meios são relatadas. Assim, o objetivo desse trabalho foi determinar o conteúdo dos principais estilbenos monômeros: *cis*-resveratrol, *trans*-resveratrol, *cis*-piceid e *trans*-piceid e do biofenol tirosol usando HPLC-DAD em vinhos tintos de São Joaquim, uma nova região vitícola do Estado de Santa Catarina, sul do Brasil; bem como avaliar a capacidade antioxidante e hipolipemiante *in vivo* desses vinhos, e verificar a contribuição desses compostos sobre a atividade biológica promovida pelo consumo de vinhos, através da correlação dos resultados *in vivo* com os conteúdos de estilbenos e tirosol encontrados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Padrões e reagentes

Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC e foram adquiridos da Carlo Erba (Rodano, Itália). *Trans*-resveratrol foi adquirido da Extrasynthèse (Genay, França); *cis*-resveratrol foi obtido por fotoisomerização do *trans*-resveratrol após exposição à luz UV (254nm) por 24 horas (Mattivi et al., 1995). Tirosol, a enzima glutationa redutase (GR), os reagentes terc-butil hidroperóxido, ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB); nicotinamina adenina dinucleotideo fosfato na forma reduzida (NADPH); 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH); ácido tiobarbitúrico (TBA); peróxido de hidrogênio; 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ); hidroxitolueno butilado (BHT); TROLOX; glutationa reduzida (GSH); GSSG e epinefrina foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Kits enzimáticos para as análises de lipídios foram obtidos da Labtest Diagnóstica SA (Lagoa Santa - Minas Gerais, Brasil).

2.2 Amostras

Foram analisados os vinhos das variedades Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese e Syrah, safras 2006 e 2007, provenientes de São

Joaquim. A região de São Joaquim está localizada no Estado de Santa Catarina, em altitudes que variam de 800 a 1.400 m, e caracteriza-se por apresentar as maiores altitudes da vitivinicultura brasileira com vinhedos à altitudes que variam de 900 a 1.400 m. De acordo com o sistema de Classificação Climática Multicritério Geovitécola - Sistema CCM Geovitécola (Tonietto e Carbonneau, 2004) o clima vitícola da região de São Joaquim é classificado como “Frio, de Noites Frias e Úmido”: IH-2 IF+1 IS-2, Índice Heliotérmico-IH-2 de 1.714; Índice de Frio Noturno-IF de 12,1 °C; e Índice de Seca-IS 200 mm, úmido. O solo da região foi classificado como Inceptisol (Falcão et al., 2008a). Os vinhedos estão localizados a 28° 15' lat., 49° 50' long. e a 1.290 m de altitude. As videiras das variedades estudadas foram implementadas em 2003 e os clones utilizados foram Cabernet Franc 986, Merlot 181, Sangiovese VCR23 e Syrah VCR1. O porta-enxerto usado foi o Paulsen 1103 (*V. berlandieri* Planch x *V. rupestris* Scheele) e o sistema de condução foi o tipo espaldeira, com espaçamento 3,0 x 1,2 m. Durante o período dos ensaios, todos os tratamentos culturais necessários foram realizados, de acordo com as recomendações para a cultura. Os rendimentos médios das quatro variedades variaram entre 7 e 6 t.ha⁻¹.

2.3 Produção dos vinhos

Todos os vinhos foram produzidos sob as mesmas condições. As uvas foram separadas das hastes, esmagadas, e mantidas em cubas de aço inoxidável. O período de maceração foi de 15 dias, com uma ou duas remontagens diárias e temperatura entre 22 °C e 28 °C. Antes de iniciar a fermentação alcoólica, foram adicionadas ao mosto: metabissulfito de potássio (12 g 100 kg⁻¹ de mosto, correspondente a 60 mg L⁻¹ de SO₂ livre) (Noxitan, Pascal Biotech, Paris) *Saccharomyces cerevisiae* (20 g 100 kg⁻¹) (Fermol Rouge, Pascal Biotech, Paris), e as enzimas comerciais com atividade pectinolítica (2–4 g hL⁻¹) (Pectinex SPL/Ultra, Pascal Biotech, Paris). O mosto foi separado das partes sólidas e transferido para outras cubas de aço inoxidável. O consumo do ácido málico pelas bactérias lácticas ocorreu espontaneamente entre 60–75 dias. Terminadas as fermentações alcoólica e malolática os vinhos foram transferidos para barris de carvalho francês onde permaneceram por aproximadamente 1 ano. Antes do engarrafamento foi adicionado Noxitan (35 mg L⁻¹ de SO₂ livre, em média). As amostras de vinhos provenientes das safras 2006 e 2007 foram analisadas após 1 e 2 anos de guarda, respectivamente, e foram mantidas a 10 °C antes das análises.

2.4 Análises cromatográficas

2.4.1 Estilbenos nomômeros

Preparação das amostras

A preparação das amostras foi realizada de acordo com Mattivi (1993b). À amostra de vinho (50,0 mL) foi adicionado 0,5 mL de uma solução alcoólica de *trans*-4-hidroxiestilbeno (padrão interno, 200 mg L⁻¹), essa solução foi neutralizada (pH 7,0) com NaOH, e após a neutralização o volume foi aferido para 100 mL com água destilada. Uma alíquota de 10 mL dessa solução foi aplicada em cartucho C18-SPE (1g, Waters, Milford, MA) previamente ativado com 4 mL de metanol seguido de 10 mL de solução tampão pH 7,0. O cartucho foi então lavado por duas vezes com 10 mL de solução tampão pH 7,0. O cartucho foi seco com N₂ para retirada de toda a solução de lavagem e então os estilbenos foram eluídos com 5,0 mL de acetato de etila. A fração obtida foi congelada em freezer (-18 °C) e mantida por 30 minutos, a fração orgânica foi então retirada, seca em rotaevaporador (40 °C) e redissolvida em solução metanol/ água (1:1), filtrada em cartucho 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA) e imediatamente injetada em HPLC-DAD. A preparação das amostras e análises foram realizadas em triplicata para cada vinho.

Análise CLAE-DAD

A separação e quantificação dos estilbenos: *trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol, *trans*-piceid e *cis*-piceid foi realizada de acordo com Mattivi (1993b) e Mattivi et al. (1995). Utilizou-se o sistema HPLC Waters 2695 equipado com detector DAD 2996 (Waters, Milford, MA) e a coluna de fase reversa Hypersil ODS 200 mm x 2,1 mm (5 µm), com a respectiva pré-coluna (Merck, Alemanha). Ácido fosfórico (10⁻³M) e acetronitrila foram os solventes A e B, respectivamente, e o seguinte gradiente linear foi utilizado para a separação dos compostos: 0 a 50 % do solvente B em 25, a coluna foi lavada com 100 % de B por 3 minutos e reequilibrada por 5 minutos. O fluxo utilizado foi 0,6 mL min⁻¹, o volume de injeção foi de 6 µL e a temperatura da coluna foi 40 °C.

A detecção foi realizada a 310 nm para os isômeros *trans* e 282 nm para os isômeros *cis*. A identificação e quantificação dos piceid foram realizadas com base nos espectros UV das respectivas agliconas, uma vez que o perfil dos espectros UV das formas glicosídicas são idênticas àquelas das respectivas agliconas e o seu coeficiente de

extinção molar são bastante similares. Os compostos foram quantificados por curvas de calibração externas. A quantificação dos estilbenos glicosilados (piceid) foi realizada por curvas de calibração externas das respectivas formas livres, calculadas de acordo com a perda do padrão interno, e expressas em mg L^{-1} (Mattivi et al., 1995).

2.4.2 Tirosol

Análise CLAE-DAD-MS

As amostras de vinho foram filtradas em filtro de $0,22 \mu\text{m}$ (PTFE, Millipore, Bedford, MA) antes da injeção no sistema CLAE Waters 2690 (Waters, Milford, MA, E.U.A.) equipado com DAD Waters 996 e Micromassa ZQ com analisador quadrupolo e fonte de ionização por eletrospray- espectrometria de massa (ESI-MS). O detector do sistema de espectrometria de massa foi operado a uma voltagem de capilaridade de 3000 V , tensão do extrator de 3 V , temperatura de $105 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura de dessolvatação de $200 \text{ }^\circ\text{C}$, fluxo de gás (N_2) de 61 L h^{-1} e um fluxo de gás de dessolvatação (N_2) de 460 L h^{-1} . ESI-MS variou de m/z 100-1500 com um tempo de permanência de $0,1 \text{ s}$. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Gemini RP18 (Phenomenex) ($250 \times 2,0 \text{ mm}$, 5 mm), protegido por uma pré-coluna. O solvente A foi 1% de ácido fórmico em água e o solvente B foi acetronitrila. O seguinte gradiente linear foi utilizado: de 0 a 20% de B em 40 min. , de 20 a 100% de B em $0, 1 \text{ min.}$, 100% de B durante 2 minutos , e retorno à 0% de B em $0,1 \text{ min.}$ O tempo de equilíbrio da coluna foi de 5 min. , o volume de injeção foi de $10 \mu\text{L}$ e o fluxo de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$. A temperatura da coluna foi de $40 \text{ }^\circ\text{C}$. A identificação foi realizada com base em seu tempo de retenção, de seu íon molecular e fragmento principal dado pelo MS através da comparação com o respectivo padrão externo. O coeficiente ideal de variação (CV) foi 20 . O íon molecular (M-H^-) do tirosol (m/z 121,00) foi usado para a quantificação do composto, expresso em mg L^{-1} , a partir de curva externa do respectivo padrão.

Repetibilidade do método e limites de detecção e quantificação

A repetibilidade do método foi baseada em seis determinações diretas consecutivas aplicadas ao mesmo vinho. O Coeficiente de Variação (CV%) obtido para o tirosol foi: $6,19 \%$. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para o método CLAE-DAD-MS foram estimados em uma relação sinal-ruído de 3 e 10 , respectivamente,

e foram os seguintes: 0,323 e 1,064 mg L⁻¹ (R² = 0,9977). Os resultados foram considerados adequados.

2.5 Animais e dietas

Para avaliação das atividades antioxidante e hipolipemiante foram utilizados camundongos C57BL6 *knockout* para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}), machos (18 – 20 g de peso), provenientes do Biotério do Laboratório de Bioquímica Experimental do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas sob condições controladas (ciclo claro-escuro de 12 h, temperatura 21 ± 2 °C, ~ 60 % umidade do ar), recebendo ração comercial e água *ad libitum* para adaptação. Os animais foram aleatoriamente divididos em 14 grupos (n= 6): dois grupos controle alimentados com uma dieta padrão normal para roedores, um grupo tratado com água (DNA) e outro com solução alcoólica 12 % (DNE) por 30 dias; dois grupos controle alimentados com uma dieta hipercolesterolêmica (20 % de gordura, 1,25 % de colesterol e 0,5 % de ácido cólico) onde um grupo foi tratado com água (DHA) e outro com solução alcoólica 12 % (DHE) por 30 dias; e 8 grupos testes: Cabernet Franc (CF06 e CF07), Merlot (M06 e M07), Sangiovese (Sa06 e Sa07) e Syrah (Sy06 e Sy07) tratados com os respectivos vinhos, safras 2006 (06) e 2007 (07), por 30 dias (7,0 mL kg⁻¹), e alimentados com a dieta hipercolesterolêmica. O tratamento foi realizado diariamente por gavagem. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal da UFSC (CEUA- PP00542).

2.6 Atividade antioxidante *in vivo*

A partir do plasma foi realizada a análise da capacidade antioxidante total do plasma (FRAP); e a partir do fígado dos animais foram realizadas as análises de avaliação da peroxidação lipídica endógena (TBARS); avaliação do dano oxidativo às proteínas por carbonilação (PC); avaliação da glutathiona reduzida (GSH) e atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido desmutase (SOD).

A avaliação da capacidade antioxidante total do plasma (FRAP) foi determinada através do potencial antioxidante redutor férrico (Benzie e Strain, 1996). Essa análise avaliou a capacidade do plasma em reduzir o complexo de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe(III) a Fe(II)-TPT. O complexo com Fe(II) foi medido a 539 nm. A capacidade

antioxidante total do plasma foi expressa como equivalente de TROLOX (TEAC μM).

A avaliação da peroxidação lipídica endógena (TBARS) foi realizada pela detecção dos seus derivados lipoperóxidos, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (Ohkawa, 1979). Essa análise foi realizada com o homogenato do fígado misturado à uma solução contendo TBA, NaOH, BHT e ácido fosfórico. A amostra foi incubada a 100 °C por 15 min e depois adicionou-se butanol. Posteriormente os tubos foram agitados vigorosamente e centrifugados a 2000 g por 5 min. A fase orgânica foi removida e medida espectrofotometricamente em 532 e 600 nm. Para o branco foi substituído a solução de TBA por HCl. Os resultados foram expressos como índice de peroxidação lipídica por g de proteína (TBARS – $\text{nM g proteína}^{-1}$).

Avaliação do dano oxidativo às proteínas por carbonilação (PC), quantificada pelo conteúdo de proteína carbonilada, foi realizada conforme descrito por Levine e Stadtman (1990). Os homogenatos dos fígados foram centrifugados, o sobrenadante foi removido e adicionou-se aos precipitados 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 1 hora, sendo vigorosamente agitadas a cada 15 min. Então, adicionou-se TCA 20 % e os tubos foram agitados e centrifugados por 6 min a 15000 g. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados resultantes foram dissolvidos em guanidina e incubados por 15 min a 37 °C, para dissolução. As absorvâncias máximas no intervalo de 360 – 370 nm foram determinadas e os valores finais das proteínas carboniladas quantificados utilizando o coeficiente de extinção molar de 22 mM. Os brancos foram preparados substituindo-se a DNPH por HCl. Os resultados foram expressos como índice de carbonilação de proteínas ($\text{nM g proteína}^{-1}$).

A avaliação da glutatona reduzida (GSH) foi realizada através do monitoramento da concentração de pequenos tióis após a obtenção dos extratos ácidos hepáticos (Anderson, 1995). Amostras de fígado foram precipitadas com TCA seguidos de centrifugação a 5000 g durante 5 min. A adição de DTNB em tampão fosfato de potássio permitiu, após cerca de 2 min, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável em 412 nm. Os valores foram expressos em $\text{mM g proteína}^{-1}$.

A atividade da enzima catalase (CAT) foi verificada através do monitoramento da velocidade de decomposição do peróxido de

hidrogênio (H_2O_2), medido a 240 nm (Aebi, 1984). Para esse ensaio, utilizou-se a solução de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato de potássio pH 7,0 preparada e titulada no dia da análise. Em uma cubeta de quartzo, foram colocados 2 mL da solução de H_2O_2 e 20 μL de amostra. Após homogeneização a velocidade de decomposição do H_2O_2 foi medida durante 20 segundos. Os valores foram expressos em mM de H_2O_2 consumido/ min.g proteína ($\text{nM min.}^{-1}\text{g proteína}^{-1}$).

A atividade da enzima superóxido desmutase (SOD) foi determinada espectrofotometricamente a 480 nm pela medida da inibição da oxidação da epinefrina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0) que produz o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo (Misra e Fridovich, 1972). Quando a amostra é adicionada, a enzima (SOD) presente nesta alíquota retardava sua formação. Numa cubeta contendo glicina (pH 10,2) foi adicionada a adrenalina e então a velocidade de formação do adrenocromo foi monitorada durante cerca de 100 s a partir do início da reação, para então adicionar a alíquota da amostra. O tempo total de monitoramento da reação foi de 3 min. Curvas de 4 ou 5 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Os valores da SOD ($\text{U SOD g proteína}^{-1}$) foram expressos em termos de atividade da enzima, definida como a quantidade de enzima necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo.

O teor de proteína foi determinado pelo método de Lowry et al. (1993), utilizando albumina bovina como padrão.

2.7 Avaliações dos níveis lipídicos

As avaliações dos níveis lipídicos dos animais, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e triglicerídeos foram realizadas através de kits enzimáticos comerciais (Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa - Minas Gerais, Brasil).

2.8 Análise Estatística

Todas as análises químicas e biológicas foram realizadas em triplicata. ANOVA (two-way) e Teste Tukey HSD foram realizados no programa STATISTICA 6 (2007) e ORIGIN (2001) admitindo nível de significância de 5 %.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Conteúdo de estilbenos e tirosol

Os resultados do conteúdo dos estilbenos *trans* e *cis*-resveratrol, *trans* e *cis*- piceid quantificados nas amostras de vinhos são apresentados na Tabela 5.1. Verificou-se que as concentrações médias das formas glicosiladas (piceid) variaram entre 11,91 mg L⁻¹ (*trans*-piceid) e 8,29 mg L⁻¹ (*cis*-piceid) e das formas livres entre 4,72 mg L⁻¹ (*trans*-resveratrol) e 2,50 mg L⁻¹ (*cis*-resveratrol), verificando-se a predominância das formas glicosiladas, como já reportado por outros pesquisadores tanto em uvas (Gatto et al., 2008) como em vinhos (Ribeiro de Lima et al., 1999; Vitrac et al., 2005). Entre os isômeros quantificados (*cis* e *trans*) verificou-se que a forma *trans* foi predominante, tanto na forma livre (resveratrol) quanto na conjugada (piceid), sendo que essa tendência é observada como típica em vinhos (Mattivi et al., 1995; Vitrac et al., 2002). Goldberg et al. (1995c) sugeriram que o isômero *cis* pode ser produzido durante a fermentação por enzimas fermentativas ou pela quebra de viniferinas. A hidrólise enzimática de glicosídeos de resveratrol também leva à formação das formas livres *cis* e *trans*-resveratrol (Mattivi et al., 1995).

Verificou-se que os fatores safra e variedade influenciaram significativamente o conteúdo de estilbenos totais ($p < 0,05$; ANOVA *two-way*). Na safra 2006 os vinhos Syrah e Merlot apresentaram os maiores conteúdos de estilbenos totais, sendo que na safra posterior os maiores conteúdos foram verificados nos vinhos Cabernet Franc e Merlot ($p < 0,05$). A variedade Merlot é comumente citada como uma das variedades que apresenta tipicamente altas concentrações de estilbenos (Rosier et al., 2003; Vitrac et al., 2005). Embora as variações climáticas influenciem significativamente a síntese de estilbenos (Goldberg et al., 1995b), a influência da variedade da uva na concentração desses compostos é relatada por vários estudos (Adrian et al., 2000; Vitrac et al., 2005; Gatto et al., 2008), e ocorre porque o genótipo desempenha um papel fundamental na determinação do conteúdo de resveratrol em uvas, como demonstrado pela primeira vez por Gatto et al. (2008).

Os vinhos analisados apresentaram, em média, conteúdo significativo de estilbenos. As concentrações de estilbenos totais (soma das formas *cis* e *trans*-piceid e *cis* e *trans*-resveratrol) variaram de 12,74 a 52,81 mg L⁻¹, com média de 27,42 mg L⁻¹. Esses valores são superiores aos relatados por Ribeiro de Lima (1999) em vinhos

portugueses e franceses, por Vitrac et al. (2002) em vinhos franceses, por Baptista et al. (2001) em vinhos portugueses e por Lamuela-Raventós et al. (1995) em vinhos espanhóis. Nossos resultados são semelhantes aos relatados por Vitrac et al. (2005) que também avaliaram o conteúdo de estilbenos em vinhos da região sul do Brasil. Esses autores afirmam que os vinhos brasileiros jovens, em especial vinhos da variedade Merlot, apresentaram em média elevados conteúdos de estilbenos e que esses vinhos brasileiros podem constituir uma importante fonte de estilbenos da dieta. Altas concentrações de *trans*-resveratrol também foram relatados por Rosier et al. (2003) em vinhos brasileiros. Esses dados confirmam uma hipótese empiricamente relatada nessa região do Brasil, de que as condições climáticas e orográficas dessa região estimulam a produção de estilbenos pelas videiras, o que consequentemente promove elevadas concentrações de estilbenos em vinhos produzidos na região sul do Brasil. Além disso, verificou-se que o conteúdo de estilbenos totais, como também das formas glicosiladas e livres estão em concordância com os valores relatados por Adrian et al. (2000) que avaliaram o conteúdos desses estilbenos em vinhos Pinot Noir, provenientes de famosas regiões da França (apelação *Grand Cru*) e conhecidos por suas altas concentrações de estilbenos.

As amostras de vinho apresentaram uma concentração relativamente elevada de tirosol (média de até 37 mg L⁻¹), apresentadas na Tabela 5.1, que quando comparada com outras pesquisas (Minussi et al., 2003; Monagas et al., 2007; La Torre et al., 2008). Esses valores variaram de 23,40 a 47,85 mg L⁻¹, conteúdos quantificados nas amostras dos vinhos Sangiovese 2007 e Merlot 2006. Nos vinhos provenientes da safra 2006 as maiores concentrações de tirosol foram verificadas nas amostras Merlot (47,85 mg L⁻¹) e Syrah (46,74 mg L⁻¹), que não diferiram significativamente ($p < 0,05$), seguidas pela Cabernet Franc (41,32 mg L⁻¹) e Sangiovese (35,41 mg L⁻¹). Já na safra 2007 a maior concentração de tirosol foi verificada na variedade Merlot (44,13 mg L⁻¹), seguida pelas variedades Cabernet Franc (35,41 mg L⁻¹), Syrah (26,42 mg L⁻¹) e Sangiovese (23,40 mg L⁻¹). Verificamos assim que, em relação às diferentes variedades estudadas a Merlot foi a que apresentou as maiores concentrações de tirosol e a Sangiovese as menores, independente da safra avaliada ($p < 0,05$). Esses resultados estão de acordo com outros estudos que relatam diferenças significativas no conteúdo desse biofenol entre diferentes variedades (Minussi et al., 2003; Boselli et al., 2006).

Tabela 5.1. Estilbenos monômeros e tirosol quantificados nas amostras de vinhos das diferentes variedades.

	<i>Trans-resveratrol</i>	<i>Cis-resveratrol</i>	<i>Trans-piceid</i>	<i>Cis-piceid</i>	<i>Estilbenos totais</i>	<i>Tirosol</i>
<i>Cabernet Franc 2006</i>	3,72±0,06 ^a	1,70±0,08 ^a	10,53±0,34 ^a	5,26±0,19 ^a	21,20 ^a	41,32±2,07 ^a
<i>Merlot 2006</i>	5,54±0,07 ^b	0,70±0,06 ^b	14,39±0,55 ^b	6,93±0,26 ^b	27,56 ^b	47,85±1,65 ^b
<i>Sangiovese 2006</i>	3,22±0,08 ^c	1,25±0,05 ^c	9,38±0,23 ^c	4,14±0,17 ^c	17,99 ^c	36,57±1,78 ^c
<i>Syrah 2006</i>	7,44±0,11 ^d	6,88±0,13 ^d	10,30±0,41 ^{a,d}	13,29±0,43 ^d	37,90 ^d	46,74±1,32 ^b
<i>Cabernet Franc 2007</i>	3,80±0,08 ^a	2,04±0,04 ^e	12,23±0,37 ^e	7,95±0,30 ^e	26,02 ^b	35,41±0,97 ^c
<i>Merlot 2007</i>	7,36±0,11 ^d	3,71±0,08 ^f	23,17±0,67 ^f	18,58±0,78 ^f	52,81 ^e	44,13±0,79 ^a
<i>Sangiovese 2007</i>	2,10±0,06 ^e	1,23±0,03 ^c	5,73±0,21 ^g	3,69±0,21 ^c	12,74 ^f	23,40±1,02 ^d
<i>Syrah 2007</i>	4,60±0,05 ^f	2,52±0,07 ^g	9,53±0,39 ^{c,d}	6,50±0,22 ^b	23,15 ^a	26,42±1,42 ^d

Valores expressos em unidades de mg L⁻¹ ± desvio padrão de 3 repetições. Letras diferentes em uma mesma coluna são diferentes significativamente (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Realizou-se ANOVA (*two-way*) considerando os fatores: variedade e safra, e essa análise revelou que esses dois fatores influenciaram significativamente o conteúdo de tirosol nas amostras ($p < 0,05$). Em relação ao fator safra, as diferenças verificadas no conteúdo de tirosol podem ter ocorrido devido às diferenças nas condições climáticas observadas entre as duas safras avaliadas (Capítulo 2). Como o tirosol é um composto produzido partir da tirosina pelas leveduras durante a fermentação do mosto, teoricamente não é susceptível às diferenças climáticas a que são submetidas às uvas durante a maturação. Porém, como os parâmetros climáticos influenciam fortemente a composição da uva (Cantos et al., 2000; Spayd et al., 2002), e, conseqüentemente, seu conteúdo de aminoácidos, indiretamente o conteúdo de tirosol pode ser influenciado pelos parâmetros climáticos. Outra hipótese que também pode justificar a diferença de conteúdo de tirosol entre as duas safras é a sua evolução durante o armazenamento em garrafas, uma vez que os compostos fenólicos são altamente reativos e susceptíveis à várias reações (Ribéreau-Gayon et al., 1998), embora pouco é conhecido sobre a evolução do tirosol durante o tempo de guarda de vinhos. Outro fator que influencia significativamente o conteúdo de tirosol em vinhos é a técnica de vinificação (Boselli et al., 2006; Monagas et al., 2007), porém, como em nosso estudo não houve diferença entre as técnicas de vinificação empregadas para a elaboração dos vinhos, esse fator não justifica as diferenças verificadas entre as safras. Em relação ao fator variedade, outros estudos também verificaram a influência desse fator sobre o conteúdo de tirosol (Boselli et al., 2006), o que demonstra a influência do fator genético na produção de tirosol em vinhos. Isso é esperado pois se verificam diferenças significativas no conteúdo de tirosina, aminoácido precursor do tirosol, entre diferentes variedades de uvas (Kliewer, 1969).

Considerando os significativos conteúdos de estilbenos e tirosol quantificados nas amostras de vinhos deste estudo, esses compostos foram utilizados como alvo na avaliação das atividades antioxidante e hipolipemiante *in vivo* em camundongos submetidos à uma dieta hipercolesterolêmica e concomitantemente ao consumo crônico desses vinhos.

3.2 Atividade antioxidante

A influência da dieta hipercolesterolêmica sobre os marcadores do estresse oxidativo é apresentada na Figura 5.1, onde se observa que,

de modo geral, a dieta influenciou negativamente os níveis dos marcadores do estresse oxidativo nos grupos controle ($p < 0,05$) quando comparados à dieta normal. Wissler (1992) afirma que uma dieta rica em colesterol parece induzir a formação de radicais livres, seguida pelo desencadeamento da hipercolesterolemia. Pode-se observar na Figura 5.1 um aumento significativo dos níveis de peroxidação lipídica nos animais tratados com a dieta hipercolesterolêmica, tanto nos animais tratados com água (DHA= 22 %) quanto nos animais tratados com etanol (DHE= 33 %); o mesmo verificou-se para os níveis de carbonilação de proteínas (DHA= 28 %; DHE= 15 %). A dieta hipercolesterolêmica promoveu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da atividade antioxidante total do plasma (FRAP) apenas no grupo tratado com etanol (DHE= 12 %). A mesma tendência foi observada na atividade das enzimas antioxidantes SOD (DHE= 35 %) e CAT (DHE= 33 %).

A influência do consumo de etanol pode ser verificada na Figura 5.1. Observou-se que o etanol não influenciou significativamente os níveis de GSH, de peroxidação lipídica e de carbonilação de proteínas nos grupos controle ($p < 0,05$). Os níveis de FRAP aumentaram significativamente com o consumo de etanol apenas nos grupos tratados com a dieta normal (20 %). A atividade das enzimas também foi influenciada pelo consumo de etanol ($p < 0,05$), mas de forma distinta. O consumo de etanol promoveu uma diminuição da atividade da SOD (18 %) apenas no grupo tratado com a dieta normal, e promoveu um aumento da atividade da CAT (22 %) apenas no grupo submetido à dieta hipercolesterolêmica.

O efeito do consumo de vinhos sobre os parâmetros avaliados da atividade antioxidante *in vivo* nos grupos teste submetidos à dieta hipercolesterolêmica pode ser observado na Figura 5.1. Verificou-se que, de forma geral, o consumo de vinhos influenciou de forma positiva os marcadores de estresse oxidativo. ANOVA (*two-way*) revelou que os dois fatores, safra e variedade, de modo geral, não influenciaram significativamente os valores dos parâmetros avaliados ($p < 0,05$).

Um aumento significativo nos níveis de FRAP foi verificado em todos os grupos teste, demonstrando que o consumo de vinhos promoveu um aumento na atividade antioxidante total do plasma, que variou de 46 a 83 % em relação ao grupo DHE, sendo que o maior aumento foi promovido pelo consumo do vinho Merlot 2007. Verificou-se também que os níveis de peroxidação lipídica foram significativamente diminuídos pelo consumo dos vinhos ($p < 0,05$)

quando comparados ao grupo DHE. Essa diminuição variou de 30 % (Sangiovese 2006) a 47 % (Syrah 2006). O consumo de vinhos também diminuiu significativamente ($p < 0,05$) o índice de carbonilação protéica, e essa diminuição variou entre 33 e 42 %, diminuições promovidas pelo consumo dos vinhos Sangiovese 2006 e Syrah 2006, respectivamente. Esses resultados demonstraram que o consumo de vinhos por animais submetidos à uma dieta hipercolesterolêmica, e conseqüentemente ao estresse, é capaz de minimizar os níveis de estresse oxidativo nos animais. Verificou-se ainda que os níveis de GSH não foram afetados pelo consumo de vinhos.

Observou-se que o consumo dos vinhos promoveu significativa diminuição na atividade das enzimas SOD e CAT quando comparados ao grupo DHE ($p < 0,05$). A enzima SOD teve sua atividade diminuída em média 28 %; as maiores diminuições foram verificadas nos grupos tratados com os vinhos Merlot 2007 (41 %) e Syrah 2006 (34 %). A atividade da CAT diminuiu em média 36 %, destacando-se a diminuição promovida pelo consumo dos vinhos Cabernet Franc (50 %) e Syrah 2006 (42 %). A diminuição da atividade dessas enzimas é devido, provavelmente, à supressão da formação de ROS, promovida pelo consumo de vinhos, o que leva à diminuição da atividade dessas enzimas, como verificado por outros autores (Nielsen et al., 1999).

Os efeitos benéficos do consumo de vinhos verificados em nosso estudo estão de acordo com outras pesquisas (Orellana et al., 2002; Rodrigo et al., 2005), e ocorrem principalmente, devido à alta capacidade que os compostos fenólicos presentes nos vinhos possuem de atuar contra os radicais livres no organismo (Renaud e De Lorgeril, 1992), embora esse compostos também possam agir através de outros mecanismos de ação. Dentre esses compostos, os estilbenos e o tirosol se destacam como potentes agentes antioxidantes, hipolipemiantes e cardioprotetores (Frankel et al., 1993; Murcia e Martínez-Tomé, 2001; Covas et al., 2003; Dudley et al., 2009; Queiroz et al., 2009). Assim, o conteúdo dos principais estilbenos monômeros e do tirosol quantificados nos vinhos em estudo foi correlacionado com os resultados das atividades *in vivo*.

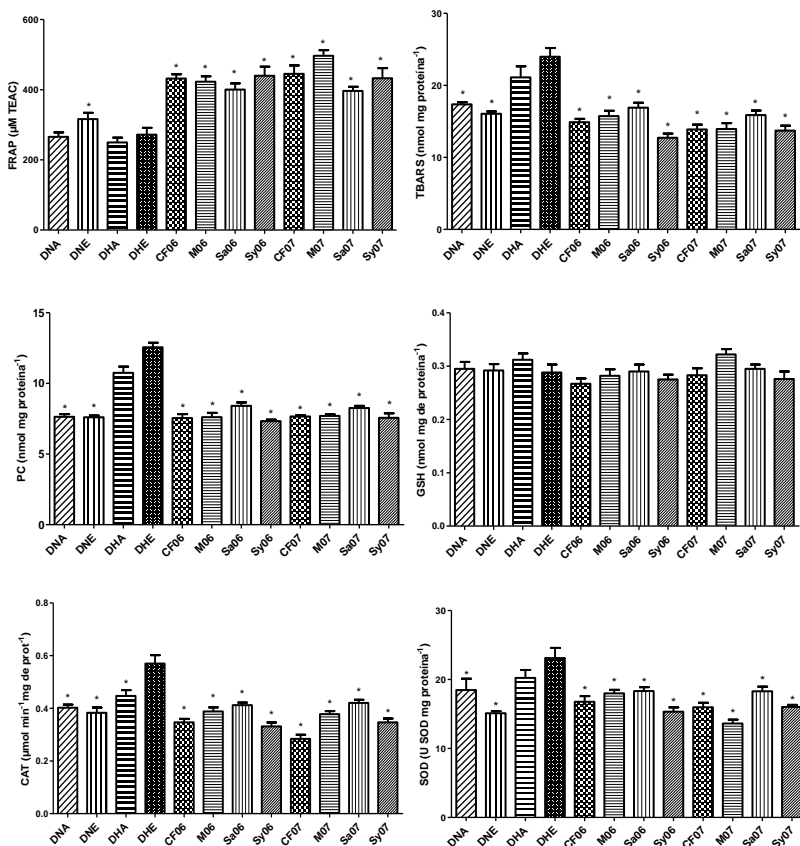


Figura 5.1. Valores da capacidade antioxidante total do plasma (FRAP, TEAC μM); índice de peroxidação lipídica (TBARS; $\text{nmol mg proteína}^{-1}$), índice de carbonilação de proteínas (PC, $\text{nmol mg proteína}^{-1}$), concentração de GSH hepática ($\text{mmol mg proteína}^{-1}$) e atividade das enzimas catalase (CAT; $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg de proteína}^{-1}$) e superóxido desmutase (SOD; $\text{U SOD mg proteína}^{-1}$) em fígados de camundongos. DNA= grupo controle dieta normal – água; DNE= grupo controle dieta normal – etanol; DHA= grupo controle dieta hipercolesterolêmica- água; DHE= grupo controle dieta hipercolesterolêmica - etanol; CF06= grupo teste tratado com vinho Cabernet Franc 2006; M06= grupo teste tratado com vinho Merlot 2006; Sa06= grupo teste tratado com vinho Sangiovese 2006; Sy06= grupo teste tratado com vinho Syrah 2006; CF07= grupo teste tratado com vinho Cabernet Franc 2007; M07= grupo teste tratado com vinho Merlot 2007; Sa07= grupo teste tratado com vinho Sangiovese 2007; Sy07= grupo teste tratado com vinho Syrah 2007. Todos os grupos teste forma tratados com a dieta hipercolesterolêmica. * diferem significativamente do grupo DHE (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Pode-se verificar na Tabela 5.2 que, de maneira geral, o conteúdo de estilbenos quantificados foram significativamente correlacionados com a atividade antioxidante *in vivo* verificada pelo consumo de vinhos nos grupos teste. Alta correlação foi verificada entre o aumento do FRAP e os valores de estilbenos totais ($R= 0,82$), *cis* ($R= 0,81$) e *trans*-piceid ($R= 0,79$) e também com o tirosol ($R= 0,51$). Os níveis do índice de peroxidação lipídica foram inversamente correlacionados com os valores dos principais estilbenos quantificados nesse estudo, destacando-se a alta correlação com o *cis*-resveratrol ($R= -0,74$). O índice de carbonilação de proteínas foi inversamente correlacionado com os valores de *trans*-resveratrol ($R= -0,56$) e do total de estilbenos ($R= -0,48$). Correlação inversa também foi verificada entre a atividade da enzima SOD e os valores de estilbenos totais ($R= -0,84$), *cis* ($R= -0,87$) e *trans*-piceid ($R= -0,68$), *cis* ($R= -0,66$) e *trans*-resveratrol ($R= 0,72$) e tirosol ($R= -0,53$) quantificados.

Tabela 5.2. Coeficientes de correlação da análise de correlação linear entre o conteúdo de estilbenos e tirosol e os marcadores do estresse oxidativo e os níveis lipídicos.

	<i>Trans-resveratrol</i>	<i>Cis-resveratrol</i>	<i>Trans-piceid</i>	<i>Cis-piceid</i>	<i>Estilbenos totais</i>	<i>Tirosol</i>
<i>Estresse oxidativo</i>						
FRAP	0,66*	0,42	0,79*	0,81*	0,82*	0,51*
TBARS	-0,60*	-0,74*	-0,25	-0,60*	-0,56*	-0,32
PC	-0,56*	-0,46	-0,26	-0,41	-0,48*	-0,29
SOD	-0,72*	-0,66*	-0,68*	-0,87*	-0,84*	-0,53*
CAT	-0,25	-0,38	-0,09	-0,24	-0,23	0,0
<i>Níveis lipídicos</i>						
CT	-0,67*	-0,58*	-0,66*	-0,80*	-0,79*	-0,52*
HDL	0,64*	0,44	0,58*	0,67*	0,68*	0,11
LDL	-0,79*	-0,62*	-0,76*	-0,89*	-0,89*	-0,49*
Triglicérides	-0,55*	-0,44	-0,67*	-0,76*	-0,74*	-0,22
CT/HDL	-0,75*	-0,54*	-0,69*	-0,80*	-0,81*	-0,30

* Correlação significativa ($p < 0,05$). CT - Colesterol Total

Nossos resultados estão de acordo com outras pesquisas que demonstraram o efeito protetor do resveratrol e do tirosol. Olas e Wachowicz (2005) verificaram que o resveratrol reduziu a peroxidação lipídica, a oxidação e a nitração de plaquetas e proteínas plasmáticas. Cao et al. (2005) verificaram que a atividade antioxidante do resveratrol pode diminuir o estresse oxidativo e os danos à biomoléculas celulares, como lipídios, proteínas e DNA induzidos por compostos de platina. Além disso, investigações têm indicado que o resveratrol pode reduzir o

estresse oxidativo em uma linha celular humana RPE (King et al., 2005) e proteger as lipoproteínas durante o dano oxidativo (Miura et al., 2003; Vitrac et al., 2005).

Apesar de alguns estudos afirmarem que o tirosol é um importante agente antioxidante (Bertelli et al., 2002; Covas et al., 2003), efetivo contra espécies reativas como NOO^- e O_2^- , quando comparado com outros fenóis com a substituições *orto*-dihidroxi como por exemplo o hidroxitirosol, a sua atividade antioxidante *in vitro* é bastante reduzida, provavelmente devido a sua baixa capacidade de captura de radicais livres (Di Benedetto et al., 2007). Entretanto, estudos revelam que esse composto possui significativa atividade antioxidante *in vivo*, pois exerce um forte efeito protetor contra danos oxidativos em vários sistemas celulares (Dudley et al., 2008). Di Benedetto et al. (2007) verificaram que o tirosol foi capaz de reduzir a oxidação de LDL (TBARS) induzida em cultura celular (J774 A) e também promoveu proteção contra o estresse oxidativo. Além disso, evidências mostram que o tirosol possui capacidade de modular os níveis de LDL em humanos (Covas et al., 2006).

Estudos sobre a absorção pelo organismo e biodisponibilidade de diferentes estilbenos e de tirosol ainda são necessários para um melhor entendimento da forma de ação desses compostos. Alguns estudos com o *trans*-resveratrol revelam que esse composto é bem absorvido por via oral, amplamente distribuído no corpo, é metabolizado nas formas sulfatada e glucuronada (Saiko et al., 2008, Williams et al., 2009), e é detectado na corrente sanguínea em média, aproximadamente 15 minutos depois de sua ingestão. Após o consumo moderado de vinho, os níveis séricos de *trans*-resveratrol são detectados em concentrações bastante baixas. Em contrapartida, seus metabólitos, que podem ser os princípios ativos, são detectados em elevadas concentrações e circulam no sangue por até 9 horas (Saiko et al., 2008). A conversão dos principais metabólitos, dihidro-resveratrol e di-piceatanol, é provavelmente mediada pela fermentação microbiana do *trans*-resveratrol no trato gastrointestinal, através da conjugação sistêmica e/ou pré-sistêmica com o ácido glucurônico e/ou sulfato, que ocorre no intestino e fígado (Williams et al., 2009). Covas et al.(2003) verificaram a biodisponibilidade de tirosol em humanos após a ingestão de azeite de oliva e verificaram que o tirosol é absorvido de forma dose-dependente, é excretado pela urina, alcançando uma máxima excreção no intervalo de 0 a 4 horas.

3.3 Atividade hipolipemiante

A influência do consumo das amostras de vinhos tintos, ricos em estilbenos e tirosol, sobre os níveis lipídicos foi avaliada em camundongos submetidos à dieta hipercolesterolêmica. O metabolismo de lipoproteínas em camundongos é comparável ao dos seres humanos devido à semelhança dos componentes metabólicos e dos mecanismos de metabolismo das lipoproteínas e dos ácidos biliares. Assim, os camundongos são considerados um modelo ideal, entre os pequenos animais, para o estudo do metabolismo lipídico e de lipoproteínas (Guo et al., 2001).

Os camundongos *knockout* para a proteína receptora de LDL colesterol são obtidos a partir de recombinação homóloga de células tronco embrionárias (*stem cells*) para produção de camundongos com perda funcional dos genes que codificam a proteína receptora de LDL. As partículas de VLDL e LDL, normalmente, competem por receptores hepáticos comuns, denominados receptores de LDL ou B/E, os quais reconhecem as apolipoproteínas B e E (apoB e apoE), presentes nestas lipoproteínas (Catanozi et al, 2003). Esses camundongos não possuem estes receptores de LDL de alta afinidade, porém, apresentam os receptores de LDL de baixa afinidade. Desta forma, o prejuízo na taxa de remoção de VLDL, por meio dos receptores B/E, resulta em aumento de competição na taxa de captação com as partículas de LDL nos receptores de baixa afinidade (Ishibashi et al, 1994; Catanozi et al, 2003). Consequentemente, ambos os tipos de partículas (VLDL e LDL) podem apresentar suas concentrações plasmáticas simultaneamente aumentadas, e quando submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica eles tornam-se severamente hipercolesterolêmicos (Catanozi et al, 2003; Ishibashi et al, 1994).

A hiperlipidemia, promovida pela dieta hipercolesterolêmica, foi verificada nos grupos controle tratados com água (DHA) e com etanol (DHE) (Tabela 5.3), e foi caracterizada pelo aumento dos níveis de colesterol total, que variou de 53 a 78 %, (hipercolesterolemia) e de triglicérides, que variou de 45 a 81 %, (hipertrigliceridemia) (Irikura et al., 1985; Kawasaki et al., 1995, 1998; Komatsu et al., 1998). Além disso, a hipercolesterolemia mostrou-se com um alto perfil aterogênico sobre as lipoproteínas, isto é, um notável aumento da fração VLDL + LDL colesterol e uma significativa diminuição nos níveis de HDL (Irikura et al., 1985).

O efeito do consumo de etanol nos animais submetidos à dieta hipercolesterolêmica ou à dieta normal é apresentado na Tabela 5.3. Observou-se que no grupo controle tratado com dieta normal (DNE) o consumo de etanol não alterou significativamente os níveis de colesterol HDL e o índice aterogênico (CT/HDL), entretanto promoveu um aumento nos níveis de colesterol LDL (53 %), de colesterol total (14 %) e de triglicerídeos (9 %) quando comparados ao grupo controle tratado com dieta normal e água (DNA) ($p < 0,05$). Nos grupos controle tratados com a dieta hipercolesterolêmica (DH) verificou-se que o consumo de etanol promoveu significativo aumento nos níveis de HDL (15 %), embora também tenha promovido um aumento nos níveis de LDL colesterol (40 %), colesterol total (35 %) e triglicerídeos (13 %) ($p < 0,05$). Esse aumento nos níveis lipídicos promovido pelo consumo de etanol pode ser atribuído, em parte, ao seu efeito pró-oxidante (van Golde et al., 1999), embora algumas pesquisas afirmem que o consumo crônico de etanol em pequenas concentrações pode promover uma diminuição nos níveis lipídicos (Groenbaek et al., 1995), além de ser verificada uma relação inversa entre o consumo moderado de álcool e a mortalidade por doenças coronárias (Renaud e Lorgeril, 1992). Van Golde et al. (1999) afirmaram que devido ao potencial pró-oxidante do álcool o equilíbrio entre o álcool e os polifenóis em vinhos pode ser um fator crítico para seus efeitos *in vivo* sobre a oxidação do colesterol LDL.

O efeito do consumo crônico de vinho sobre os níveis lipídicos são apresentados na Tabela 5.3. Os resultados foram comparados e discutidos em relação ao grupo controle tratado com a dieta hipercolesterolêmica e etanol (DHE), uma vez que os grupos testes também foram submetidos à dieta hipercolesterolêmica.

Verificou-se que o consumo de vinho foi capaz de reduzir significativamente a hipercolesterolemia e a hipertrigliceridemia promovidas pela dieta hipercolesterolêmica, além de diminuir o índice aterogênico ($p < 0,05$). Observou-se nos grupos teste que o consumo de vinho promoveu uma diminuição, em relação ao DHE, nos níveis de colesterol LDL (32 a 51 %), de colesterol total (32 a 40 %), de triglicerídeos (37 a 51 %), do índice aterogênico (42 a 59 %), além de promover significativo aumento nos níveis de HDL (22 a 66 %). Resultados similares foram verificados por outros autores após o consumo de vinhos tintos (Auger et al., 2002; Estruch, 2000; Montilla et al., 2006).

Tabela 5.3. Valores de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL, triglicerídeos e índice aterogênico (CT/HDL) do soro de camundongos tratados com as amostras de vinhos.

Tratamentos	Colesterol HDL	Colesterol LDL	Colesterol VLDL	Colesterol Total	Triglicerídeos	CT/HDL
DNA	82,5 ±4,0*	102,3±3,4*	20,4±1,0*	223,5±10,8*	102,3±3,2*	2,7*
DNE	83,8±2,1*	157,4±4,1*	18,6±0,7*	259,7±10,6*	93,2±2,1*	3,1*
DHA	49,5±2,1*	263,4±4,7*	29,7±0,8	342,3±11,4*	148,4±3,7*	6,9
DHE	58,2±2,2	370,2±6,1	33,8±1,2	462,7±12,1	169,0±3,2	7,9
CF06	75,2±2,9*	218,4±8,2*	20,7±0,9*	314,2±12,9*	103,4±2,5*	4,1*
M06	77,6±1,9*	209,8±5,4*	20,2±0,9*	307,3±8,6*	102,3±3,8*	3,9*
Sa06	70,9±3,1*	221,0±6,1*	21,1±1,2*	312,3±7,5*	105,6±4,1*	4,4*
Sy06	82,6±3,3*	186,2±3,4*	18,9±0,6*	287,6±6,2*	94,3±4,2*	3,5*
CF07	78,8±3,1*	184,1±6,2*	16,7±0,7*	279,6±5,8*	83,7±2,1*	3,5*
M07	96,1±2,4*	165,9±3,5*	16,5±0,3*	280,9±8,9*	82,8±2,2*	2,9*
Sa07	70,7±3,1*	231,2±5,2*	20,9±0,9*	322,3±12,2*	104,2±2,4*	4,5*
Sy07	96,9±2,6*	197,6±7,1*	18,9±0,8*	312,3±8,7*	94,7±2,4*	3,2*

* diferem significativamente do grupo controle DHE (Teste de Tukey, $p < 0,05$). Valores expressos em $\text{mg L}^{-1} \pm$ desvio padrão. DNA= grupo controle dieta normal tratado com água; DNE= grupo controle dieta normal tratado com etanol 12 %; DHA= grupo controle dieta hipercolesterolêmica tratado com água; DHE= grupo controle dieta hipercolesterolêmica tratado com etanol 12 %; CF06= grupo teste tratado com vinho Cabernet Franc 2006; M06= grupo teste tratado com vinho Merlot 2006; Sa06= grupo teste tratado com vinho Sangiovese 2006; Sy06= grupo teste tratado com vinho Syrah 2006; CF07= grupo teste tratado com vinho Cabernet Franc 2007; M07= grupo teste tratado com vinho Merlot 2007; Sa07= grupo teste tratado com vinho Sangiovese 2007; Sy07= grupo teste tratado com vinho Syrah 2007.

Verificou-se interação entre os fatores safra e variedade em relação aos níveis lipídicos observados ($p < 0,05$, ANOVA *two-way*). Pode-se observar na Tabela 5.3 que os vinhos provenientes da safra 2007 promoveram, de modo geral, um maior aumento dos níveis de HDL que os vinhos da safra anterior, sendo que as maiores aumentos foram promovidos pelos vinhos Merlot (65 %) e Syrah (66 %), safra 2007. As diminuições dos níveis de colesterol LDL foram mais relevantes nos grupos tratados com os vinhos Merlot 2007 (51 %), Cabernet Franc 2007 (46 %) e Syrah 2006 (45 %). Nos grupos tratados com os vinhos Cabernet Franc e Merlot, ambos provenientes da safra 2007, foram observadas as maiores diminuições tanto nos níveis de colesterol total (39 %) como de triglicerídeos (51 %). Esses resultados são importantes uma vez que a hipercolesterolemia é um maior fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose e está relacionada com doenças vasculares oclusivas (Wissler, 1992); assim, a capacidade de compostos fenólicos de vinhos em inibir a oxidação do colesterol LDL é sugerida como um possível mecanismo que explica o “Paradoxo francês” (Frankel et al., 1993; Kinsella et al., 1993).

A correlação entre os valores de estilbenos e tirosol quantificados nas amostras de vinhos e os níveis lipídicos foi verificada ($p < 0,05$) e é apresentada na Tabela 5.2. Verificou-se que o aumento dos níveis de colesterol HDL observado nos grupos teste foram positivamente correlacionados com os níveis dos isômeros *trans* (resveratrol e piceid), com o *cis*-piceid ($R = 0,67$), como também com o total de estilbenos ($R = 0,68$). Os níveis de colesterol LDL foram negativamente correlacionados com os valores de tirosol ($R = -0,49$) e dos estilbenos quantificados, destacando-se a correlação com os valores totais de estilbenos e *cis*-piceid ($R = -0,89$), como também com os isômeros *trans* (resveratrol e piceid).

Uma correlação negativa entre o conteúdo de estilbenos e os níveis de colesterol total foi verificada nesse estudo, destacando-se as correlações com os conteúdos de estilbenos totais ($R = -0,79$) e *cis*-piceid ($R = -0,80$); o mesmo foi verificado pra os níveis de triglicerídeos, sendo que os conteúdos de colesterol total ($R = -0,74$), *cis* ($R = -0,76$) e *trans* ($R = -0,67$) piceid foram os mais fortemente correlacionados com a diminuição da hipertrigliceridemia. O conteúdo de tirosol também foi correlacionado negativamente ($R = -0,52$) com a diminuição dos níveis de colesterol total nos grupos teste. O índice aterogênico foi negativamente correlacionado com os valores dos etilbenos quantificados nesse estudo, verificando-se altos índices de correlação

entre o conteúdo de estilbenos totais ($R = -0,81$), *cis*-piceid ($R = -0,80$) e *trans*-resveratrol ($R = -0,75$). Cabe destacar a importante correlação encontrada entre a diminuição dos níveis lipídicos e o conteúdo dos isômeros *cis*, que são reportados por algumas pesquisas possuírem menor atividade biológica que seus isômeros *trans* (Ribeiro de Lima et al., 1999; Varache-Lembège et al., 2000; Vitrac et al., 2002).

A capacidade de vinhos tintos em diminuir os níveis lipídicos, a aterosclerose e também o risco de doenças cardiovasculares pode ser decorrente das propriedades antioxidantes do resveratrol e de seus metabólitos, como sugerido por outros pesquisadores (Frankel et al., 1993; Miura et al., 2003; Cho et al., 2008). Mais recentemente estudos afirmam que fenóis como o tirosol possuem relevante ação antioxidante, antiaterosclerótica e cardioprotetora (Dudley et al., 2008; Covas et al., 2006) contribuindo assim para esses efeitos benéficos promovidos pelo consumo de vinhos. Em nosso estudo, nós verificamos, de modo geral, uma correlação positiva entre a diminuição dos níveis lipídicos promovida pelo consumo de vinhos pelos animais e os estilbenos e o tirosol quantificados nas amostras de vinhos, o que vem de encontro com as pesquisas citadas acima. Mas a forma como esses compostos agem no organismo ainda é alvo de muitos estudos. O mecanismo pelo qual o resveratrol reduz os níveis séricos de triglicerídeos e colesterol é ainda desconhecido. Uma das hipóteses é que o mecanismo fisiológico está baseado na inibição da oxidação do LDL promovida por substâncias fenólicas (Frankel et al., 1993). Berrouguia et al. (2009) observaram que o resveratrol inibiu a oxidação do LDL e HDL induzida pela irradiação, e esses autores afirmam que esse efeito pode estar relacionado com a preservação das propriedades físico-químicas do HDL e com a integridade de moléculas de proteína, como apoA-1 e PON1. Miura et al. (2003) sugerem que a ação hipocolesterolêmica do resveratrol é atribuída, pelo menos em parte, ao aumento da excreção de esteróis neutros e ácidos biliares. Cho et al. (2008) sugerem que o resveratrol indiretamente afeta o processo intravascular de lipoproteínas pela redução de transferência de éster de colesterol das HDL para as VLDL. Além disso, esses autores sugerem que os efeitos do resveratrol podem ser mediados através da diminuição da atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGR) e pela baixa regulação da expressão do HMGR mRNA, mecanismo esse similar ao da atorvastatina (Endo, 1992). Segundo Saiko et al. (2008) evidências revelam que o resveratrol interage com diferentes proteínas, incluindo ciclooxigenases, ribonucleotídeo redutases e DNA polimerases. Assim,

a sua atividade não pode ser resumida em a um único mecanismo de ação, sendo provavelmente resultado de várias ações complementares de diferentes vias bioquímicas.

Assim como a maioria dos compostos fenólicos, o mecanismo de ação do tirosol na modulação dos níveis lipídicos e seu efeito cardioprotetor ainda são desconhecidos. Pesquisas afirmam que o tirosol provavelmente age de diversas formas no organismo, e uma das hipóteses de sua ação é a sua comprovada capacidade antioxidante *in vivo* (Dudley et al., 2008). Embora sua estrutura não seja de um potente agente antioxidante (Di Benedetto et al., 2007), a sua ação no organismo pode ser não devido a sua estrutura, mas ao seu acúmulo intracelular, como sugerem Di Benedetto et al. (2007). Além disso, Masella et al. (2004) afirmam que biofenóis como o tirosol podem oferecer uma proteção indireta contra o estresse oxidativo por ativação de sistemas de defesas endógenos, em particular pela preservação do conteúdo de GSH intracelular.

4 CONCLUSÃO

Os resultados das análises dos estilbenos monômeros e tirosol em vinhos de quatro diferentes variedades, de duas safras consecutivas, provenientes da região de São Joaquim, revelaram o potencial dessa região do Brasil em produzir vinhos com significativos conteúdos de desses compostos, destacando-se o vinho da variedade Merlot. O consumo desses vinhos por animais submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica foi capaz de aumentar dos níveis de FRAP, diminuir os níveis de TBARS e de PC, além de diminuir a atividade das enzimas SOD e CAT. Verificou-se também que o consumo desses vinhos reduziu significativamente a hipercolesterolemia e a hipertrigliceridemia, como também diminuiu o índice aterogênico e aumentou significativamente os valores de colesterol HDL nos animais ($p < 0,05$). Alta correlação foi verificada entre os marcadores da atividade antioxidante *in vivo* e os níveis de lipídeos com o conteúdo dos estilbenos e do tirosol, destacando-se as significativas correlações com os valores de estilbenos totais e com os isômeros *cis*, demonstrando uma importante atividade biológica desses compostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIAN, M.; JEANDET, P.; BREUIL, A. C.; LEVITE, D.; DEBORD, S.; BESSIS, R. Assay of resveratrol and derivative stilbenes in wines by Direct Injection High Performance Liquid Chromatography. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 51, p.37-41, 2000.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AKÇAY, Y.; YILDIRIM, H.; GÜVENÇ, U.; SÖZMEN, E. The effects of consumption of organic and nonorganic red wine on low-density lipoprotein oxidation and antioxidant capacity in humans. **Nutrition Research**, v. 24, p. 541-554, 2004.

AMERINE, M. A.; OUGH, C. S. **Análisis de vinos y mostos**. Zaragoza: Acribia, 1976. 158p.

AMORIM, D. A.; REGINA, M. A.; FÁVERO, A. C.; MOTA, R. V.; PEREIRA, G. E. Elaboração de vinho tinto. **Informe Agropecuário**, v. 27, p. 65-76, 2006.

ANASTASIADI, M.; ZIRA, A.; MAGIATIS, P.; HAROUTOUNIAN, S.A.; SKALTSOUNIS, A.L.; MIKROS, E. ¹H NMR-based metabonomics for the classification of greek wines according to variety, region and vintage. Comparison with HPLC data. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 11067–11074, 2009.

ANDERSON, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 548-555, 1985.

ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction**, Wiley: Huddersfield, 2003.

AUGER, C.; CAPORICCIO, B.; LANDRAULT, N.; TEISSEDE, P. L.; LAURENT, C.; CROS, G.; BESANÇON, P.; ROUANET, J-M. Red wine phenolic compounds reduce plasma lipids and apolipoprotein B and prevent early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 1207–13, 2002.

AVELLONE, G.; DI GARBO, V.; CAMPISI, D.; DE SIMONE, R.; RANELI, G.; SCAGLIONE, R.; LICATA, G. Effects of moderate Sicilian red wine consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 60, p. 41–47, 2006.

BAKKER, J., TIMBERLAKE, C. F. Isolation, identification and characterization of new colourstable anthocyanins occurring in some red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 35–43, 1997.

- BAPTISTA, J. A. B.; TAVARES, J. F. P.; CARVALHO, R. C. B. Comparison of polyphenols and aroma in red wines from Portuguese mainland versus Azores Islands. **Food Research International**, v. 34, p. 345–355, 2001.
- BAUTISTA-ORTÍN, A. B.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J.I.; LÓPEZ-ROCA, J. M.; GÓMEZ-PLAZA, E. The effects of enological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine colour and their dependence on grape characteristics. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 546–552, 2007.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70–76, 1996.
- BERROUGUI, H.; GRENIER, G.; LOUED, S.; DROUIN, G.; KHALIL, A. A new insight into resveratrol as an atheroprotective compound: Inhibition of lipid peroxidation and enhancement of cholesterol efflux. **Atherosclerosis**, v. 207, p. 420–427, 2009.
- BERTELLI, A. A. E.; GIOVANNINI, L.; GIANNESI, D.; MIGLIORI, M.; BERNINI, W.; FREGONI, M.; BERTELLI, A. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. **International Journal of Tissue Reactions**, v. 17, p. 1–3, 1995.
- BERTELLI, A. A. E.; MIGLIORI, M.; PANICHI, V.; LONGONI, B.; ORIGLIA, N.; FERRETTI, A.; CUTTANO, M.G.; GIOVANNINI, L. Oxidative stress and inflammatory reaction modulation by white wine. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 957, p. 295–301, 2002.
- BEVILAQUA, G. A. P. Avaliações físico-químicas durante a maturação de videiras cultivadas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 1, p. 151-156, 1995.
- BINDI M., F.; MIGLIETTA, B.; GOZZINI, S.; ORLANDINI, L.; SEGHI, A. Simple model for simulation of growth and development in grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Vitis**, v. 36, p. 67-61, 1996.
- BOGONI, M.; REINA, A.; VALENTI, L.; SCIENZA, A. Valutazione della variabilità intravarietale attraverso procedure di pressione selettiva debole. **Vignevini**, v.12, p. 25-30, 1993.
- BOSELLI, E.; MINARDI, M.; GIOMO, A.; FREGA, N.G. Phenolic composition and quality of white d.o.c. wines from Marche (Italy). **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 93-100, 2006.
- BORGOGNO, L.; TARETTO, E.; BOLOGNA, P.; ARNULFO, C.; MORANDO, A. La maturazione dell’uva. **Vignevini Bologna**, v. 3, p. 59-65, 1984.
-

BOULTON, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 52, p. 67-87, 2001.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. **Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species**. In: CLERCK, L.; MASSARO, D. Oxygen, Gene Expression, and Cellular. Marcel Dekker: New York, v. 105, 199, p. 1-25.

BRAND-MILLER, J.C.; FATIMA, K.; MIDDLEMISS, C.; BARE, M.; LIU, V.; ATKINSON, F.; PETOCZ, P. Effect of alcoholic beverages on postprandial glycemia and insulinemia in lean, young, healthy adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.85, p.1545-1551, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**,v. 28, p. 25-30, 1995.

BRIGHENTI, E.; TONIETTO, J. O clima de São Joaquim para a viticultura de vinhos finos: classificação pelo sistema CCM geovitícola. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 8, 2004, Florianópolis. **Anais eletrônicos**. Florianópolis.

BROADHURST R.B.; JONES W.T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 29, p. 788-794, 1978.

BU, Y.; RHO, S.; KIM, J.; KIM, M. K.; LEE, D. H.; SUN YEOU KIM, S. Y.; CHOI, H.; KIM, H. Neuroprotective effect of tyrosol on transient focal cerebral ischemia in rats. **Neuroscience Letters**, v. 414, p. 218-221, 2007.

BURNS, J.; GARDNER, P.; O'NEIL, J.; CRAWFORD, S.; MORECROFT, I.; MCPHAIL, D.; LISTER, C.; MATTHEWS, D.; MACLEAN, M. R.; LEAN, M. E.; DUTHIE, G. G.; CROZIER, A. Relationship among antioxidant activity, vasodilatation capacity and phenolic content of red wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 220-230, 2000.

BUSCH, K. W.; BUSCH, M. A. **Multielement Detection Systems for Spectrochemical Analysis**, John Wiley: New York, 1990, p. 170-176.

CALÒ, A.; TOMASI, D.; DI STEFANO. R. Relationship between environmental factors and the dynamics of growth and composition of the grapevine. Proceedings of the Workshop Strategies to Optimize Wine Grape Quality. **Acta Horticulture**, 217-231, 1996.

CANTOS, E.; GARCÍA-VIGUERA, C.; DE PASCUAL-TERESA, S.; TOMÁS-BARBERÁ, F.A. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on

resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 4606–4612, 2000.

CAO, Y.; WANG, F.; LIU, H. Y.; FU, Z. D.; HAN, R. Resveratrol induces apoptosis and differentiation in acute promyelocytic leukemia (NB4) cells. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 7, p. 633–641, 2005.

CARTONI, G. P.; COCCIOLI, F.; PONTELLI, L. Separation and identification of free phenolic acids in wines by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 537, p. 93–99, 1991.

CARTRON, E.; FOURET, G.; CARBONNEAU, M. A.; LAURET, C.; MICHEL, F.; MONNIER, L.; DESCOMP, B.; LÉGER, C. L. Red-wine beneficial long term effect on lipids but not on antioxidant characteristics in plasma in a study comparing three types of wine. Description of two O-methylated derivatives of gallic acid in humans. **Free Radical Research**, v. 37, p. 1021–35, 2003.

CASTIA, T.; FRANCO, M. A.; MATTIVI, F.; MUGGIOLU, G.; SFERLAZZO, G.; VERSINI, G. Characterization of grapes cultivated in Sardinia: chemometric methods applied to the anthocyanic fraction. **Sciences des Aliments**, v. 2, p. 239–255, 1992.

CATANOZI, S.; ROCHA, J. C.; PASSARELLI, M.; GUZZO, M. L.; ALVES, C.; FURUKAWA, L. N. S.; NUNES, V. S.; NAKANDAKARE, E. R.; HEIMANN, J. C.; QUINTÃO, E. C. R. Dietary sodium chloride restriction enhances aortic wall lipid storage and raises plasma lipid concentration in LDL receptor knockout mice. **Journal of Lipid Research**, v. 44, p. 727–732, 2003.

CATAPANO, A. L. Antioxidant effects of flavonoids. **Angiology**, v. 48, p. 39–41, 1997.

CHANG, Q.; ZUO, Z.; CHOW, M. S. S.; HO, W. K. K. Difference in absorption of the two structurally similar flavonoids glycosides, hyperoside and isoquercitrin, in rats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, p. 549–555, 2005.

CHEN, H.; TAPPEL, A. L. Protection of multiple antioxidants against heme protein oxidation and lipid peroxidation induced by CBrCl₃ in liver, lung, kidney, heart and spleen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 4, p. 854–858, 1996.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623–636, 2008.

CHIRA, K.; SCHMAUCH, G.; SAUCIER, C.; FABRE, S.; TEISSEDE, P.-L. Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from Bordeaux wine grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for two consecutive vintages (2006 and 2007). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 545-553, 2009.

CHO, I. J.; AHN, J. Y.; KIM, S.; CHOI, M. S.; HA, T. Y. Resveratrol attenuates the expression of HMG-CoA reductase mRNA in hamsters. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 367, p. 190-194, 2008.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC**. Edgard Blucher: São Paulo, 1998, 179p.

CIRICO, T. L.; OMAJE, S.T. Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 510-516, 2006.

CLIFFORD, A.; EBELER, S.; EBELER, J.; BILLS, N.; HINRICH, S.; TEISSEDE, P.; WATERHOUSE, A.L. Delayed tumour onset in transgenic mice fed an amino acid-based diet supplemented with red wine solids. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, p. 748-756, 1996.

COLNAGO, L. C.; ALMEIDA, F. C. L.; VALENTE, A. P.. Espectrometria de massa e RMN multidimensional e multinuclear: Revolução no estudo de macromoléculas biológicas. **Química Nova**, v. 16, p. 9-14, 2002.

COOMBE, B. G. The regulation of set and development of the grape berry. **Acta Horticulture**, v. 34, p. 261-273, 1973.

COOMBE, B.G.; DRY, P.R. **Viticulture**. Australian Industrial Publishers PTY LTD: Adelaide, Austrália, 1988.

COSME, F.; RICARDO DA SILVA, J. M.; LAUREANO, O. Effect of various proteins on different molecular weight proanthocyanidin fractions of red wine during wine fining. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 60, p. 74-81, 2009.

COVAS, M. I.; MIRÓ-CASAS, E.; FITÓ, M.; FARRÉ-ALBADALEJO, M.; GIMENO, E.; MARRUGAT, J.; DE LA TORRE, R. Bioavailability of tyrosol, an antioxidant phenolic compound present in wine and olive oil, in humans. **Drugs under Experimental and Clinical Research**, v. 29, p. 203-206, 2003.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

- DALLAS, C.; RICARDO DA SILVA, J. M.; LAUREANO, O. Degradation of oligomeric procyanidins and anthocyanins in a Tinta Roriz red wine during maturation, *Vitis*, v. 34, p. 51–56, 1995.
- DÉDREZ, S. **Biomarquage de tanins condensés et étude de leur biodisponibilité dans l'organisme humain**. Institut National Agronomique Paris-Grignon: Paris, 1999.
- DELL'AGLI, M.; GALLI, G.V.; VRHOVSEK, U.; MATTIVI, F.; BOSISIO, E. *In vitro* inhibition of human cGMP-specific phosphodiesterase-5 by polyphenols from red grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 1960-1965, 2005.
- DELMAS, D.; LANCON, A.; COLIN, D.; JANNIN, B.; LATRUFFE, N. Resveratrol as a chemopreventive agent: A promising molecule for fighting cancer. *Current Drug Targets*, v. 7, p. 423–442, 2006.
- DELOIRE, A.; KRAEVA, E.; DAÍ, G. H.; RENAULT, A. S.; ROCHARD, J.; CHATELAIN, C.; CARBONNEAU, A.; ANDARY, C. Les mécanismes de défense de la vigne. Des utilisations possibles pour lutter contre les pathogènes. *Phytoma*, v. 510, p.46-51, 1998.
- DEMROW, H. S.; SLANE, P. R.; FOLTS, J. D. Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation*, v. 91, p. 1182-1188, 1995.
- DI BENEDETTO, R.; VARÌA, R.; SCAZZOCCHIO, B.; FILESI, C.; SANTANGELO, C.; GIOVANNINI, C.; MATARRESE, P.; D'ARCHIVIO, M.; MASELLA, R. Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, v. 17 p. 535-545, 2007.
- DI STEFANO, R.; CRAVERO, M.C.; GUIDONI, S. The phenolics extraction from grape solids during fermentation. *Vini d'Italia*, v. 23, p. 15–22, 1990.
- DIEBOLT, M.; BUCHER, B.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. *Hypertension*, v. 38, 159-165, 2001.
- DIPLOCK, A.; AGGETT, P.; ASWELL, M.; BORNET, F.; FREN, E.; ROBERFROID, M. Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document. *British Food Journal*, v. 81, p. S1–S27, 1999.
- DOROSHOW, J. H.; AKMAN, S.; CHU, F. F.; ESWORTHY, S. Role of the glutathione-glutathione peroxidase cycle in the cytotoxicity of the anticancer quinones. *Pharmacology and Therapeutics*. v. 47, p. 359-370, 1990.
-

DRINKINE, J.; LOPES, P.; KENNEDY, J. A.; TEISSEDE, P. L.; SAUCIER, C. Ethylidene-bridged flavan-3-ols in red wine and correlation with wine age. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6292–6299, 2007.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physical Review**, v. 82, p. 47-95, 2002.

DUDLEY, J. I.; LEKLI, I.; MUKHERJEE, S.; DAS, M.; BERTELLI, A. A.; DAS, D. K. Does white wine qualify for French paradox? Comparison of the cardioprotective effects of red and white wines and their constituents: resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 9362-9373, 2008.

ENDO, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. **Journal of Lipid Research**, v. 33, p. 1569–1582, 1992.

ESTEBAN M.A.; VILLANUEVA, M. J.; LISSARRAGUE, J. R. Relationships between different berry components in Tempranillo (*Vitis vinifera* L) grapes from irrigated and non-irrigated vines during ripening. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p.1136-1146, 2002.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 11, p. 81-128, 1991.

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

FALCÃO, L. D. **Caracterização analítica e sensorial de vinhos Cabernet Sauvignon de diferentes altitudes**. 150f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

FALCÃO, L. D.; CHAVES, E. S.; BURIN, V. M.; FALCÃO, A. P.; GRIS, E. F.; BONIN V.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Maturity Cabernet Sauvignon berries from grapevines grown with two different training systems in a new grape growing region in Brazil. **Ciencia e Investigación Agraria**, v., 35, 321-332, 2008a.

FALCÃO, L. D.; DE REVEL, G.; PERELLO, M. C.; MOUTSIU, A.; ZANUS, M. C.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. A survey of seasonal temperatures and vineyard altitude influences on 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, C13-norisoprenoids and the sensory profile of Brazilian Cabernet Sauvignon wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 3605–36012, 2007.

- FALCÃO, L. D.; DE REVEL, G.; PERELLO, M. C.; RIQUIER, L.; ROSIER, J. P.; UBERTI, A.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Volatile profile characterization of young Cabernet Sauvignon wines from a new grape growing region in Brazil. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, v. 42, p. 133-144, 2008b.
- FALCÃO, L. D.; DE REVEL, G.; ROSIER, J. P.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Aroma impact components of Brazilian Cabernet Sauvignon wines using detection frequency analysis (GC-olfactometry). **Food Chemistry**, 107, 497-505, 2008c.
- FERNÁNDEZ, K.; KENNEDY, J. A.; AGOSIN, E. Characterization of *Vitis vinifera* L. cv. Carménère grape and wine proanthocyanidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 3675-3680, 2007.
- FLECHTNER-MORS, M.; BIESALSKI, H. K.; JENKINSON, C. P.; ADLER, G.; DITSCHUNEIT, H. Effects of moderate consumption of white wine on weight loss in overweight and obese subjects. **International Journal of Obesity**, v.28, p.1420-14206, 2004.
- FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 114-121, 1984.
- FRANCIA-ARICHA, F. M.; GUERRA, M. T.; RIVAS-GONZALO, I. C.; SANTOS-BUELGA, C. New anthocyanin pigments formed after condensation with flavonols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p. 2262-2266, 1997.
- FRANKEL, E. N.; KANNER, J.; GERMAN, J. B.; PARKS, E.; KINSELLA, J. E. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. **Lancet**, v. 341, p. 454-457, 1993a.
- FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; KINSELLA, J. E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. **Lancet**, v. 341, p. 1103-1104, 1993b.
- FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; TEISSEGRE, P. L. Principal phenolic phytochemicals 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.
- FREMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**, v. 66, p. 663-673, 2000.
- GALATI, G.; LIN, A.; SULTAN, A. M.; O'BRIEN, P. J. Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolics acids and catechins. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, p. 570-580, 2006.
-

GAMBELLI, L.; SANTARONI, G. P. Polyphenols content in some Italian red wines of different geographical origins. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, p. 613–618, 2004.

GATTO, P.; VRHOVSEK, U.; MUTH, J.; SEGALA, C.; ROMUALDI, C.; FONTANA, P.; PRUEFER, D.; STEFANINI, M.; MOSER, C.; MATTIVI, F.; VELASCO, R. Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11773-11785, 2008.

GENY, L.; SAUCIER, C.; BRACCO, S.; DAVIAUD, F.; GLORIES, Y. Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 8051–8054, 2003.

GIROUX, M.; DAVIGNON, J.; NARUSZEWICZ, M. Simvastatin inhibits the oxidation of low-density lipoproteins by activated human monocyte-derived macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1165, p. 335-338, 1993.

GOLDBERG, D. M.; HAHN, S. E.; PARKES, G. J. Beyond alcohol: beverage consumption and cardiovascular mortality. **Clinica Chimica Acta**, v. 237, p. 155–187, 1995a.

GOLDBERG, D. M.; YAN, J.; NG, E.; DIAMANDIS, E. P.; KARUMANCHIRI, A.; SOLEAS, G. J.; WATERHOUSE, A. L. A global survey of *trans*-resveratrol concentrations in commercial wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 46, p. 159–165, 1995b.

GOLDBERG, D.M.; KARUMANCHIRI, A.; NG, E.; YAN, J.; DIAMANDIS, E.P.; SOLEAS, G.J. Direct gas chromatographic-mass spectrometric method to assay *cis*-resveratrol in wines: preliminary survey of its concentration in commercial wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1245-1250, 1995c.

GÓMEZ-PLAZA, E.; GIL-MUNOZ, R.; LÓPEZ-ROCA, J. M.; MARTÍNEZ, A. Color and phenolic compounds of a young red wine. influence of wine-making techniques, storage temperature, and length of storage time. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 736-741, 2000.

GOODWIN, T. W.; MERCER, E. I. **Introduction to plant biochemistry**. 2º Ed. Oxford: Pergamon, 1983. 677p.

GRIFFITHS, L. A. Mammalian metabolism of flavonoids. In: HARBORNE J, MABRY T, Eds. **The Flavonoids; Advances in Research**. London: Chapman and Hall, 1982; v. 68, p. 1-71.

GRIS E.F.; BURIN, V.M.; FALCÃO, L.D.; BRIGHENTI, E.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Ripening of *Vitis vinifera* varieties in São Joaquim, a new wine growing region, southern Brazil. In: VII Congrès International des Terroirs Viticoles, Proceedings of VII Congrès International des Terroirs Viticoles, Agroscope Changins-Wadenswil, Nyon, **2008**. pp. 325-330.

GROENBAEK, M.; DELS, A.; SORENSEN, T.I.; BECKER, U.; SCHNOHR, P.; JENSEN, G. Mortality associated with moderate intakes of wine, beer or spirits. **British Medical Journal**, v. 310, p. 1165–1169, 1995.

GROOTVELD, M.; HALLIWELL, B. Aromatic hydroxylation as a potential measure of hydroxyl radical formation *in vivo*. **Biochemical Journal**, v. 237, p. 499-504; 1986.

GRUNDY, S.M. Low-density lipoprotein, non-high-density lipoprotein, and apolipoprotein B as targets of lipid-lowering therapy. **Circulation**, v. 106, p. 2526-2529, 2002.

GÜLÇİN, I. Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v., p. 210-218, 2010.

GUERRA, C. C.. **Recherches sur les interactions anthocyanes-flavonols: application à l'interprétation chimique de la couleur des vins rouges**. Thèse de Doctorat, University Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, 1997.

GUO, Q.; WANG, P.R.; MILOT, D.P.; IPPOLITO, M.C.; HERNANDEZ, M.; BURTON, C.A.; WRIGHT, S.D.; CHAO, Y. Regulation of lipid metabolism and gene expression by fenofibrate in hamsters. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1533, p. 220–232, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts – the role of superoxide and hydroxyl radicals. **FEBS Letters**, v. 128, n. 2, p. 347-352, 1981.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical Biology and Medicine**, 3^o Ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HASLAM, E. *In vino veritas*: oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2577-2582, 1980.

HERTOG, M. G. L., HOLLMAN, P. C. H., VAN de PUTTE, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1242–1246, 1993.

- HEYWOOD, V.H. **Flowering plants of the world**. Barsford Ltd: London, B.T., 1993.
- HOLVOET, P.; COLLEN, D. Oxidation of low density lipoprotein in the pathogenesis of atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 137, p. S33-S38, 1998.
- HOU, DE-X.; MASUZAKI, S.; HASHIMOTO, F.; UTO, T.; TANIGAWA, S.; FUJII, M.; SAKATA, Y. Green tea proanthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-activated mouse macrophages: Molecular mechanisms and structure–activity relationship. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 460, p. 67–74, 2007.
- IPPOLITO, O. P. **Estudios fenológicos en los cvs. Chardonnay, Sauvignon gris, Cabernet Sauvignon y Merlot**. 55f. Monografía. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, 2004.
- IRIKURA, T.; TAKAGI, K.; OKADA, K.; YAGASAKI, K. Effect of KCD-232, a new hypolipidemic agent, on serum lipoprotein changes in hepatoma-bearing rats. **Lipids**, v. 20, p. 420–424, 1985.
- ISHIBASHI, S.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S.; HERZ, J.; BURNS, D. K. Massive xanthomatosis in cholesterol-fed low density receptor-negative mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 93, p. 1885-1893, 1994.
- JACKSON, Ron S. Chemical constituents of grapes and wine. In: JACKSON, Ron S. **Wine Science: principles, practice, perception**. 2° Ed. San Diego, California, EUA: Academic Press, 2000. Cap. 6, p.232-275.
- JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G. O.; SLOWING, K. V.; THOMAS, C. F.; BEECHER, C.; FONG, H.; FARNSWORTH, N.; KINGHORN, A.; MEHTA, R.; MOON, R.; PEZZUTO, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 275, p. 218–220, 2000.
- JEANDET, P.; BESSIS, R.; SBAGHI, M.; MEUNIER, P. Occurrence of a resveratrol β D-glucoside in wine: preliminary studies. **Vitis**, v. 33, p. 183–184, 1994.
- JIMENEZ-RAMSEY, L. M.; ROGLER, J. C; HOUSLEY, T. L.; BUTLER, L. G; ELKIN, R. G. Absorption and distribution of C-14-labelled condensed tannins and related sorghum phenolics in chickens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 963-967, 1994.
- JONES, G. V.; DAVIS, R. E. Using a synoptic climatological approach to understand climate viticulture relationships. **International Journal of Climatology**, v. 20, p.813-837, 2000.
-

- JONES, G.V.; DUCHENE, E.; TOMASI, D.; YUSTE, J.; BRASLAVKSA, O.; SCHULTZ, H.; MARTINEZ, C.; BOSO, S.; LANGELLIER, F.; PERRUCHOT, C.; G. GUIMBERTEAU. Changes in European Winegrape Phenology and Relationships with Climate, GESCO, 2005. **XIV Internationales Weinbau-Symposium**. Geisenheim, Germany, 2005.
- KÁDAR, A.; GLASZ, T. Development of atherosclerosis and plaque. **Cardiovascular Surgery**, v. 9, p. 109-121, 2001.
- KARATZI, K. N.; PAPAMICHAEL, C. M. P.; KARATZIS, E. N.; PAPAIOANNOU, T. G.; AZNAOURIDIS, K. A.; KATSICHTI, P. P.; STAMATELOPOULOS, K. S.; ZAMPELAS, A.; LEKAKIS, J. P.; MAVRIKAKIS, M. E. Red wine acutely induces favorable effects on wave reflections and central pressures in coronary artery disease patients. **American Journal of Hypertension**, v.18, p. 18, 1161–1167, 2005.
- KAWASAKI, M.; FUNABIKI, R.; YAGASAKI, K. Effect of dietary methionine and cystine on lipid metabolism in hepatomabearing rats with hyperlipidemia. **Lipids**, v. 33, p. 905–911, 1998.
- KAWASAKI, M.; YAGASAKI, K.; MIURA, Y.; FINABIKI, R. Reduction of hyperlipidemia in hepatoma-bearing rats by dietary fish oil. **Lipids**, v. 30, p. 431–436, 1995.
- KEBARLE, P.; TANG, L. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 28, p. 898–917, 2009.
- KELLER M.; HRAZDINA, G. Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during véraison. II. Effects on anthocyanin and phenolic development during grape ripening. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 49, p.341-349,1998.
- KENNEDY, J. A.; JONES, G. P. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1740-1746, 2001.
- KING, R.E.; KENT, K.D.; BOMSER, J.A. Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition. **Chemico-Biological Interactions**., v. 151, p. 143–149, 2005.
- KINSELLA, J. E.; FRANKEL, E.; GERMAN, B.; KANNER, J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. **Food Technology**, v. 47, p. 85-89, 1993.
- KIRIMLIOGLU, V.; ARA, C.; YILMAZ, M.; OZGOR, D.; ISIK, B.; SOGUTLU, G.; KIRIMLIOGLU, H.; KARABULUT, A. B.; YILMAZ, S.; KAYAALP, C.; YOLOGLU, S. Resveratrol, a red wine constituent
-

- polyphenol, protects gastric tissue against the oxidative stress in cholestatic rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 51, p. 298–302, 2006.
- KLIEWER, W. M. The free amino acids and other nitrogenous substances of table grape varieties. **Journal of Food Science**, v. 34, p. 274-278, 1969.
- KLINGE, C. M.; RISINGER, K. E.; WATTS, M. B.; BECK, V.; EDER, R.; JUNGBAUER, A. Estrogenic activity in white and red wine extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1850-1857, 2003.
- KOMATSU, W.; MIURA, Y.; YAGASAKI, K. Suppression of hypercholesterolemia in hepatoma-bearing rats by cabbage extract and its component, S-methyl-L-cysteine sulfoxide. **Lipids**, v. 33, p. 499–503, 1998.
- KOSIR, I. J.; LAPORNIK, B.; ANDRENESEK, S.; WONDRA, A. G.; VRHOVSEK, U.; KIDRIC, J. Identification of anthocyanins in wines by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 277-282, 2004.
- KOTSERIDIS Y.; RAZUNGLES A.; BERTRAND A.; BAUMES R. Differentiation of the aromas of Merlot and Cabernet Sauvignon wines using sensory and instrumental analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5383-5388, 2000.
- LA TORRE, L. G.; LA PERA, L.; RANDO, R.; LO TURCO, V.; DI BELLA, G.; SAITTA, M.; DUGO, G. Classification of Marsala wines according to their polyphenol, carbohydrate and heavy metal levels using canonical discriminant analysis. **Food Chemistry**, v. 110, p. 729-734, 2008.
- LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; ROMERO-PÉREZ, A. I.; WATERHOUSE, A. L.; De La TORRE-BORONAT, M. C. Direct HPLC analysis of *cis* and *trans*-resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 281–283, 1995.
- LEÃO, P.C. S. de; SILVA, E. E. G. Caracterização fenológica e requerimentos térmicos de variedades de uvas sem sementes no vale do São Francisco. **Revista de Fruticultura**, v. 25, p. 458-460, 2003.
- LEE, Y. A.; CHO, E. J.; YOKOZAWA, T. Effects of proanthocyanidin preparations on hyperlipidemia and other biomarkers in mouse model of Type 2 Diabetes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7781–7789, 2008.
- LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, A. I.; LENZ, A. G.; AHN, B. W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464-78, 1990.
-

LOPES, P.; SAUCIER, C.; TEISSEDE, P.-L.; GLORIES, Y. Impact of storage position on oxygen ingress through different closures into wine bottles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6471-6746, 2006.

LOPEZ-VELEZ, M.; MARTINEZ-MARTINEZ, F.; VALLE-RIBES, C. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, p. 233-244, 2003.

LOTITO, S. B.; ACTIS-GORETTA, L.; RENART, M. L.; CALIGIURI, M.; REIN, D.; SCHMITZ, H. H.; STEINBERG, F. M.; KEEN, C. L.; FRAGA, C. G. Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 276, p. 945-951, 2000.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. Protein measurement with Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**; v. 193, p. 265-75, 1993.

MANTLE, D.; PREEDY, V. R. Free radicals as mediators of alcohol toxicity. **Adverse Drug Reactions**, v. 18, p. 235-252, 1999.

MASELLA, R.; VARI, R.; D'ARCHIVIO, M.; DI BENEDETTO, R.; MATARRESE, P.; MALORNI, W. Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 785-791, 2004.

MATEJÍČEK, D.; MIKES, O.; KLEJDUS, B.; STERBOVÁ, D.; KUBÁN V. Changes in contents of phenolic compounds during maturing of barrique red wines. **Food Chemistry**, v. 90, p. 791-800, 2005.

MATSUMOTO, H.; INABA, H.; KISHI, M.; TOMINAGA, S.; HIRAYAMA, M.; TSUDA, T. Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1546-1551, 2001.

MATTIVI, F. Resveratrol content in red and rose wines produced in Trentino (Italy) and currently available on the market. **Rivista di Viticoltura e di Enologia**, v. 1, p. 37-45, 1993a.

MATTIVI, F. Solid phase extraction of trans-resveratrol from wines for HPLC analysis. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, v. 196, p. 522-525, 1993b.

MATTIVI, F.; GUZZON, R.; VRHOVSEK, U.; STEFANINI, M.; VELASCO, R. Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7692-7702, 2006.

MATTIVI, F.; VRHOVSEK U.; MASUERO D.; TRAINOTTI D. Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 15, p. 27–35, 2009.

MATTIVI, F.; ZULIAN, C.; NICOLINI, G.; VALENTI, L. Wine, biodiversity, technology, and antioxidants. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 957, p. 37-56, 2002.

MATTIVI, M.; RENIERO, F.; KORHAMMER, S. J. Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1620-1823, 1995.

MAZZA, G. Anthocyanins in grapes and grape products. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 341-371, 1995.

MAZZA, G.; MINIATI, E. **Anthocyanins in fruits, vegetables and grains**. Boca Raton: CRC Press Inc., 1993. 362 p.

MINUSSI, R. C.; ROSSI, M.; BOLOGNA, L.; CORDI, L.; ROTILIO, D.; PASTORE, G. M.; DURÁN, N. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. **Food Chemistry**, v. 82, p.409-416, 2003.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 3170-3175, 1972.

MIURA, D.; MIURA, Y.; YAGASAKI, K. Hypolipidemic action of dietary resveratrol, a phytoalexin in grapes and red wine, in hepatoma-bearing rats. **Life Sciences**, v. 73, p. 1393–1400, 2003.

MONAGAS, M.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, 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.

MONAGAS, M.; GOMEZ-CORDOVES, C.; BARTOLOMÉ, B.; LAUREANO, O.; RICARDO DA SILVA, J. M. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis Vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6475-6481, 2003.

MONTILLA, P.; ESPEJO, I.; MUNOZ, M. C.; BUJALANCE, I.; MUNOZ-CASTANEDA, J. R.; TUNEZ, I. Protective effect of red wine on oxidative stress and antioxidant enzyme activities in the brain and kidney induced by feeding high cholesterol in rats. **Clinical Nutrition**, v. 25, 146–153, 2006.

- MORLAT, R.; BODIN, F. Characterization of viticultural terroirs using a simple field model based on soil depth – II. Validation of the grape yield and berry quality in the Anjou vineyard (France). **Plant and Soil**, v. 281, p. 55-69, 2006.
- MOTA, R. V.; REGINA, M. A.; AMORIM, D. A.; FÁVERO, A. C. Fatores que afetam a maturação e a qualidade da uva para vinificação. **Informe Agropecuário**, v. 27, p. 56-64, 2006.
- MURAKAMI, K. R.; CORDEIRO, A. J. C.; CEREJA, B. S.; BARROS, J. C. S. M.; MARINHO, C. S. Caracterização fenológica da videira cv. Itália (*Vitis vinifera* L.) sob diferentes épocas de poda da região norte do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 615-617, 2002.
- MURCIA, M. A.; MARTÍNEZ-TOMÉ, M. Antioxidant activity of resveratrol content compared with common food additives. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 379–384, 2001.
- NARDINI, M.; FORTE, M.; VRHOVSEK, U.; MATTIVI, F.; VIOLA, R.; SCACCINI, A. C. White wine phenolics are absorbed and extensively metabolized in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, p. 2711-2718, 2009.
- NETO, F. R. A.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins**. Interciência: Rio de Janeiro, 2003, 187p.
- NIELSEN, I. L.; DRAGSTED, L. O.; RAVN-HAREN, G.; FREESE, R.; RASMUSSEN, S. E. Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2813-2820, 2003.
- NIELSEN, S. E.; YOUNG, J. F.; DANESHVAR, B.; LAURIDSEN, S. T.; KNUTHSEN, P.; SANDSTRÖM, B.; DRAGSTED, L. O. Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress. **British Journal of Nutrition**, v. 81, p. 447-455, 1999.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.
- OJEDA H. **Influence de la contrainte hydrique sur la croissance du péricarpe et sur l'évolution des phénols des baies de raisin (*Vitis vinifera* L.) cv. Syrah**. 1999. Montpellier. Tese (Doutorado em Agronomia) - Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, Montpellier.
- OLAS, B.; WACHOWICZ, B. Resveratrol a phenolic antioxidant with effects on blood platelet functions. **Platelets**, v. 16, p. 251–260, 2005.
-

- OOKHTENS, M.; KAPLOWITZ, N. Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. **Seminars in Liver Disease**, v. 18, p. 313-329, 1998.
- OPIE, L.H.; LECOUR, S. The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules. **European Heart Journal**, v.28, p.1683-1693, 2007.
- ORAK H.H. Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities and its correlation of some important red wine grape varieties which are grown in Turkey. Electronic J. Polish Agric. Universities, **Food Science Technology**. v. 9, p. 1-4, 2006.
- ORELLANA, M.; VARELA, N.; GUAJARDO, V.; ARAYA, J.; RODRIGO, R. Modulation of rat liver cytochrome P450 activity by prolonged red wine consumption. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 131, p. 161-166, 2002.
- PACE-ASCIAK, C. R.; HAHN, S. E.; DIAMANDIS, E. P.; SOLEAS, G.; GOLDBERG., D. M. The red wine phenolics *trans*-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary disease. **Clinical Chemistry**, v. 235, p. 207–219, 1995.
- PAGANGA, G.; MILLER, N.; RICE-EVANS, C. The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? **Free Radical Research**, v. 30, p. 153–162, 1999.
- PASSAMONTI, S.; VRHOVSEK, U.; VANZO, A.; MATTIVI, F. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. **FEBS Letters**., v. 544, p. 210-213, 2003.
- PASTOR DEL RIO, J. L.; KENNEDY, J. A. Development of proanthocyanidins in *Vitis Vinifera* L. cv. Pinot noir grapes and extraction into wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, p. 125-132, 2006.
- PEÑA, S.; PEÑA, J. B.; RÍOS, C.; SANCHO, E.; FERNÁNDEZ, C.; FERRANDO, M. D. Role of glutathione in thiobencarb resistance in the European eel *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 46, p. 51-56, 2000.
- PIGNATELLI. P.; GHISELLI, A.; BUCHETTI, B.; CARNEVALE, R.; NATELLA, F.; GERMANÒ, G.; FIMOIGNARI, F.; DI SANTO, S.; LENTI, L.; VIOLI, F. Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine. **Atherosclerosis**, v. 188, p.77-83, 2006.
- PLUMB, G.W.; DE PASCUAL-TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: Effect of
-

polymerisation, galloylation and glycosylation. **Free Radical Research**, v. 29, p. 351–158, 1998.

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

PRIEUR, C.; RIGAUD, J.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. **Phytochemistry**, v. 36, p. 781–784, 1994.

QUEIROZ, A. N.; GOMES, B. A.Q.; MORAES JR., W. M.; BORGES, R. S. A theoretical antioxidant pharmacophore for resveratrol. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1644-1649, 2009.

RAIMUNDO JR., I. M.; PASQUINI, C. Espectrofotometria multicanal e arranjos de fotodiodos. **Química Nova**, v. 20, p. 83–88, 1997.

RANAIVO, H. R.; DIEBOLT, M.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Wine polyphenols induce hypotension, and decrease cardiac reactivity and infarct size in rats: involvement of nitric oxide. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 671-678, 2004.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6º Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2001, 906 p.

RAY, G.; HUSIAN, S. A. Oxidant, antioxidants and carcinogenesis. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 40, p. 213-232, 2002.

RAY, S.; MAULIK, G.; CORDIS, G. A.; BERTELLI, A. A. E.; BERTELLI, A.; DAS, D. K. The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury Parth A **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, p. 160–169, 1999.

RAZA, H.; JOHN, A. *In vitro* protection of reactive oxygen species-induced degradation of lipids, proteins and 2-deoxyribose by tea catechins. **Food Chemistry**, v. 45, p. 1814–1820, 2007.

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, p. 1231-1237, 1999.

RENAUD, S.C.; GUEGUEN, R.; SCHENKER, J.; D’HOUTAUD, A. Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. **Epidemiology**, v. 9, p. 184-188, 1998.

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

- REVILLA, I.; GÓZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L. Compositional changes during the storage of red wines treated with pectolytic enzymes: low molecular-weight phenols and flavan-3-ol derivate levels. **Food Chemistry**, v. 80, p. 205-214, 2003.
- REYNIER, A. **Manual de Viticultura**. 3º Ed. Publicações Europa-América: Portugal. 1986, 424p.
- RIBEIRO DE LIMA, M. T.; WAFFO-TGUO, P.; TEISSEDE, P. L.; PUJOLAS, A.; VERCAUTEREN, J.; CABANIS, J. C.; MRILLON, J. M. Determination of stilbenes (*trans*-astringin, *cis*- and *trans*-piceid, and *cis*- and *trans*-resveratrol) in Portuguese wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 2666-2670, 1999.
- RIBÉREAU-GAYON, P.. **Identification d'esters des acides cinnamiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies de V. vinifera**. CR Acad Sci: Paris, v. 260, 1965. 341p.
- RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Traité d'oenologie 2. Chimie du vin stabilisation et traitements**. 5º Ed. Dunod: Paris, 1998; 564p.
- RIBÉREAU-GAYON, P.; STONESTREET, E. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. **Bulletin de la Société Chimique de France**, v. 419, p. 2649-2652, 1965.
- RICARDO DA SILVA, J. M.; CHEYNIER, V.; SOUQUET, J.; MOUTOUNET, M.; CABANIS, J.; BOURZEIX, M. Interaction of grape seed procyanidins with various protein in relation to wine fining. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 57, p. 111-125. 1991.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.
- RICHASSE, J. **Caracterización de las características ampelográficas y fenológicas de los cultivares Cabernet sauvignon, Moscatel negra y Verdot y evaluación de la calidad de sus vinos**. Tesis, 114f. Agr. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, 1999.
- RIGO, A.; VIANELLO, F.; CLEMENTI, G.; ROSSETTO, M.; SCARPA, M.; VRHOVSEK, U.; MATTIVI F. Contribution of the proanthocyanidins to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1996-200, 2000.
- RIZZON, L. A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Cabernet Franc para elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p.249-255, 2001.
-

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Merlot para elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 156-161, 2003.

ROBICHAUD, J. L.; NOBLE, A. C. Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 53, p.343–353, 1990.

RODRIGO, R.; CASTILLO, R.; CARRASCO, R.; HUERTAA, P.; MORENO, M. Diminution of tissue lipid peroxidation in rats is related to the in vitro antioxidant capacity of wine. **Life Sciences**, v. 76, p. 889-900, 2005.

RODRIGO, R.; RIVERA, G.; ORELLANA, M.; ARAYA J.; BOSCO, C. Rat kidney antioxidant response to long-term exposure to flavonol rich red wine. **Life Sciences**, v. 71, p. 2881-2895, 2002.

ROGGERO, J. P. Changes in resveratrol and piceid contents in wines during fermentation or ageing. Comparison of Garnacha and Mourvedre varieties. **Sciences des Aliments**, v. 16, p. 631–642, 1996.

ROGGERO, J. P.; ARCHIE, P. Quantitative determination of resveratrol and one of its glycosides in wines. **Sciences des Aliments**, v. 14, p. 99–107, 1994.

ROMERO, C.; BAKKER, J. Effect of acetaldehyde and several acids on the formation of vitisin A in model wine anthocyanin and colour evolution. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, p. 129–140, 2000.

ROMERO, C.; BAKKER, J. Interaction between grape anthocyanins and pyruvic acid, with effect of pH and acid concentration on anthocyanins composition and color in model solutions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3130-3139, 1999.

ROMEYER F. M.; MACHEIX, J. J.; GOIFFON, J. J.; REMINIAC, C. C.; SAPIS, J. C. The browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v 31, p.339-346, 1983.

ROSIER, J. P. Vinhos de altitude: característica e potencial na produção de vinhos finos brasileiros. **Informe Agropecuário**, v. 27, p. 105-110, 2006.

ROSIER, J. P.; CARNEIRO, M.; MIOTTO, R. Teores de resveratrol em vinhos sul americanos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 10, 2003, Bento Gonçalves. **Anais Eletrônicos...Bento Gonçalves**, 2003.

ROSSETTO, M.; VANZANI, P.; ZENNARO, L.; MATTIVI, F.; VRHOVSEK, U.; SCARPA, M.; RIGO, A. Stable free radicals and peroxy radical trapping capacity in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6151-6155, 2004.

ROYCHOWDHURY, S.; WOLF, G.; KEILHOFF, G.; BAGCHI, D.; HORN, T. Protection of primary glial cells by grape seed proanthocyanidin extract against nitrosative/oxidative stress, Nitric Oxide: Biology and Chemistry. **Nitric Oxide**, v. 5, p.137-149, 2001.

RUF, J. C. Wine and polyphenols related to platelet aggregation and atherothrombosis. **Drugs Experiments and Clinical Research**, v. 25, p. 125-131, 1999.

SAIKO, P.; SZAKMARY, A.; JAEGER, W.; SZEKERES, T. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? **Mutation Research**, v. 658, p. 68-94, 2008.

SAINT-CRICQ DE GAULEJAC, N.; DE-FREITAS, V.; GLORIES, Y.; BOURGEOIS, G.; VIVAS, N. Fractionnement et dosage des procyanidines oligomères des raisins et des vins: relation avec la qualité des vins. **Sciences des Aliments**, v. 18, p. 59-76, 1998.

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

SAITO, M.; HOSOYAMA, H.; ARIGA, T.; KATAOKA, S.; YAMAJI, N. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1460-1464, 1998.

SATO, M.; BAGCHI, D.; TOSAKI, A.; DAS, D. K. Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia/reperfusion-induced activation of JNK-1 and C-JUN. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, p. 729-737, 2001.

SCANDALIOS, J. G. Introduction to Oxyradicals. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, p. 471- 472, 1997.

SCHWARZ, M.; WABNITZ, T. C.; WINTERHALTER, P. Pathway leading to the formation of anthocyanin-vinylphenol adducts and related pigments in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3682-3687, 2003.

SCIENZA, A. Vigneti policlonali e valorizzazione della diversità dei vini. **VigneVini**, v.12, p. 23-24, 1993.

- SCOTT, R. B.; REDDY, H. S.; HUSAIN, K.; SCHLORFF, E. C.; RYBAK, R. P.; SOMANI, S. M. Dose response of ethanol on antioxidant defense system of liver, lung, and kidney in the rat. **Pathophysiology**, v.7, p. 25-32, 2000.
- SEIGNEUR, M.; BONNET, J.; DORIAN, B.; BENCHIMOL, D.; DROUILLET, F.; GOUVERNEUR, G.; LARRUE, J.; CROCKETT, R.; BOISSEAU, M.; RIBEREAU-GAYON, P.; BRICAUD, H. Effect of the consumption of alcohol, white wine, and red wine on platelet function and serum lipids. **Journal of Applied Cardiology**, v. 5, p. 215–222, 1990.
- SERAFINI, M.; MALANI, G.; FERRO-LUZZI, A. Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 1003-1007, 1998.
- SEVER, P. S.; DAHLÖF, B.; POULTER, N. R.; WEDEL, H.; BEEVERS, G.; CAULFIELD, M.; COLLINS, R.; KJELDSEN, S.E.; KRISTINSSON, A.; MCINNES, G. T.; MEHLSSEN, J.; NIEMINEN, M.; O'BRIEN, E.; ÖSTERGREN, J. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial - Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. **Lancet**, v. 361, p. 1149-1158, 2003.
- SIEMANN, E. H.; CREASY, L. L. Concentration of the phytoalexine resveratrol in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 43, p. 49–52, 1992.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v.215, p.213 –219, 1993.
- SILVA, L. R.; ANDRADE, P- B.; VALENTÃO, P.; SEABRA, R. M.; TRUJILLO, M. E.; VELÁZQUEZ, E. Analysis of non-coloured phenolics in red wine: Effect of *Dekkera bruxellensis* yeast. **Food Chemistry**, v. 89, p. 185-189, 2005.
- SILVA, R. P.; DANTAS, G. G.; NAVES, R. V.; CUNHA, M. G.. Comportamento fenológico de videira, cultivar Patrícia em diferentes épocas de poda de frutificação em Goiás. **Fitotecnia**, v. 65, p. 399-406, 2006.
- SIMONETTI, P.; PIETTA, P.; TESTOLIN, G. Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 45, p. 1152-1155, 1997.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.
-

- 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.; GOLDBERG, D.; M KARUMANCHIRI, A.; DIAMANDIS, E. P.; NG, E. A. Influences of viticultural and oenological factors on changes in *cis*- and *trans*-resveratrol. **Journal of Wine Research**, v. 6, p. 107-121, 1995.
- SOLEAS, G.; GRASS, L.; JOSEPHY, D.; GOLDBER, D.; DIAMANDIS, E. A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 119-124, 2002.
- SOMERS, T. C. The phenolic nature of wine pigments. **Phytochemistry**, v. 10, p. 2175-2186, 1971.
- SOMERS, T. C.; EVANS, M. E. Evolution of red wine. Ambient influences on color composition during early maturation. **Vitis**, v. 25, p. 31-39, 1986.
- SOMERS, T. C.; VÉRETTE, E.; POCOCK, K. F. Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera*: changes during white vinification and effects of exogenous enzymic hydrolysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 40, p. 67-78, 1987.
- SOUQUET, J. M.; CHEYNIER, V.; BROSSAUD, F.; MOUTOUNET, M. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. **Phytochemistry**, v. 43, p. 509-512, 1996.
- SOUQUET, J. M.; MAZAURIC, J. P.; MEUDEEC, E.; PREYS, S.; MOREL-SALMI, C.; CHEYNIER, V. Comparison on different methods of depolymerization to the characterization and quantification of proanthocyanidins in grape seed, grape skin and wine. In Polyphenols Communications, Proceedings of the XXII International conference on polyphenols- ICP2004 (pp. 693-694); 2004. Hoikkala, A., Soidinsalo, O., Wahala, K. (Eds); Groupe Polyphenols: Helsinki, Finland.
- SPAYD, S. E.; TARARA, J. M.; MEE, D. L.; FERGUSON, J. C. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 53, p. 171-182, 2002.
- STAFFORD, H. A. **Flavonoid Metabolism**. CRC Press: Boca Raton: FL 1990; 298 pp.
- STANNER, S. A.; HUGHES, J.; KELLY, C. N. M.; BUTTRISS, J. A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'. **Public Health Nutrition**, v. 7, p. 407-422, 2003.
-

SUN, B. S.; PINTO, T.; LEANDRO, M. C.; RICARDO DA SILVA, J. M.; SPRANGER, M. I. Transfer of catechins and proanthocyanidins from solid parts of the grape cluster into wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, p. 179-184, 1999.

TIMBERLAKE, C.; BRIDLE, P. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 27, p. 97-105, 1976.

TONIETTO, J.; CARBONNEAU, A. A multicriteria climatic classification system for grape-growing regions worldwide. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 124, p. 81-97, 2004.

TONIETTO, J.; MANDELLI, F. **Uvas viníferas para processamento em regiões de clima temperado**. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. EMBRAPA, 2003. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/UvasViniferasRegioesClima-Temperado/clima.htm>>. Acesso em: 13 nov 2009.

TROWBRIDGE, D.; STRIEGLER, R. K.; BERG, G. T. Effect of production system on vegetative growth, yield, and fruit composition of Syrah grapevines grown in the San Joaquin Valley. **California Agricultural Technology Institute**, Publication n. 970201, 4 p, 1997.

VAN GOLDE, P. H. M.; SLOOTS, L. M.; VERMEULEN, W. P.; WIELDERS, J. P. M.; HART, H. C.; BOUMA, B. N.; VAN DE WIEL, A. The role of alcohol in the anti low density lipoprotein oxidation activity of red wine. **Atherosclerosis**, v. 147, p. 365-370, 1999.

VANZO, A.; CECOTTI, R.; VRHOVSEK, U.; TORRES, A. M.; MATTIVI, F.; PASSAMONTI, S. The fate of *trans*-caftaric acid administered into the rat stomach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1604-1611, 2007.

VARACHE-LEMBÈGE, M.; WAFFO-TÉGUO, P.; RICHARD, T.; MONTI, J. P.; DEFFIEUX, G.; VERCAUTEREN, J.; MÉRILLON, J. M.; NUHRICH, A. Structure-activity relationships of polyhydroxystilbene derivatives extracted from *Vitis vinifera* cell cultures as inhibitors of human platelet aggregation. **Medicinal Chemistry Research**, v. 10, p. 253-267, 2000.

VITRAC, X.; BORNET, A.; VANDERLINDE, R.; VALLS, J.; RICHARD, T.; DELAUNAY, J.-C.; MRILLON, J.-M.; TEISSEDE, P.-L. Determination of stilbenes (δ -viniiferin, *trans*-astringin, *trans*-piceid, *cis*- and *trans*-resveratrol, ϵ -viniiferin) in Brazilian wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5664-5669, 2005.

VITRAC, X.; MONTI, J. P.; VERCAUTEREN, J.; DEFFIEUX, G.; MÉRILLON, J. M. Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanols in wines with absorbance and fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 21, p. 1-8, 2002.

VRHOVSEK, U. Extraction of hydroxycinnamoyltartaric acids from berries of different grape varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4203-4208, 1998.

VRHOVSEK, U.; RIGO, A.; TONON, D.; MATTIVI, F. Quantitation of Polyphenols in Different Apple Varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6532-6538, 2004.

VRHOVSEK, U.; WENDELIN, S.; EDER, R. Quantitative Bestimmung von Hydroxyzimtsauren und Hydroxyzimtsaurederivaten (Hydroxycinnamaten) in Weissweinen mittels HPLC [Quantitative determination of hydroxycinnamic acids and their derivatives (hydroxycinnamates) in white wine by means of HPLC]. **Mitt. Klosterneuburg**, v. 47, p. 164-172, 1997.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p. 304-309, 1997.

WATERHOUSE, A. L.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries. **Phytochemistry**, v. 37, p. 571-573, 1994.

WATSON, B. Evaluation of winegrape maturity. In: E. W. HELLAMN (Ed). **Oregon Viticulture**, Oregon State University Press, Corvallis, Oregon, p. 235-245, 2003.

WILLIAMS, L. D.; BURDOCK, G. A.; EDWARDS, J. A.; BECK, M.; BAUSCH, J. Safety studies conducted on high-purity *trans*-resveratrol in experimental animals. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2170-2182, 2009.

WINKLER, A.; COOK, J. A.; KLIWER, W. M.; LIDER, L. A. **General Viticulture**, 4^o Ed., University of California Press: California, 1974, 710 p.

WINROW, V. R.; WINYARD, P. G.; MORRIS, C. J.; BLACK, D. R. Free radical in inflammation: second messenger and mediators of tissue destruction. *British Medical Bulletin*, 49, 509-510, 1993.

WISSLER, R. W. Theories and new horizons in the pathogenesis of atherosclerosis and the mechanisms of clinical effects. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 116, p. 1281-1291, 1992.

ZAFRILLA, P.; MORILLAS, J.; MULERO, J.; CAYUELA, J.M.; MARTÍNEZ-CACHÁ, A.; PARDO, F.; LÓPEZ NICOLÁS, J.M. Changes during storage in conventional and ecological wine: phenolic content and antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4694-4700, 2003.

ZOECKLEIN, B. W.; FUGELSANG, K. C.; GUMP, B. H.; NURY, F. S. **Wine Analysis and Production**; Chapman & Hall: New York, 1995.
