

# **ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* EM VINHOS E SUCOS DE UVA**

**EMÍLIA YASUKO ISHIMOTO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Departamento de Nutrição da Faculdade de  
Saúde Pública da Universidade de São Paulo,  
para obtenção do Grau de Mestre.

Área de concentração: Nutrição

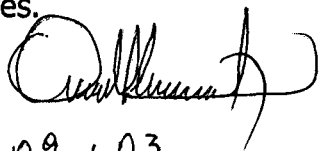
Orientadora:  
Prof<sup>ª</sup>. Assoc. Elizabeth A.F.S.Torres

São Paulo  
2003



Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores.

Assinatura:



Data: 24 / 09 / 03

44178/2003 CG

## DEDICATÓRIA

Ao Marcel, por 12 anos de amor e companheirismo;

À minha mãe, por ser meu melhor exemplo de  
força, coragem e perseverança.

**“Não acuse a natureza, ela fez a sua parte!  
Faça, então, a sua!”**

**Milton, Paraíso Perdido, 1667.**

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup> Assoc. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres, pela confiança e pelo modo democrático, humano e compreensivo com o qual conduziu a sua orientação;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Déborah M. Bastos, pelo auxílio durante a fase laboratorial e sugestões, que melhoraram o conteúdo deste trabalho;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lígia Muradian, pelas importantes sugestões, fornecidas desde o exame de qualificação;

Ao Prof. Titular José Alfredo G. Arêas, pela permissão do uso do laboratório de Propriedades Funcionais e também pelas sugestões fornecidas, que foram fundamentais para a viabilização deste projeto;

Ao Prof. Dr. José Cesar Panetta, pelo incentivo e confiança, e por ser minha fonte de inspiração como mestre e como ser humano;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Regina Mara Fisberg, pelas sugestões no exame de qualificação;

Ao Prof. Jorge Mancini, por conceder um período de estágio no laboratório de Lípidos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP;

À nutricionista Ana Vlândia B. Moreira e à farmacêutica Fernanda J. Archilla, alunas do laboratório de lípidos, FCF/USP, pelas orientações referentes aos métodos analíticos;

Ao Carlos K.B. Ferrari, pelo auxílio e amizade, especialmente pelo apoio no momento mais crítico do desenvolvimento deste projeto;

Ao Sílvio Vicente, pela solidariedade e por me ensinar quase tudo que sei sobre química analítica;

À Geni R. Sampaio e Marty M. Visky, pelo auxílio, apoio e amizade;

À Rosana A.M. Soares e José Pereira, por me socorrerem sempre que precisei;

À Yara, Rosana, Vanessa, Cláudia e alunas de iniciação científica, pelo alegre convívio de laboratório, especialmente à Karine Daud, por me ajudar no levantamento de material bibliográfico;

Ao Prof. Dr. José Machado Moita Neto, pelo enorme auxílio prestado na análise estatística dos dados, e à Gianni Yanaguibashi, pela análise estatística;

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Saúde Pública/USP, pela competência e profissionalismo, em especial à Sueli Campos, pelo esforço no auxílio prestado;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de estudo concedida.

Aos meus irmãos Kiyoko, Sueli, Masao, minha sobrinha Katherine, e minha tia Kinuyo, pela torcida e presença constante;

Ao meu pai, pelas lições de responsabilidade, dedicação e disciplina;

À todos os pesquisadores com os quais fiz contato, especialmente ao Prof. Dr. Kerstin Höner, da Universidade de Tecnologia de Braunschweig, Alemanha, que gentilmente responderam as questões enviadas, prestando, deste modo, um grande auxílio;

E, por fim, mas não menos importante, à minha grande amiga Laura, por tantos anos de amizade incondicional, compartilhando os melhores e piores momentos da minha vida.

## RESUMO

Ishimoto EY. **Atividade antioxidante *in vitro* em vinhos e sucos de uva.** São Paulo; 2003. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública/USP].

Nas últimas décadas, muita atenção tem sido direcionada ao envolvimento dos radicais livres na patogênese de diversas doenças não transmissíveis; o consumo de antioxidantes é considerado o principal mecanismo de defesa contra o efeito deletério destes radicais. Evidências recentes comprovaram as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos presentes em produtos derivados da uva (*Vitis vinifera*), como sucos e vinhos, especialmente o vinho tinto. **Objetivo.** Avaliar a atividade antioxidante de vinhos e sucos de uva brasileiros e quantificar o teor total de compostos fenólicos nestas bebidas, verificando possíveis correlações entre os métodos empregados. **Metodologia.** Marcas diferentes de vinhos tintos, rosados, brancos e sucos de uva foram submetidos a três testes analíticos *in vitro*: quantificação de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, inibição da oxidação lipídica pelo método do tiocianato férrico e avaliação do poder redutor. **Resultados.** O teor de fenólicos totais, inibição de oxidação lipídica e poder redutor variaram de 297 a 2478 mg/L, 25,75 a 59,66% e 0,087 a 0,751 (densidade ótica,  $\lambda = 700$  nm) respectivamente. Diferenças significantes ( $p < 0,05$ ) foram detectadas entre os diferentes tipos e marcas de bebidas. Os vinhos tintos apresentaram os maiores teores de fenólicos e os melhores resultados na avaliação da atividade antioxidante; os rosados apresentaram valores intermediários e os brancos, inferiores. Os teores de fenólicos em sucos de uva foram relativamente altos, porém como antioxidantes não foram tão efetivos quanto os vinhos tintos. **Conclusão.** Este estudo evidenciou uma forte correlação entre o teor de fenólicos totais e atividade antioxidante, tanto na inibição da oxidação lipídica ( $r = 0,862$ ) quanto no poder redutor ( $r = 0,839$ ); entre estes últimos, a correlação foi mais fraca ( $r = 0,690$ ), sugerindo que o perfil de compostos fenólicos influencia a atividade antioxidante, tanto em termos quantitativos como qualitativos.

Palavras-chave: radicais livres, atividade antioxidante, vinhos, sucos de uva, compostos fenólicos.



## SUMMARY

Ishimoto EY. *In vitro* antioxidant activity in wines and grape juices. São Paulo (BR); 2003. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

In the last decades increasing attention has been given to the involvement of free radicals in the pathogenesis of several non-communicable diseases; the consumption of antioxidants is believed to be the main defense mechanism against the deleterious effects of these radicals. Recent evidences showed the antioxidant properties of phenolic compounds present in products derived from grape (*Vitis vinifera*), as juices and wines, specially red wine. **Objective.** Evaluate the antioxidant activity of Brazilian wines and grape juices, and quantify the content of total phenolics in these beverages, examining possible correlations between the methods. **Methodology.** Different brand and types of red, pink and white wines, and grape juices were submitted to three *in vitro* experiments: quantification of total phenolic compounds by Folin-Ciocalteu method, inhibition of lipid oxidation by ferric thiocyanate test, and the evaluation of reducing power. **Results.** The content of total phenolics, inhibition of lipid oxidation and the reducing power varied from 297 to 2478 mg/ L /GAE (gallic acid equivalent), 25,75 to 59,66% and 0,087 to 0,751 (optical density,  $\lambda = 700$  nm), respectively. Significant differences ( $p < 0,05$ ) were detected between the samples. The red wines presented the highest contents of phenolics and the best results in the evaluation of antioxidant activity; the pink ones presented intermediate values and the white ones, the lowest. The content of phenolics in grape juices were relatively high, but as antioxidant they were not as effective as the red wines. **Conclusion.** This study showed a strong correlation between the content of phenolics and antioxidant activity, in the inhibition of lipid oxidation ( $r = 0,862$ ) as in the reducing power ( $r = 0,839$ ); between these two last methods, however, the correlation was not significant ( $r = 0,690$ ), suggesting that the profile of phenolic compounds influence the antioxidant activity, both in quantitative and qualitative aspects.

**Key-words:** free radicals, antioxidant activity, wines, grape juices, phenolic compounds.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Principais compostos fenólicos em uvas e vinhos .....	22
<b>Tabela 2</b> - Tipos de bebida, uvas empregadas na produção, teor de açúcar e ano de safra .....	30
<b>Tabela 3</b> - Teores médios $\pm$ desvio padrão de resíduo seco e fenólicos totais em vinhos e sucos de uva .....	36
<b>Tabela 4</b> - Valores médios $\pm$ desvio padrão da atividade antioxidante de vinhos, sucos de uva e BHT diluídos em etanol, na concentração de 0,02%, pelo teste do tiocianato férrico .....	41
<b>Tabela 5</b> - Médias e desvios padrão do poder redutor de vinhos e sucos de uva diluídos em metanol, em 3 concentrações diferentes .....	45
<b>Tabela 6</b> - Médias e desvios padrão do teor de fenólicos totais, inibição da OL e poder redutor de vinhos e sucos de uva .....	46
<b>Tabela 7</b> - Pesos das variáveis nos componentes principais 1 e 2 .....	48
<b>Tabela 8</b> - Correlação entre as variáveis .....	50

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura química básica de um flavonóide .....	23
<b>Figura 2</b> - Curva padrão para a determinação de fenólicos totais .....	35
<b>Figura 3</b> - Teor de fenólicos totais, por tipo de bebida .....	37
<b>Figura 4</b> - Atividade antioxidante das amostras diluídas de vinhos tintos, pelo método do tiocianato férrico .....	39
<b>Figura 5</b> - Atividade antioxidante das amostras diluídas de vinhos <i>rosé</i> , pelo método do tiocianato férrico .....	40
<b>Figura 6</b> - Atividade antioxidante das amostras diluídas de vinhos brancos, pelo método do tiocianato férrico .....	40
<b>Figura 7</b> - Atividade antioxidante das amostras diluídas de sucos de uva, pelo método do tiocianato férrico .....	41
<b>Figura 8</b> - Poder redutor em amostras diluídas de vinhos tintos .....	43
<b>Figura 9</b> - Poder redutor em amostras diluídas de vinhos <i>rosé</i> .....	43
<b>Figura 10</b> - Poder redutor em amostras diluídas de vinhos brancos .....	44
<b>Figura 11</b> - Poder redutor em amostras diluídas de sucos de uva .....	44
<b>Figura 12</b> - Relação entre as amostras, por análise de componentes principais .....	49
<b>Figura 13</b> - Agrupamento de dados das amostras avaliadas .....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\lambda$	comprimento de onda
A	antioxidante
ACP	análise de componentes principais
ATP	adenosin triphosphate (trifosfato de adenosina)
BHA	butil-hidroxi-anisol
BHT	butil-hidroxi-tolueno
DCI	doenças coronarianas isquêmicas
DNA	ácido desoxirribonucleico
DRI	dietary reference intakes (ingestão diária recomendada)
$e^-$	elétron desemparelhado
EAG	equivalente de ácido gálico
ERRO	espécie reativa de oxigênio
ERN	espécie reativa de nitrogênio
ERTO	espécie reativa tóxica de oxigênio
$Fe^{+2}$	ferro (II), íon férrico
$Fe^{+3}$	ferro (III), íon ferroso
$[Fe(CN)_6]^{3-}$	ferricianeto
$[Fe(CN)_6]^{4-}$	ferrocianeto
FOSHU	foods for special health use (alimentos para uso específico de saúde)
FRAP	ferric reducing antioxidant power (poder antioxidante pela redução do íon ferroso)
g	grama
°C	graus Celsius
H	hidrogênio
HDL	high density lipoprotein (lipoproteína de alta densidade)
$H_2O_2$	peróxido de hidrogênio
$K_3[Fe(CN)_6]$	ferricianeto de potássio
L	litro

<b>L<sup>·</sup></b>	radical livre lipídico
<b>LDL</b>	low density lipoprotein (lipoproteína de baixa densidade)
<b>LH</b>	ácido graxo insaturado
<b>LO<sup>·</sup></b>	radical alcoxila
<b>LOO<sup>·</sup></b>	radical peroxila
<b>LOOH</b>	hidroperóxido
<b>M</b>	concentração molar
<b>µg</b>	micrograma
<b>mg</b>	miligrama
<b>mL</b>	mililitro
<b>mn</b>	nanômetro
<b>n</b>	número de amostras
<b>NO<sup>·</sup></b>	óxido nítrico
<b>O<sub>2</sub></b>	oxigênio molecular
<b>O<sub>3</sub></b>	gás ozônio
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	oxigênio singlete
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	radical superóxido
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	peroxinitrito
<b>OH<sup>·</sup></b>	radical hidroxila
<b>OL</b>	oxidação lipídica
<b>PG</b>	propil galate (galato de propila)
<b>p/p</b>	peso/peso
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>p/v</b>	peso/volume
<b>R<sup>·</sup></b>	radical livre iniciador de reação em cadeia
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>SOD</b>	superóxido dismutase
<b>TBHQ</b>	terci-butil-hidroquinona
<b>v/v</b>	volume/volume
<b>WHO</b>	world health organization (organização mundial da saúde)

# ÍNDICE

LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Radicais livres e deterioração oxidativa .....	2
1.1.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO) .....	3
1.1.2 Espécies reativas de nitrogênio (ERN) .....	5
1.1.3 Oxidação Lipídica .....	6
1.2 Antioxidantes .....	8
1.2.1 Mecanismos de ação .....	8
1.2.2 Antioxidantes em sistemas biológicos .....	9
1.2.3 Antioxidantes em alimentos .....	10
1.2.3.1 Antioxidantes como aditivos .....	11
1.2.3.2 Fontes naturais de antioxidantes .....	12
1.2.3.3 Compostos fenólicos: antioxidantes de origem vegetal .....	13
1.2.4 Avaliação da atividade antioxidante .....	13
1.3 Estresse oxidativo .....	15
1.4 Alimentos Funcionais .....	15
1.5 Vinho: Aspectos culturais, científicos e de saúde pública .....	17
1.5.1 Histórico .....	17
1.5.2 Tipos de vinho, produção e consumo .....	18
1.5.3 Composição química .....	20
1.5.4 Vinho e saúde .....	23
1.5.4.1 A questão do álcool .....	26
1.6 Outros derivados da uva .....	26

<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
2.1 Objetivo geral .....	28
2.2 Objetivos específicos .....	28
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
3.1 Materiais .....	29
3.1.1 Solventes e reagentes .....	29
3.1.2 Amostragem .....	29
3.2 Métodos .....	31
3.2.1 Determinação do resíduo seco .....	31
3.2.2 Quantificação dos compostos fenólicos .....	31
3.2.3 Avaliação da atividade antioxidante .....	32
3.2.3.1 Método do tiocianato férrico .....	32
3.2.3.2 Avaliação do poder redutor .....	33
3.2.4 Análise estatística .....	34
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
4.1 Concentração de matéria seca e de fenólicos totais .....	35
4.2 Atividade antioxidante .....	39
4.2.1 Método do tiocianato férrico .....	39
4.2.2 Avaliação do poder redutor .....	43
4.3 Correlação entre as variáveis .....	48
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>52</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>
 <b>ANEXOS</b>	
Anexo 1 Marca, tipo, procedência, teor de álcool e açúcar das amostras .....	A <sub>1</sub>

## 1. INTRODUÇÃO

Entre as dez principais causas de óbito no mundo, cinco são desencadeadas por doenças não transmissíveis, ou seja, 50%; contudo, em termos absolutos, estas são numericamente mais representativas. Por esta razão, são consideradas o maior desafio em termos de saúde pública. A principal causa registrada em 1990, em oito regiões do mundo (incluindo América Latina), foi a doença isquêmica do coração, seguida de acidentes cerebrovasculares, totalizando 10,7 milhões de óbitos (MURRAY e LOPEZ, 1997). No Brasil, a principal causa de mortalidade é representada pelas doenças do aparelho circulatório, onde se incluem as doenças cardiovasculares (MELLO JORGE *et al.*, 2001).

Nas últimas décadas, inúmeros estudos têm relacionado fatores dietéticos à prevenção de doenças não transmissíveis, como câncer e doenças cardiovasculares (BLOCK, 1992; HERTOOG *et al.*, 1993; WILLETT, 1994; KNEKT *et al.*, 1996; CRAIG, 1997; BECK, 2000; LAMARTINIERE, 2000; CORDER *et al.*, 2001).

Entretanto, a crença na capacidade dos alimentos em curar, atenuar ou prevenir doenças é antiga, remonta a época de Hipócrates, há 2.500 anos, quando este defendia o uso de alimentos como medicamentos. Em contrapartida, a sociedade moderna consolidou a utilização de drogas produzidas pela indústria farmacêutica, que, apesar de seus comprovados benefícios, representam riscos de efeitos colaterais indesejáveis. Isto, somado ao grande avanço da ciência na capacidade analítica em nível molecular, bem como o desenvolvimento da área de tecnologia de alimentos e ingredientes alimentares, renovaram o antigo conceito sobre a função dos alimentos em promover a saúde (LABUZA, 1999).

Alguns componentes alimentares já são considerados agentes que previnem o desenvolvimento de certas doenças, como as citadas acima, e entre estes componentes estão os antioxidantes, encontrados principalmente em alimentos de origem vegetal. Os antioxidantes alimentares atuam na inibição dos efeitos deletérios provocados por radicais livres, ou seja, espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN),



frequentemente relacionados à patogênese de diversas doenças não transmissíveis (WEISBURGER, 1999).

O vinho tinto é uma das fontes mais significativas de antioxidantes provenientes da dieta, e são cada vez mais fortes as evidências indicando uma correlação negativa entre consumo moderado de vinho tinto e incidência de doenças cardiovasculares (RENAUD e de LORGERIL, 1992; FRANKEL *et al.*, 1995; MÉRILLON *et al.*, 1997).

A importância dos antioxidantes para a saúde consiste na sua capacidade em inibir ou retardar a formação e ação deletéria de certos compostos oxidantes provenientes do metabolismo do oxigênio molecular, popularmente conhecidos como radicais livres.

## **1.1 Radicais livres e deterioração oxidativa**

Denomina-se radical livre toda espécie capaz de uma existência independente (daí o termo “livre”), e que contém um elétron ímpar, isto é, desemparelhado, em sua órbita externa (HALLIWELL, 1996). Dentro das moléculas, os elétrons em geral se reúnem em pares. Um par de elétrons é mais estável que os elétrons isolados, e o não-emparelhamento de elétrons da última camada confere uma alta reatividade a estas moléculas, propiciando reações em cadeia que instabilizam o meio molecular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).

A maioria dos radicais livres deriva do metabolismo do oxigênio molecular ( $O_2$ ), utilizado na cadeia respiratória, que ocorre na membrana interna da mitocôndria para a produção de energia, na forma de ATP (trifosfato de adenosina). Entretanto, não é todo o oxigênio disponível na célula que se converte em energia; uma pequena parte (5%) dá origem a radicais livres, também conhecidos como espécies reativas tóxicas de oxigênio – ERO (RABAY e TORRES, 1997), ou espécies reativas de oxigênio – ERO (HALLIWELL, 1996). A produção de radicais livres é, portanto, uma consequência natural da existência dos seres aeróbicos, que utilizam o oxigênio para oxidar (queimar) substratos ricos em carbono e

hidrogênio, obtendo a energia química e térmica (calor), essenciais para a vida (GUTTERIDGE, 1995).

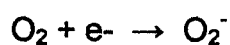
HARMAN (1956), citado por NOHL (1993, p.653) propôs que os radicais livres induzem o processo de envelhecimento. Desde então, um número crescente de estudos têm relacionado os radicais livres não só à senescência, mas também à patogênese de mais de 50 doenças crônicas não transmissíveis ou eventos nosológicos, como: aterosclerose, enfisema, diabetes, câncer, infecções virais, doenças cérebro-vasculares, catarata, doenças neurodegenerativas e outros (BLOCK *et al.*, 1992; NOHL, 1993; CRAIG 1997; BECK 2000).

Uma das características relevantes dos radicais livres é a sua capacidade de reagir imediatamente com uma molécula vizinha, estabilizando-se, e, de forma geral, produzindo um novo radical livre. Esta reação pode ser de doação (oxidação) ou recepção (redução) do elétron não pareado. Portanto, os radicais livres ou provocam ou resultam destas reações de óxido-redução (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Apesar de amplamente empregado, o termo radical livre não é o ideal, considerando que nem todos os agentes reativos apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Portanto, o termo mais adequado é aquele que inclui radicais e não radicais, como o oxigênio singlete. O termo genérico “espécies reativas de oxigênio” (ERO) e “espécies reativas de nitrogênio” (ERN) foram então adotados por diversos autores (HALLIWELL *et al.*, 1995).

### 1.1.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

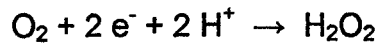
- Radical superóxido ( $O_2^-$ ): formado pela adição de um elétron na molécula de  $O_2$  em seu estado fundamental:



Seu potencial tóxico está relacionado à formação de outras espécies reativas, ou seja: peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e peroxinitrito.

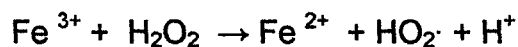
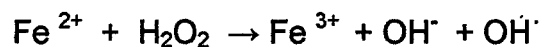
Sua importância biológica reside, portanto, na capacidade em gerar outras espécies de maior reatividade (HALLIWELL, 1996).

- Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): resultante da redução bivalente do O<sub>2</sub>:



O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser proveniente também de uma reação de dismutação enzimática do radical superóxido gerado in vivo. Com forte poder oxidante, o peróxido de hidrogênio pode produzir outro radical altamente reativo, o radical hidroxila (HALLIWELL *et al.*, 1995).

- Radical hidroxila (OH<sup>•</sup>): sua formação in vivo parece estar relacionada com a decomposição do peroxinitrito (RADI *et al.*, 1991), do peróxido de hidrogênio (HALLIWELL *et al.*, 1995), e com reações catalisadas por metais de transição, conhecidas como reações de Fenton e Haber-Weiss, descritas abaixo:



Embora o cobre também possa catalisar a reação de Haber-Weiss, o ferro é o metal pesado mais abundante no organismo e está biologicamente mais capacitado para catalisar as reações de oxidação de biomoléculas.

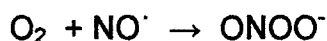
Entre as espécies de oxigênio, o radical hidroxila é o de maior reatividade em sistemas biológicos. Algumas evidências indicam que este radical é mais reativo que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1986, citados por FERREIRA e MATSUBARA, 1997, p.62).

- Oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>): não é um radical livre, pois não possui elétrons desemparelhados em sua última camada; é uma forma excitada de oxigênio molecular (GUTTERIDGE, 1995). Pode ser gerado durante a peroxidação lipídica (descrita no item 1.1.3), por reações de fotossensibilização ou por reações do gás ozônio (O<sub>3</sub>) com moléculas biológicas (HALLIWELL *et al.*,

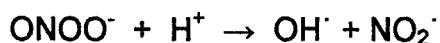
1995). Poucas doenças foram atribuídas à sua presença; segundo HALLIWELL e GUTERIDGE (1990), citados por FERREIRA e MATSUBARA (1997, p.62), a excessiva formação desta espécie foi relacionada ao dano em células visuais, expostas à luz por tempo prolongado, e a certos sintomas na epiderme (erupções e espessamento).

### 1.1.2 Espécies reativas de nitrogênio (ERN)

- Óxido nítrico (NO<sup>·</sup>): gerado in vivo a partir do aminoácido L-arginina, possui um potencial tóxico semelhante ao radical superóxido, ou seja, está relacionado à formação de outras espécies de alta reatividade, como o radical hidroxila e o peroxinitrito, como apresentado abaixo:



- Peroxinitrito (ONOO<sup>·</sup>): espécie com potencial citotóxico, age diretamente sobre moléculas biológicas, particularmente através da oxidação de grupamentos sulfidrilas de biomoléculas (RADI *et al.*, 1991). É encontrado no ar poluído e na fumaça gerada na queima de materiais orgânicos, como o cigarro (HALLIWELL *et al.*, 1995). A decomposição deste radical leva à geração de outras espécies tóxicas, incluindo o radical hidroxila, conforme representado abaixo:



Embora as ERO e as ERN estejam envolvidas com processos biológicos indesejáveis, é importante ressaltar que nem sempre a presença destas espécies é prejudicial à saúde. Foi comprovado que o ânion superóxido, por exemplo, possui um papel importante no combate a infecções provocadas por bactérias, auxiliando os neutrófilos na destruição dos microrganismos. Além disso, algumas ERO estão envolvidas na regulação do tônus muscular (BAST *et al.*, 1991), e o óxido nítrico contribui

no controle da pressão e fluxo sanguíneo do sistema cardiovascular, entre outras funções (MONCADA e HIGGS, 1993).

### 1.1.3 Oxidação Lipídica

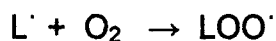
Todos os componentes celulares são suscetíveis ao ataque dos radicais livres, mas a membrana, que é rica em lipídios insaturados (ácidos graxos poliinsaturados), é um dos mais atingidos. A oxidação lipídica, lipoperoxidação ou peroxidação lipídica, é uma das principais consequências das reações radicalares, e ocorre também em alimentos (óleos, gorduras e frações lipídicas). Nos alimentos, resultam em alterações nas suas características sensoriais e nutricionais, reduzindo sua vida útil (NAWAR, 1996).

O radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) é frequentemente reconhecido como a espécie iniciadora da oxidação lipídica, cujos aspectos principais são descritos abaixo (KAHL e HILDEBRANDT, 1986):

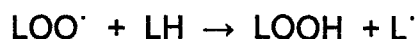
- Em um processo chamado iniciação, ácidos graxos insaturados (LH) são convertidos, via abstração de hidrogênio ( $\text{H}^\cdot$ ), em radicais livres lipídicos ( $\text{L}^\cdot$ ):



- Este processo é catalisado por luz, calor e na presença de metais de transição, como o ferro. Os radicais livres gerados são oxidados pelo oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ), originando radicais peroxila ( $\text{LOO}^\cdot$ ):



- Os radicais peroxila são capazes de abstrair o  $\text{H}^\cdot$  de uma nova molécula LH, em um processo denominado propagação, formando hidroperóxidos ( $\text{LOOH}$ ), que são os produtos primários da oxidação lipídica:

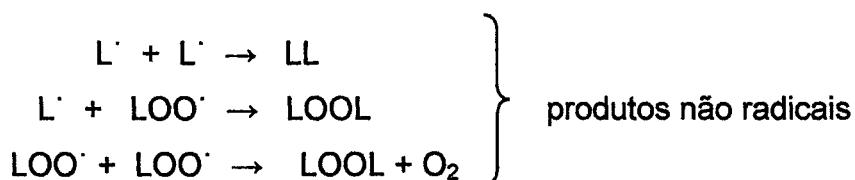


- Concomitantemente, quantidades expressivas de LOOH se decompõem, por reações secundárias, a uma grande variedade de produtos monoméricos e poliméricos, cuja química ainda não é completamente compreendida; entre as espécies geradas, estão os radicais alcoxila (LO $\cdot$ ) e hidroxila (OH $\cdot$ ).



- Entre os produtos da decomposição dos hidroperóxidos estão certos compostos voláteis, responsáveis pela deterioração no sabor e odor dos lipídios oxidados, e provavelmente são gerados a partir dos radicais alcoxila.

Uma vez iniciada, a reação de oxidação lipídica segue em cadeia, e somente termina quando estiverem esgotadas as reservas de ácidos graxos insaturados e o oxigênio do meio (KIRK, 1984, citado por FERRARI, 1998, p.5). Deste modo, a fase da terminação tem como característica a formação de produtos finais estáveis ou não reativos (GRAY, 1978):



Estes processos oxidativos resultam em alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas, gerando produtos citotóxicos, como o malonaldeído, culminando com a morte celular (OLIVIERI *et al.*, 1994; FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Os produtos tóxicos da lipoperoxidação, sejam estes gerados no meio celular ou em alimentos, têm sido relacionados com a patogenia de diversos distúrbios e doenças degenerativas, particularmente a aterosclerose. A peroxidação lipídica contribui para o desenvolvimento de placas de ateroma, que evolui para a aterosclerose (TORRES *et al.*, 1988; STEINBERG *et al.*, 1989), um dos principais fatores de risco da doença isquêmica do coração, a principal causa de óbito registrada em oito regiões do mundo (MURRAY e LOPEZ,

1997). Por esta razão, os fatores que desencadeiam, bem como os que previnem a peroxidação lipídica são amplamente discutidos e documentados, tendo sido importante objeto de estudo nas últimas décadas (GRAY, 1978; TORRES, 1987; TORRES e OKANI, 1997; FERRARI e TORRES, 2000).

## 1.2 Antioxidantes

O termo antioxidante se refere a qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, atrasa ou inibe consideravelmente a oxidação do substrato (GUTTERIDGE, 1995). THOMAS (2000) refere que o conceito de antioxidação inclui todos os processos que diminuem ou cessam a oxidação de radicais livres. Pode-se dizer que os antioxidantes possuem um papel de vital importância na defesa contra os efeitos prejudiciais dos radicais livres.

### 1.2.1 Mecanismos de ação

SHAHIDI *et al.*, (1992) classificaram os antioxidantes de acordo com o seu modo de ação, dividindo-os em primários e secundários. Os antioxidantes primários possuem basicamente dois mecanismos de ação:

(1) evitam a fase de iniciação da reação pela captação de radicais iniciadores, doando hidrogênio ou elétrons:



A = antioxidante

H = hidrogênio

Entre os compostos que exercem este mecanismo de ação estão os compostos fenólicos (descritos no item 1.2.2.3), tocoferol, carotenóides e alguns aminoácidos (NAMIKI, 1990).

(2) quelam metais catalisadores da oxidação lipídica, inibindo a formação de espécies reativas. O ácido cítrico, alguns compostos fenólicos e aminoácidos parecem possuir este mecanismo (DONNELLI e ROBINSON, 1995). Um exemplo clássico é a reação catalisada pelo ferro:



Os antioxidantes secundários agem na decomposição de peróxidos, convertendo-os à forma inativa, através da captação de espécies reativas, como o radical peroxila ( $\text{ROO}^{\cdot}$ ) e alcoxila ( $\text{RO}^{\cdot}$ ):



Alguns compostos fenólicos e aminas atuam através deste mecanismo (NAMIKI, 1990).

### 1.2.2 Antioxidantes em sistemas biológicos

O desenvolvimento de sistemas naturais de defesa antioxidante pelo organismo está relacionado ao processo evolutivo da vida anaeróbica para a aeróbica. Os primeiros organismos vivos sobre a Terra eram essencialmente anaeróbios; sua evolução para a forma de vida aeróbica envolveu a adaptação a maiores níveis de oxigênio. Para que isto fosse possível, foi necessário o desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante contra as propriedades tóxicas do oxigênio (GUTTERIDGE, 1995).

O ar atmosférico é composto, em sua maior parte, por nitrogênio (78%) e oxigênio (21%). Níveis maiores de oxigênio parecem produzir efeitos prejudiciais ao organismo humano (HALLIWELL, 1996). Um desses efeitos foi constatado após o uso de grandes concentrações de oxigênio no tratamento de bebês prematuros, provocando danos na retina e, em casos mais severos, cegueira (Anonymus, 1991).



De acordo com NAMIKI (1990), o radical hidroxila tem papel importante na toxicidade do oxigênio, pela sua capacidade em provocar reações que levam à cisão na cadeia de DNA (ácido desoxiribonucleico), cujos efeitos podem causar mutagênese e carcinogênese.

GERSCHMAN *et al.* (1954) sugeriram que o efeito tóxico do oxigênio poderia ser atribuído à formação do radical superóxido, e desta hipótese surgiu a “teoria da toxicidade do superóxido”, ou seja, do oxigênio em sua forma reduzida. O desenvolvimento de um sistema natural de defesa com a participação da enzima superóxido dismutase (SOD) reforça esta hipótese. A ação desta enzima é essencial para a proteção da célula contra o dano causado pelo radical superóxido (FRIDOVICH, 1986), ou seja, esta enzima atua como um antioxidante endógeno.

Os sistemas naturais de defesa incluem compostos com ação antioxidante sintetizados no organismo humano (HALLIWELL, 1996). Estes sistemas incluem: (1) enzimas e seus substratos: superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase, catalase e glutathione reduzida; estas substâncias atuam removendo radicais superóxido, hidropéroxido, peróxido e espécies reativas de nitrogênio, como o ONOO<sup>-</sup> (BECKMAN *et al.*, 1994, citado por HALLIWELL, 1996, p.37); (2) sistema de seqüestro de íons de metais catalisadores: algumas biomoléculas formam complexos com metais, como a transferrina, que se liga ao ferro, bloqueando sua ação como catalisador de reações oxidativas.

### **1.2.3 Antioxidantes em alimentos**

Basicamente, há duas formas em que os antioxidantes podem ser encontrados em alimentos: adicionados por processamento tecnológico ou como constituinte natural. Quando adicionado, é considerado um aditivo, e em geral é empregado para preservar a qualidade sensorial de alimentos que contém lipídios.

### 1.2.3.1 Antioxidantes como aditivos

As embalagens à vácuo e sob atmosfera modificada são recursos que excluem o oxigênio, sendo portanto utilizados para prolongar a vida útil dos alimentos, uma vez que previnem a oxidação lipídica. Entretanto, estes meios não asseguram a exclusão total de oxigênio, e bastam quantidades mínimas para iniciar o processo oxidativo. Portanto, a combinação destes métodos com o uso de antioxidantes é meio mais indicado para conservar as propriedades qualitativas dos alimentos (NAMIKI, 1990).

Por sua eficácia em reduzir o impacto negativo dos processos oxidativos sobre as características sensoriais dos alimentos, os antioxidantes têm sido aplicados como aditivos pela indústria alimentícia há várias décadas. Desse modo, é possível controlar fatores indesejáveis, como o desenvolvimento de sabor e aroma (flavor) de requentado, resultante da oxidação lipídica (PEARSON *et al.*, 1977). Quanto à procedência, os antioxidantes podem ser sintéticos ou naturais.

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados atualmente são: BHA (butil-hidroxi-anisol), BHT (butil-hidroxi-tolueno), galato de propila (PG) e TBHQ (terci-butil-hidroquinona) (DORKO, 1994).

Se por um lado estes compostos possibilitaram melhor controle da qualidade dos alimentos, fatores também relacionados à qualidade suscitaram polêmica, devido a possíveis efeitos tóxicos provocados pelo seu consumo. Segundo MARTIN e GILBERT (1968) e HALLADAY *et al.* (1980), o BHA e BHT causaram hepatomegalia e alterações na atividade das enzimas do fígado e intestino de ratos. Estes antioxidantes são largamente empregados pela indústria alimentícia em óleos, gorduras, salgadinhos e produtos cárneos (FERRARI e TORRES, 2000). Em função da preocupação por alimentos mais seguros, uma das tendências consiste em pesquisas com a finalidade de viabilizar a substituição de antioxidantes sintéticos por naturais (ECONOMOU *et al.*, 1991).

Quanto aos compostos naturais empregados como antioxidantes, os mais utilizados são: ácido cítrico, ácido ascórbico e palmitato de ascorbila (DORKO, 1994). Muitas outras substâncias de origem vegetal têm sido propostas com a mesma finalidade, entre as quais se incluem: especiarias

(CHIPAULT *et al.*, 1952), sementes de frutas cítricas (PEREIRA, 1996) e microalgas (MIRANDA, 1997).

### **1.2.3.2 Fontes naturais de antioxidantes**

Os organismos vivos, incluindo as plantas, sofrem exposição ao radical hidroxila (OH<sup>•</sup>), uma vez que este é gerado durante o processo de divisão da molécula de água, induzido pela radiação ambiental. A presença de antioxidantes em plantas se deve, portando, a um mecanismo de defesa natural desenvolvido para minimizar os efeitos prejudiciais de agentes agressores, como o radical hidroxila (HALLIWELL, 1996).

Entre os componentes bioativos dos alimentos, o grupo dos antioxidantes é considerado um dos mais relevantes, e cada vez mais tem merecido a atenção da comunidade científica.

Um dos aspectos importantes diz respeito às recomendações de quantidades de antioxidantes a serem ingeridos habitualmente. Entretanto, o estágio atual de conhecimento acerca destes componentes é ainda precoce para se definir seus níveis seguros de consumo. Nos Estados Unidos, foi formado um grupo de estudos para discutir especificamente questões sobre a ingestão diária recomendada (Dietary Reference Intakes – DRI) dos “antioxidantes alimentares”, assim denominados pelo grupo, que propôs a seguinte definição: “Um antioxidante alimentar é uma substância presente em alimentos que diminui significativamente os efeitos adversos das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, ou ambas, em condições normais de funcionamento fisiológico em humanos” (INSTITUTE OF MEDICINE, 1998).

Entre os componentes naturais de plantas capazes de agir como antioxidantes se incluem: vitamina E, vitamina C, β-caroteno e outros carotenóides, alguns minerais (principalmente os que constituem enzimas, como o selênio) e compostos fenólicos, cujo significado nutricional é discutido no próximo item.

### **1.2.3.3 Compostos fenólicos: antioxidantes de origem vegetal**

Quantitativamente, os compostos fenólicos são os antioxidantes mais representativos, e podem ser quimicamente definidos como substâncias que possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas; podem também apresentar outros grupos substituintes em sua estrutura, como ésteres, metil-ésteres e glicosídeos (MARTINEZ-VALVERDE *et al.*, 2000).

Mais de 8000 compostos fenólicos foram identificados; quando formam estruturas poliméricas, são também conhecidos como polifenóis. De acordo com HARBONE (1989), as classes de fenóis ou polifenóis com maior significado para a saúde são:

- fenóis, ácidos fenólicos e ácidos fenil acéticos
- ácidos cinâmicos, cumarinas, isocumarinas e cromonóis
- lignanos e neolignanos
- flavonóides
- taninos

Alguns polifenóis, como os taninos, são considerados antinutrientes por formarem complexos com proteínas, amidos e enzimas digestivas, reduzindo a digestibilidade e portanto o valor nutricional dos alimentos (DREOSTI, 2000). Entretanto, a descoberta do grande potencial destes compostos como antioxidantes estimulou a realização de inúmeros estudos, desde levantamentos epidemiológicos até investigações a nível molecular.

As fontes alimentares de polifenóis foram investigadas. De acordo com SCALBERT e WILLIAMSON (2000), os flavonóides correspondem aproximadamente a dois terços do total de compostos fenólicos normalmente ingeridos no padrão dietético ocidental; os ácidos fenólicos representam o terço restante. Esse estudo concluiu que as frutas e algumas bebidas, como vinho, suco de frutas, chá, café e chocolate, são as principais fontes alimentares de compostos fenólicos.

### **1.2.4 Avaliação da atividade antioxidante**

Diversos métodos podem ser aplicados para avaliar a capacidade antioxidante de substâncias bioativas em alimentos ou componentes

alimentares. Técnicas *in vitro* são normalmente empregadas, e entre as mais utilizadas estão aquelas que quantificam subprodutos da oxidação lipídica, que variam de simples avaliações organolépticas à análises químicas e físicas (GRAY, 1978; SILVA *et al.*, 1999).

O método do tiocianato férrico utiliza um sistema químico para quantificar produtos primários da oxidação lipídica, ou seja, hidroperóxidos; estes, por sua vez, oxidam o íon ferroso a íon férrico (ALLINGER *et al.*, 1997).



O íon férrico, ao reagir com o tiocianato de amônio forma o tiocianato férrico, gerando compostos de cor vermelha, que são dosados por colorimetria. As amostras que apresentarem baixos valores de absorbância indicarão alto nível de atividade antioxidante (KIKUZAKI e NAKATANI, 1993). Portanto, o potencial antioxidante do composto em estudo é avaliado pela sua capacidade em inibir a oxidação lipídica.

Dois estudos que aplicaram este método em vinhos obtiveram bons resultados, indicando que esta técnica pode ser reproduzida em bebidas (LARRAURI *et al.*, 1996; SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1999).

Outro método colorimétrico, denominado poder redutor, consiste na verificação da capacidade dos compostos em doar elétrons – desse modo, é possível converter os radicais livres a produtos mais estáveis, interrompendo a reação em cadeia. Neste processo, o ferricianeto –  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  – é reduzido a ferrocianeto –  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ , que reage com íons férrico produzindo coloração esverdeada, cuja concentração é determinada espectrofotometricamente. Ao contrário do método anterior, o aumento nos valores de absorbância indica o poder redutor das amostras (YEN e CHEN, 1995). JAYAPRAKASHA *et al.* (2001) comprovaram, através deste método, um alto nível de atividade antioxidante em extratos de sementes de uva (*Vitis vinifera*).

Estudos comparativos entre vinhos tintos e brancos, com relação ao potencial antioxidante, foram realizados em diversos países, com diferentes tipos de vinhos. VINSON e HONTZ (1995) concluíram que o vinho tinto

possui atividade antioxidante significativamente maior que o vinho branco, dado este consistente com diversos outros relatos (FRANKEL *et al.*, 1995; SIMONETTI *et al.*, 1997; JAMROZ e BELTOWSKI, 2001). CAMPOS e LISSI (1996) investigaram as propriedades antioxidantes de vinhos chilenos, comparando tintos, rosados e brancos; o potencial antioxidante variou conforme a intensidade da cor, ou seja, os tintos foram mais efetivos que os rosados, e estes mais do que os brancos. Estes dados sugerem que há uma correlação positiva entre teor de fenólicos (que é maior em vinhos tintos), e atividade antioxidante, quando são comparados diferentes tipos de vinhos. A quantidade total de compostos fenólicos na amostra pode ser medida colorimetricamente, e foi proposta por SINGLETON e ROSSI em 1965; desde então, esta técnica tem sido amplamente utilizada, nos mais diversos tipos de alimentos ou constituintes alimentares de origem vegetal.

### **1.3 Estresse oxidativo**

Em condições em que há excesso de ERO e ERN, e deficiência no sistema de defesa, ocorrerá um desequilíbrio entre agentes agressores e defensores, caracterizando o estresse oxidativo. Em consequência, ocorrem modificações na função e na estrutura celular, causando, lenta e progressivamente, alterações nos tecidos e no código genético. FERREIRA e MATSUBARA (1997) salientam que as ERO podem ser causa ou consequência de doenças humanas associadas ao estresse oxidativo, muitas delas doenças crônicas não transmissíveis, já citadas anteriormente.

Uma das fortes tendências para combater o estresse oxidativo e a oxidação lipídica consiste no consumo de alimentos fontes de antioxidantes (HALLIWELL *et al.*, 1995).

### **1.4 Alimentos Funcionais**

O crescente interesse na aplicação de terapias preventivas contra a instalação de doenças crônicas, levando a um envelhecimento mais

saudável, tem incentivado inúmeros pesquisadores a explorar os possíveis fatores de risco, estejam estes relacionados a fatores biológicos (genética), ou ambientais (estilo de vida), e como estes fatores se relacionam entre si.

Evidências recentes associaram o consumo de dietas ricas em frutas e verduras com a redução do risco de doenças de alta prevalência em países do ocidente; ou seja, o consumo habitual destes alimentos, quando comparado ao seu baixo consumo, pode reduzir em até 50% o risco de doenças crônicas. Os efeitos protetores destes alimentos têm sido atribuídos à presença de constituintes bioativos, que equilibram ou modulam o metabolismo, auxiliando a reduzir o risco de doenças futuras (LAJOLO, 2000). O grupo mais representativo destes constituintes é o dos fitoquímicos, definidos por CRAIG (1997) como toda substância química biologicamente ativa que ocorre naturalmente em plantas.

Entre as observações médicas e científicas que sugeriram a influência dos fitoquímicos na promoção da saúde, se incluem: abordagens médicas tradicionais, pesquisas epidemiológicas, intervenções e experimentos controlados em humanos, estudos laboratoriais com animais, investigações a nível celular (organelas), e experimentos químicos (BEECHER, 1999).

DIPLOCK *et al.* (1999) e ROBERFROID (2000) ressaltaram que um alimento só pode ser considerado como funcional se os seus benefícios sobre uma ou mais funções orgânicas, além de seus valores nutricionais (inerentes à composição química), forem cientificamente demonstrados, tanto para a manutenção da saúde e bem-estar quanto para a redução de riscos de doenças.

A idéia de agrupar estes alimentos em uma categoria especial surgiu nos anos 80, no Japão, através de propostas que relacionavam duas questões principais: o aumento da longevidade e os altos índices de doenças crônicas na população idosa. Em 1991, o governo japonês regularizou a legislação referente a este grupo distinto de alimentos, que passou a ser chamado de “Foods for Special Health Use” (FOSHU) (LAJOLO, 2000).

Os achados médicos e científicos, somados aos recentes avanços no campo da tecnologia de alimentos e ingredientes alimentares, provocaram

um processo de mudança na ciência da nutrição – se antes o consumo dos alimentos era focado na prevenção de carências nutricionais, hoje eles representam promoção de saúde e menor risco de desenvolver doenças (HARDY, 2000; ROBERFROID, 2000). A Organização Mundial da Saúde recomenda o consumo diário de pelo menos 400 gramas de frutas e verduras, incluindo pelo menos 30 gramas de leguminosas, nozes, grãos e sementes (WHO, 1990).

Atualmente o grande desafio neste campo de estudo tem sido o de esclarecer questões ainda pouco consistentes, como os fatores que afetam a biodisponibilidade e a atividade antioxidante destes compostos bioativos (DREOSTI, 2000; SCALBERT e WILLIAMSON, 2000). Neste sentido, há um crescente interesse nos potenciais efeitos benéficos de certos alimentos e bebidas, em especial o vinho.

## **1.5 Vinho: aspectos culturais, científicos e de saúde pública**

### **1.5.1 Histórico**

Não se sabe precisamente onde e quando se deu a origem do vinho, mas alguns registros históricos indicam que foi há cerca de 6000 anos, no Oriente, na região do Cáucaso, onde se localizam atualmente a Georgia e a Armênia (SOLEAS *et al.*, 1997). Desde então, o vinho tem sido parte da história da humanidade, sendo utilizado para os mais diversos fins, desde religiosos até medicinais. No Egito, o vinho era primordial em rituais de celebração às entidades divinas, sendo também usado para purificar o altar e a vítima nos sacrifícios religiosos. Na liturgia católica, o vinho faz parte da celebração da missa, representando o sangue de Cristo, filho de Deus (ALBERT e FEDERICO, 2002). Gregos e romanos consideravam a uva, matéria prima do vinho, um alimento afrodisíaco, sendo então componente comum no cardápio de banquetes. Hipócrates, Galeno e Celsius, eminentes médicos da antiguidade, exaltaram as propriedades medicinais do vinho,



que foi descrito, entre outras funções, como um componente importante no preparo de antídotos de venenos (JOHNSON, 1989).

Do Cáucaso, a cultura do vinho se instalou na Grécia, onde se verificou um notável desenvolvimento da viticultura na Europa.

No Brasil, o marco inicial se deu em 1532, quando Martim Afonso de Souza desembarcou em São Vicente, cidade litorânea paulista, trazendo consigo algumas cepas de *Vitis vinifera*, uva de origem européia. Entretanto, apenas no século XIX, com a presença de imigrantes italianos e alemães na Região Sul do país, é que foi impulsionada a viticultura brasileira (LONA, 2001).

Apesar de ser produzido há milênios, o processo de fermentação do vinho somente foi compreendido no século XIX, a partir das descobertas dos microrganismos, por Louis Pasteur (1822-1895), fato este de fundamental importância para o desenvolvimento da enologia moderna (JOHNSON, 1989).

A elaboração dos vinhos no mundo tomou novos rumos a partir do século XX, com a evolução de recursos tecnológicos aplicados à viticultura e enologia, entre os quais se incluem: cruzamento genético de diferentes cepas de uvas, desenvolvimento de cepas de leveduras selecionadas geneticamente, colheita mecanizada, fermentação "a frio" na elaboração dos vinhos brancos, entre outros (ALBERT e FEDERICO, 2002).

### **1.5.2 Tipos de vinho, produção e consumo**

A uva é o fruto da videira ou vinha, planta que possui a seguinte classificação botânica (MACRAE *et al.*, 1993):

- Ordem: Ramnidea
- Família: Vitacea
- Sub-família: Ampelidea
- Gênero: *Vitis*
- Sub-gênero: *Euvitis*

- Espécies: *Vitis vinifera*, *Vitis labrusca*, *Vitis rupestris*, *Vitis aestivalis*, *Vitis riparia*, *Vitis cinerea*.

Cada uma dessas espécies possui diferentes variedades, denominadas cepas ou castas. As uvas que originam os melhores vinhos são da espécie *Vitis vinifera*, de origem européia, que possui inúmeras castas, entre as quais se destacam: Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Syrah e Chardonnay. As demais espécies são de origem americana e, em geral, não são adequadas para a elaboração de vinhos, prestando-se mais como uvas de mesa e suco. Essas espécies também possuem muitas variedades, cujos melhores exemplos no Brasil são a Niágara e Isabel, que até a década de 80 eram as únicas castas utilizadas na elaboração dos vinhos brasileiros (LONA, 2001). Embora a qualidade dos vinhos brasileiros tenha evoluído positivamente, ainda são produzidos vinhos com a espécie americana *Vitis labrusca*, em função do seu menor custo, e, apesar da qualidade inferior, são bastante populares entre consumidores de baixo poder aquisitivo.

As uvas são as frutas mais cultivadas no mundo (cerca de 65 milhões de toneladas/ano), e aproximadamente 80% do total produzido são usados na produção de vinhos. A Europa concentra a maior parte do cultivo de uvas, e somente três países europeus – Itália, França e Espanha – respondem por cerca de 40% da produção mundial de uvas (MAZZA, 1995).

O vinho é o produto resultante da fermentação dos açúcares do suco da uva sã, fresca e madura, por ação de leveduras. Quanto à coloração, o vinho mais consumido no Brasil e no mundo é o tinto, embora o branco e o rosado (ou rosé) sejam também apreciados. A qualidade do vinho resulta basicamente de quatro elementos: a cepa, o solo, condições climáticas e o processo de vinificação (ALBERT e FEDERICO, 2002).

A determinação da cor dos vinhos depende do processo de elaboração, e nem sempre da cor da uva. Por exemplo, os vinhos brancos podem ser elaborados tanto a partir de uvas tintas quanto brancas, já que na sua produção não ocorre o contato com a casca da fruta, onde estão presentes pigmentos intensamente coloridos, denominados antocianinas,

responsáveis pela coloração azul, violeta e vermelho de diversos vegetais (MAZZA, 1995). Isto justifica a cor dos vinhos tintos, cuja produção inclui a maceração, etapa onde as uvas são prensadas juntamente com as cascas, e este procedimento dura, em média, de quatro a cinco dias. Já na elaboração dos vinhos rosados, são empregadas uvas tintas, onde as cascas permanecem em contato com o líquido somente algumas horas, até a aquisição da cor rosada desejada (LONA, 2001).

Quanto ao teor de açúcar, os vinhos brasileiros normalmente seguem a seguinte denominação (BRASIL, 1990):

- seco: de 3 a 5 gramas/litro
- *demi-sec* (ou semi-seco): 5 a 20 gramas/litro
- suave: teor maior do que 20 gramas/litro.

A maior parte da produção de vinhos nacionais, isto é, 92%, se concentra no estado do Rio Grande do Sul, especialmente na região da Serra Gaúcha, considerada o centro da vitivinicultura brasileira, não só pela quantidade, mas também pela qualidade dos vinhos produzidos; nesta região, os principais municípios produtores são: Bento Gonçalves, Caxias do Sul e Garibaldi. Os 8 % da produção restante são produzidos no Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Minas Gerais (VIOTTI, 2002).

Em termos de produção e consumo, o Brasil está longe de atingir os níveis europeus, embora a procura por vinhos nacionais, especialmente os de melhor qualidade, tenha crescido muito nos últimos anos (ALBERT e FEDERICO, 2002). De acordo com a UVIBRA - União dos Vitivinicultores do Brasil (1994), os estados brasileiros que mais consomem vinhos são:

- Rio Grande do Sul: 4,8 litros per capita / ano;
- São Paulo: 3,95 litros per capita / ano;
- Paraná: 3,20 litros per capita / ano.

### **1.5.3 Composição química**

Mais de 500 compostos foram reconhecidos no vinho, entretanto, apenas alguns são responsáveis pela sua estabilidade e características sensoriais, entre os quais se incluem (SOLEAS *et al.*, 1997):

- **Água:** constituinte predominante em uvas e vinhos, essencial na maioria das reações químicas envolvidas na fermentação e envelhecimento do vinho;
- **Açúcares:** glicose e frutose são os principais açúcares; estes, fornecem a energia metabólica para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, necessária para o processo de fermentação do vinho; a sacarose raramente é encontrada em espécies *Vitis vinifera*.
- **Polissacarídeos:** pectinas e  $\beta$ -glucans estão presentes em pequenas quantidades nos vinhos, e são extraídas durante a fase da maceração;
- **Etanol:** álcool mais importante e mais abundante em vinhos, atinge a concentração média de 10 a 13%. É crucial para a estabilidade, maturação e propriedades sensoriais do vinho, atuando como um dos componentes principais na formação de compostos voláteis. Outros álcoois presentes em menores quantidades no vinho são: metanol, 1-propanol e 3-metil-1-butanol;
- **Ácidos:** podem ser divididos em duas categorias: voláteis e não voláteis. O componente volátil mais comum em vinhos é o ácido acético. Os não voláteis são representados pelos ácidos carboxílicos, como o ácido cítrico, que controlam o pH do vinho;
- **Compostos fenólicos:** conforme citados no item 1.2.3.3, constituem uma grande classe de compostos químicos, que ocorrem naturalmente em vegetais. Em vinhos, influenciam as propriedades sensoriais (cor, aroma, adstringência e “corpo”) e vida útil – em função de seus efeitos bactericidas, os fenólicos do vinho são essenciais no seu envelhecimento (LEE e JAWORSKI, 1987, citados por SHAHIDI e NACZK, 1995, p.136). A composição dos fenólicos do vinho depende do tipo de uva usada para a vinificação, sua extração, procedimentos empregados na produção do vinho e das reações que ocorrem durante o envelhecimento (MACHEIX e SAPIS, 1990). O contato entre o mosto (líquido resultante da prensagem das uvas) e o barril de madeira, bem como o tipo de madeira, justificam a presença de

certos fenólicos no vinho. Alguns fenóis simples, certos flavonóides e taninos podem ser passados da madeira para o vinho. A fermentação de substâncias não fenólicas, a solubilização e extração de fenólicos pelo etanol também influenciam o perfil dos fenólicos da bebida (SINGLETON, 1992, citado por SHAHIDI e NACZK, 1995, p.137). Os principais fenólicos identificados em uvas e vinhos podem ser divididos em duas classes principais: flavonóides e não flavonóides, conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Principais compostos fenólicos em uvas e vinhos (adaptado de: FRANKEL *et al.*, 1995 e SOLEAS *et al.*, 1997).

Flavonóides	Não flavonóides
Flavonóis. Exemplos: quercetina, kaempferol, miricetina.	Ácidos benzóicos. Exemplos: ácido vanílico, ácido gálico, taninos hidrolizáveis
Antocianinas. Exemplos: cianina, delphinina, peonina, malvina	Benzaldeídos. Exemplos: vanilina, siringaldeído
Flavan-3-óis. Exemplos: catequina, epicatequina, galocatequina, procianidinas, taninos condensados	Ácidos cinâmicos. Exemplos: ácido P- cumárico, ácido ferúlico, ácido clorogênico, ácido cafeico
	Cinamaldeídos. Exemplos: coniferaldeído, sinapaldeído
	Tirosol
	Resveratrol

Os flavonóides (figura 1) representam o maior grupo de polifenóis encontrados em alimentos (SCALBERT e WILLIAMSON 2000), além de serem considerados os mais potentes antioxidantes entre os compostos fenólicos (SHAHIDI *et al.*, 1992). São solúveis em água e solventes orgânicos, sendo mais comumente encontrados na forma de glicosídeos.

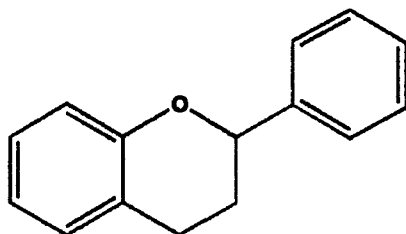


Figura 1. Estrutura química básica de um flavonóide: C6-C3-C6 (RICE-EVANS *et al.*, 1996).

Em vinhos, sub-classes de flavonóides (antocianinas, flavonóis e catequinas) determinam suas características aromáticas (AMERINE e OUGH, 1988).

Os ácidos fenólicos, especialmente os taninos, contribuem com a adstringência do vinho (AMERINE e OUGH, 1988).

O resveratrol é uma fitoalexina presente na casca da uva, sendo, portanto, praticamente inexistente na composição de vinhos brancos (FRANKEL *et al.*, 1995).

#### 1.5.4 Vinho e saúde

É antiga a crença nas propriedades benéficas do vinho em relação à prevenção de doenças e manutenção da saúde. Mas só recentemente esta teoria ganhou importância no meio científico, graças à evolução da ciência e da tecnologia, o que possibilitou a análise do comportamento de substâncias bioativas em nível molecular. A demanda pela ampliação do conhecimento nesta área fez surgir um novo campo de estudo – a biologia molecular, que hoje é reconhecida como um instrumento imprescindível na compreensão da complexa interação entre nutrientes conhecidos, compostos alimentares bioativos (talvez uma nova classe de nutrientes) e fisiologia humana.

Diversos achados epidemiológicos apresentaram uma forte correlação negativa entre consumo moderado de vinho tinto e incidência de doenças cardiovasculares (ST LEGER *et al.*, 1979; RENAUD e DE

LORGERILL, 1992; HERTOOG *et al.*, 1993; KNEKT *et al.*, 1996) e cerebrovasculares (TRUELSEN *et al.*, 1998). Destes estudos, um dos mais notórios foi o realizado por RENAUD e DE LORGERILL (1992), que investigaram os hábitos referentes ao estilo de vida da população francesa, que apresenta elevados índices de tabagismo, sedentarismo e, especialmente, alto consumo de gordura saturada, três conhecidos fatores de risco para doenças cardíacas coronarianas; contudo, esta população apresenta apenas um terço da incidência destas doenças em relação à população americana, fato este que ficou conhecido como “o paradoxo francês” (RENAUD e DE LORGERILL, 1992). Este paradoxo tem sido atribuído, em grande parte, ao consumo habitual de vinho tinto que, em comparação com outras bebidas alcoólicas, possui um teor de compostos fenólicos significativamente maior (MÉRILLON *et al.*, 1997); KLURFELD e KRITCHEVSKY (1981), citados por SOLEAS *et al.* (1997, p. 296) comprovaram, em um estudo com coelhos, a superioridade do vinho tinto em relação a cinco outras bebidas alcoólicas na prevenção da aterosclerose. Uma explicação plausível está na capacidade destes compostos em atuar como antioxidantes, inibindo a formação de óxidos de colesterol, produtos da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade, ou LDL (low density lipoprotein) colesterol. Um número cada vez maior de evidências aponta para a oxidação destas lipoproteínas como o principal fator responsável pela promoção da aterogênese. Ou seja, o colesterol, na forma de LDL, torna-se aterogênico por oxidação (VINSON e HONTZ, 1995).

Segundo a teoria corrente, o início da lesão aterosclerótica ocorre no endotélio (epitélio que reveste o coração e os vasos sanguíneos); neste processo, há afluxo de macrófagos que, quando ativados, liberam radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e enzimas hidrolíticas, que provocam a lesão de células vizinhas. Esta lesão pode ser exacerbada pela fumaça do cigarro que, por ser rica em ferro, catalisa a oxidação do LDL colesterol. Tal oxidação estimula a internalização destas lipoproteínas nos macrófagos, os quais, conseqüentemente, se convertem em células espumosas, contribuindo para a formação da placa de ateroma; esta, ao se romper, leva à formação de um coágulo ou trombo, cuja presença pode provocar a

interrupção do fluxo sanguíneo, caracterizando a trombose, responsável por mais de 90% das mortes por doenças coronarianas isquêmicas (STEINBERG *et al.*, 1989; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990, citados por FERREIRA e MATSUBARA, 1997; KINSELLA *et al.*, 1993; MÉRILLON *et al.*, 1997).

FRANKEL *et al.* (1993) demonstraram, através de um estudo *in vitro*, que os compostos fenólicos extraídos do vinho tinto inibem a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade, dado este consistente com outras abordagens, como: experimentos controlados em humanos (FUHRMAN *et al.*, 1995), estudos laboratoriais com animais (LUZ *et al.*, 1999), investigações em nível celular (TEISSEDRE *et al.*, 1996), entre outros.

O mecanismo vascular mediado por compostos fenólicos do vinho tinto constitui, também, um dado relevante, uma vez que estes inibiram a síntese da endotelina-1, um peptídeo vasoativo que possui papel crucial no desenvolvimento da aterosclerose (CORDER *et al.*, 2001).

Experimentos *in vitro* e *in vivo* sugeriram que a agregação plaquetária, importante fator de risco para coronariopatias, é inibida pelo resveratrol (WANG *et al.*, 2002), e pelos flavonóides quercetina e catequina (PIGNATELLI *et al.*, 2000).

Outras propriedades farmacológicas foram atribuídas ao fenólicos do vinho, como descrito abaixo:

- Proteção contra disfunções neurológicas, exercida pelo resveratrol (SUN *et al.*, 2002);
- Efeito anti-inflamatório e imunomodulador do flavonóide quercetina, inibindo a ação inflamatória da citocina e influenciando a produção de óxido nítrico (CHO *et al.*, 2003);
- Ação anticancerígena, através de diversos mecanismos, como a inibição do crescimento de células tumorais e apoptose (ou morte celular programada). Tais efeitos têm sido atribuídos principalmente à quercetina (WEI *et al.*, 1994) e catequina (STAVRIC, 1994).



#### **1.5.4.1 A questão do álcool**

Já está bem estabelecido que o consumo moderado de bebida alcoólica produz efeito cardioprotetor, principalmente pelo aumento dos níveis de HDL colesterol, fator de risco negativo para doenças cardiovasculares. Este efeito parece ser exercido pelo etanol, independentemente do perfil de compostos fenólicos existentes na bebida (GAZIANO *et al.*, 1993; KLATSKY, 1996; PACE-ASCIAC *et al.*, 1996). Alguns estudos sugeriram a existência de um sinergismo entre os dois componentes, ou seja, o etanol e os constituintes fenólicos atuam em conjunto na proteção contra doenças coronarianas isquêmicas (DCI) (GOLDBERG *et al.*, 1996; CHAN *et al.*, 2000).

Apesar dos dados convergirem para o efeito protetor do etanol contra DCI, é importante salientar que o consumo excessivo de álcool, ou a associação do consumo de álcool a alguns fatores de risco, pode inverter esta correlação (KLATSKY *et al.*, 1974). Portanto, é razoável presumir que profissionais da área de saúde devem adotar uma conduta cautelosa quanto à possibilidade de recomendar o uso de bebidas alcoólicas – caso isto seja feito, deve ser enfatizada a importância da moderação na dose ingerida.

O consumo moderado de álcool pode ser definido como sendo a ingestão máxima de 59,2 g de álcool por dia. Isto equivale a 394 mL de vinho (aproximadamente meia garrafa) com 15% de graduação alcoólica, ou 1184 mL de cerveja (quase duas garrafas) com 5% de álcool, ou ainda 118,4 mL de bebidas destiladas (duas doses) com teor alcoólico de 50% (KLATSKY, 1990).

#### **1.6 Outros derivados da uva**

Considerando o amplo espectro de ação bioquímica dos compostos fenólicos do vinho e, em contrapartida, a preocupação em não se estimular o alcoolismo, uma das tendências atuais consiste na busca de fontes alternativas destes compostos, isentas de álcool; entre as possibilidades, se

incluem: sucos de uva, extratos e suplementos de sementes e cascas de uva (DURAK *et al.*, 1999; JAYAPRAKASHA *et al.*, 2001).

Há diversos estudos comparando os efeitos biológicos, especialmente na proteção celular contra os danos oxidativos, entre sucos de uva e vinhos, e os resultados são conflitantes. Alguns indicaram que o potencial antioxidante do suco de uva é equivalente ao do vinho tinto (DURAK *et al.*, 1999; VINSON *et al.*, 2001), enquanto outros evidenciaram o contrário, ou seja, o efeito antioxidante do vinho tinto não é reproduzido por sucos de uva (GOLDBERG *et al.*, 1996; MIYAGI *et al.*, 1997; SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1999). Tais controvérsias apontam para a necessidade de outros estudos comparativos sobre a atividade antioxidante destas bebidas. Além disso, embora haja inúmeros estudos com vinhos e sucos disponíveis na literatura mundial, são precárias as informações relatando as propriedades antioxidantes de vinhos e sucos de uva brasileiros.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

- Avaliar a atividade antioxidante de diferentes tipos e marcas de vinhos e sucos de uva brasileiros.

### **2.2 Específicos**

- Determinar o teor de fenólicos totais nas bebidas selecionadas e comparar os valores entre os diferentes tipos e marcas;
- Avaliar a atividade antioxidante através de dois métodos *in vitro*: inibição da oxidação lipídica e poder redutor, e comparar os resultados entre os diferentes tipos e marcas;
- Avaliar a correlação entre o teor de fenólicos totais e os dois métodos de avaliação da atividade antioxidante.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Materiais**

##### **3.1.1 Solventes e reagentes**

Os solventes e reagentes utilizados nos experimentos eram de qualidade analítica, e tiveram as seguintes procedências: Sigma Aldrich Brasil Ltda; Merck S.A. Produtos para Laboratório Ltda; Synth-Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda; Dinâmica Química Contemporânea Ltda; Quimex Produtos Químicos Ltda.

##### **3.1.2 Amostragem**

Foi feito um levantamento das marcas mais vendidas de vinhos tinto, rosé, branco e sucos de uva, nas quatro maiores redes de hipermercados da cidade de São Paulo. As amostras foram adquiridas nestes mesmos locais. Foram incluídos neste estudo 8 tipos diferentes de bebidas, apresentadas na Tabela 2.

De acordo com VINSON *et al.* (2001a), o número de amostras para este tipo de estudo deve variar de 2 a 6. Em função da considerável variedade de amostras (8 tipos de bebidas, 10 marcas diferentes), optou-se por trabalhar com 2 amostras de cada marca. Para os tipos vinho tinto suave e suco de uva, foram utilizadas 2 marcas diferentes; quanto aos demais, uma marca para cada tipo foi adquirida, ou seja, foram avaliadas 10 marcas diferentes de bebidas. Como foram adquiridas 2 amostras de cada marca (do mesmo lote), foram incluídos neste estudo um total de 20 amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 2. Tipos de bebida, uvas empregadas na produção, teor de açúcar e ano de safra.

Tipo de bebida	Sigla <sup>1</sup>	Espécies de uva	Safra	Teor de açúcar <sup>4</sup> (%)	Teor Alcoólico (%)
Vinho tinto suave (n=4)	VT1	<i>Vitis labrusca</i>	2002	5,0	10,6
	VT2	(ambas as marcas)	2002	9,0	11,0
Vinho tinto <i>demi-sec</i> (n=2)	VT3	<i>Vitis vinifera</i> , variedade: Cabernet Sauvignon	2001	0,5 – 0,6	11,0
Vinho tinto seco (n=2)	VT4	<i>Vitis vinifera</i> , variedades: Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir e Alicante Bouschet	2001	0,25	11,5
Vinho rosé suave (n=2)	VR1	<i>Vitis vinifera</i> , variedades: Gamay Bejoaulais e Napa Gamay	2001	3,5	11,5
Vinho rosé <i>demi-sec</i> (n=2)	VR2	<i>Vitis vinifera</i> , variedade: empresa não informou	2001	1,5	10,3
Vinho branco suave (n=2)	VB1	<i>Vitis labrusca</i>	2002	6,0	11,0
Vinho branco <i>demi-sec</i> (n=2)	VB2	<i>Vitis vinifera</i>	2002	1,5	11,5
Suco de uva (n=4)	S1	Fabricantes	2003 <sup>3</sup>	11,0	-
	S2	não informaram <sup>2</sup>	2003 <sup>3</sup>	15,5	-

<sup>1</sup> duas siglas diferentes para o mesmo tipo de bebida representam marcas diferenciadas, onde n=2 para cada marca.

<sup>2</sup> segundo os produtores, informações sobre a matéria prima utilizada (qualidade e quantidade) são confidenciais.

<sup>3</sup> ano de fabricação.

<sup>4</sup> informação fornecida pelos fabricantes.

As marcas das bebidas, bem como suas respectivas procedências, estão relacionadas no ANEXO 1.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Determinação do resíduo seco**

Amostras de 50 mL foram coletadas em cápsulas de porcelana, de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Antes de serem levadas à estufa, as amostras (com exceção dos sucos) foram colocadas em banho-maria, a 100°C, por 40 minutos, para evaporar o álcool e parte da água. O resíduo seco foi determinado secando-se as amostras concentradas (parcialmente evaporadas) em estufa a 105°C, por 16 horas (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1999), seguido de resfriamento em dessecador e pesagem.

### **3.2.2 Quantificação dos compostos fenólicos**

A obtenção do total de compostos fenólicos presentes nos vinhos e sucos foi realizada pelo método desenvolvido por SINGLETON e ROSSI (1965), com o reagente Folin-Ciocalteu. Este método colorimétrico baseia-se na redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico em solução alcalina, e é o mais utilizado para a determinação de compostos fenólicos totais em alimentos. A cor azul produzida pela redução do reagente Folin-Ciocalteu pelos fenólicos é medida espectrofotometricamente, no comprimento de onda de 765 nm. Os procedimentos foram realizados na seguinte sequência: alíquotas de 1 mL da bebida foram diluídas em água deionizada em diferentes proporções, ou seja:

- vinhos tintos = 1:100
- vinhos rosé = 1:20
- vinhos brancos = 1:10
- sucos de uva = 1:100

Em seguida, 2 mL da amostra diluída foram colocados em um tubo de ensaio; 10 mL do reagente Folin-Ciocalteu, previamente diluído em 1:10

(1 mL de reagente + 9 mL de água destilada) foram adicionados. A mistura foi homogeneizada em agitador, e, após 8 minutos e 30 segundos, foram adicionados 8 mL de solução saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (75 g/L). Após agitar novamente, as amostras foram deixadas em repouso à temperatura ambiente, por 2 horas; a medida da absorbância, em comprimento de onda de 765 nm, foi obtida utilizando-se espectrofotômetro UV-visível, marca CECIL, modelo CE 1020 (Cambridge, UK). Para o branco, utilizou-se água destilada. O cálculo do teor de fenólicos foi realizado através da elaboração de curvas padrão, onde o ácido gálico foi utilizado em 5 concentrações diferentes (0,01 a 0,05 mg/mL).

### **3.2.3 Avaliação da atividade antioxidante**

#### **3.2.3.1 Método do tiocianato férrico**

Foi utilizada a metodologia descrita por MITSUDA *et al.* (1966) e OSAWA e NAMIKI (1981), citados por KIKUZAKI e NAKATANI (1993, p.1407).

Procedimentos: 1 mL de amostra (p/p) diluída em etanol absoluto foi misturado com: 1,1 mL de ácido linoléico (2,51% em etanol absoluto), 2 mL de tampão fosfato (0,05M, pH 7,0) e 0,9 mL de água, em um frasco com tampa rosqueável; os frascos foram estocados em estufa a 40°C, no escuro. Para 0,1 mL desta solução, foram adicionados 9,7 mL de etanol 75%, 0,1 mL de tiocianato de amônio 30% (p/p) e 0,1 mL de cloreto ferroso 0,02M recentemente preparado. Após exatamente 3 minutos de reação à temperatura ambiente, foi realizada a leitura da absorbância em 500 nm; a primeira leitura foi realizada antes de armazenar as amostras em estufa, ou seja, no “tempo zero” ( $t_0$ ). O procedimento foi repetido a cada 24 horas, até que a cor do controle (solução sem o antioxidante) alcançasse um máximo. Para a obtenção do controle, foram utilizados os mesmos reagentes, com exceção da amostra diluída em etanol, que foi substituída por etanol absoluto, na mesma quantidade.

Nesta análise, foi utilizado o espectrofotômetro da marca CELM, modelo E210D (São Paulo, Brasil).

A porcentagem de inibição da oxidação lipídica foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Abs}^* \cdot \text{média final do controle} - \text{Abs. média final da amostra}}{\text{Abs. média final do controle}} \times 100$$

\*Abs. = absorvância

Para esta análise, as amostras foram padronizadas a uma concentração de 0,02% (p/v) com base no resíduo seco; além das bebidas, foi avaliada uma solução com BHT (antioxidante padrão), na mesma concentração e solvente.

### 3.2.3.2 Avaliação do poder redutor

O poder redutor das amostras foi determinado de acordo com o método de OYAIZU (1986), citado por YEN e CHEN (1995, p.28).

As amostras foram diluídas em 3 concentrações diferentes: 300, 500 e 800 µg, em 1 mL de metanol, com base na proporção de resíduo seco. Em seguida, foram misturadas com 2,5 mL de tampão fosfato (0,2M, pH 6,6) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio  $K_3[Fe(CN)_6]$  a 1% (p/v). Os tubos de ensaio com a mistura foram levados à estufa a 50°C, por 20 minutos. Uma alíquota de 2,5 mL de ácido tricloroacético (10%, p/v) foi adicionada à mistura, a qual foi centrifugada (3.000 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente), em centrífuga refrigerada, marca ALC International, modelo 4239R (Milão, Itália) ; 2,5 mL do sobrenadante foram retirados e misturados com 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de  $FeCl_3$  (0,1%, p/v). Após agitar os tubos, a absorvância foi lida em 700 nm, em espectrofotômetro da marca CECIL, modelo CE 1020 (Cambridge, UK).



### **3.2.4 Análise estatística**

As médias dos resultados foram comparadas conforme as técnicas disponíveis no Software SPSS for Windows 10.0. Os resultados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o delineamento em blocos, pelo teste de Tukey (NETER et al., 1996), análise por componentes principais (ACP) e agrupamento de dados. O nível de significância de 5% foi estabelecido para as avaliações dos resultados.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Concentração de matéria seca e de fenólicos totais

Para a determinação do teor total de compostos fenólicos, utilizou-se a equação obtida através da curva padrão, a partir da relação entre a absorbância e a concentração de ácido gálico (0,01 a 0,05 mg/mL), o padrão utilizado para esta análise. Portanto, a medida do resultado é expressa em equivalentes de ácido gálico (EAG). Ao longo do experimento, seis curvas padrão foram elaboradas, e seus coeficientes de regressão variaram de 0,9904 a 0,9978. Como modelo, a última curva analítica elaborada é apresentada na figura 2.

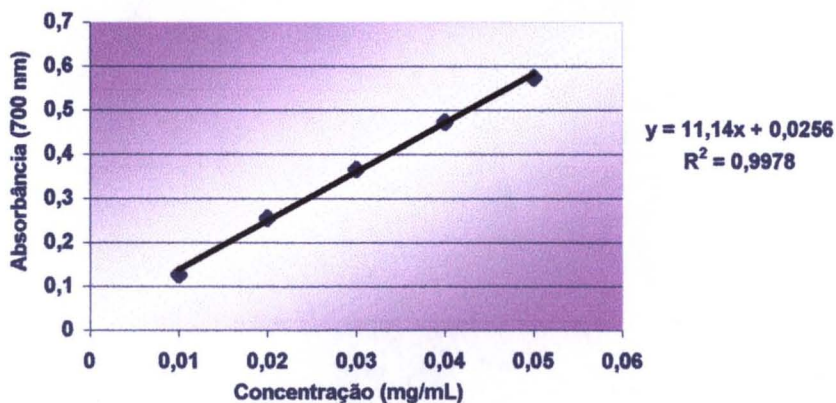


Figura 2 – Curva padrão para a determinação de fenólicos totais, onde y = valor da absorbância; x = concentração de fenólicos, cujo valor deverá ser posteriormente multiplicado pelo fator diluição;  $R^2$  = coeficiente de determinação.

Os valores obtidos em relação ao resíduo seco e compostos fenólicos totais variaram de 22,0 a 123,0 mg/mL, e 297 a 2478 mg/L/EAG, respectivamente (tabela 3).

Tabela 3. Teores médios  $\pm$  desvio padrão de resíduo seco e fenólicos totais em vinhos e sucos de uva.

Tipo de bebida	Sigla	Resíduo Seco (mg/mL)	Fenólicos totais (mg/L/EAG <sup>1</sup> )	Teor de fenólicos totais em relação ao resíduo seco (%)
Vinho tinto suave, marca A	VT1	61,6	1.298 $\pm$ 83,85 <sup>a</sup>	2,11
Vinho tinto suave, marca B	VT2	82,6	939 $\pm$ 48,79 <sup>a</sup>	1,09
Vinho tinto <i>demi-sec</i>	VT3	22,4	1.874 $\pm$ 33,94 <sup>b</sup>	8,48
Vinho tinto seco	VT4	23,2	2.478 $\pm$ 110,31 <sup>c</sup>	10,78
Vinho <i>rosé</i> suave	VR1	38,4	964 $\pm$ 82,97 <sup>d</sup>	2,60
Vinho <i>rosé</i> <i>demi-sec</i>	VR2	22,0	642 $\pm$ 34,88 <sup>e</sup>	2,73
Vinho branco suave	VB1	58,2	313 $\pm$ 16,97 <sup>f</sup>	0,52
Vinho branco <i>demi-sec</i>	VB2	23,8	297 $\pm$ 65,53 <sup>f</sup>	1,26
Suco de uva, marca A	S1	114,0	1.117 $\pm$ 23,57 <sup>a</sup>	0,96
Suco de uva, marca B	S2	123,0	1.184 $\pm$ 23,57 <sup>a</sup>	0,98

<sup>1</sup> EAG = equivalentes de ácido gálico.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

Em relação ao total de resíduo seco, a concentração de fenólicos totais apresentou uma grande variação, ou seja, de 0,52 a 10,78%; os maiores percentuais não correspondem necessariamente aos maiores teores de fenólicos totais. O VT4, por exemplo, apresentou os valores mais altos de fenólicos e percentual em relação à matéria seca; entretanto, o inverso ocorreu com os sucos (S1 e S2) – seus teores de fenólicos são relativamente altos, mas, com relação à matéria seca, estão entre as menores proporções. Isto se deve à expressiva contribuição dos açúcares na composição dos sucos - em média 140 g/L (Del Valle, 2003), que é bastante superior ao encontrado em vinhos “*demi-sec*”, ou “*semi-secos*”, termo que se refere à concentração de açúcar na faixa de 5 a 20 gramas por litro (BRASIL, 1990). Nesta linha de raciocínio, o VB2 deveria apresentar percentual de fenólicos semelhante ao VT3, já que ambos são *semi-secos*. Isto não ocorreu, pois, como se sabe, os vinhos brancos são produzidos sem o contato com a casca da uva, onde se concentra a maior

parte dos compostos fenólicos (SINGLETON, 1982, citado por KANNER *et al.*, 1994, p.67).

Os valores de fenólicos totais são apresentados, por tipo de bebida, na figura 3.

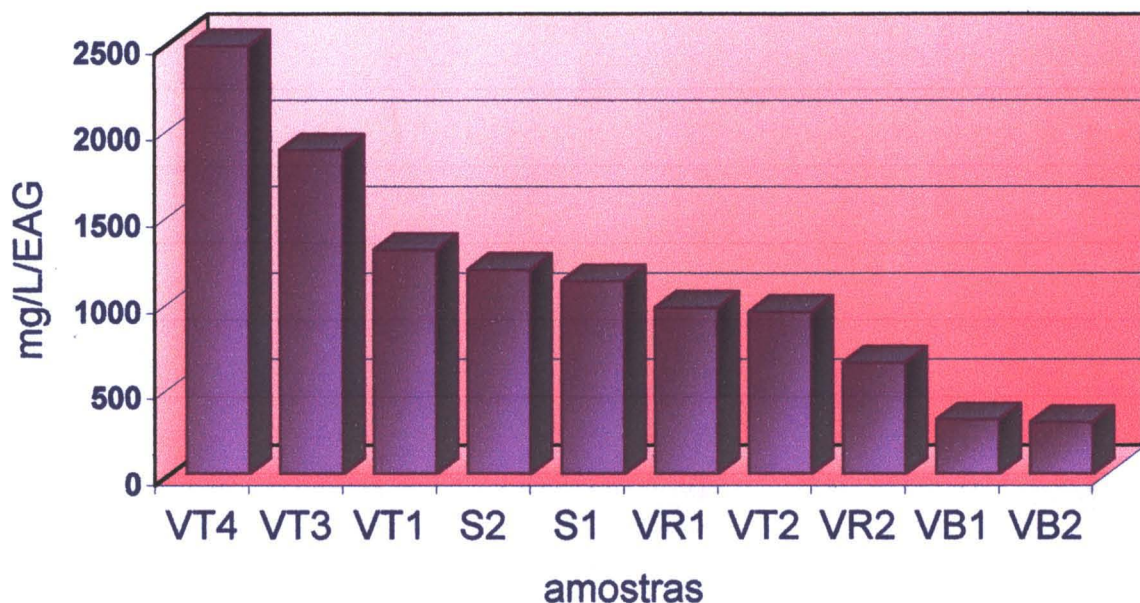


Figura 3: Teor de fenólicos totais

O vinho tinto 4 (VT4) apresentou o maior teor de fenólicos totais; esta bebida foi elaborada com diferentes variedades de espécies europeias (*Vitis vinifera*), ou seja: Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir e Alicante Bouschet. Observou-se diferença significativa desta marca (VT4) em relação aos demais tipos e marcas, indicando a influência das condições empregadas na vinificação, bem como a qualidade das uvas, sobre o teor de compostos fenólicos do vinho. O VT3, também produzido com uva nobre (Cabernet Sauvignon), apresentou teor significativamente maior do que as outras marcas e tipos, perdendo apenas para o VT4.

Conforme esperado, os vinhos tintos apresentaram maiores teores de fenólicos totais em relação aos vinhos rosé, e estes em relação aos brancos. Quanto ao sucos de uva, não houve diferença significativa ( $p=0,136$ ) destes com os vinhos tintos suave (VT1 e VT2). Os vinhos tintos suave foram elaborados com cepas da espécie americana (*Vitis labrusca*), mas provavelmente o processo de vinificação, e não a qualidade da uva, exerceu maior influência sobre o resultado obtido, ou seja, os teores de fenólicos em VT1 e VT2 são significativamente menores dos que os encontrados em VT3 e VT4. Como se sabe, os vinhos feitos com a espécie americana são considerados de qualidade inferior, já que esta espécie não é a mais indicada na elaboração de vinhos; portanto, as condições empregadas na sua produção (como menor tempo de fermentação), são diferentes, visando o menor custo final do produto. Já os vinhos tintos elaborados com cepas da espécie européia (VT3 e VT4), são de qualidade superior em relação a VT1 e VT2, não só em relação à qualidade das cepas, mas também quanto à vinificação, onde os procedimentos e materiais empregados permitiram uma maior extração de compostos fenólicos, justificando este resultado.

Os vinhos brancos foram as bebidas que apresentaram os menores teores de fenólicos, como já era esperado, e não houve diferença significativa ( $p=0,1359$ ) entre VB1 e VB2.

Os valores obtidos estão de acordo com os dados disponíveis na literatura, tanto em relação aos vinhos (FRANKEL *et al.*, 1995; HÖNER *et al.*, 2002) quanto aos sucos de uva (MIYAGI *et al.*, 1997).

No que se refere ao ano de safra, este fator não determinou diferenças ou semelhanças entre as amostras, uma vez que todos os vinhos são jovens\*, como a maioria dos vinhos nacionais.

---

\* O vinho jovem é elaborado para ser consumido em até 2 anos após o engarrafamento, enquanto o vinho de guarda deve ser consumido somente após 2 anos da data de seu engarrafamento (LONA, 2001).

## 4.2 Atividade antioxidante

### 4.2.1 Método do tiocianato férrico

Avaliou-se o potencial antioxidante das amostras através da capacidade de seus compostos bioativos em inibir a oxidação do ácido linoleico, substrato utilizado no método do tiocianato férrico.

Para fins comparativos, utilizou-se um antioxidante sintético, o BHT, na mesma concentração das amostras, ou seja, 0,02%. O comportamento das amostras diluídas em etanol sobre a oxidação do ácido linoleico, ao longo das 96 horas de incubação a 40°C, está representado nas figuras 4, 5, 6 e 7.

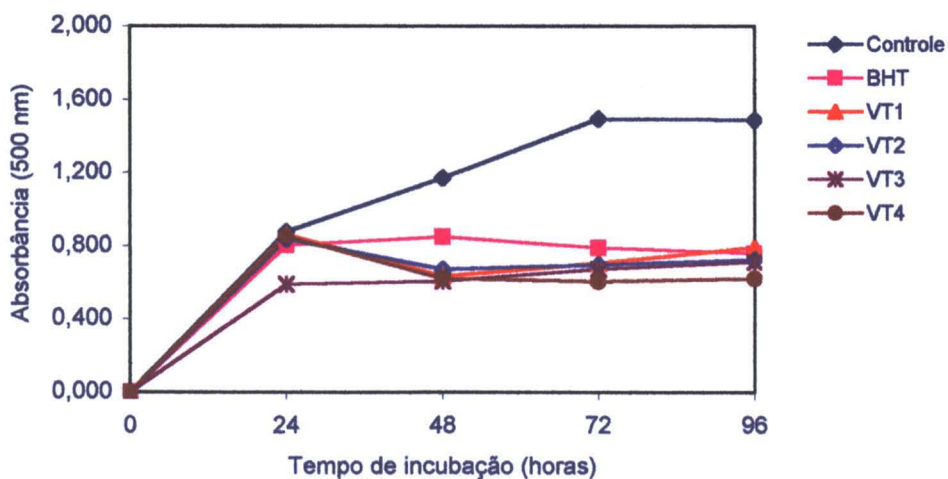


Figura 4 – Atividade antioxidante das amostras diluídas de vinhos tintos, pelo método do tiocianato férrico.

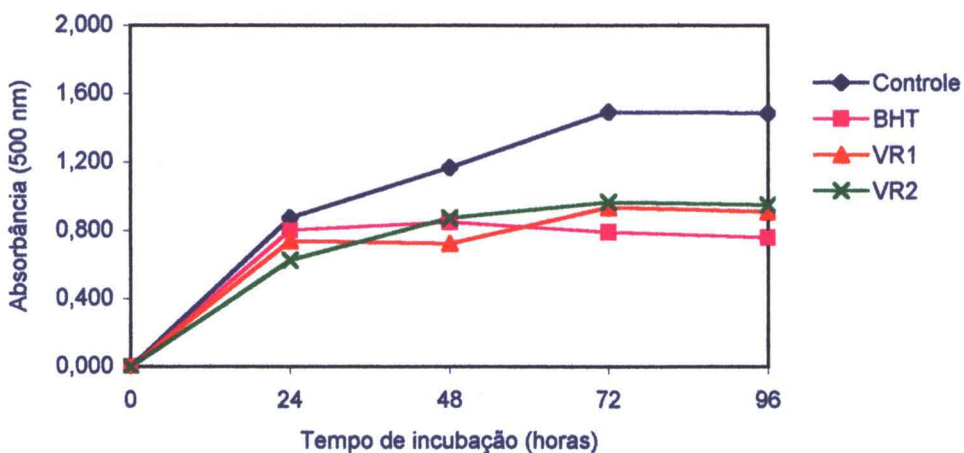


Figura 5 – Atividade antioxidante das amostras diluídas de vinhos rosé, pelo método do tiocianato férrico.

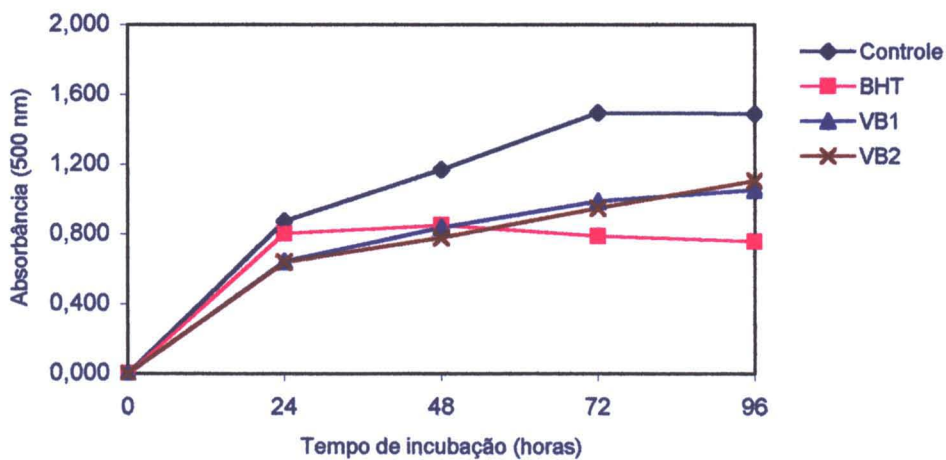


Figura 6 – Atividade antioxidante das amostras diluídas de vinhos brancos, pelo método do tiocianato férrico.

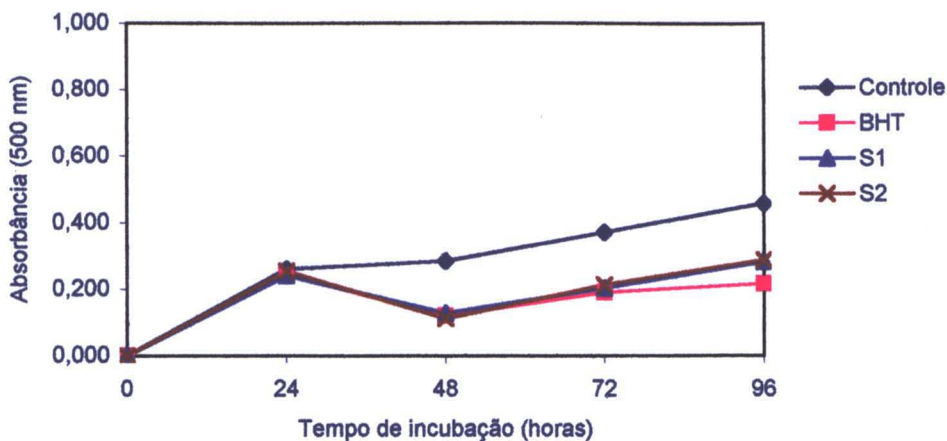


Figura 7 – Atividade antioxidante das amostras diluídas de sucos de uva, pelo método do tiocianato férrico.

Com os valores da absorbância, calculou-se a porcentagem de inibição da oxidação lipídica (OL) de cada amostra, conforme apresentado na tabela 4.

Tabela 4. Valores médios  $\pm$  desvio padrão da atividade antioxidante de vinhos, sucos de uva e BHT diluídos em etanol, na concentração de 0,02%, pelo teste do tiocianato férrico.

Amostra	Inibição da OL (%)
VT4	59,66 $\pm$ 1,63 <sup>a</sup>
VT1	52,41 $\pm$ 3,18 <sup>b</sup>
VT3	52,19 $\pm$ 4,12 <sup>b</sup>
VT2	51,38 $\pm$ 6,53 <sup>b</sup>
BHT	50,98 $\pm$ 2,60 <sup>b</sup>
VR1	38,97 $\pm$ 4,96 <sup>c</sup>
S1	38,39 $\pm$ 2,00 <sup>c</sup>
S2	37,27 $\pm$ 2,70 <sup>c</sup>
VR2	36,09 $\pm$ 5,60 <sup>c</sup>
VB1	29,36 $\pm$ 4,33 <sup>d</sup>
VB2	25,75 $\pm$ 2,10 <sup>d</sup>

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).



De acordo com NAMIKI (1990), os antioxidantes naturais são menos efetivos do que os sintéticos; entretanto, verifica-se, pela tabela 4, que todos os vinhos tintos apresentaram maior porcentagem de inibição da OL em relação ao BHT, utilizado nas mesmas condições e concentração, embora a diferença tenha sido significativa apenas em relação a VT4.

Os sucos de uva, apesar de seus níveis de polifenóis serem estatisticamente semelhantes a VT1 e VT2, apresentaram valores significativamente inferiores de inibição de OL, e esta diferença aumenta quando são comparados com VT4. Este resultado é consistente com o relatado por GOLDBERG *et al.* (1996) e SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, (1999).

O potencial antioxidante de vinhos tintos foi demonstrado *in vitro* (FRANKEL *et al.*, 1993) e *in vivo* (FUHRMAN *et al.*, 1995); entretanto, quando se trata de sucos de uva, os dados são bastante controversos. GAZIANO *et al.* (1993) e GOLDBERG *et al.* (1996) e SOLEAS *et al.* (1997), especulam que a vantagem dos vinhos tintos sobre os sucos de uva está na presença do etanol, que exerce uma influência indireta sobre a atividade antioxidante por melhorar a solubilidade dos fenólicos em meio aquoso. MIYAGI *et al.* (1997) avaliaram a capacidade antioxidante de vinhos tintos e sucos de uva sobre o LDL colesterol. Os autores concluíram que ambos exercem efeito semelhante em sistema *in vitro*; no entanto, em sistema *in vivo* o suco de uva não foi efetivo. Os autores sugerem que a diferença está principalmente na melhor biodisponibilidade dos fenólicos do vinho tinto. Isto se deve, provavelmente, à transformação dos fenólicos durante a fermentação do vinho, que são convertidos, da forma polimérica, para a monomérica. Complexos poliméricos de flavonóides não são facilmente quebrados pelo suco digestivo, além de sua relativa insolubilidade em meio aquoso; ou seja, a forma monomérica e hidrosolúvel de flavonóides parece ser melhor absorvida pelo intestino humano.

## 4.2.2 Avaliação do poder redutor

Estudos recentes relatam que a atividade antioxidante tem uma correlação com o poder redutor (YEN e DUH, 1993). Segundo OKUDA *et al.* (1983, citados por DUH e YEN, 1997, p.645), os taninos inibem a formação de peróxidos lipídicos em função do seu poder redutor.

O poder redutor de cada amostra diluída em metanol foi avaliado através de gráficos com os valores de absorvância contra a concentração (300, 500 e 800  $\mu\text{g/mL}$ ). Os maiores valores de absorvância indicam maior poder redutor (figuras 8, 9, 10 e 11).

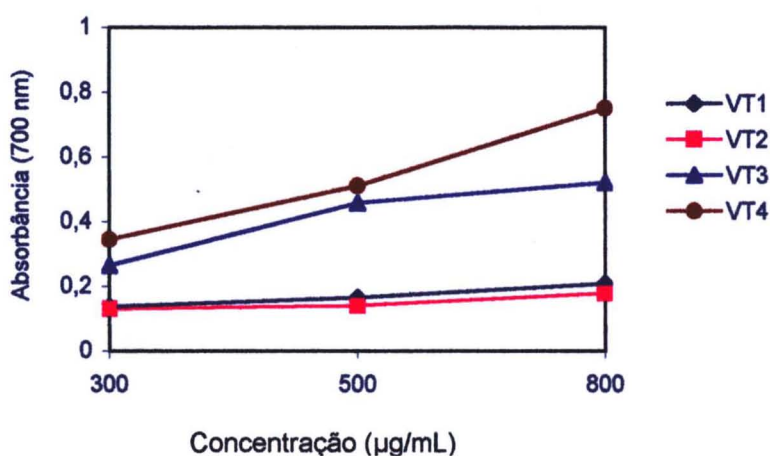


Figura 8 – Poder redutor em amostras diluídas de vinhos tintos.

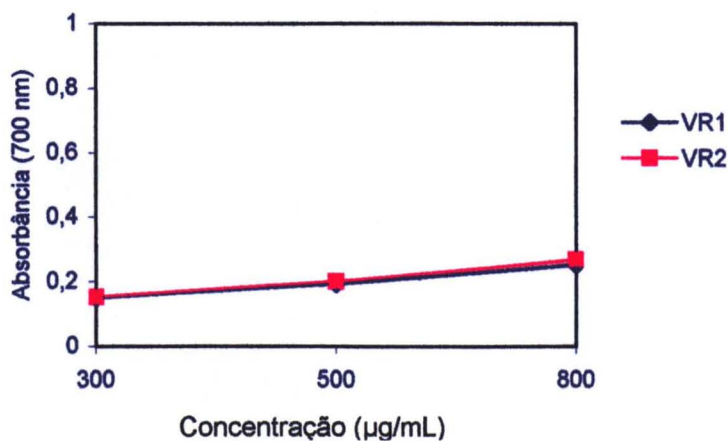


Figura 9 – Poder redutor em amostras diluídas de vinhos rosé.

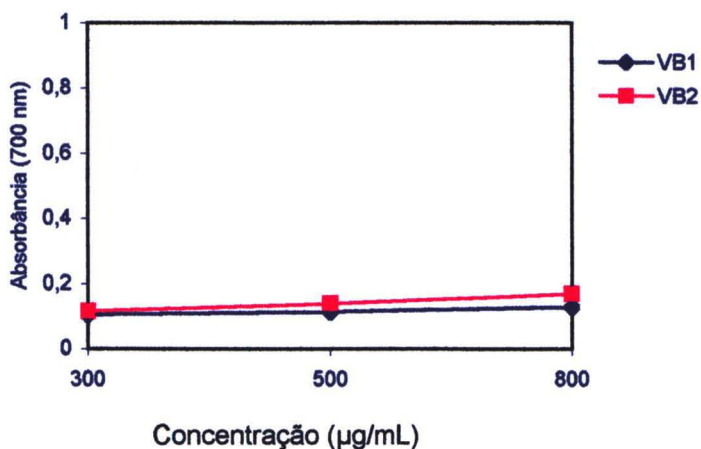


Figura 10 – Poder redutor em amostras diluídas de vinhos brancos.

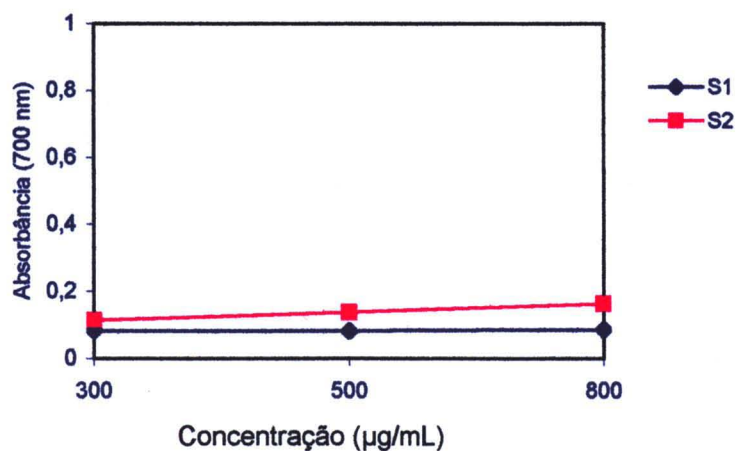


Figura 11 – Poder redutor em amostras diluídas de sucos de uva.

Partindo-se da premissa que o material testado apresenta poder redutor, o aumento da concentração deste levaria a um proporcional aumento da coloração após o teste, ou seja, maior absorbância em 700 nm. Verificamos nas figuras 8 a 11 que as amostras VT4 e VT3 apresentaram

este comportamento, indicando que os mesmos apresentam esta propriedade. Já as demais amostras não apresentaram aumento significativo na absorbância com o uso de quantidades crescentes, o que indica que o poder redutor das mesmas é reduzido ou nulo, como foi o caso de S1. Na tabela 5, são apresentados os valores médios obtidos neste teste.

Tabela 5. Médias e desvios padrão do poder redutor de vinhos e sucos de uva diluídos em metanol, em 3 concentrações diferentes.

Amostra	300 µg/mL	500 µg/mL	800 µg/mL
VT1	0,138 ± 0,01	0,166 ± 0,02	0,209 ± 0,02 <sup>d</sup>
VT2	0,130 ± 0,01	0,140 ± 0,00	0,179 ± 0,01 <sup>d</sup>
VT3	0,264 ± 0,05	0,458 ± 0,09	0,521 ± 0,10 <sup>b</sup>
VT4	0,345 ± 0,02	0,510 ± 0,01	0,751 ± 0,03 <sup>a</sup>
VR1	0,150 ± 0,00	0,193 ± 0,01	0,253 ± 0,01 <sup>c</sup>
VR2	0,152 ± 0,01	0,200 ± 0,02	0,268 ± 0,03 <sup>c</sup>
VB1	0,105 ± 0,00	0,114 ± 0,00	0,138 ± 0,01 <sup>e</sup>
VB2	0,116 ± 0,00	0,138 ± 0,00	0,168 ± 0,01 <sup>d</sup>
S1	0,083 ± 0,01	0,082 ± 0,00	0,087 ± 0,00 <sup>f</sup>
S2	0,114 ± 0,00	0,138 ± 0,01	0,163 ± 0,00 <sup>d</sup>

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significante ( $p < 0,05$ ).

Os resultados indicam que VT4 possui maior poder redutor, ou seja, possui maior capacidade de doar elétrons e reagir com radicais livres, convertendo-os a produtos mais estáveis.

Os vinhos *rosé* (VR1 e VR2), ao contrário do que ocorreu no teste de inibição da OL, apresentou poder redutor significativamente maior do que os vinhos tintos suave (VT1 e VT2). Isto pode ser explicado pela diferença no perfil de compostos fenólicos entre os dois tipos de vinho, e/ou interação destes compostos com outros componentes da bebida. Foi demonstrado que os polifenóis do vinho podem atuar como agentes redutores, mas este

é apenas um dos diversos mecanismos de ação já evidenciados nestes compostos (RICE-EVANS *et al.*, 1996; BURNS *et al.*, 2000).

Tal argumento vale também para justificar, em parte, os níveis bastante inferiores de poder redutor encontrados nos sucos de uva, que, no teste do tiocianato férrico, foram tão efetivos quanto os vinhos *rosé*. O perfil de polifenóis desta amostra pode explicar o resultado; entretanto, os sucos de uva possuem outros componentes cujo poder redutor é conhecido, como o ácido ascórbico (SZETO *et al.*, 2002) e os açúcares – com exceção da sacarose, que não possui esta propriedade (MORRISON e BOYD, 1973). Uma das possibilidades é a alteração química destes componentes durante o processo de industrialização do suco, influenciando suas propriedades redutoras. Um outro estudo comparativo poderia elucidar esta questão, incluindo suco de uva natural, preparado pouco antes da realização do experimento, com ou sem adição de açúcar.

Os valores médios obtidos nos 3 experimentos, bem como o teor de açúcar, foram reunidos na tabela 6.

Tabela 6. Médias e desvios padrão do teor de fenólicos totais, inibição da OL e poder redutor de vinhos e sucos de uva.

Amostra	Teor de açúcar (%)	Teor Alcoólico (%)	Fenólicos totais (mg/L/EAG)	Inibição da OL (%)	Poder redutor <sup>1</sup> (800 µg/mL)
VT1	5,0	10,6	1.298 ± 83,85 <sup>a</sup>	52,41 ± 3,18 <sup>b</sup>	0,209 ± 0,02 <sup>d</sup>
VT2	9,0	11,0	939 ± 48,79 <sup>a</sup>	51,38 ± 6,53 <sup>b</sup>	0,179 ± 0,01 <sup>d</sup>
VT3	0,5 – 0,6	11,0	1.874 ± 33,94 <sup>b</sup>	52,19 ± 4,12 <sup>b</sup>	0,521 ± 0,10 <sup>b</sup>
VT4	0,25	11,5	2.478 ± 110,31 <sup>c</sup>	59,66 ± 1,63 <sup>a</sup>	0,751 ± 0,03 <sup>a</sup>
VR1	3,5	11,5	964 ± 82,97 <sup>d</sup>	38,97 ± 4,96 <sup>c</sup>	0,253 ± 0,01 <sup>c</sup>
VR2	1,5	10,3	642 ± 34,88 <sup>e</sup>	36,09 ± 5,60 <sup>c</sup>	0,268 ± 0,03 <sup>c</sup>
VB1	6,0	11,0	313 ± 16,97 <sup>f</sup>	29,36 ± 4,33 <sup>d</sup>	0,138 ± 0,01 <sup>e</sup>
VB2	1,5	11,5	297 ± 65,53 <sup>f</sup>	25,75 ± 2,10 <sup>d</sup>	0,168 ± 0,01 <sup>d</sup>
S1	14,0	-	1.117 ± 23,57 <sup>a</sup>	38,39 ± 2,00 <sup>c</sup>	0,087 ± 0,00 <sup>f</sup>
S2	15,5	-	1.184 ± 23,57 <sup>a</sup>	37,27 ± 2,70 <sup>c</sup>	0,163 ± 0,00 <sup>d</sup>

<sup>1</sup> Nesta tabela foi considerado o maior valor encontrado em todas as amostras, que foi obtido com a maior concentração, ou seja, 800 µg/mL.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa (p<0,05).

No geral, os vinhos tintos apresentaram maior poder antioxidante ( $p < 0,05$ ) do que os rosados e brancos, conforme relatado em diversos outros estudos, onde os métodos aplicados foram os mesmos (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1999), ou diferentes (FRANKEL *et al.*, 1995; VINSON e HONTZ, 1995; SIMONETTI *et al.*, 1997; JAMROZ e BELTOWSKI, 2001) dos apresentados neste trabalho.

Confirmando as expectativas, os vinhos brancos (VB1 e VB2) apresentaram baixos valores nos três experimentos deste estudo.

Um dos fatores que pode interferir na atividade antioxidante de vinhos é a adição de sulfito de sódio, empregado como conservador (JAMROZ e BELTOWSKI, 2001). Entretanto, o teor médio adicionado deste composto é o mesmo em todos os vinhos, independentemente da cor, graduação alcoólica ou teor de açúcar; como os resultados na avaliação do potencial antioxidante foram bastante diversificados entre as diferentes bebidas, pode-se afirmar que, nesta avaliação, não houve influência significativa deste conservante.

JAMROZ e BELTOWSKI (2001) evidenciaram, através do método FRAP (ferric reducing antioxidant power), uma influência significativa do teor de açúcar sobre a atividade antioxidante de vinhos secos, semi-secos, suaves e sucos de uva. De acordo com os autores, as bebidas com menores teores de açúcar foram mais efetivas como antioxidantes do que as mais doces; assim, os autores concluíram que a glicose presente em vinhos e sucos, cujo teor variou de 5 a 50%, não possui atividade antioxidante pelo método FRAP.

No presente estudo, os vinhos tintos com menor teor de açúcar (VT3 e VT4) foram significativamente mais efetivos do que os tintos suaves (VT1 e VT2) e sucos de uva (tabela 6); entretanto, entre os rosados e os brancos não houve esta relação, refletindo a possibilidade da interferência de outros fatores. Para uma avaliação mais aprofundada dos açúcares sobre as propriedades antioxidantes de vinhos e sucos, seria necessário realizar um estudo com um número maior de amostras – este trabalho incluiu, por exemplo, apenas 2 amostras de vinho tinto seco (VT4), o que limita a comparação estatística desta bebida com as demais, em relação a este fator, ou seja, teor de açúcar.

A possível influência do etanol sobre a composição dos fenólicos, e portanto sobre a atividade antioxidante pode explicar a significativa inferioridade dos valores obtidos para os sucos em relação aos vinhos tintos 1 e 2, apesar de não haver diferença estatística com relação ao teor de fenólicos entre ambos os grupos. Como já exposto anteriormente, estudos sugerem que o etanol aumenta o potencial antioxidante, por melhorar a solubilidade dos compostos fenólicos em água, e influenciar a transformação química dos flavonóides durante a fermentação alcoólica (GOLDBERG, 1995).

### 4.3 Correlação entre as variáveis

Com os valores obtidos nos 3 experimentos, realizou-se a análise de componentes principais (ACP), que permite visualizar, em forma de gráfico, a relação entre as 3 variáveis do estudo, ou seja: 1. fenólicos totais; 2. inibição da oxidação lipídica; 3. poder redutor.

Para cada variável foi atribuído um peso, como indicado na tabela 7.

Tabela 7. Pesos das variáveis nos componentes principais 1 e 2.

Variável	Componente principal 1	Componente principal 2
Fenólicos totais	0,719	0,651
Inibição da OL	0,923	0,357
Poder redutor	0,374	0,920

Verifica-se, pela tabela acima, que a componente principal 1 é influenciada principalmente pela inibição da OL, enquanto a componente 2 é mais influenciada pelo poder redutor. Na representação gráfica (figura 12), observa-se o comportamento das amostras em função dos pesos das variáveis, sendo que o gráfico das duas componentes principais corresponde a 96,91% da informação estatística.

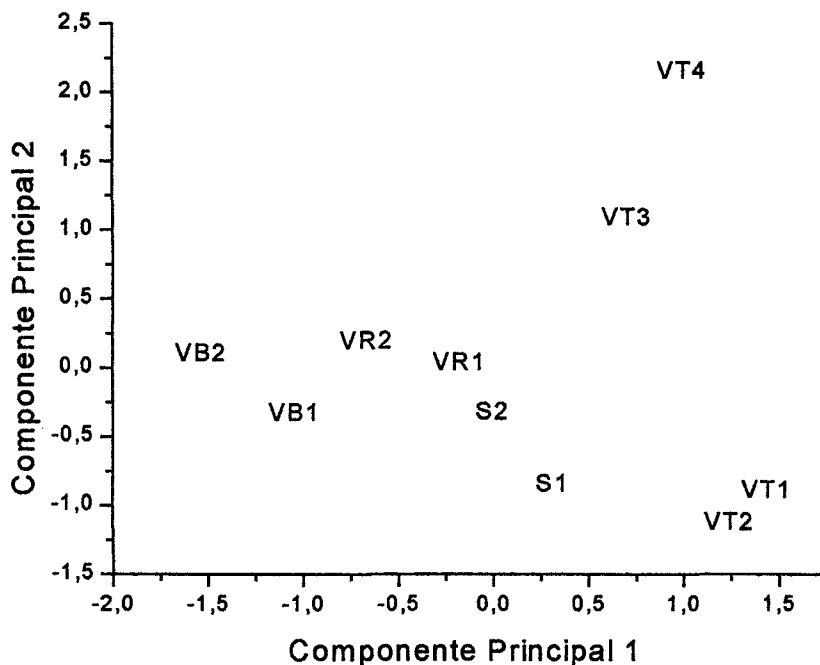


Figura 12. Relação entre as amostras, por análise de componentes principais.

Pelo gráfico acima, observa-se que a componente principal 1 separa os vinhos tintos das demais bebidas, por estes apresentarem maiores valores de inibição da OL, e os vinhos brancos estão à esquerda pois, nesta variável, apresentaram os menores valores.

Na parte superior estão representados os vinhos tintos 3 e 4 por exibirem maior poder redutor, e o vinho tinto 4 se destaca dos demais (região superior e à direita) por apresentar valores superiores nas 3 variáveis estudadas.

O mesmo resultado é representado na figura 13, na forma de dendrograma, obtido por análise de agrupamento de dados.



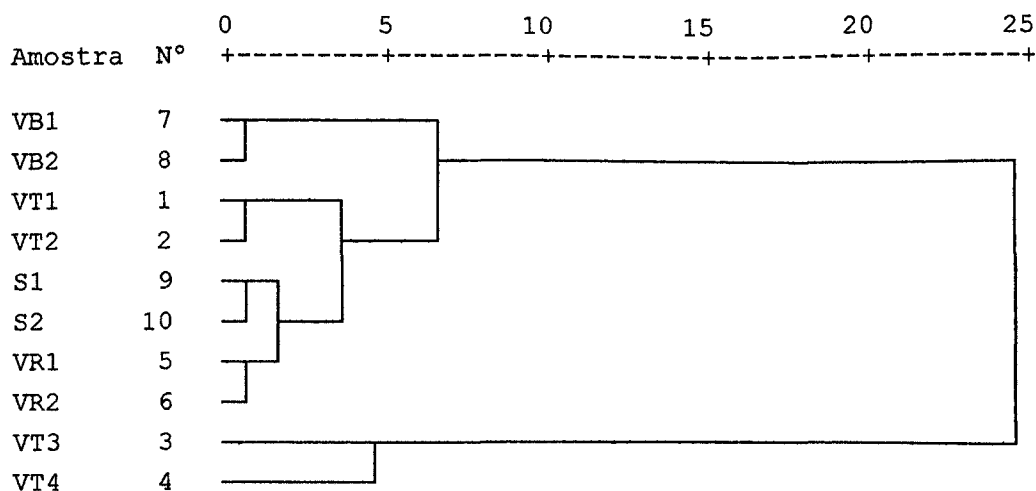


Figura 13. Agrupamento de dados das amostras avaliadas.

A figura acima mostra que os vinhos tintos 3 e 4 diferem bastante do restante do grupo, pelo distanciamento destes em relação às demais amostras; pela proximidade entre as bebidas do mesmo tipo, observa-se que há uma grande similaridade entre as mesmas.

Pelo teste de correlação de Pearson, verificou-se a existência de correlação positiva entre os métodos utilizados neste estudo, conforme indicado na tabela 8.

Tabela 8. Correlação entre as variáveis.

Variável		Fenólicos totais	Inibição da OL	Poder redutor
Fenólicos totais	CP	1,000	0,862	0,839
	NS	-	0,001	0,002
Inibição da OL	CP	0,862	1,000	0,690
	NS	0,001	-	0,027
Poder redutor	CP	0,839	0,690	1,000
	NS	0,002	0,027	-

CP = correlação de Pearson; NS = nível de significância.

Diversos autores relataram a existência de uma correlação significativa entre o teor de fenólicos totais e atividade antioxidante (FRANKEL *et al.*, 1995; SIMONETTI *et al.*, 1997; BURNS *et al.*, 2000; BRENNA e PAGLIARINI, 2001; KARAKAYA *et al.*, 2001; HÖNER *et al.*, 2002). Este dado foi comprovado também neste estudo; como se verifica na tabela 8, houve uma boa correlação entre o teor de fenólicos totais e o método do tiocianato férrico ( $r = 0,862$ ), bem como em relação ao poder redutor ( $r = 0,839$ ).

Entre os métodos do tiocianato férrico e poder redutor observou-se uma correlação mais fraca ( $r = 0,690$ ), indicando que componentes bioativos capazes de inibir a oxidação lipídica não são, necessariamente, fortes agentes redutores. Isto reforça o que já foi demonstrado, ou seja, os diversos compostos fenólicos atuam como antioxidantes através de diferentes mecanismos (RICE-EVANS *et al.*, 1996; WEISBURGER, 1999).

Os dados evidenciados neste estudo reafirmaram a hipótese de que os compostos bioativos de vinhos, especialmente os tintos, são potencialmente benéficos à saúde, uma vez que foi demonstrada a sua capacidade em inativar espécies reativas de oxigênio. Contudo, cabe ressaltar que resultados obtidos em experimentos *in vitro* nem sempre são reproduzidos em sistemas *in vivo*. Outros estudos são necessários para se avaliar o comportamento destes compostos em sistemas biológicos, seja através de experimentos com animais ou ensaios clínicos com humanos.

## 5. CONCLUSÕES

- Os vinhos tintos 3 e 4 (VT3 e VT4) apresentaram os melhores valores na avaliação da atividade antioxidante, sendo que o VT4 foi a mais efetiva entre todas as bebidas avaliadas neste estudo;
- Na quantificação de fenólicos totais, os maiores teores foram verificados nos vinhos tintos 3 e 4, e o VT4 apresentou o maior entre todos os valores obtidos;
- Os sucos de uva avaliados apresentaram valores de inibição da oxidação lipídica e poder redutor significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) aos valores encontrados nas 4 marcas de vinhos tintos;
- Os resultados obtidos para os vinhos rosé (VR1 e VR2) situaram-se, entre os vinhos, em posição intermediária, em todos os testes;
- As duas marcas de vinhos brancos (VB1 e VB2) apresentaram os menores valores de fenólicos totais, e também foram pouco efetivos nos testes de avaliação da atividade antioxidante;
- Não foi evidenciada correlação significativa entre os 2 métodos de avaliação da atividade antioxidante ( $r = 0,690$ );
- Verificou-se uma boa correlação entre o teor de fenólicos totais e os dois métodos utilizados para a avaliação da atividade antioxidante, ou seja, em relação à inibição da oxidação lipídica ( $r = 0,862$ ) e ao poder redutor ( $r = 0,839$ );
- Os resultados indicam uma provável influência do perfil de compostos fenólicos, tanto em termos quantitativos como qualitativos, sobre a atividade antioxidante *in vitro* nas bebidas avaliadas.

## 6. REFERÊNCIAS\*

1. Albert AZ, Federico E. **Curso básico de iniciação ao vinho e à degustação** [curso on line]. Winexperts, 2002. Disponível em: <<http://www.winexperts.terra.com.br/htm>> [2002 jun 19].
2. Allinger NL *et al.* **Química Orgânica**. 4º ed. Rio de Janeiro:Ed. Guanabara Dois S/A,1997.
3. Amerine MA, Ough CS. **Methods for analysis of musts and wines**. New York:John Wily, 1988.
4. [Anonymus]. Retinopathy of prematurity. **Lancet**, 1991; 337:83-84.
5. Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJA. Oxidants and antioxidants:state of the art. **Am J Med**, 1991; 91 (suppl 3C):3S-13S.
6. Beck MA. Nutritionally induced oxidative stress: effect on viral disease. **Am J Clin Nutr** 2000; 71(suppl):1676S-1679S.
7. Beecher GR. Phytonutrient's Role in Metabolism: Effects on Resistance to Degenerative Processes. **Nutr Rev**, 1999; (II)S3-S6.
8. Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. **Nutr Cancer** 1992; 18(1):1-29.
9. Brasil, Ministério da Agricultura. Decreto nº 99.066, de 08 de março de 1990, que regulamenta a Lei nº 7.678, de 08 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados do vinho e da uva. Brasília, 08 mar 1990. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br.htm>> [2003 maio 24].
10. Brenna OV, Pagliarini E. Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **J Agric Food Chem**, 2001; 49: 4841-4844.
11. Burns J, Gardner PT, O'Neil J, Crawford S, Morecroft I, McPhail DB *et al.* Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. **J Agric Food Chem**, 2000; 48(2):220-230.
12. Campos AM, Lissi EA. Total antioxidant potential of Chilean wines. **Nutr Res**, 1996; 16(3):385-389.

---

\* De acordo com as normas do Guia de apresentação de Teses. Biblioteca/CIR – Centro de Informação e Referência em Saúde Pública. São Paulo; 1998.

13. Chan MM-Y, Mattiacci JA, Hwang HS, Shah A, Fong D. Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. **Biochem Pharmacol**, 2000; 60:1539-1548.
14. Chipault JR, Mizuno GR, Hawkins JM, Lundberg WO. The antioxidant properties of natural spices. **Food Res**, 1952; 17:46-55.
15. Cho SY, Park SJ, Kwon MJ, Jeong TS, Bok SH, Choi WY *et al.* Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF-kappaB pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. **Mol Cell Biochem**, 2003; 243 (1-2):153-160.
16. Corder R, Douthwaite D, Lees DM, Khan NQ, Viseu dos Santos AC, Wood EG, Carrier MJ. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. **Nature**, 2001; 414:863.
17. Craig WJ. Phytochemicals: guardians of our health. **J Am Diet Assoc**, 1997; (97):S 2, 199-204.
18. Del Valle. **Sucos Del Valle** [Home page]. Disponível em: <<http://www.delvalle.com.br/htm>> [2003 abr 19].
19. Diplock AT, Aggott PJ, Ashwell M. et al. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. **Br J Nutr**, 1999; 81(suppl):S1-27.
20. Donnelly Jk, Robinson DS. Invented review. Free radicals in foods. **Free Radical Res**, 1995; 22(2):147-176.
21. Dorko C. Antioxidants used in foods. **Food Technol**, 1994, abril:33.
22. Dreosti IE. Antioxidant Polyphenols in Tea, Cocoa, and Wine. **Nutrition**, 2000; (16):692-694.
23. Duh PD, Yen GC. Antioxidative activity of three herbal water extracts. **Food Chem**, 1997;60:639-645.
24. Durak I, Avcı A, Kaçmaz M, Büyükkoçak S, Çimen MYB, Elgün S, Öztürk S. Comparison of antioxidant potentials of red wine, White wine, grape juice and alcohol. **LibraPharm Limited**, 1999; 15:1196.
25. Economou KD, Oreopolou V, Thomopoulos CD. Antioxidant activity of some plant extracts of the family Labiatae. **J Am Oil Chem Soc**, 1991; (68):109-113.
26. Ferrari CKB. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Rev Nutr Campinas**, 1998; 11(1)3-14.

27. Ferrari CKB, Torres EAFS. Fatores Físicos e Bioquímicos da Industrialização, Preparo e Armazenamento de Alimentos e sua Relação com Radicais Livres e a Oxidação Lipídica. **Hig Aliment**, 2000; 14 (68/69):19-25.
28. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, 1997; 43(1):61-68.
29. Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. **Lancet**, 1993; 341:454-457.
30. Frankel EN, Waterhouse AL, Teissedre PL. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. **J Agric Food Chem**, 1995; 43:890-894.
31. Fridovich I. Biological effects of superoxide radical. **Arch Biochem Biophys**, 1986; 127:1-11.
32. Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. **Am J Clin Nutr**, 1995; 61:549-554.
33. Gaziano JM, Buring JE, Breslow JL, Goldhaber SZ, Rosner B, VanDenburgh M *et al*. Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. **New Engl J Med**, 1993;329:1829-1834.
34. Gerschman K, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. **Science**, 1954; 119:623-626.
35. Goldberg DM. Does wine work? **Clin Chem**, 1995; 41:14-16.
36. Goldberg DM, Garovic-Kocic V, Diamandis EP, Pace-Asciak CR. Wine: does the colour count? **Clin Chim Acta**, 1996; 246:183-193.
37. Gray JJ. Measurement of lipid oxidation: a review. **J Am Oil Chem Soc**, 1978; 55:539-546.
38. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clin Chem**, 1995; (41/12):1819-1828.
39. Hadi SM, Asad SF, Singh S, Ahmad A. Putative mechanism for anticancer and apoptosis-inducing properties of plant-derived polyphenolic compounds. **IUBMB Life**, 2000; 3:167-171.
40. Halladay SC, Ryerson BA, Smith CR, Brown JP, Parkinson TM. Comparison of effects of dietary administration of butylated hydroxytoluene

or a polymeric antioxidant on the hepatic and intestinal cytochrome P-450 mixed-function-oxygenase system of rats. **Food Cosm Toxicol**, 1980; 18(6):569.

41. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, 1990;186:1-85.
42. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation : its mechanism, measurement, and significance. **Am J Clin Nutr** 1993;57(suppl):715S-725S.
43. Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 1995; 35(1&2):7-20.
44. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. **Annu Rev Nutr**, 1996;16:33-50.
45. Hammerstone JF, Lazarus SA, Schmitz HH. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. **Nutrition**, 2000; 130: 2086S-2092S.
46. Harbone JB. **Plant Phenolics**, from "Methods in Plant Biochemistry Series". London:Academic Press, 1989.
47. Hardy G. Nutraceuticals and Function Foods : Introduction and Meaning. **Nutrition**, 2000; (16): 688-689.
48. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. **Lancet**, 1993; (342): 1007-1011.
49. Höner K, Cervellati R, Neddens C. Measurement of the *in vitro* antioxidant activity of German white wines using a novel method. **Eur Food Res Technol**, 2002; 214:356-360.
50. Institute of Medicine – Food and Nutrition Board. **Dietary Reference Intakes – proposed definition and plan for review of dietary antioxidants and related compounds**. Washington (DC): National Academy Press;1998.
44. Instituto Adolfo Lutz. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo:1985.
45. Jamroz A, Beltowski J. Antioxidant capacity of selected wines. **Med Sci Monit**, 2001; 7(6):1198-1202.
46. Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. **Food Chem**, 2001; 73:285-290.

47. Johnson H. **A História do Vinho**. São Paulo:Companhia das Letras, 1999.
48. Kahl R, Hildebrandt AG. Methodology for studying antioxidant activity and mechanisms of action of antioxidants. **Food Chem Toxicol**, 1986; 24 (10/11): 1007-1014.
49. Kanner J, Frankel E, Granit R, German B, Kinsella JE. Natural antioxidants in grapes and wines. **J Agric Food Chem**, 1994; 42:64-69.
50. Karakaya S, El SN, Tas AA. Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. **Int J Food Sci Nutr**, 2001;52:501-508.
51. Kikuzaki H, Nakatani N. Antioxidant effects of some ginger constituents. **J Food Sci**, 1993; 58:1407-1410.
52. Kinsella JE, Frankel E, German B, Kanner J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. **Food Technol**, 1993; 47:85-89.
53. Klatsky AL, Friedman GD, Singleman AB. Alcohol consumption before myocardial infarction. Results from Kaiser-Permanent epidemiologic study of myocardial infarction. **Ann Intern Med**, 1974; 81:294-301.
54. Klatsky AL. Alcohol and coronary artery disease. **Alcohol Health World**, 1990; 14:289-300.
55. Klatsky AL. Alcohol, coronary disease, and hypertension. **Annu Rev Med**, 1996; 47:149-160.
56. Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. **BMJ**, 1996; (312):478-481.
57. Labuza TP. Foreword. in: **Functional foods – designer foods, pharmafoods, nutraceuticals**. New York:Aspen Publishers, 1999.
58. Lajolo F. Alimentos Funcionais: Um Mercado Ávido por Produtos Inovadores. **Food Ingredients**, São Paulo, 2000; 9:26-43.
59. Lamartiniere CA. Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. **Am J Clin Nutr**, 2000; 71 (suppl):1705-1707S.
60. Larrauri JA, Goñi I, Martín-Carrón N, Rupérez P, Saura-Calixto F. Measurement of health-promoting properties in fruit dietary fibres: antioxidant capacity, fermentability and glucose retardation index. **J Sci Food Agric**, 1996;71:515-519.
61. Lona AA. **Vinhos – degustação, elaboração e serviço**. 6ª ed. Porto Alegre: AGE Editora, 2001.



62. Long LH, Halliwell B. Antioxidant and prooxidant abilities of foods and beverages. **Meth Enzymol**, 2001;335:181-190.
63. Luz PL, Serrano JR C, Chacra AP, Monteiro HP, Yoshida VM, Furtado M, Ferreira S, Gutierrez P, Pileggi F. The effect of red wine on experimental atherosclerosis:lipid-independent protection. **Exp Mol Pathol**, 1999; 65: 150-159.
64. Macheix J-J, Sapis J. Phenolics compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 1990; (30):441.
65. Macrae R, Robinson RK, Sadler MJ, editors. **Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition**. London:Academic Press, 1993.
66. Martin AD, Gilbert D. Enzyme changes accompanying liver enlargement in rats treated with 3-tertbutyl-4-hydroxyanisole. **Biochem J**, 1968; 106:22.
67. Martinez-Valverde I, Periago MJ, Ros G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Arch Latinoam Nutr**, 2000 50:5-18.
68. Mazza G. Anthocyanins in grapes and grape products. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 1995; 35(4):341-371.
69. Mello Jorge MHPM, Gotlieb SLD, Laurenti R. **A Saúde no Brasil: análise do período de 1996 a 1999**. Brasília:Organização Pan-Americana da Saúde, 2001.
70. Mérillon JM, Fauconneau B, Teguo PW, Barrier L, Vercauteren J, Huguet F. Antioxidant activity of the stilbene astringin, newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. **Clin Chem**, 1997; 43:1092-1093.
71. Mitsuda H, Yasumoto K, Iwami K. **Eiyo to Shokuryo**, 1966; 19:210.
72. Miyagi Y, Miwa K, Inoue H. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. **Am J Cardiol**, 1997; 80:1627-1631.
73. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, 1993; 329:2002-2020.
74. Morrison RT, Boyd RN. **Química Orgânica**. 7º ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1973.
75. Murray CJ, Lopes AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. **Lancet**, 1997; 349 (9061):1269-1276.
76. Namiki M. Antioxidants/antimutagens in food. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 1990; 29:273-300.

77. Nawar W W. Lipids. In: Fennema OR (Ed.) **Food Chemistry**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996; p.226-319.
78. Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. **Applied linear statistical models**. 4<sup>th</sup> ed. Boston:Irwin, 1996.
79. Nohl H. Involvement of free radicals in ageing: a consequence or cause of senescence. **Br Med Bull**, 1993; 49: 653-667.
80. Okuda T, Kimura Y, Yoshida T, Hatano T, Okuda H, Arichi S. Studies on the activities of tannins and related compounds from medical plants and drugs. I. Inhibitory effects on lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver. **Chem Pharm Bull**, 1983; 31:1625-1631.
81. Olivieri O, Stanzial AM, Girelli D, Trevisan MT, Guarini P, Terzi M, *et al*. Selenium status, fatty acids, vitamins A and E, and aging: the Nove Study. **Am J Clin Nutr** 1994; 60:510-517.
82. Osawa T, Namiki M. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus* leaves. **Agric Biol Chem**, 1981;45(3):735-739.
83. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosinamine. **Jpn J Nutr**, 1986; 173:111-115.
84. Pace-Asciak CR, Rounova O, Hahn SE, Diamandis EP, Goldberg DM. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. **Clin Chim Acta**, 1996; 246:163-182.
85. Pearson AM, Love JD, Shorland FB. "Warmed-over" flavor in meat, poultry, and fish. **Adv Food Res**, 1977;(23):1-74.
86. Pereira RB. **Avaliação da atividade antioxidante de sementes de frutas cítricas**. São Paulo, 1996. 90p. [Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].
87. Pignatelli P, Pulcinelli FM, Celestini A, Lenti L, Ghiselli A, Paolo P *et al*. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. **Am J Clin Nutr**, 2000; 72: 1150-1155.
88. Rabay A, Torres EAFS. Radicais Livres: considerações e prevenção. **Hig Aliment** 1997; 11(51):12-14.
89. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of suphydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **J Biol Chem**, 1991; 266:4244-4250.
90. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet**, 1992; 339:1523-1526.

91. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biol Med**, 1996; 20(7):933-956.
92. Roberfroid MB. European Consensus of Scientific Concepts of Functional Foods. **Nutrition**, 2000; (16): 689-691.
93. Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. **Food Res Int**, 1999; 32:407-412.
94. Scalbert A; Williamson G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. **J Nutr**, 2000; (130):2073S-2085S.
95. Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD. Phenolic antioxidants. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 1992; 32(1):67-103.
96. Shahidi F, Naczk M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster:Technomic Publishing Company, 1995.
97. Silva FAM, Borges MFM, Ferreira MA. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Quim Nova**, 1999; 22(1): 94-103.
98. Simonetti P, Pietta P, Testolin G. Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines. **J Agric Food Chem**, 1997;45:1152-1155.
99. Singleton VL, Rossi Jr, JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am J Enol Vitic**, 1965; 16:144-158.
100. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. **J Clin Lab Anal**, 1997; 11:287-313.
101. Stavric B. Quercetin in our diet: from potent mutagen to a probable anticarcinogen. **Clin Biochem**, 1994; 27:245-248.
102. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **N Engl J Med**, 1989; 320:915-24.
103. St Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. **Lancet**, 1979; 12:1017-1020.
104. Sun AY, Simonyi A, Sun GY. The "French Paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. **Free Rad Biol Med**, 2002; 32:314-318.

105. Szeto YT, Tomlinson B, Benzie IF. Total antioxidant and ascorbic acid content of fresh fruits and vegetables: implications for dietary planning and food preservation. **Br J Nutr**, 2002; 87(1):55-59.
106. Teissedre P, Frankel E, Waterhouse AL, Peleg H, German JB. Inhibition of *in vitro* human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. **J Sci Food Agric**, 1996; 70:55-61.
107. Thomas MJ. The Role of Free Radicals and Antioxidants. **Nutrition**, 2000; 16(7/8):716-718.
108. Torres EAFS. Oxidação lipídica em charque. São Paulo, 1987 [Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo] 91p.
109. Torres E, Pearson AM, Gray JI, Booren AM, Shimokomaki M. Effect of salt on oxidative changes in pre and post-rigor ground beef. **Meat Sci**, 1988; 23: 151-163.
110. Torres EAFS, Okani ET. Teste de TBA:ranço em alimentos. **Rev Nac Carne**, 1997;243:68-78.
111. Truelsen T, Gronbæk M, Schnohr P, Boysen G. Intake of beer, wine, and spirits and risk of stroke. **Stroke**, 1998;29:2467-2472.
112. UVIBRA – União dos Vitivinicultores do Brasil. **Consumo de vinhos no Brasil.** Disponível on line, em: <[URL:http://www.academiadovinho.com.br/geografia/produção.htm](http://www.academiadovinho.com.br/geografia/produção.htm)>. [2003 maio 18].
113. Vinson JA, Hontz BA. Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. **J Agric Food Chem**, 1995; 43:401-403.
114. Vinson JA, Proch J, Bose P. Determination of quantity and quality of polyphenol antioxidants in foods and beverages. **Meth Enzymol**, 2001a; 335: 103-104.
115. Vinson JA, Teufel K, Wu N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. **Atherosclerosis**, 2001b;156:67-72.
116. Viotti E. **Guia dos vinhos brasileiros.** São Paulo:Market Press, 2002.
117. Wang Z, Zou J, Huang Y, Cao K, Xu Y, Wu JM. Effect of resveratrol on platelet aggregation *in vivo* and *in vitro*. **Chin Med J (Engl)**, 2002;115(3): 378-380.

118. Wei Y, Zhao X, Kariya Y, Gutakà H, Teishigawara K, UshidaA. Induction of apoptosis by quercetin:involvement of heat shock protein. **Cancer Res**, 1994; 54:4952-4957.
119. Weisburger JH. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. **Food Chem Toxicol**, 1999; 37 (9-10):943-948.
120. [WHO] World Health Organization. Study Group on Diet, Nutrition and Prevention of Chronic Diseases. **Report**. Geneva; 1990 (WHO – Technical Report Series, 797).
121. Willett WC. Diet and Health: what should we eat? **Science**, 1994; 264:532-537.
122. Yen G-C, Duh P-D. Antioxidative properties of methanolic extracts from peanut hulls. **JAOCS**, 1993; 70:383-386.
123. Yen G-C, Chen H-Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **J Agric Food Chem**, 1995; 43:27-32.

**Anexo 1: Marca, tipo, procedência, teor de álcool e açúcar das amostras.**

Amostra	Marca	Tipo	Empresa	Local de produção	Teor alcoólico (%)	Teor de Açúcar (%)
VT1	Sangue de Boi	Tinto – suave	Vinícola Aurora	Bento Gonçalves/RS	10,6	5,0
VT2	Chapinha	Tinto – suave	Passarin Ind e Com	Jundiaí/SP	11,0	9,0
VT3	Almadén C.S.	Tinto – demi-sec	Seagram do Brasil	Santana do Livramento/RS	11,0	0,5 – 0,6
VT4	Miolo Seleção	Tinto – seco	Vinícola Miolo	Bento Gonçalves/RS	11,5	0,25
VR1	Almadén	Rosé – suave	Seagram do Brasil	Santana do Livramento/RS	11,5	3,5
VR2	Chateau Duvalier	Rosé – demi-sec	Bacardi-Martini do Brasil	Garibaldi/RS	10,3	1,5
VB1	Chalise	Branco suave	Vinhos Salton S/A	Bento Gonçalves/RS	11,0	6,0
VB2	Sonnenberg	Branco demi-sec	Vinhos Salton S/A	Bento Gonçalves/RS	11,5	1,5
S1	Del Valle	Suco de uva	Del Valle	Americana/SP	-	11,0
S2	Santal	Suco de uva	Parmalat	Jundiaí/SP	-	15,5