

PAULO CÉSAR FORTES DA SILVA

PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES *in vitro* DE UVA BRANCA E DE  
UVA TINTA E DE SEUS RESPECTIVOS VINHOS ELABORADOS

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência e Tecnologia  
de Alimentos, para obtenção do  
Título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2003

PAULO CÉSAR FORTES DA SILVA

PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES *in vitro* DE UVA BRANCA E DE  
UVA TINTA E DE SEUS RESPECTIVOS VINHOS ELABORADOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do Título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2003.

---

Prof. Paulo Henrique A. da Silva  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>a</sup>. Tânia Toledo de Oliveira  
(Conselheira)

---

Prof. Marcelo Henrique dos Santos

---

Prof. Tanus Jorge Nagem

---

Prof. Paulo Cesar Stringheta  
(Orientador)

A DEUS,

AGRADEÇO.

Aos meus queridos pais Paulo César da Silva e Heloisa Helena Fortes da Silva e aos meus irmãos Rodrigo, Ana Paula e Arlen,

OFEREÇO.

À minha namorada, amiga e companheira Carmen Luíza,

DEDICO.

## **AGRADECIMENTO**

A Deus, força e luz divina que me conduz.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), pela oportunidade de realizar este curso.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Ao professor Paulo Cesar Stringheta, pela orientação, motivação e apoio; um amigo que não mediu esforços quando precisei de algum suporte, o que foi fundamental para realização do presente trabalho.

À EMBRAPA UVA e VINHO, localizada em Bento Gonçalves – RS, onde conseguimos o fornecimento de parte das matérias-primas, com especial estima para o Dr. Luiz Antenor Rizzon e para o amigo Irineu que me receberam com especial atenção e amizade.

À vitivinicultura CHANDON DO BRASIL, localizada em Garibaldi-RS, onde também conseguimos o fornecimento de parte das matérias-primas. Com especial estima para o meu amigo e gerente de produção Juliano Daniel Perin, pelo treinamento, orientação e todo o suporte que precisei em minha estada no RS. Ao diretor da empresa, Felipe, pela atenção e incentivo à realização do meu trabalho.

Ao enófilo e cardiologista Dr. Jairo Monson, Garibaldi-RS, pela orientação e motivação.

Ao professor Marcelo H. dos Santos, pela amizade e aprendizado. Aos professores Paulo Henrique Alves da Silva, Tânia Toledo de Oliveira e Tanus Jorge Nagem, pela disponibilidade, críticas e conselhos que muito contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório de Pigmentos Naturais e Secagem, Lígia Santana e Valério Poletto, pela compreensão e ajuda, sendo responsáveis pela responsabilidade, organização e ótimo clima do laboratório, propiciando conhecimento e interação. Também aos pesquisadores de Pós-Graduação e iniciação científica, pelo ótimo convívio e amizade, inúmeros são os nomes, lembro de cada um de vocês, saibam disso.

Aos funcionários do DTA, que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto, sendo pois de fundamental importância, dentre nomes e apelidos, sendo assim mais amigável: Bilico, Tineca, Zé Geraldo, Adão, Ademir, Vaninha, Sueli, Maria Rita, Geralda e Juarez.

Aos meus queridos pais, exemplo de humildade, dignidade e luta. Me espelhei nestes grandes atributos para realizar esta etapa da minha vida, e agradeço a Deus por ter eles como grandes referências de ser humanos.

Ao professor Luiz Clairmont de Lima Gomes e à sua esposa Heloisa Helena Feitosa de Lima Gomes, pela motivação, orientação, suporte e acolhimento, sendo pessoas fundamentais para a elaboração do presente trabalho. Ao Zico e ao Paulo Clairmont pelo companheirismo e atenção e à Ritinha pela paciência e ajuda em momentos críticos.

À Carmen Luíza, ser humano fantástico, que me acompanhou durante toda a jornada. Pela partilha dos momentos mais difíceis e mais alegres, sendo fonte inesgotável de companheirismo, paciência, compreensão, atenção e principalmente, de muito amor.

A todos aqueles que porventura não tenham sido citados, mas que com certeza contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

PAULO CÉSAR FORTES DA SILVA, filho de Paulo César da Silva e Heloisa Helena Fortes da Silva, nasceu em Viçosa – Estado de Minas Gerais, em 19 de junho de 1975.

Graduou-se em outubro de 2000, em Engenharia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Em outubro de 2000, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais. Obtendo o título de *Magister Scientiae* pela defesa de tese em 25 de fevereiro de 2003.

## CONTEÚDO

LISTA DE QUADROS.....	x	
LISTA DE FIGURAS.....	xii	
RESUMO.....	xvii	
ABSTRACT.....		
INTRODUÇÃO GERAL.....	1	
CAPÍTULO 1		
EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS DAS FRAÇÕES DAS UVAS RIESLING ITÁLICO E CABERNET SAUVIGNON E DE SEUS RESPECTIVOS VINHOS.....		3
1.1. INTRODUÇÃO.....	3	
1.2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5	
1.3. OBJETIVOS.....	9	
1.4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10	
1.4.1. Inativação enzimática.....	11	
1.4.2. Determinação do método de extração.....	11	

1.4.3. Determinação de polifenóis totais de acordo com o método do reagente Folin Denis.....	12
1.4.4. Contribuição percentual dos componentes dos frutos das uvas Riesling Itálico e Cabernet Sauvignon.....	13
1.4.5. Determinação do teor de polifenóis das frações dos frutos das uvas Riesling Itálico e Cabernet Sauvignon e de seus respectivos vinhos.....	13
1.4.6. Poder redutor.....	13
1.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
1.5.1. Inativação enzimática.....	15
1.5.2. Determinação do método de extração.....	17
1.5.3. Contribuição percentual das frações dos frutos das uvas Riesling Itálico e Cabernet Sauvignon.....	21
1.5.4. Determinação do teor de polifenóis totais das frações dos frutos das uvas Riesling Itálico e Cabernet Sauvignon e de seus respectivos vinhos .....	21
1.5.5. Poder redutor.....	23
1.6. CONCLUSÕES.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

## CAPÍTULO 2

QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLASSES EM EXTRATOS DE FRAÇÕES DE UVAS RIESLING ITÁLICO E CABERNET SAUVIGNON E EM SEUS RESPECTIVOS VINHOS.....	32
2.1. INTRODUÇÃO.....	32
2.2. REVISÃO DE LITERATURA.....	34

2.2.1. Compostos fenólicos e vinho.....	34
2.2.2. Vinificação.....	35
2.2.3. Fenólicos encontrados em vinhos e uvas.....	39
2.2.4. Avaliações de compostos fenólicos em uvas e derivados....	50
2.3. OBJETIVOS.....	56
2.4. METODOLOGIA.....	57
2.4.1. Extração de polifenóis.....	57
2.4.2. Avaliação dos taninos.....	58
2.4.3. Avaliação das Antocianinas.....	58
2.4.4. Avaliação espectrofotométrica das classes fenólicas.....	59
2.4.5. Cromatogramas das amostras.....	59
2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
2.5.1. Concentrações das classes fenólicas.....	61
2.5.2. Perfis cromatográficos dos extratos e vinhos.....	63
2.6. CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

### CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DE EXTRATOS DAS FRAÇÕES DAS UVAS RIESLING ITÁLICO E CABERNET SAUVIGNON E DE SEUS RESPECTIVOS VINHOS.....	80
3.1. INTRODUÇÃO.....	80
3.2. REVISÃO DE LITERATURA.....	84
3.2.1. Antioxidantes e saúde.....	84

3.2.2. Metodologias antioxidantes <i>in vitro</i> .....	89
3.2.2.1. Avaliação da atividade redutora.....	93
3.2.2.2. Determinação da inibição da formação de peróxidos.....	93
3.2.2.3. Avaliação da capacidade sequestrante de radicais DPPH.....	94
3.3. OBJETIVOS.....	95
3.4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	96
3.4.1. Extração de polifenóis.....	96
3.4.2. Avaliação do poder redutor.....	97
3.4.3. Avaliação da inibição de formação de peróxidos.....	97
3.4.4. Avaliação da capacidade sequestrante de radicais DPPH...	98
3.4.4.1. Análise cinética.....	99
3.4.4.2. Análise da percentagem de moléculas de radicais DPPH sequestrado.....	99
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	100
3.5.1. Avaliação do Poder Redutor.....	100
3.5.2. Avaliação da Inibição de Formação de Peróxidos.....	101
3.5.3. Avaliação da capacidade sequestrante de radicais DPPH...	103
3.6. CONCLUSÕES.....	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
RESUMO E CONCLUSÕES.....	114
PERSPECTIVAS.....	117
APÊNDICE.....	118

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Valores percentuais das diferentes frações das uvas Riesling Itálico e Cabernet Sauvignon.....	21
Quadro 2	Teores de polifenóis totais das frações das uvas e vinhos expressos em mg de ácido gálico/100 g da fração ou do vinho em base seca.....	22
Quadro 3	Valores de correlação entre Poder Redutor (Azul da Prússia) e Teor de Polifenóis (Folin-Denis) de extratos fenólicos das frações das uvas e dos vinhos.....	23
Quadro 4	Avaliação espectrofotométrica dos fenólicos totais, ésteres tartáricos, flavonóis e antocianinas dos diferentes componentes das uvas Riesling Itálico e Cabernet Sauvignon e seus respectivos vinhos.....	62
Quadro 5	Valores de concentrações médias de polifenóis (AGE) obtidos por metodologias distintas nos extratos.....	63
Quadro 6	Valores médios do poder redutor apresentado pelos extratos e vinhos expressos em ácido ascórbico equivalente (ppm).....	101
Quadro 7	Valores das percentagens da atividade antioxidante dos extratos e vinhos a 96 horas de reação pela inibição de formação de peróxidos.....	102

Quadro 8	Valores médios dos tempos de meia vida em segundos..	104
Quadro 9	Valores médios em percentagem da concentração de radicais DPPH sequestrados pelos extratos e vinhos a 50 ppm de polifenóis (AGE).....	104
Quadro 1A	Equações das regressões para obtenção do tempo de meia vida.....	127

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Teores de polifenóis expressos em AGE das frações branqueadas e não branqueadas.....	15
Figura 2	Teores relativos de taninos expressos unidades de absorbâncias das frações branqueadas e não branqueadas.....	16
Figura 3	Teores de polifenóis totais dos diferentes extratos da casca de uva Riesling Itálico expresso em ppm de AGE	17
Figura 4	Teores relativos de taninos da casca da uva Riesling Itálico expressos em unidades de absorbância (metodologia de LARRAURI et. al, 1996).....	18
Figura 5	Teores relativos de taninos da casca da uva Riesling Itálico expressos em unidades de absorbância (metodologia SHAHIDI e NACZK, 1995).....	19
Figura 6	Fluxograma de produção de vinhos brancos e tintos (GIRARD e MAZZA, 1998).....	36
Figura 6	Estruturas de alguns ácidos fenólicos: (a) derivados do ácido benzóico; (b) derivados do ácido cinâmico.....	38
Figura 7	Fatores vitivinícolas e ambientais que influenciam a composição de uvas e a qualidade do vinho (ZOECKLEIN et. al, 1995).....	41

Figura 8	Estruturas de alguns ácidos fenólicos: (a) derivados do ácido benzóico; (b) derivados do ácido cinâmico (SHAHIDI e NACZK, 1995).....	43
Figura 9	Representação básica da estrutura do flavonol.....	45
Figura 10	Estrutura básica das antocianinas (cátion flavílium).....	45
Figura 11	Equilíbrio das antocianinas em vinhos (RIBÉREAU-GAYON, 1982).....	46
Figura 12	Estruturas químicas das catequinas, dímeros de procianidinas e trímero C1.....	50
Figura 13	Perfis cromatográficos dos extratos das cascas das uvas a 280 nm (fenólicos totais).....	64
Figura 14	Perfis cromatográficos dos extratos das cascas das uvas a 320 nm (ésteres tartáricos).....	65
Figura 15	Perfis cromatográficos dos extratos das cascas das uvas a 360 nm (flavonóis).....	65
Figura 16	Perfil cromatográfico do extrato da casca da uva Cabernet Sauvignon a 520 nm (pigmentos antociânicos).....	66
Figura 17	Perfis cromatográficos dos extratos das polpas das uvas a 280 nm (fenólicos totais).....	66
Figura 18	Perfis cromatográficos dos extratos das polpas das uvas a 320 nm (ésteres tartáricos).....	67
Figura 19	Perfis cromatográficos dos extratos das polpas das uvas a 360 nm (flavonóis).....	67
Figura 20	Perfil cromatográfico do extrato da polpa da uva Cabernet Sauvignon a 520 nm (pigmentos antociânicos).....	68
Figura 21	Perfis cromatográficos dos vinhos a 280 nm (fenólicos totais).....	68
Figura 22	Perfis cromatográficos dos vinhos a 320 nm (ésteres tartáricos).....	69

Figura 23	Perfis cromatográficos dos vinhos a 360 nm (flavonóis).....	69
Figura 24	Perfil cromatográfico do vinho Cabernet Sauvignon a 520 nm (pigmentos antociânicos).....	70
Figura 25	Porcentagem de atividade antioxidante dos extratos quanto à inibição de formação de peróxidos.....	102
Figura 1A	Curva padrão de polifenóis totais obtida pelo reativo Folin Denis expressa em ácido gálico equivalente.....	119
Figura 2A	Curva padrão do Poder Redutor expressa em ácido ascórbico equivalente.....	119
Figura 3A	Curvas padrões de algumas classes fenólicas obtidas por espectrofotometria.....	120
Figura 4A	Perfil da evolução do índice de oxidação apresentado pelos extratos pela inibição de formação de peróxidos.	121
Figura 5A	Perfil da evolução do índice de oxidação apresentado pelos vinhos pela Inibição de formação de peróxidos....	122
Figura 6A	Comportamento cinético dos valores de absorvância pela redução dos radicais DPPH pelo extrato da casca da uva Riesling Itálico.....	123
Figura 7A	Comportamento cinético dos valores de absorvância pela redução dos radicais DPPH pelo extrato da polpa da uva Riesling Itálico.....	123
Figura 8A	Comportamento cinético dos valores de absorvância pela redução dos radicais DPPH pelo extrato da semente da uva Riesling Itálico.....	124
Figura 9A	Comportamento cinético dos valores de absorvância pela redução dos radicais DPPH pelo extrato do vinho da uva Riesling.....	124
Figura 10A	Comportamento cinético dos valores de absorvância pela redução dos radicais DPPH pelo extrato da casca da uva Cabernet Sauvignon.....	125

Figura 11A	Comportameto cinético dos valores de absorvância pela redução dos radicais DPPH pelo extrato da polpa da uva Cabernet Sauvignon.....	125
Figura 12A	Comportameto cinético dos valores de absorvância pela redução dos radicais DPPH pelo extrato da semente da uva Cabernet.....	126
Figura 13A	Comportameto cinético dos valores de absorvância pela redução dos radicais DPPH pelo extrato do vinho da uva Cabernet Sauvignon.....	126
Figura 14A	Perfil cromatográfico do extrato da casca da uva Riesling Itálico a 280 nm.....	128
Figura 15A	Perfil cromatográfico do extrato da casca da uva Riesling Itálico a 320 nm.....	128
Figura 16A	Perfil cromatográfico do extrato da casca da uva Riesling Itálico a 360 nm.....	129
Figura 17A	Perfil cromatográfico do extrato da casca da uva Cabernet Sauvignon a 280 nm.....	129
Figura 18A	Perfil cromatográfico do extrato da casca da uva Cabernet Sauvignon a 320 nm.....	130
Figura 19A	Perfil cromatográfico do extrato da casca da uva Cabernet Sauvignon a 360 nm.....	130
Figura 20A	Perfil cromatográfico do extrato da casca da uva Cabernet Sauvignon a 520 nm.....	131
Figura 21A	Perfil cromatográfico do extrato da polpa da uva Riesling Itálico a 280 nm.....	131
Figura 22A	Perfil cromatográfico do extrato da polpa da uva Riesling Itálico a 320 nm.....	132
Figura 23A	Perfil cromatográfico do extrato da polpa da uva Riesling Itálico a 360 nm.....	132
Figura 24A	Perfil cromatográfico do extrato da polpa da uva Cabernet Sauvignon a 280 nm.....	133

Figura 25A	Perfil cromatográfico do extrato da polpa da uva Cabernet Sauvignon a 320 nm.....	133
Figura 26A	Perfil cromatográfico do extrato da polpa da uva Cabernet Sauvignon a 360 nm.....	134
Figura 27A	Perfil cromatográfico do extrato da polpa da uva Cabernet Sauvignon a 520 nm.....	134
Figura 28A	Perfil cromatográfico do vinho da uva Riesling Itálico a 280 nm.....	135
Figura 29A	Perfil cromatográfico do vinho da uva Riesling Itálico a 320 nm.....	135
Figura 30A	Perfil cromatográfico do vinho da uva Riesling Itálico a 360 nm.....	136
Figura 31A	Perfil cromatográfico do vinho da uva Cabernet Sauvignon a 280 nm.....	136
Figura 32A	Perfil cromatográfico do vinho da uva Cabernet Sauvignon a 320 nm.....	137
Figura 33A	Perfil cromatográfico do vinho da uva Cabernet Sauvignon a 360 nm.....	137
Figura 34A	Perfil cromatográfico do vinho da uva Cabernet Sauvignon a 520 nm.....	138

## RESUMO

SILVA, Paulo César Fortes da, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro 2003. **Propriedade antioxidantes *in vitro* de uva branca e de uva tinta e de seus respectivos vinhos elaborados.** Orientador: Paulo Cesar Stringheta. Conselheiros: Tânia Toledo de Oliveira e Paulo Henrique Alves da Silva.

Nas últimas décadas tem se observado um crescente consumo de vinho, principalmente o vinho tinto. Dentre vários fatores, destaca-o seu consumo devido principalmente a algumas alegações relacionadas com a saúde, como, retardo do envelhecimento, prevenção de doenças coronarianas e até mesmo atividades anti-inflamatórias e anti-tumorais. Devido a estes fatores o presente trabalho teve como objetivo geral estabelecer uma base comparativa quanto ao potencial antioxidante entre vinho branco e vinho tinto e também averiguar a contribuição das frações (casca, polpa e semente) das uvas que originaram os vinhos para este potencial. Avaliou-se os conteúdos de algumas classes fenólicas do vinho tinto (Cabernet Sauvignon) e do vinho branco (Riesling Itálico) e a atividade antioxidante destes pelo ensaios do Poder Redutor, Inibição de Formação de Peróxidos e Capacidade Sequestrante de radicais livres DPPH. Foram preparados extratos fenólicos das frações das uvas do

mesmo lote que se elaborou os vinhos. Também foi analisado o perfil fenólico destes extratos bem como as atividades antioxidantes. Polifenóis de menor massa molecular se encontram em maior proporção no vinho branco e os cadeias maiores são mais significativos no vinho tinto. Quanto ao poder de redução, todas as amostras possuíram equivalência semelhante. Os vinhos se apresentaram como os melhores inibidores da formação de peróxidos, com destaque para o vinho Riesling Itálico. Os extratos das sementes obtiveram o melhor desempenho na capacidade de sequestrar radicais livres e o vinho Cabernet Sauvignon foi superior ao vinho Riesling Itálico. Pôde-se concluir que os extratos e vinhos que continham uma proporção maior de fenólicos de alto peso molecular, conseguiram sequestrar maior concentração de DPPH radical em menor tempo. Nota-se portanto, que a atividade antioxidante dos extratos e vinhos está fortemente condicionada ao conteúdo fenólico destes, pela quantidade e principalmente pelo tipo de classes de polifenóis presentes. O vinho branco por possuir baixo nível de polifenóis de cadeias maiores (resultante do processo tradicional de vinificação em branco) somente não mostrou uma satisfatória atividade sequestrante de radicais livres quando comparado com o vinho tinto. Sendo assim, verifica-se que uma modificação adequada no processo tecnológico de vinificação em branco, de modo que haja uma participação efetiva de cascas e sementes no mosto para maior extração de polifenóis de cadeias maiores, pode-se obter um efeito comparativo aos vinhos tintos.

## ABSTRACT

SILVA, Paulo César Fortes da, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2003. **Antioxidant *in vitro* properties of white grape and red grape and its respective elaborated.** Advisor: Paulo Cesar Stringheta. Committee Members: Tânia Toledo de Oliveira e Paulo Henrique Alves da Silva.

In the last decades an increasing consumption of wine has been observed, mainly of the red wines. Among several factors, its consumption is distinguished mainly due to some allegations related with health, as retardation of the aging, prevention of coronary diseases and also anti-inflammatory and anti-tumorais activities. Due to these factors, the present work had a general objective to establish a comparative base about the antioxidant potential between white wine and red wine, and also to infer the contribution of the fractions (skin, pulp, and seed) of the grapes which originated the wines. The content of some phenolic classes of the red wine (Cabernet Sauvignon) and of the white wine (Riesling Italic) was evaluated and also the antioxidant activity of those throughout the Reducing Power assay, Inhibition of Peroxide Formation assay, and Scavenging Capacity of DPPH free radicals. Phenolic extracts had been prepared from grape fractions of the same lot which the wines were elaborated. Also the

phenolic profile of these extracts as well as the antioxidant activities were analyzed. Poliphenols of lower molecular mass were found in higher ratio in the white wine, and those of longer chains were more significant in the red wine. According to the reducing power, all the samples presented similar equivalence. The wines presented as the best inhibitors of the peroxide formation with prominence for the Riesling Italic wine. The seed extracts had the best performance in the scavenging capacity of free radicals and the Cabernet Sauvignon wine was better than the Riesling Italic wine. It could be concluded that the extracts and wines which contained a higher ratio of phenolics of high molecular weight could scavenge higher concentration of DPPH radical in a shorter time. Thus, it was noticed that the antioxidant activity of extracts and wines is strongly related to the phenolic content of those, as well as for the amount and mainly for the type of the presented phenolic classes. Due to the fact that white wine contains a low level of phenolics of longer chains (resultant of the traditional process of blank winemaking), it only did not show a satisfactory scavenging activity of free radicals when compared with the red wine. Nevertheless, it is verified that an adequate modification in the technological process of blank winemaking, in such a way that it has an effective participation of grape skin and grape seeds in the must in order to accomplish higher extraction of higher chain poliphenols, can achieve a comparative effect to the red wines.

## INTRODUÇÃO GERAL

Um estudo comparativo iniciado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) tem mostrado diferenças marcantes na mortalidade e enfermidades a partir de doenças do coração entre, especialmente, populações da França e Estados Unidos. Apesar de uma dieta rica em ácidos graxos saturados a níveis comparáveis do conteúdo de colesterol no plasma sanguíneo, os indivíduos franceses mostraram-se menos susceptíveis a doenças coronárias que os indivíduos norte-americanos. Usando análises multivariadas, Renaud e de Lorgeril em 1992, postularam que o consumo de vinho foi o único fator responsável por esta discrepância, sendo comumente referida como o “Paradoxo Francês”.

Desde então, o interesse no consumo dos vinhos alcançou um novo patamar nos últimos anos. A uva e seus produtos derivados contém uma grande variedade de compostos fenólicos e tem sido relatado pela literatura científica que estes tem demonstrado possuir múltiplos efeitos biológicos relacionados à atividade antioxidante.

Vários trabalhos tem sido desenvolvidos para a avaliação de propriedades antioxidantes de vinhos. Bons resultados tem se conseguido particularmente com os vinhos tintos, na maioria dos casos em consequência de apresentarem maior conteúdo fenólico.

Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os constituintes fenólicos das uvas brancas e roxas, bem como de seus respectivos vinhos elaborados. Também avaliar o potencial antioxidante *in vitro* deste material, em diversas concentrações equivalentes em polifenol total, utilizando as análises de poder redutor, inibição de formação de peróxidos e capacidade sequestrante de radicais DPPH e estabelecendo assim um perfil do potencial comparativo entre uvas roxas e brancas e de seus vinhos brancos e tintos.

## **CAPÍTULO 1**

### **EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS DAS FRAÇÕES DAS UVAS RIESLING ITÁLICO E CABERNET SAUVIGNON E DE SEUS RESPECTIVOS VINHOS**

#### **1.1. INTRODUÇÃO**

Os compostos fenólicos em alimentos originam-se de uma das principais classes de metabólitos secundários dos vegetais, são essenciais para o crescimento e reprodução das plantas e também agem contra o ataque de parasitas e patógenos.

Alimentos comuns como a uva e seus produtos derivados contém uma grande variedade de compostos fenólicos em quantidades variando de traços a alguns gramas por quilograma do alimento fresco. Tem sido relatado que estes compostos tem demonstrado possuir múltiplos efeitos biológicos como atividade antioxidante, ação anti-inflamatória, inibição da agregação de plaquetas nos vasos sanguíneos, inibição da oxidação do colesterol LDL bem como atividade antimicrobiana.

A uva é utilizada como matéria-prima para a elaboração de uma gama enorme de produtos como doces, geléias, compotas, uvas passas, tortas, sucos e vinhos. Sendo a fruta de maior produção no mundo, resulta em um elevado volume de resíduos, principalmente casca e semente, em que alguns casos é destinado somente ao consumo animal devido ao seu alto conteúdo de fibras.

O consumo de vinho tinto tem crescido abruptamente no mundo inteiro desde a publicação do relatório sobre o “Paradoxo Francês” em 1981, relacionando o consumo do vinho tinto com um reduzido risco de doenças coronárias. Aliado a isso, verifica-se uma crescente oferta de produtos fitoterápicos derivados de compostos fenólicos da uva, principalmente os taninos derivados da casca e da semente, antocianinas, resveratrol, ácidos fenólicos e flavonóides de modo geral.

Atualmente, métodos industriais para a recuperação de compostos fenólicos de resíduos sólidos das indústrias processadoras de uvas estão sendo desenvolvidos. Estes métodos geralmente estão protegidos por patentes, pois existe uma grande variedade de polifenóis na uva e seus resíduos, e seus métodos de extração e fracionamento de modo a selecionar uma classe específica de polifenol preservando a sua atividade bem como a determinação destes ainda não estão bem definidos.

Assim, devido à grande oferta de resíduos industriais de uva e à complexidade dos polifenóis provenientes desta, é plenamente justificável o estudo de métodos de extração em que se consiga recuperar um teor significativo destes compostos, sem contudo modificar as estruturas destes, bem como obter métodos para a elucidação da sua composição nos extratos para que sirvam de referência como potenciais compostos com benefícios à saúde e ao bem estar humano.

## 1.2. REVISÃO DE LITERATURA

Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas (SÁNCHEZ-MORENO, 2002). São classificados em pelo menos 10 grupos diferentes, dependendo da sua estrutura química. Quimicamente, podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático ligado a um ou mais substituintes hidroxila, incluindo seus derivados funcionais (SHAHIDI e NACZK, 1995). A maioria dos vegetais, se não todos, contém polifenóis os quais se diferenciam um dos outros, sendo assim muitos dos fenólicos alimentícios são solúveis em água e outros em solventes orgânicos.

O nível e variedade de polifenóis nos alimentos está determinado, não só por fatores genéticos da espécie e variedade, mas também por condições da estação, solo, estado de germinação, ataques de parasitas e predadores, exposição à luz solar, tratamentos culturais, colheita, grau de maturação, processamento e armazenamento em que a matéria-prima tenha sido submetida (JEANDET et al., 1995; LARRAURI et al., 1996; ROMANI et al., 1996; AUW et al., 1996; MAZZA et al., 1999; PALMA e TAYLOR, 1999; de FREITAS et al., 2000; ALONSO et al., 2002; SÁNCHEZ-MORENO, 2002; VIDAL et al., 2002).

As análises de compostos polifenólicos em material vegetal são influenciadas pela sua própria natureza, método de extração empregado, tamanho da partícula do material, substâncias interferentes, tempo e temperatura.

Não existe um método de extração completamente satisfatório para a recuperação de todos os compostos fenólicos ou uma classe específica destes em um alimento. A solubilidade dos polifenóis é governada pelo tipo (polaridade) de solvente utilizado, pelo grau de polimerização dos fenólicos, bem como pelas interações dos fenólicos com outros constituintes que podem até resultar na formação de complexos insolúveis.

Os solventes frequentemente utilizados para a extração dos compostos fenólicos incluem o metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformamida e suas combinações.

PALMA e TAYLOR (1999), avaliaram a extração de compostos fenólicos de sementes de uva utilizando o fluido supercrítico dióxido de carbono; LARRAURI et al. (1998), estudaram o efeito da temperatura de processamento (80, 100 e 120°C) dos extratos de casca de uva roxa e branca quanto a capacidade sequestrante de radicais livres. FULEKI e SILVA (1997), utilizaram diferentes solventes em sequência a temperaturas de -24°C por longos períodos para a extração e quantificação de catequinas e procianidinas de sementes de uva Riesling Itália. PALMA et al. (2001), avaliaram a estabilidade de nove compostos fenólicos da semente de uva na extração com metanol superaquecido em diferentes temperaturas (40, 50, 100 e 150°C).

Vários métodos de ensaio para a quantificação de compostos fenólicos tem sido desenvolvidos, mas a maioria deles são métodos isolados. Dificilmente há um trabalho onde se verifica uma comparação de métodos como visto em WATERHOUSE et al. (2000). Um número de revisões sobre análises de polifenóis tem também sido publicado

(Deshpande et al., Jackman et al., Makkar citado por SHAHIDI e NACZK, 1995).

Estes ensaios podem ser classificados como também aqueles os quais determinam um conteúdo total de fenólicos, ou aqueles que quantificam um grupo específico ou classe destes compostos.

Folin-Ciocalteu, Folin-Denis e Prussian Blue são os métodos colorimétricos mais usados para determinação de fenólicos totais, são baseados na redução de um composto (reagente do método) pelos compostos fenólicos, formando assim um complexo cromóforo.

Para a quantificação de polifenóis totais, o método Folin-Denis é o ensaio mais largamente utilizado em materiais vegetais e bebidas (SHAHIDI e NACZK, 1995). Este método é baseado na redução do reagente ácido fomicilídico-fosfotungstico (reagente Folin Denis) para um complexo de coloração azul em solução alcalina pelos compostos fenólicos. É também um método referencial usado para a determinação de compostos fenólicos totais pela AOAC.

SCHNEIDER (1995), fez uma comparação de quatro ensaios distintos entre si para quantificar flavonóides em vinhos de mesa branco, utilizando portanto a reação com o reagente Folin-Ciocalteu, com a vanilina, com o 4-dimetilamino-cinamaldeído e o escurecimento rápido em meio oxidativo. Obtendo portanto uma alta correlação positiva entre as concentrações obtidas pelos três primeiros métodos.

Entre vários métodos colorimétricos para determinação de taninos condensados, o ensaio com a vanilina, baseado na condensação desta com proantocianinas em soluções ácidas, é geralmente reconhecido como um método colorimétrico largamente utilizado em materiais vegetais devido a sua sensibilidade, especificidade e simplicidade (SHAHIDI e NACZK, 1995). Entretanto, JOSLYN e GOLDSTEIN (1963), citam que uma variedade de procedimentos utilizados por diversos autores tem sido usados

para a determinação do conteúdo de taninos. Estes métodos são baseados na redução de permanganato fracamente acidificado pelos polihidroxibenzenos, ou do fosfotungstato-fosfomolibdato alcalino; pela formação de complexos férricos coloridos; pela formação de produtos coloridos oriundos da reação com vários reagentes eletrofílicos como a diazotizado *p*-nitroanilina, vanilina-ácido sulfúrico, ácido nitroso, ou pela precipitação das soluções por uma variedade de reagentes incluindo sais de alumínio, zinco, proteínas como a gelatina, e alcalóides. Ao mesmo tempo nenhum desses métodos é específico, mesmo a clássica precipitação de proteína.

### **1.3. OBJETIVOS**

- Determinar a contribuição percentual das frações (casca, semente e polpa) dos frutos de uvas Riesling Itáliaico e Cabernet Sauvignon;
- Determinar um método de extração de polifenóis de modo a obter uma satisfatória recuperação de polifenóis;
- Determinar a contribuição de polifenóis totais de cada fração das uvas citadas;
- Determinar o poder redutor dos extratos obtidos de cada fração das uvas citadas;

## **1.4. MATERIAIS E MÉTODOS**

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Pigmentos Naturais e Secagem do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais.

As uvas e os vinhos utilizados foram adquiridos da região Sul do Brasil, precisamente da Serra Gaúcha, Bento Gonçalves - RS, onde lá mesmo as uvas foram submetidas ao processo de vinificação. As variedades de uva escolhidas foram a Cabernet Sauvignon e a Riesling Itália, estando estas entre as mais utilizadas no mundo para a elaboração de vinhos finos.

As uvas foram acondicionadas em embalagens plásticas (polietileno de alta densidade) e armazenadas em congeladores (freezer horizontal) à temperatura de  $-15^{\circ}\text{C}$  após processo de congelamento rápido por nitrogênio líquido. Os vinhos, após a elaboração, foram armazenados em garrafas de vidro sob temperatura de refrigeração ( $+6^{\circ}\text{C}$ ) após sua elaboração. Os vinhos e uvas foram mantidos sob estas condições de estocagem durante o experimento até o momento das análises que se seguiram. Todas as leituras espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro (UV-1601 PC Shimadzu) e cubetas de quartzo com 10mm de caminho ótico.

#### **1.4.1. Inativação enzimática**

Utilizou-se a casca e a polpa da uva Riesling Itáliaico para verificar a influência do branqueamento na extração de polifenóis.

Os cachos de uvas congelados foram diretamente mergulhados em água (95°C) por um minuto. Em seguida realizou-se o teste do catecol (qualitativo) (ZAWISTOWSKI et al., 1991) para verificar a eficiência do branqueamento.

Este material foi liofilizado, e um grama em peso seco dos componentes liofilizados triturados, exceto semente (meio grama), foi adicionado de 40 mL de metanol:água, 70:30, por uma hora. O sobrenadante foi recolhido por centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos a 20°C (FANEN EXCELSA II 206 MP) e o resíduo foi adicionado de 40 mL de acetona:água, 70:30, por mais uma hora. O sobrenadante foi recolhido da mesma maneira que a anterior e foram combinados em balão de 100 mL (volume completado com água destilada) para realizar as análises de polifenóis totais e taninos pelo método Folin-Denis e reação com vanilina, respectivamente (SHAHIDI e NACZK, 1995). Como testemunhas realizou-se este mesmo procedimento com as frações frescas da uva Riesling Itáliaico. As extrações foram realizadas em três repetições e as leituras quantitativas em triplicata.

#### **1.4.2. Determinação do método de extração**

O material a ser analisado foi submetido à inativação enzimática, separação das frações (casca, polpa e semente) manualmente e posteriormente ao processo de liofilização. Os vinhos foram concentrados à pressão reduzida a 37°C e em seguida também submetidos ao processo de liofilização.

Foram avaliados diversos sistemas extratores utilizados em literatura para obtenção do extrato somente da casca da uva Riesling Itália liofilizada de modo a conseguir uma satisfatória extração de compostos fenólicos. O material liofilizado foi adicionado de solvente extrator na proporção de 1 g em peso seco por 40 mL de solvente, e permaneceu em repouso por 24 horas à temperatura de  $17 \pm 1^\circ\text{C}$ . Após este período o material foi filtrado em lã de vidro e o volume final foi completado com água destilada para 100 mL. Uma alíquota foi retirada deste extrato para a quantificação de polifenóis totais expresso em ácido gálico equivalente (AGE), obtido por curva padrão, pelo método de Folin-Denis segundo (Swain e Hillis, 1959) citado por SHAHIDI e NACZK (1995). Também do mesmo extrato foi retirada uma alíquota para quantificação de taninos extraídos segundo metodologia (Price et al., 1978) citada por SHAHIDI e NACZK (1995), e segundo a metodologia (Swain e Hillis, 1959) citado por LARRAURI et al. (1996). Este procedimento foi realizado em três repetições.

#### **1.4.3. Determinação de polifenóis totais de acordo com o método do reagente Folin Denis.**

As análises de polifenóis totais nos extratos e vinhos foram realizadas segundo metodologia, que utiliza o reagente Folin Denis, citada por SHAHIDI e NACZK (1995). Para cada 1,0 mL da amostra a ser analisada em um tubo de ensaio, adicionou-se nesta ordem 7,5 mL de água destilada e 0,5 mL do reativo de Folin Denis, agitou-se em seguida vigorosamente este tubo e esperou por três minutos até então ser adicionado 1,0 mL de solução de bicarbonato de sódio saturada. Em seguida deixou-se o tubo por uma hora ao abrigo da luz à temperatura ambiente quando então prontamente foi feita a leitura espectrofotométrica desta solução a 725 nm contra um branco. A solução “branco” foi

preparada nas mesmas condições que a amostra, contanto que o volume da amostra foi substituído por 1,0 mL do solvente a qual esta tenha sido preparada. Os polifenóis foram expressos em concentração de ácido gálico equivalente (AGE) obtido por curva padrão pelo mesmo método.

#### **1.4.4. Contribuição percentual dos componentes dos frutos das uvas Riesling Itálico e Cabernet Sauvignon**

Pesou-se em torno de 700g de uvas inteiras pré-inativadas enzimaticamente (Riesling Itálico e Cabernet Sauvignon) e realizou-se manualmente a separação da casca, semente e polpa. Posteriormente pesou-se as cascas levemente pressionadas e as sementes previamente secas em papel toalha, e por diferença em relação à massa inicial de frutos obteve-se a contribuição da polpa. Este procedimento foi realizado em três repetições.

#### **1.4.5. Determinação do teor de polifenóis das frações dos frutos das uvas Riesling Itálico e Cabernet Sauvignon e de seus respectivos vinhos**

Realizou-se a extração de polifenóis das frações das uvas utilizando o método de extração selecionado no ítem 1.4.2. com algumas modificações que estão mencionadas em ítem da secção resultados e discussão, sendo então avaliado o conteúdo fenólico destas frações e dos vinhos pelo método de Folin-Denis citado por SHAHIDI e NACZK (1995). Os polifenóis foram expressos em ácido gálico equivalente (AGE). A umidade das frações e do vinho foi obtida por secagem de aproximadamente 1 grama do material liofilizado em estufa (FANEM) a 75°C até peso constante. As análises foram realizadas em três repetições.

#### **1.4.6. Poder redutor**

Realizou-se as extrações de polifenóis dos vinhos e das demais frações das uvas utilizando o método de extração do item anterior. As

amostras dos extratos foram diluídas em concentrações de 50, 10 e 1 ppm de polifenóis expressos em AGE de acordo curva padrão obtida pelo método Folin-Denis, quando então foi avaliado o poder de redução destas amostras de acordo com metodologia descrita (YEN e CHEN, 1995), com modificações. Uma elevada absorvância da amostra testada indicará grande poder redutor. As análises foram realizadas em triplicata.

## 1.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1.5.1. Inativação enzimática

O branqueamento, banho em água a 95°C por um minuto, foi suficiente para que fosse realizada uma inativação enzimática eficiente, principalmente das polifenol oxidases. O resultado pôde ser observado visivelmente pelo não escurecimento do material vegetal após o tratamento comparado com uma testemunha (não recebeu tratamento térmico).

A Figura 1 mostra a influência do branqueamento na extração de fenólicos das frações da uva Riesling Itália.

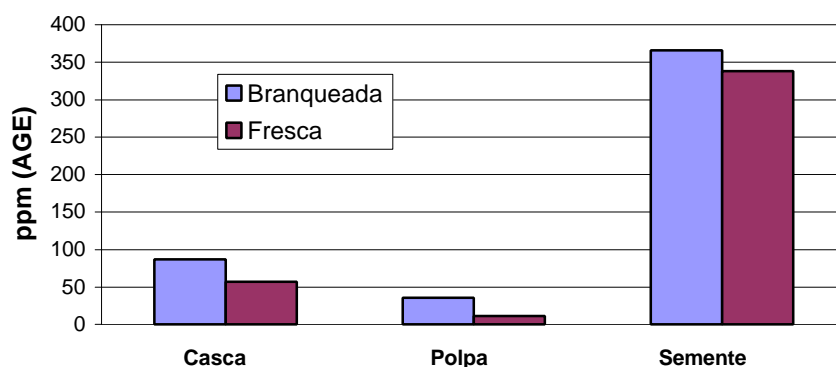


Figura 1 – Teores de polifenóis expressos em AGE das frações branqueadas e não branqueadas.

Observou-se que o branqueamento das cascas de uva possibilitou um maior rendimento na extração de polifenóis totais quando comparado com material não tratado termicamente. Para tal, verificou-se que a razão entre o teor de polifenóis de amostras branqueadas em relação às que não foram submetidas ao tratamento térmico foi maior que 1. Esta mesma relação foi também estabelecida para o teor de taninos avaliados nas mesmas amostras, sendo que esta razão foi ligeiramente maior que a razão obtida para o teor de polifenóis totais.

Fatos estes devido possivelmente a uma maior descompartimentalização do tecido vegetal e eventualmente alguma modificação de estruturas maiores de alguns polifenóis, principalmente os taninos condensados.

A Figura 2 mostra a influência do branqueamento na extração de taninos em absorvância das frações da uva Riesling Itália.

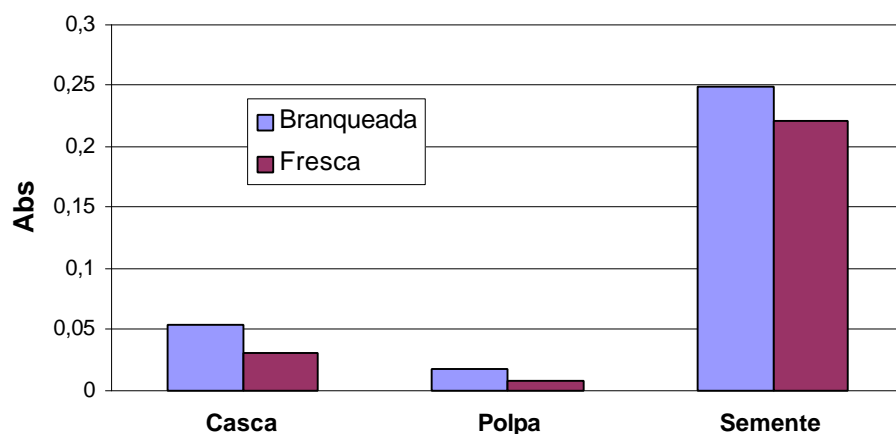


Figura 2 – Teores relativos de taninos expressos em unidades de absorvâncias das frações branqueadas e não branqueadas.

Os teores são relativos pois não foi determinado uma curva padrão com taninos propriamente ditos. Em se tratando de uma análise comparativa, decidiu-se por expressar em unidades de absorvância.

Os resultados mostram que a inativação enzimática das uvas é um fator importante (ponto crítico) nos cuidados com as amostras quando se pretende determinar a capacidade antioxidante dos componentes das uvas.

### 1.5.2. Determinação do método de extração

A Figura 3 ilustra o teor de polifenóis totais expresso em AGE (ppm) dos diferentes extratos da casca de uva Riesling Itálico obtidos por 11 sistemas solventes distintos.

Foi realizada uma análise de variância ( $p \leq 0.01$ ). Todas as médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

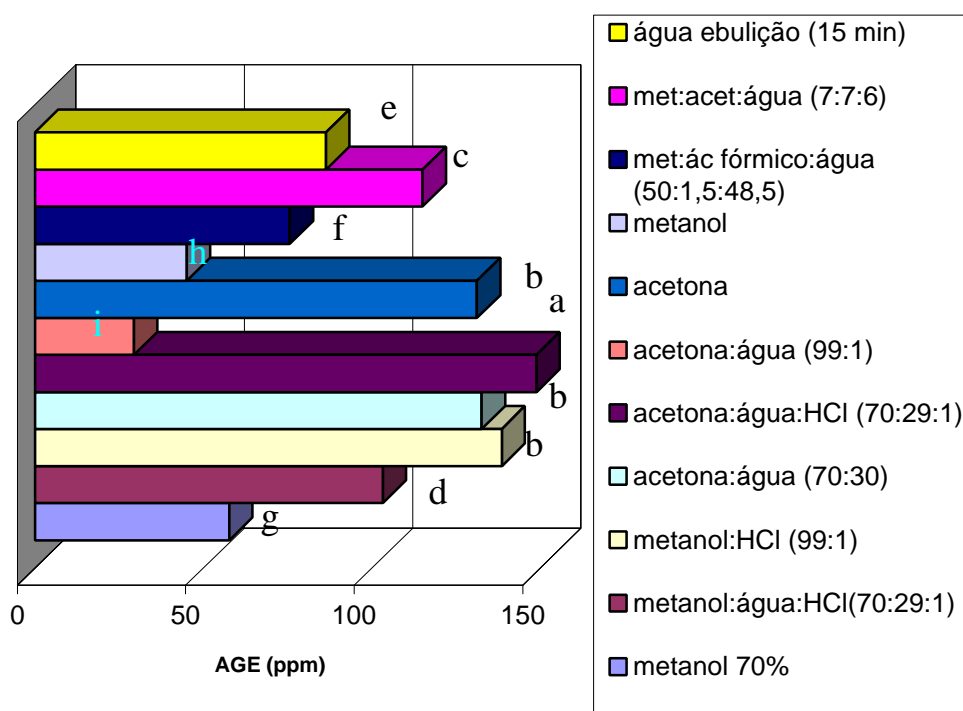


Figura 3 - Teores de polifenóis totais dos diferentes extratos da casca de uva Riesling Itálico expresso em ppm de AGE.

As Figuras 4 e 5 ilustram os teores de taninos expressos em unidades de absorvância, pelos métodos de LARRAURI et al. (1996) e

SHAHIDI e NACZK (1995), dos diferentes extratos da casca de uva Riesling Itálico obtidos por sistemas extratores distintos.

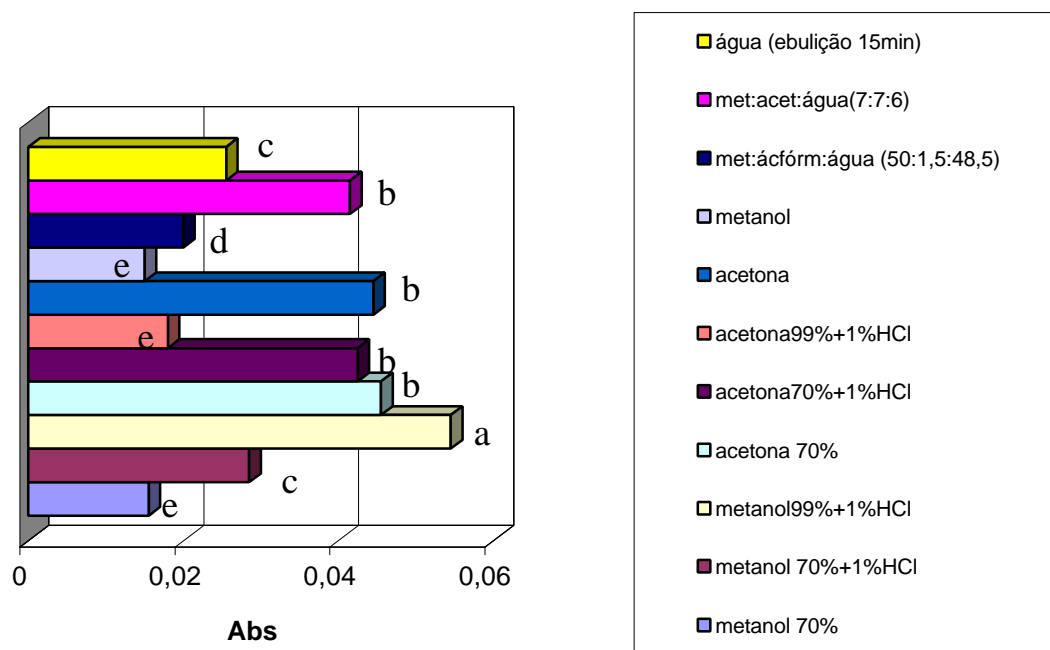


Figura 4 – Teores relativos de taninos da casca da uva Riesling Itálico expressos em unidades de absorbância (metodologia de LARRAURI et. al, 1996).

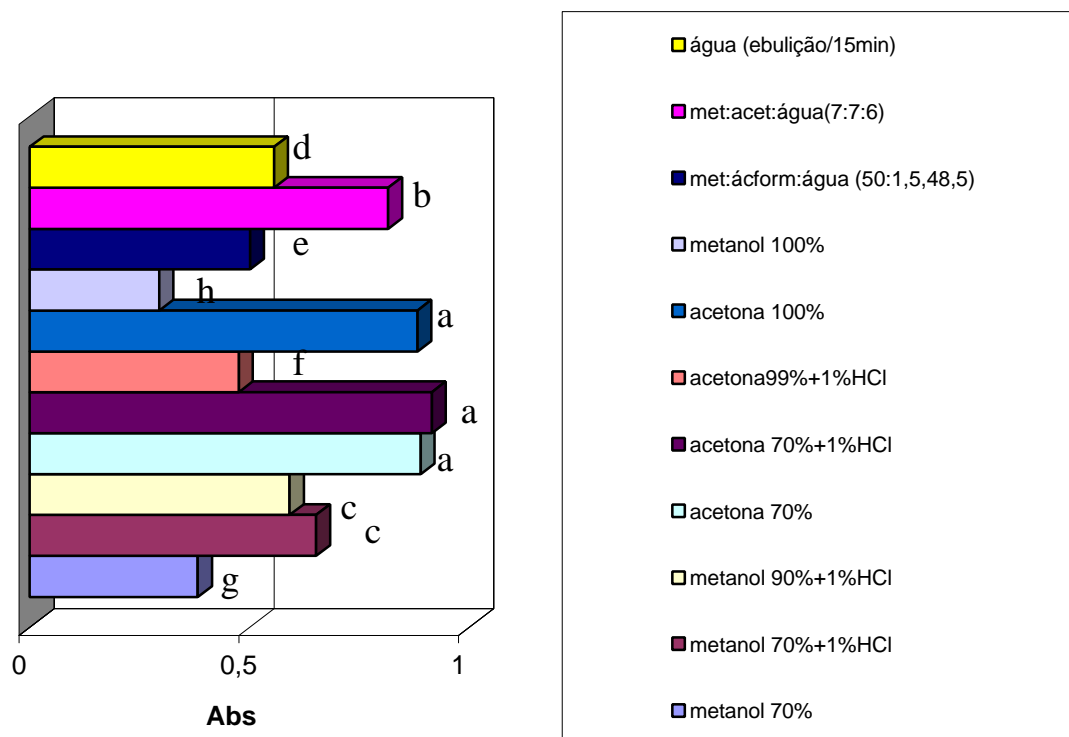


Figura 5 – Teores relativos de taninos da casca da uva Riesling Itálico expressos em unidades de absorvância (metodologia SHAHIDI e NACZK, 1995).

A curva padrão obtida com ácido gálico pelo método Folin-Denis utilizada para expressar os polifenóis totais pode ser vista na seção apêndice.

O sistema solvente acetona:água (70:30) foi selecionado para a condução das extrações do experimento, pois apresentou uma alta recuperação de polifenóis da casca de uva Riesling Itálico, ainda assim recuperando alto teor de taninos quando comparado com outros sistemas de solventes utilizados.

Outro aspecto positivo deste sistema de solvente é o fato de não conter ácido e principalmente álcool, pois segundo alguns pesquisadores, estas substâncias quando combinadas com o fator calor, comprometem a estrutura original dos taninos, transformando alguns destes em moléculas

menores (monômeros e oligômeros), principalmente nas etapas de concentração do extrato.

Devido a este inconveniente de modificação dos constituintes originais do extrato e devido ao fator tempo, uma ligeira modificação foi realizada no método de extração de polifenóis. O material liofilizado foi triturado em triturador de haste longa de aço inoxidável (MARCONI) juntamente com o solvente extrator (acetona:água;70:30) na proporção de 1 g em peso seco do material para 40 mL do solvente extrator por 5 minutos, e permaneceu em repouso por 25 minutos. Em seguida este material foi filtrado em papel Whatman nº1 e concentrado em evaporador a vácuo a 37°C (FISATON) para que se removesse a acetona remanescente. Em seguida este material foi recuperado do balão concentrador utilizando uma solução água:etanol; 90:10. Resultando assim em um extrato fenólico onde o seu conteúdo fenólico foi maior que o do procedimento anteriormente analisado.

### **1.5.3. Contribuição percentual das frações dos frutos das uvas Riesling Itálico e Cabernet Sauvignon**

Quadro 1 - Valores percentuais das diferentes frações das uvas Riesling Itálico e Cabernet Sauvignon.

	Casca	Polpa	Semente
Riesling Itálico	18,23 ± 0,52	77,77 ± 0,36	4,00 ± 0,21
Cabernet Sauvignon	22,88 ± 1,35	72,60 ± 0,97	4,52 ± 0,42

Os valores percentuais estão expressos em média ± desvio-padrão.

Nota-se que a variedades de uvas Riesling Itálico e Cabernet Sauvignon possuem um perfil semelhante quanto ao conteúdo percentual de sua frações.

### **1.5.4. Determinação do teor de polifenóis totais das frações dos frutos das uvas Riesling Itálico e Cabernet Sauvignon e de seus respectivos vinhos**

O Quadro 2 expressa o teor de polifenóis totais das frações (casca, polpa e semente) das uvas Riesling Itálico e Cabernet Sauvignon e dos seus respectivos vinhos.

Quadro 2 – Teores de polifenóis totais das frações das uvas e vinhos expressos em mg de ácido gálico/100 g da fração ou do vinho em base seca.

Frações e vinhos		Polifenóis totais (mg/100g)
	Casca	1458,71 ± 116,20
Riesling	Polpa	168,62 ± 2,91
Itálico	Semente	5097,59 ± 79,08
	Vinho	561,83 ± 7,7,3
	Casca	2670,39 ± 336,92
Cabernet	Polpa	216,62 ± 3,64
Sauvignon	Semente	5120,22 ± 41,65
	Vinho	5309,92 ± 70,72

Os teores de polifenóis estão expressos em média ± desvio-padrão.

### 1.5.5. Poder redutor

O Quadro 3 apresenta os valores de absorvância obtidos pelos extratos fenólicos das diferentes frações das uvas e vinhos testados pelo método Azul da Prússia (YEN e CHEN, 1995), observando-se que absorvâncias elevadas indicam grande poder redutor.

Quadro 3 - Valores de correlação entre Poder Redutor (Azul da Prússia) e Teor de Polifenóis (Folin-Denis) dos extratos fenólicos das frações das uvas e dos vinhos.

Frações das uvas e vinhos	Valores médios de absorvância pelo método Azul da Prússia			Valores de Correlação
	*1 ppm	*10 ppm	*50 ppm	
Casca Riesling	0,0200a	0,1525abc	0,6765bc	<b>0,9998</b>
Casca Sauvignon	0,0200a	0,1390c	0,6280cd	<b>0,9999</b>
Polpa Riesling	0,0150a	0,1495abc	0,7260ab	<b>1,0000</b>
Polpa Sauvignon	0,0190a	0,1325c	0,5965d	<b>0,9999</b>
Semente Riesling	0,0215a	0,1605ab	0,7250ab	<b>0,9999</b>
Semente Sauvignon	0,0221a	0,1627a	0,7640a	<b>1,0000</b>
Vinho Riesling	0,0175a	0,1405bc	0,6565c	<b>1,0000</b>
Vinho Sauvignon	0,0205a	0,1385c	0,6285cd	<b>0,9999</b>

\*Concentrações de polifenóis expresso em AGE (ppm) dos extratos e vinhos pelo método Folin Denis.

Observa-se no Quadro 3 uma correlação muito alta entre os três valores de concentração dos extratos obtidos pelo método Folin-Denis e

pelos valores de absorvância obtidos pelo método Azul da Prússia (poder redutor).

As médias seguidas por uma mesma letra em cada coluna não diferem entre si estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Sendo o método Azul da Prússia um método de determinação de compostos fenólicos, nota-se que este método mostra-se favorável quanto ao seu emprego na determinação de polifenóis totais em extratos de uvas e vinhos quando comparado com o método Folin-Denis.

## 1.6. CONCLUSÕES

Não existe na literatura um método satisfatório para a extração de polifenóis para variados materiais vegetais. Dependendo da amostra há a necessidade de tomar alguns cuidados prévios quanto às condições de armazenamento, pré-tratamento para inativação de enzimas indesejáveis, principalmente quando há rompimento do tecido vegetal. É interessante saber que um bom método deve conseguir recuperar o máximo teor de polifenóis de uma amostra em um intervalo de tempo relativamente curto. Pois dependendo do objetivo de utilização dos polifenóis e classes destes a serem extraídas, podemos ter muitas modificações em suas estruturas, comprometendo o perfil original destes quando comparado com o tecido vegetal intacto.

Vários fatores podem interferir em tal situação, sendo o tipo de maceração, tamanho das partículas do material vegetal, solventes utilizados, o tempo e temperatura de extração, métodos de filtração, fracionamento e recuperação.

Percebe-se, portanto, que na literatura, variados são os métodos de extração de polifenóis em um mesmo tipo de material, a uva por exemplo. Estes métodos podem variar de acordo com os objetivos a que se destina a análise, mas não verifica-se uma padronização destes em análises que

possuem objetivos semelhantes como exemplo análises de avaliação antioxidante ou análises de quantificação e caracterização de certas classes de polifenóis.

Quanto à quantificação de polifenóis, também não existem métodos padronizados, mesmo aqueles colorimétricos que podem ser utilizados em rotina. O método mais empregado para a quantificação de polifenóis totais em uvas e derivados é o Folin-Ciocalteu, mesmo assim verifica-se variações no método de acordo com cada pesquisador. Neste trabalho utilizamos o método Folin-Denis, que segundo SHAHIDI e NACZK (1995), não há influência de interferentes como proteínas, açúcares ou outras substâncias redutoras que não sejam polifenóis. Também utilizamos o método Azul da Prússia (YEN e CHEN, 1995) para a determinação do poder redutor dos extratos obtidos, observando-se uma alta correlação nos valores numéricos das concentrações obtidas pelo método Folin-Denis e Azul da Prússia, podendo-se talvez ser um método alternativo para a quantificação de polifenóis totais, principalmente pela facilidade de sua aplicação e obtenção dos reagentes para o preparo do método. É interessante notar que para estes tipos de análises, deve se ter um conhecimento prévio do material bem como a seleção do tipo de padrão para representar uma classe ou todo um conteúdo fenólico. O uso de catequina como padrão em métodos que quantificam procianidinas (taninos condensados) por colorimetria através da reação de polifenóis com vanilina em meio ácido, sempre superestima o conteúdo de procianidinas, sendo estas formadas por unidades de catequinas, epicatequinas e seus derivados substituídos. Há várias variações neste método.

Hoje em dia métodos mais precisos como os que utilizam cromatografia líquida de alta eficiência estão sendo desenvolvidos para determinações rápidas e sem muito preparo das amostras, para que reflitam

mais fielmente o conteúdo fenólico. Mesmo assim estes métodos são muito variados.

Devido à complexidade da composição de polifenóis presentes nas uvas e vinhos, verifica-se a necessidade de estudos específicos, distinguindo critérios para a padronização de alguns métodos de extração e quantificação de polifenóis. Não para que sejam postulados, mas que evoluam de acordo com os avanços tecnológicos da ciência e que sirvam de ferramentas confiáveis para análises da composição química destas preparações para cientistas e para o interesse comercial.

Neste capítulo pôde-se concluir sobre a potencialidade apresentada pela uva branca Riesling Itálico comparada com a uva tinta Cabernet Sauvignon. O teores fenólicos das diferentes frações foram muito similares, também o mesmo pode ser averiguado quanto ao poder redutor. Assim, torna-se interessante o uso da uva branca na elaboração de derivados de modo a obter um produto com maior valor agregado principalmente devido à potencialidade dos efeitos farmacológicos apresentados pelos polifenóis dos vinhos tintos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, A. M; GUILLÉN, D. A; BARROSO, C. G; PUERTAS, B; GARCÍA, A. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. **J. Agric. Food Chem.** n.50, p.5832-5836, 2002.
- AUW, J. M; BLANCO, V; O'KEEFE, S. F; SIMS, C. A. Effect of processing on the phenolics and color of cabernet sauvignon, chambourcin, and noble wines and juices. **Am. J. Enol. Vitic.** v.47, n.3, p.279-286, 1996.
- de FREITAS, V. A. P; GLORIES, Y; MONIQUE, A. Developmental changes of procyanidins in grapes of red *Vitis vinifera* varieties and their composition in respective wines. **Am. J. Enol. Vitic.** n.4, v. 51, p.397-403, 2000.
- FUHRMAN, B; VOLKOVA, N; SURASKI, A; AVIRAM, M. White wine with red wine – like properties: Increased extraction of grape skin polyphenols improves the antioxidants capacity of the derived white wine. **J. Agric. Food Chem.** n. 49, p.3164-3168, 2001.
- FULEKI, T; SILVA, J. M. R. Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. **J. Agric. Food Chem.** n.45, p.1156-1160, 1997.

- GAO, L; MAZZA, G. Characterization, quantitation, and distribution of anthocyanins and colorless phenolics in sweet cherries. **J. Agric. Food Chem.** n.43, p.343-346, 1995.
- JEANDET, P; BESSIS, R; SBAGHI, M; MEUNIER, P; TROLLAT, P. Resveratrol content of wines of different ages: relationship with fungal disease pressure in the vineyard. **Am. J. Enol. Vitic.** v.46, n.1, p.1-4, 1995.
- JOSLYN, M. A; GOLDSTEIN, J. L. Conversion of leucoanthocyanins into the corresponding anthocyanidins. **Science.** p.179-217, 1963.
- KANNER, J; FRANKEL, E; GRANIT, R; GERMAN, B; KINSELLA, J.E. Natural antioxidants in grapes and wines. **J. Agric. Food Chem.** n.42, p.64-69, 1994.
- LANDRAULT, N; POUCHERET, P; RAVEL, P; GASE, F; CROS, G; TEISSEDE, P. L. Antioxidant capacities and phenolics level of french wines from different varieties and vintages. **J. Agric. Food Chem.** n.49, p.3341-3348, 2001.
- LARRAURI, A. J; SÁNCHEZ-MORENO, C; SAURA-CALIXTO, F; Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape peels. **J. Agric. Food Chem.** n.46, p.2694-2697, 1998.
- LARRAURI, J. A; RUPEREZ, P; CALIXTO, F. S. Antioxidant activity of wine pomace. **Am. J. Enol. Vitic.** v.47, n.4, p.369-372, 1996.
- MAZZA, G; FUKUMOTO, L; DELAQUIS, P; GIRARD, B; EWERT, B. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. **J. Agric. Food Chem.** n.47, p.4009-4017, 1999.
- MOYER, R. A; HUMMER, K. E; FINN, C. E; FREI, B; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus and Ribes. **J. Agric. Food Chem.** n.50, p.519-525, 2002.

- PALMA, M; TAYLOR, L. T. Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. **Journal of Chromatography a.** v.849, p.117-124, 1999.
- PALMA, M; ZULEMA, P; BARROSO, C. G. Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents. **Journal of Chromatography A.** v.921, p.169-174, 2001.
- ROMANI, A; MANCINI, P; TATTI, S; VINCIERI, F. F. Polyphenols and polysaccharides in tuscan grapes and wines. **Ital. J. Food Sci.** n.1, p.13-24, 1996.
- SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: estructura y clasificación. Presencia en alimentos y consumo. Biodisponibilidad y metabolismo. **Alimentaria** 2002; p.19-27.
- SATO, M; RAMARATHNAM, N; SUZUKI, Y; OHKUBO, T. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. **J. Agric. Food Chem.** n.44, p.37-41, 1996.
- SCHNEIDER, R. Evaluation of small amounts of flavonoid phenols in white wines by colorimetric assays. **Am. J. Enol. Vitic.** v.46, n.2, p.274-277, 1995.
- SHAHIDI, F; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications.** 1. ed. Lancaster: Technomic Publishing Co, Inc., 1995.331p.
- SHAHIDI; F. Natural antioxidantes. An overview. In: SHAHIDI, F. (Ed.). **Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications.** Newfoundland: AOCS Press, 1997. cap. 1, p.1-11.
- SOUTO, A. A; CARNEIRO, C. M; SEFERIN, M; SENNA, M. J. H; CONZ, A; GOBBI, K. Determination of *trans*-resveratrol concentrations in Brazilian red wines by HPLC. **Journal of food composition and analysis,** v. 14, p. 441-445, 2001.

- VIDAL, S; CARTALADE, D; SOUQUET, J.M; FULCRAND, H; CHEYNIER, V. Changes in proanthocyanin chain length in winelike model solutions. . **J. Agric. Food Chem.** n.50, p.2261-2266, 2002.
- WATERHOUSE, A.L; IGNELZI, S; SHIRLEY, J. R. A comparison of methods for quantifying oligomeric proanthocanidins from grape seed extracts. **Am. J. Enol. Vitic.** n.4, v. 51, p.383-389, 2000.
- WILLIAMS, R. L, ELLIOT, M. S. Antioxidantes in grapes and wine: chemistry and health effects. In: SHAHIDI, F. (Ed.). **Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications.** Newfoundland: AOCS Press, 1997. cap. 9, p.150-173.
- YEN, G.-C., CHEN, H. Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Jornal of Agricultural and Food Chemistry**, v.67, p.415-420, 1995.
- ZAWISTOWSKI, J.; BILIADERIS, C. G.; ESKIN, N. A. M. Polyphenol oxidase. In.: **Oxidative enzymes in foods.** ROBINSON, D. S.; ESKIN, N. A. M. Ed. Elsevier Applied Science, London. 1991. p. 217- 273.

## **CAPÍTULO 2**

### **QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLASSES EM EXTRATOS DE FRAÇÕES DE UVAS RIESLING ITÁLICO E CABERNET SAUVIGNON E EM SEUS RESPECTIVOS VINHOS**

#### **2.1. INTRODUÇÃO**

Os compostos fenólicos são componentes de grande importância para os vinhos, pois são responsáveis pelas diversas variações de cor, adstringência, amargor, nível de oxidação, corpo e demais características relacionadas. São estas diferenças que tornam os vinhos tão interessantes para diversas ocasiões.

Os fenólicos do vinho refletem a variedade de uva utilizada para sua elaboração e são indicadores do grau de maceração das uvas durante a vinificação. Eles são substratos para o escurecimento enzimático dos mostos e são os principais substratos para a autooxidação não enzimática em vinhos. Usualmente mudam em resposta ao processamento, estabilização, oxidação e envelhecimento de um vinho, dependendo das condições e da

duração de cada tratamento. Diferenças na composição de fenólicos entre os vinhos são algumas vezes qualitativas, refletindo a presença ou a falta de certos fenólicos (vinho tinto e o vinho branco onde há um óbvio exemplo quanto ao conteúdo de pigmentos, as antocianinas). Mais frequente, são as diferenças entre os teores de constituintes fenólicos comuns aos vinhos. Por exemplo, dois vinhos tintos jovens com cores similares, podem ser muito diferentes no conteúdo de taninos, o que refletirá na adstringência do vinho quando consumido.

Recentemente a atenção voltada para o consumo de vinho tem sido aumentada devido a algumas alegações funcionais apresentadas. Tais alegações como, redução do colesterol LDL, prevenção de aterosclerose, doenças coronarianas de modo geral, efeito antiinflamatório e atividade antioxidante, são atribuídas pela presença dos constituintes fenólicos do vinho. Sendo algumas destas propriedades atribuídas por compostos fenólicos específicos, classes destes ou mesmo pela interação de vários compostos.

Portanto faz se notar a importância do estudo do perfil fenólico presente em uvas e vinhos para que se possa inferir características de qualidades a estes, tanto do ponto de vista sensorial bem como atribuição de potencialidades farmacológicas relacionadas ao consumo destes.

## **2.2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.2.1. Compostos fenólicos e vinho**

Os compostos fenólicos em alimentos originam de uma das principais classes de metabólitos secundários dos vegetais, são essenciais para o crescimento e reprodução das plantas e também agem como antiparasitas e antipatógenos.

Quimicamente, estes compostos podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático ligado a um ou mais substituintes hidroxila, incluindo seu derivados funcionais (SHAHIDI e NACZK, 1995). A maioria dos vegetais, se não todos, contém polifenóis os quais se diferenciam um dos outros, sendo assim muitos dos fenólicos alimentícios são solúveis em água ou em solventes orgânicos. Fenólicos encontrados em alimentos geralmente pertencem à classe dos ácidos fenólicos, flavonóides, lignanas, estilbenos, coumarinas e taninos (SHAHIDI e NACZK, 1995).

O vinho constitui uma das bebidas mais antigas e mais populares do mundo sendo os compostos fenólicos importantes componentes, contribuindo, portanto, para as características sensoriais como a cor, flavor, adstringência e corpo (dureza) do vinho, diretamente, ou pela interação

com proteínas, polissacarídeos, ou outros compostos fenólicos (SHAHIDI e NACZK, 1995).

A diversidade de tipos e estilos de vinhos é largamente devida à extrema variabilidade em concentração e composição de constituintes fenólicos, os quais são também intrínsecos à maturação e ao envelhecimento do vinho (SOMERS e VÉRETTE, 1988).

### **2.2.2. Vinificação**

O vinho é uma bebida moderadamente alcoólica elaborada pela fermentação de suco extraídos de uvas frescas e maduras. Os vinhos podem ser classificados por nomes varietais como “Riesling Itálico”, “Cabernet Sauvignon”, ou por nomes genéricos, os quais se referem a regiões européias onde vinhos de típicos foram primeiramente produzidos. Nomes genéricos incluem “Burgundy”, “Chiant”e “Chablis”. Pode ainda classificar um vinho de acordo com a época da safra ao qual este tenha sido elaborado, sendo denominados vinhos safrários.

Existem diversas classes de vinhos, dentre elas, vinhos tinto de mesa, vinhos brancos de mesa, vinhos rosé de mesa, vinhos para sobremesa, como aperitivos e etc. As diferenças entre essas classes de vinhos não são somente suas diversas cores e quando eles deveriam ser servidos, mas eles diferem significativamente quanto aos métodos de produção, composição, qualidade sensorial, e características fisiológicas. Por exemplo, vinhos tintos, os quais são produzidos pela fermentação das cascas, contém 2 a 3 vezes mais fenólicos que vinhos brancos. Vinhos brancos são usualmente mais delicados em flavor que os tintos, e pela falta de antocianinas e baixo conteúdo fenólico, defeitos no sabor e aparência são mais aparentes nestes.

A Figura 6 abaixo (adaptada de GIRARD e MAZZA, 1998) mostra um fluxograma para a elaboração de vinhos tintos e brancos através da uva.

A maior diferença na fabricação dos dois tipos está nas operações de pré-fermentação, vinho branco sendo produzido pela fermentação do suco de uva prensada, e vinho tinto sendo produzido pela fermentação do suco e cascas para extrair a cor vermelha. Os processos de produção de vinho branco almejam evitar uma ação incontrolável enzimática dos componentes da cascas, sementes ou engaços (galhos); assim sendo, pressagem e filtração precedem os processos de fermentação.

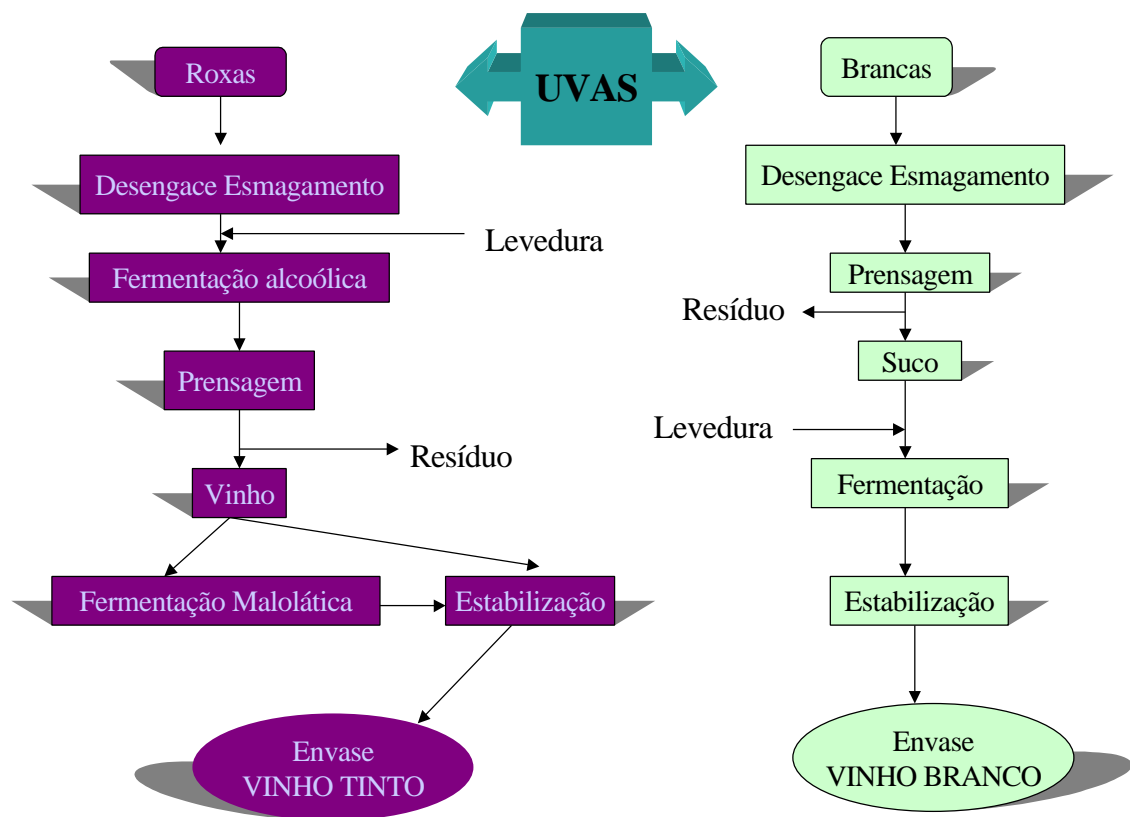


Figura 6 – Fluxograma de produção de vinhos brancos e tintos (GIRARD e MAZZA, 1998).

O processo de vinificação é responsável por mudanças qualitativas e quantitativas na composição dos compostos fenólicos do vinho. A

extração de fenólicos da uva é mínima na fabricação de vinhos brancos, contudo, estes polifenóis exercem uma importante função na elaboração de vinhos tintos. A quantidade de pigmentos e outros compostos fenólicos podem variar enormemente com a variedade da uva, a região, e outras práticas culturais. O nível de fenólicos retidos durante o processo de vinificação determinam o tipo de vinho e também tem potencial influência na qualidade do vinho (SHAHIDI e NACZK, 1995).

O esmagamento ou prensagem é a primeira operação na elaboração do vinho. Ele aumenta o nível de polifenóis no vinho devido o contato do suco com partes sólidas da uva aumentando também a superfície relativa das partes sólidas em contato com o suco. Em vinhos tintos, o esmagamento facilita a maceração durante o processo de fermentação aumentando a extração de substâncias fenólicas das partes sólidas da uva. Entretanto, um esmagamento excessivo pode aumentar a extração de fenólicos adstringentes para o suco e então pode-se afetar a qualidade do vinho. Uvas roxas são usualmente desengaçadas (retirada dos galhos) para que possa ser efetuado o esmagamento, prevenindo portanto galhos que possam ser transferidos para o recipiente de fermentação, reduzindo o conteúdo de fenólicos no vinho (SHAHIDI e NACZK 1995). O esmagamento da uva branca é feito sem o desengaçamento para que se reduza os danos nos engaços, prevenindo, portanto, a passagem de fenólicos indesejáveis para o suco. Também um esmagamento excessivo das partes sólidas da uva, incluindo as sementes, tem sido evitado, pois altos níveis de fenólicos podem ter um profundo e súbito efeito na qualidade dos vinhos brancos. Polifenóis são os maiores contribuidores de amargor e adstringência em vinhos brancos e eles eles agem como substratos nos processos de oxidação (SHAHIDI e NACZK, 1995).

Períodos longos de contato da casca, polpa e sementes em um meio que contenha etanol produzido pela fermentação permite uma maior

extração de polifenóis para o vinho. Vinhos com altos níveis de taninos são mais adstringentes e além disso requerem um longo período de maturação que aqueles com baixos conteúdos de fenólicos (SHAHIDI e NACZK, 1995). Durante o período inicial de fermentação, compostos fenólicos rapidamente difundem da casca para o mosto (SHAHIDI e NACZK, 1995). Assim sendo, quatro a cinco dias de maceração é suficiente para produzir um vinho de boa coloração e baixo conteúdo de tanino, destinado para um consumo imediato, como os vinhos Bordeaux.

Entretanto, no caso de vinhos sujeitos a processos de envelhecimento, as cascas devem permanecer por um tempo maior no mosto durante o processo de fermentação para aumentar o nível de taninos (SHAHIDI e NACZK, 1995). A medida que o processo de fermentação avança, ocorre uma polimerização entre taninos e antocianinas, diminuindo, portanto, o conteúdo de antocianinas (SHAHIDI e NACZK, 1995).

Vinhos brancos tendem ter um baixo conteúdo de fenólicos quando comparados com vinhos tintos. A proporção de diferentes classes de substâncias fenólicas em vinhos depende, primariamente, da idade do vinho. Vinhos jovens contém principalmente compostos fenólicos de baixo a médio peso molecular. Sendo a polimerização de compostos fenólicos um processo contínuo, os vinhos envelhecidos possuirão um conteúdo de fenólicos polimerizados relativamente maior. Dos fenólicos de baixo peso molecular encontrados em vinhos, catequina, epicatequina, procianidina B2, B3 e B4, quercetina e ácido gálico são predominantes (SHAHIDI e NACZK, 1995).

O conteúdo total de fenóis expressado em mg de ácido gálico equivalentes pode variar de 50 mg/L em alguns vinhos brancos a até 6500 mg/L em certos tipos de vinho tinto. Um típico vinho branco contém aproximadamente 250 mg/L de fenóis totais, entretanto alguns vinhos

podem conter eventualmente 2000 mg/L. Por outro lado, o conteúdo total de fenólicos em típicos vinhos tintos varia de 1000 a 4000 mg/L (SHAHIDI e NACZK, 1995). O conteúdo total de fenólicos em vinhos depende de um número de fatores como a variedade das uvas, época e tipo de colheita (manual ou mecanizada), natureza do esmagamento, e possível inclusão ou eliminação de cascas esmagadas, polpa e sementes (especialmente de variedades de uvas tintas) para a fermentação, aquecimento das cascas das uvas, modo de vinificação (temperatura e tempo de maceração) e envelhecimento.

### **2.2.3. Fenólicos encontrados em vinhos e uvas**

A concentração e composição de fenólicos em uvas variam com a espécie, variedade, estação do ano, e uma larga faixa de fatores ambientais como clima, condições do solo, manejos culturais e colheita (MAZZA et al., 1999). A composição de fenólicos em vinho depende da variedade de uva usada para a vinificação, sua extração, procedimentos empregados para a elaboração do vinho e reações químicas que ocorrem durante o envelhecimento do vinho. Segundo ZOECKLEIN et. al, (1995), estas reações seriam oxidações de procianidinas formando então taninos de máxima adstringência, polimerização oxidativa e não oxidativa de procianidinas formando taninos condensados e se esta polimerização for muito intensa formar-se-á então taninos de alto grau de condensação os quais possuem adstringência diminuída. Pode também ocorrer reações entre procianidinas e outras moléculas como polissacarídeos e peptídeos formando complexos de menor adstringência. Os complexos formados entre antocianinas e taninos resultam em produtos os quais têm a tonalidade púrpura da antocianina intensificada. Muitas outras reações de oxidação dependem significativamente da concentração de oxigênio nos vinhos e da temperatura, influenciando no decréscimo de antocianinas e na formação de

pigmentos poliméricos (SOMERS E VÉRETTE, 1988). O contato do mosto e vinho com o barril de madeira também contribui para a presença de alguns fenóis em vinho.

A composição de fenóis é também modificada pelas leveduras como um resultado da conversão de substâncias não fenólicas, e solubilização e extração de fenóis pelo álcool produzido durante a fermentação (SHAHIDI e NACZK, 1995). Um estudo recente (MAZZA et al., 1999), verificou que sedimentos de leveduras tem tido a capacidade de adsorver antocianinas.

Portanto, a qualidade do vinho dependerá de todos estes parâmetros. A Figura 7 mostra um resumo da influência destes fatores na qualidade do vinho.

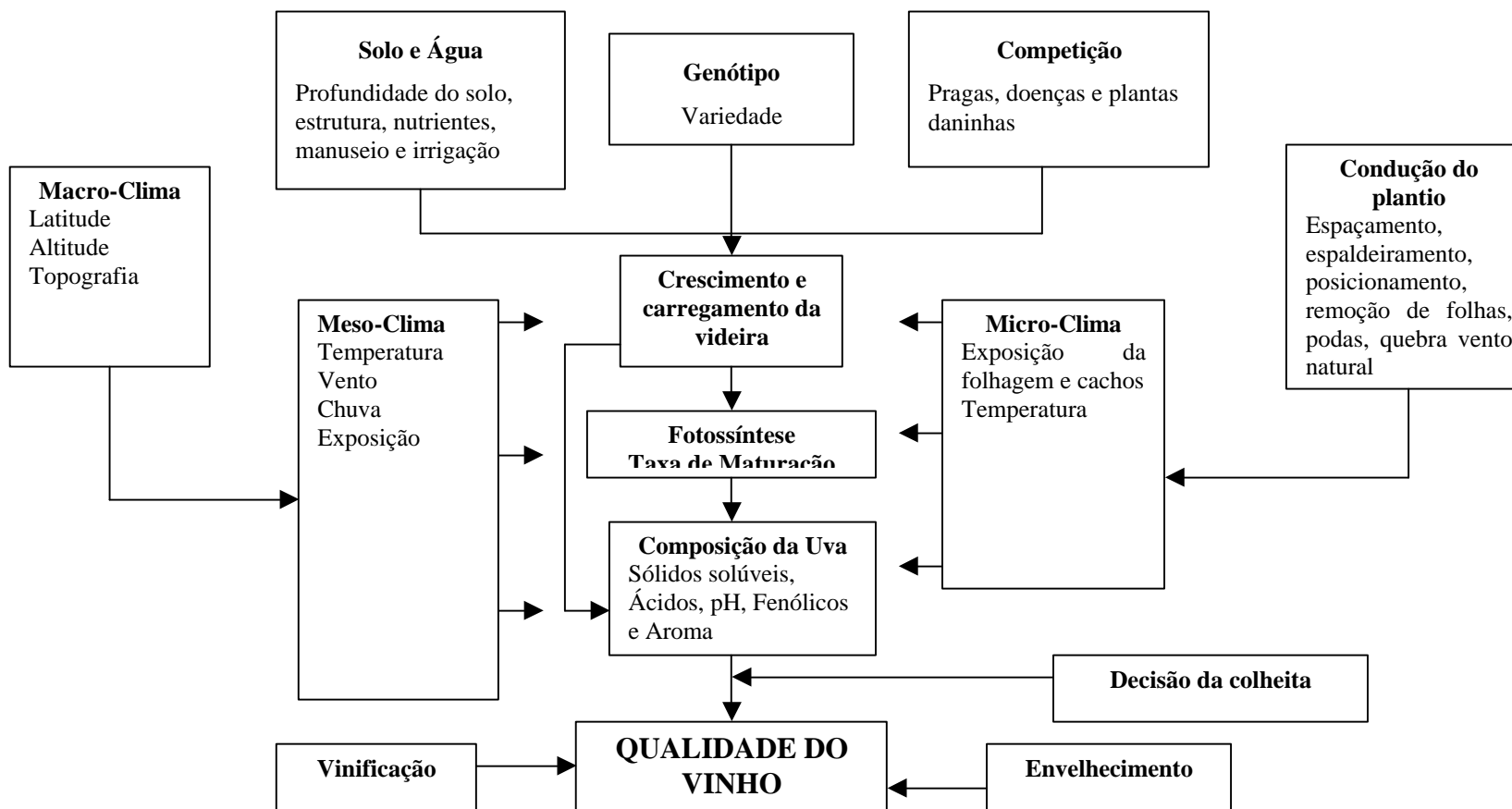
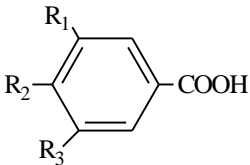


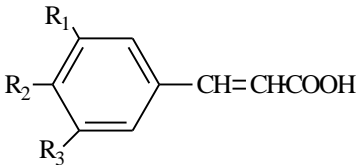
Figura 7 – Fatores vitiviniculturais e ambientais que influenciam a composição de uvas e a qualidade do vinho (ZOECKLEIN et. al, 1995).

Os polifenóis encontrados em uvas e vinhos pertencem a quatro classes: ácidos fenólicos e seus ésteres tartáricos, flavonol livres e glicosilados, antocianinas e taninos (ROMANI et al., 1996). Também o mesmo autor cita que estas substâncias estão entre os principais compostos responsáveis pelas diferenças sensoriais entre vinhos brancos e tintos, e também desempenham uma importante função na avaliação química e sensorial dos vinhos durante o processo de envelhecimento. Dentre os compostos fenólicos, em especial, antocianinas, flavonóis, catequinas e outros flavonóides, desempenham a principal função na qualidade dos vinhos (MAZZA et al., 1999).

Os ácidos fenólicos mais comumente encontrados em alimentos de origem vegetal são os derivados substituídos dos ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico. Estes derivados diferem no grau de hidroxilação e metoxilações nos seus anéis aromáticos. As estruturas químicas de alguns destes compostos são mostradas na Figura 8.



(a) derivados do ácido benzóico



(b) derivados do ácido cinâmico

Ácido	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Ácido	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
p-hidroxibenzóico	H	OH	H	p-coumárico	H	OH	H
Protocatechuico	H	OH	OH	Caféico	H	OH	OH
Vanílico	CH <sub>3</sub> O	OH	H	Ferúlico	CH <sub>3</sub> O	OH	H
Siríngico	CH <sub>3</sub> O	OH	CH <sub>3</sub> O	Sináptico	CH <sub>3</sub> O	OH	CH <sub>3</sub> O
Gálico	OH	OH	OH				

Figura 8 - Estruturas de alguns ácidos fenólicos: (a) derivados do ácido benzóico; (b) derivados do ácido cinâmico (SHAHIDI e NACZK, 1995).

Os derivados do ácido hidróxibenzóico são comumente encontrados na forma ligada, sendo componentes de estruturas complexas como a lignina e taninos hidrolizáveis (SHAHIDI e NACZK, 1995) e ainda serem encontrados na forma de ácidos orgânicos e derivados de açúcares. Entretanto os hidroxicinamatos ocorrem mais comumente em alimentos de origem vegetal, principalmente em frutas. São predominantemente encontrados na forma ligada.

Os principais componentes do vinho branco, que foram processados com mínimo contato do suco da uva com a casca, são os hidroxicinamatos solúveis e também os hidroxibenzoatos, estando estes em menor concentração (SOMERS e VÉRETTE, 1988). Entretanto, a maior fração de hidroxicinamatos não está presente nos vacúolos da polpa da uva, mas sim na casca, e um progressivo aumento na sua concentração é

observado quando há um maior período de contato do suco da uva com as cascas, ainda assim acompanhado por um aumento na extração de compostos flavonólicos (SOMERS e VÉRETTE, 1988).

Flavonóis são encontrados em todos alimentos de origem vegetal. Os flavonóis mais conhecidos são a quercetina e o kaempferol, sendo onipresentes em frutas e vegetais. Em frutas, os flavonóis e seus derivados glicosídicos são encontrados predominantemente na casca (PETERSON e DWYER, 1998).

Outras classes de flavonóides, sendo: flavonas, flavanonas e flavanonóis, também encontradas em uvas e vinhos, ocorrem em concentrações muito baixas, sendo encontradas em concentrações relativamente maiores em folhas (SINGLETON, 1988).

Sobre os flavonóis, que por estarem presentes nos vinhos em baixas concentrações, nota-se que o principal interesse na sua quantificação está relacionado a meios de detecção de adulteração em vinhos com outros frutos como figos sendo indicado pelas flavonas ou contaminação pelas folhas em uvas colhidas mecanicamente, resultando em turbidez nos vinhos devido aos flavonóis (SINGLETON, 1988).

Os flavonóis podem ser mencionados como fornecedores de mais um exemplo de “valores problemáticos” de flavonóides em vinhos brancos. Apesar deles serem meramente componentes traços, são responsáveis por uma forma rara de instabilidade fenólica (SOMERS e VÉRETTE, 1988). Como já mencionado, eles formam um sedimento amarelo, uma turbidez em vinhos anteriormente clarificados e estabilizados. Esta formação é devida à hidrólise dos flavonóis glicosilados, com a consequente precipitação das agliconas fenólicas.

A Figura 9 representa a estrutura básica de um flavonol.

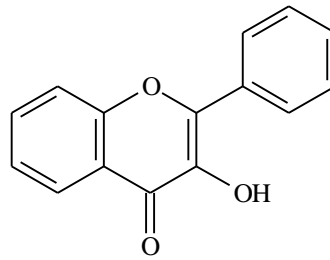


Figura 9 - Representação básica da estrutura do flavonol.

As antocianinas, substâncias fenólicas, são glicosídeos de antocianidinas, polihidroxi derivados do íon flavílium (Figura 10). As antocianidinas (agliconas) são substâncias polihidroxiladas aparentemente ausentes nos tecidos de plantas.

Estas pertencem à classe de compostos contendo uma estrutura básica de 15 carbonos, conhecidos coletivamente como flavonóides (STRINGHETA, 1991).

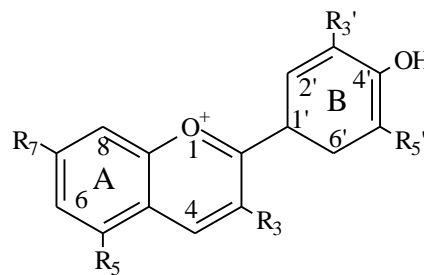


Figura 10 - Estrutura básica das antocianinas (cátion flavílium).

As antocianinas são pigmentos responsáveis por uma variedade de cores atrativas e brilhantes em frutas, flores e folhas que variam do vermelho vivo ao violeta e azul.

A Figura 11, mostra o equilíbrio ácido/base das moléculas de antocianinas em função do pH, as quais se encontram representadas abaixo:

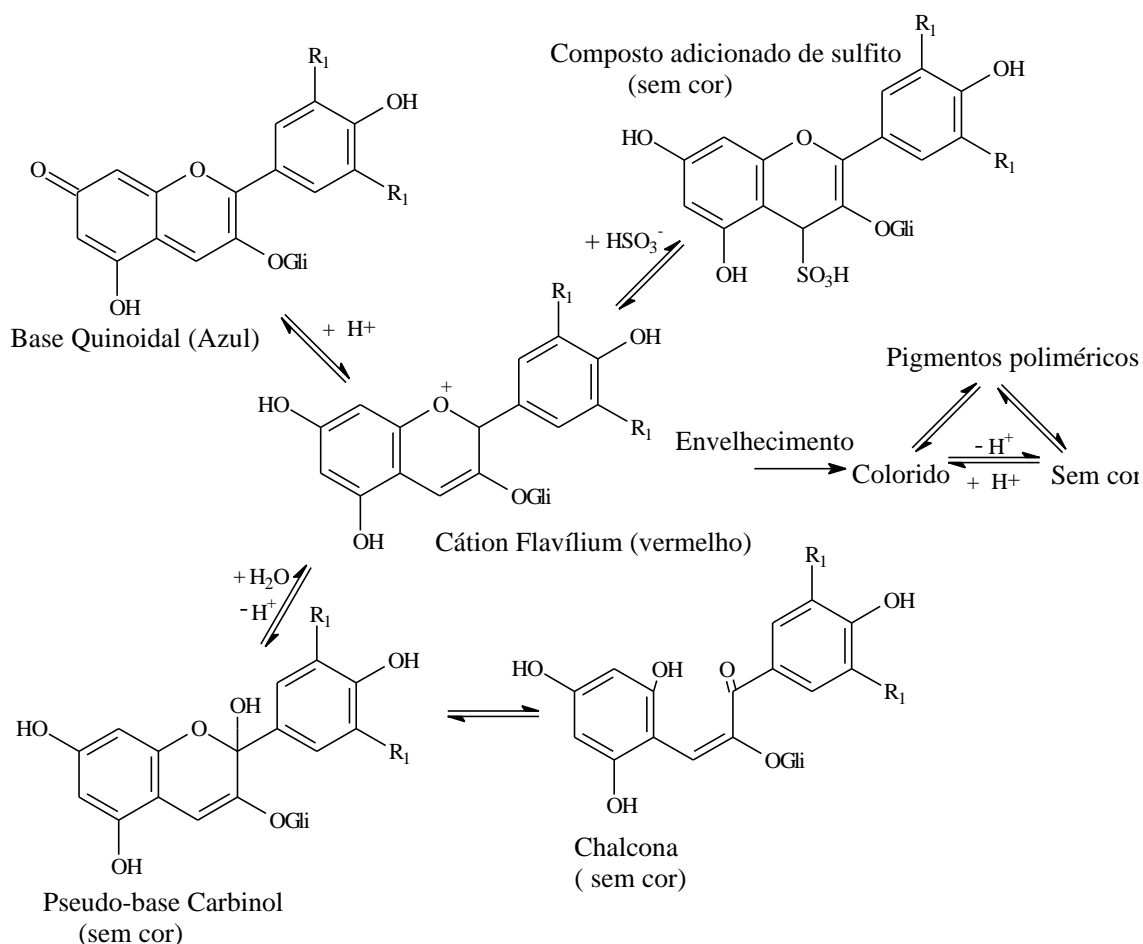


Figura 11 - Equilíbrio das antocianinas em vinhos (RIBÉREAU-GAYON, 1982).

As antocianinas são extraídas das cascas das uvas roxas durante o esmagamento ou pressagem e durante a fermentação, e são os principais componentes dos vinhos tintos responsáveis por sua coloração.

Por serem anfóteros, sua cor em solução é primariamente dependente do pH. Em baixos valores ( $pH < 4,0$ ), as formas principais que se encontram em equilíbrio são os íons cátion-flavilium na sua cor vermelha e sua pseudobase sem cor. O  $pK$  para equilíbrio entre estas formas ( $pK = 2,6$ ) favorece a forma sem cor. Em valores de pH maiores que 3,0, menos que 50% da cor vermelha potencial é visível (ZOECKLEIN

et. al, 1995). SOMERS e VÉRETTE (1988) citam que o nível de dióxido de enxofre na vinificação tem demonstrado ser de fundamental importância no equilíbrio dos pigmentos e no grau de coloração de vinhos tintos jovens, sendo até mesmo mais importante que o fator pH do vinho. Também fatores como concentração, auto-associação e co-pigmentação desempenham fundamental função nas súbitas mudanças de tonalidade e cromaticidade dos vinhos tintos jovens. Sendo portanto de fundamental importância na qualidade dos vinhos tintos.

COSTA et al. (2000), citam que seus glicosídeos são mais estáveis que as agliconas e que até 250 antocianinas diferentes tem sido isoladas dos vegetais. Frutos podem conter de duas a seis unidades de antocianinas, entretanto, algumas variedades de uva podem conter dezesseis ou mais, e somente 70 dos 250 tipos de antocianinas foram encontrados em frutas (SHAHIDI e NACZK, 1995).

As antocianinas ocorrem frequentemente em uma mistura complexa. Os extratos de uva podem ter glicosídeos, acetil glicosídeos e coumaril glicosídeos de delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina e, ainda podem estar complexadas com flavonas e íons metálicos, como o ferro e o magnésio em flores (PETERSON e DWYER, 1998).

Os pigmentos antocianínicos da uva, *Vitis vinifera*, podem também ser parcialmente acilados, pelo ácido acético, ácido *p*-coumárico e ácido cafeico, e em geral estão ligados na posição 6-hidroxil do açúcar ligado na posição 3 da antocianidina, podendo ainda ter um açúcar ligado na posição 5 da antocianidina (SINGLETON, 1988).

Estas podem ser glicosiladas por diferentes açúcares nas posições 3, 5 e 7, mas sempre ocorre a glicosilação na posição 3. Glicose, arabinose, galactose e ramnose são os açúcares mais comuns ligados às antocianidinas. Em muitos casos os açúcares são acilados pelos ácidos *p*-

coumárico, cafeico, ferúlico sinápico e mais raramente pelos ácidos malônico, acético e vanílico entre outros (STRINGHETA, 1991).

É sabido que a cor dos vinhos tintos mudam durante sua maturação e envelhecimento, isto é devido à interações entre as antocianinas e os fenólicos sem cor presentes nas uvas, incluindo (+) – catequina, (-) – epicatequina, quercetina, kaempferol e ácidos fenólicos (MAZZA et al., 1999).

Entre algumas de suas aplicações, estão: a caracterização de cultivares de acordo com o seu grau quantitativo e qualitativo (LEE, 1992). O controle de qualidade também é realizado através do acompanhamento dos seus teores durante a maturação da matéria-prima, o processamento, armazenamento e mesmo durante envelhecimento de vinhos tintos. Também pela verificação da autenticidade de sucos de frutas e produtos os quais sejam ricos em antocianinas, principalmente vinhos elaborados de *Vitis vinifera* com vinhos elaborados a partir de uvas híbridas.

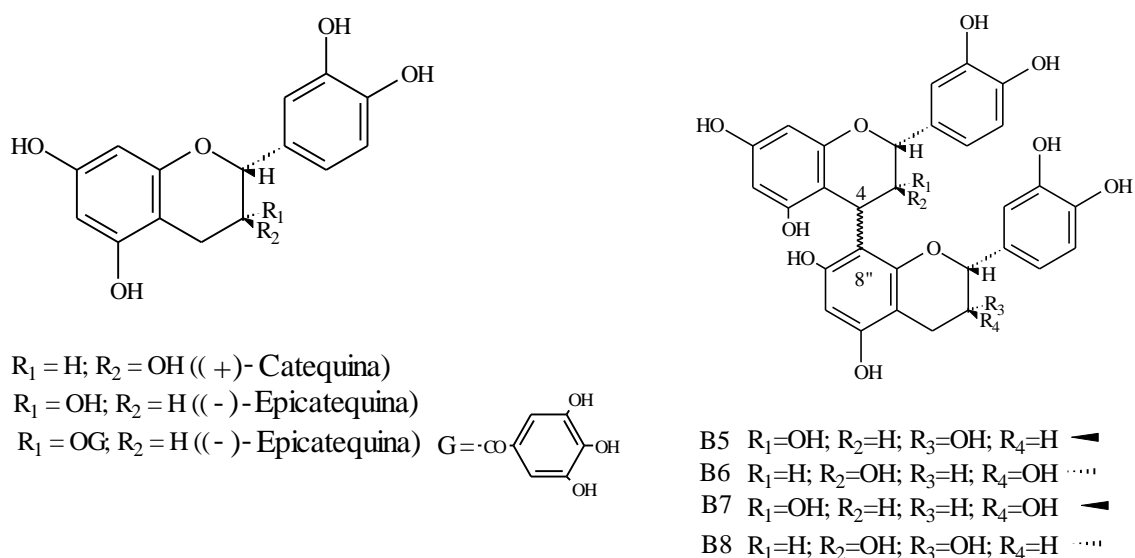
Os taninos são polímeros de médio a elevado peso molecular (GUPTA e HASLAN, 1979; SÁNCHEZ-MORENO, 2000). Caracterizam-se por terem um elevado conteúdo de grupos hidroxilas, o que lhes confere uma grande capacidade de formar complexos insolúveis com carboidratos, ácidos nucléicos, alcalóides (SHAHIDI e NACZK, 1995), e proteínas (SINGLETON, 1988; SHAHIDI e NACZK, 1995). O mecanismo da percepção de adstringência de certos vinhos e uvas é ainda pouco entendido, mas acredita-se que envolve interações de proteínas salivares com substâncias adstringentes como os taninos (VIDAL et al., 2002), eventualmente resultando em precipitações, viscosidade da saliva reduzida, e conseqüente aumento da fricção da língua (VIDAL et al., 2002). Segundo este mesmo autor a perda de adstringência que ocorre durante o armazenamento dos vinhos é usualmente atribuída à polimerização dos

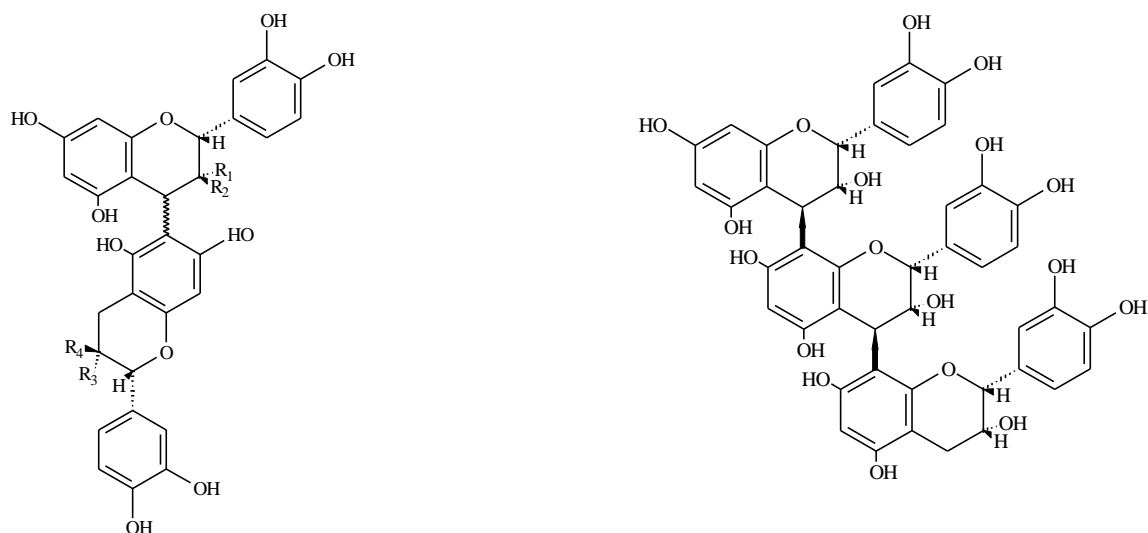
taninos ou à formação de artefatos de alto peso molecular entre antocianinas e taninos.

Dependendo da estrutura química, os taninos são convencionalmente subdivididos em dois grupos, sendo: taninos hidrolizáveis e taninos condensados (SHAHIDI e NACZK, 1995; SÁNCHEZ-MORENO, 2000). Os taninos hidrolizáveis não são encontrados em vinhos, a menos que estes sejam adicionados de ácido tânico ou estejam em contato com barris de madeira (SINGLETON, 1988).

Os taninos condensados provenientes das partes sólidas das uvas, casca e semente (encontrado em maior concentração), são também conhecidos como procianidinas (SAUCIER et al., 2001). As procianidinas são compostas de cadeias de unidades de flavan-3-ol, (+) – catequina e (-) – epicatequina ligadas juntamente através das ligações interflavanólicas C<sub>4</sub> – C<sub>6</sub> e C<sub>4</sub> – C<sub>8</sub> (de FREITAS et al., 2000). Estes taninos podem ser formados por moléculas de flavan-3-ol variando em grau de polimerização de 2 a mais de 15 unidades e a massa molecular variando de 578 a mais de 5000 Da (PENG et al., 2001).

A Figura 12 mostra alguns monômeros, dímeros e trímero dos taninos condensados.





- B1  $R_1=OH; R_2=H; R_3=H; R_4=OH$   $\blacktriangleleft$   
 B2  $R_1=OH; R_2=H; R_3=OH; R_4=H$   $\blacktriangleleft$   
 B3  $R_1=OH; R_2=OH; R_3=H; R_4=OH$   $\cdots$   
 B4  $R_1=H; R_2=OH; R_3=OH; R_4=H$   $\cdots$

Trímero C1

Figura 12 – Estruturas químicas das catequinas, dímeros de procianidinas e trímero C1.

#### 2.2.4. Avaliações de compostos fenólicos em uvas e derivados

Os vinhos e outros produtos alimentícios derivados de vegetais, quando contém compostos fenólicos, usualmente contém no mínimo poucas classes de fenólicos e frequentemente poucos compostos em cada classe (SINGLETON, 1988). A maioria das uvas tintas e vinhos tintos jovens contém glicosídeos e alguns glicosídeos acilados de no máximo cinco antocianidinas, sendo, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina.

Vários métodos de ensaios tem sido desenvolvidos para análises de compostos fenólicos. Em uma ordem cronológica crescente, de acordo com os avanços tecnológicos no campo da ciência, estes ensaios podem ser melhor classificados como: aqueles que determinam um conteúdo total de fenólicos, aqueles que quantificam um grupo ou uma classe de fenólicos e mais recentemente aqueles que conseguem quantificar e qualificar um composto fenólico separadamente. Entretanto, alguns destes métodos mais

antigos ainda são empregados e conseguem determinar um conteúdo fenólico com extrema rapidez e até mesmo com precisão similar aos sofisticados métodos hoje empregados.

Folin-Ciocalteu, Folin-Denis e Azul da Prússia são métodos colorimétricos, que envolvem reações de oxi-redução, utilizados para determinação de fenóis totais. Estes métodos quantitativos estão descritos em SHAHIDI e NACZK (1995); sendo o método Folin-Ciocalteu o mais empregado atualmente.

Dentre os métodos colorimétricos mais utilizados que quantificam classes fenólicas em uvas e derivados, estão os métodos de reação com a vanilina, onde forma-se um complexo colorido entre a vanilina e os taninos condensados. Este método torna-se mais atrativo devido à sua sensibilidade, especificidade e simplicidade (SUN et al., 1998). Alguns destes métodos estão descritos em (GUPTA e HASLAN, 1979; SINGLETON, 1988; SHAHIDI e NACZK, 1995; LARRAURI, 1996; SUN et al., 1998). Existem ainda outros métodos que estimam o conteúdo de taninos condensados, utilizando despolimerização dos taninos em soluções de ácidos minerais a altas (SUN et al., 1998), ou reações de complexação com *p*-dimetilaminocinamaldeído (SCHNEIDER, 1995; ARNOUS et al., 2001). Cada metodologia colorimétrica possui características peculiares, sendo porém adaptadas de acordo com os objetivos do pesquisador. Elas possuem variáveis que devem ser averiguadas e controladas para que se consiga uma ótima reprodução e acuracidade dos dados, sendo portanto: a temperatura, o tempo, o pH, a proporção dos reagentes e a presença de substâncias interferentes. Uma substância padrão representativa para a quantificação deve também ser bem definida.

Outra classe de compostos fenólicos avaliados em uvas e vinhos é a das antocianinas. FRANCIS (1982), faz uma revisão sobre métodos

qualitativos, utilizando cromatografia de papel, cromatografia de camada fina e dados espectrais para avaliação de antocianinas. Também cita métodos quantitativos para três sistemas antociânicos diferentes, a saber: sem substâncias interferentes, produtos de degradação interferindo, e sistemas os quais somente a quantidade de antocianinas é desejada, excetuando-se outros interferentes. Para estes sistemas, FRANCIS (1982), sugere: 1) simples medida da absorção da solução em comprimento de onda apropriado; 2) separação dos interferentes por cromatografia de papel, camada fina, troca iônica, coluna aberta, cromatografia a gás ou líquida de alta eficiência. Ou mesmo analisar o pigmento *in situ* por um método que se corrija a contribuição dos interferentes, neste caso o método diferencial de pH, onde-se analisa o conteúdo total de pigmentos, o índice de degradação destes e as taxas relativas de absorção; 3) utilizando os mesmos métodos de separação e purificação citados no item anterior, separadamente ou em combinações, ou mesmo uma análise *in situ*, onde um trabalho mais elaborado em espectrofotometria é necessário.

Outra metodologia baseia-se na diferença de intensidade de cor apresentada pelas antocianinas em pH's diferentes (WROLSTAD, 1993). Outro método se baseia na formação de compostos sem cores pelas antocianinas quando adicionadas de íons bissulfito (FRANCIS, 1982).

Entretanto, ARNOUS et al. (2001), citam outro método também baseado no branqueamento de antocianinas com íons sulfito, mas com algumas correções devido à presença de eventuais antocianinas poliméricas. FRANCIS (1988), cita este novo método como o mais preciso que os citados anteriormente (colorimetria em pH diferencial e branqueamento com sulfito).

A avaliação por espectrofotometria no espectro do ultra-violeta ao visível também tem sido muito empregada para identificação de compostos isolados, especialmente flavonóides (SHAHIDI e NACZK, 1995), e com

maior enfoque na quantificação de grupos de compostos fenólicos. Os espectros de absorção de extratos fenólicos podem ser usados para identificar a presença de grupos de compostos fenólicos predominantes (SHAHIDI e NACZK, 1995). Afirma-se ainda que cada grupo de composto fenólico é caracterizado por um ou alguns picos de máxima absorção sob a radiação ultra-violeta, entretanto, alguns fenólicos apresentam largas variações na absorvidade molecular. Ressaltando-se que vários interferentes podem eventualmente estar presentes nas amostras quando estas não são tratadas por um processo de remoção adequado.

MAZZA et al. (1999), utilizou o método de análise espectrofotométrica de classes fenólicas descrito por ROMANI et al. (1996), com algumas modificações. O conteúdo polifenólico total pode ser avaliado medindo-se a absorvância do extrato previamente tratado em 280 nm, o conteúdo de ésteres tartárico em 320 nm, flavonóis em 360 nm e antocianinas em 520nm (ROMANI et al., 1996). Curvas padrões de fenólicos específicos os quais melhor representem sua classe devem ser preparadas para a quantificação.

Alguns métodos e referências de fracionamento, separação de grupos fenólicos ou mesmo compostos individuais, são apresentados integralmente em (VILLENEUVE et al., 1982; SINGLETON, 1988; ROMANI, 1996; LEE, 1992; PEÑA et al., 1997; WATERHOUSE et al., 2000; PENG et al., 2001; SAUCIER et al., 2001). Dentre estes métodos pode-se citar: cromatografia de papel, de coluna aberta utilizando diversas fases estacionárias, eletroforese, cromatografia de camada fina, cromatografia de troca-iônica, cromatografia de baixa pressão, de alta performance e de partição gás-líquido. Estes métodos podem servir para a determinação final de compostos fenólicos ou até mesmo servirem como tratamentos prévios para eliminação de interferentes das amostras para que sejam analisadas em métodos tecnologicamente mais avançados.

Uma crescente utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a partir da década de 70 tem resultado em muitas novas informações sobre os constituintes fenólicos das uvas e vinhos. A técnica é rápida e relativamente simples para desenvolver, fornecendo ambos dados qualitativos e quantitativos jamais observados pelos métodos cromatográficos anteriormente desenvolvidos.

As colunas cromatográficas conseguem obter uma ótima separação de compostos, devido à natureza das partículas, ao empacotamento, e ao elevado número de pratos teóricos aliado a sistemas de solventes que podem ser binários (a maioria), ternários e até mesmo quartenários. Apesar de as antocianinas estarem entre ou poucos fenólicos em análises de vinhos a serem quantificados diretamente por CLAE, sem a necessidade de uma preparação prévia (pois absorvem em comprimento de onda bastante distinto das outras classes fenólicas), tem existido outros esforços para analisar qualquer outro tipo de fenólicos por injeção direta das amostras sem preparação prévia (REVILLA e RYAN, 2000). Esses método, ainda cita os mesmos autores, requerem sistemas complexos de solventes, como aqueles que usam gradientes ternários, e algumas vezes estes solventes podem conter sais (REVILLA e RYAN, 2000).

A construção destes equipamentos que conseguem separar e quantificar compostos, aliado ao avanço na construção de detectores mais sensíveis e precisos, permitiu um grande impulso na avaliação de amostras onde as misturas de compostos fenólicos é mais complexa.

Dentre os detectores podemos citar os detectores ultra-violeta – visível, utilizado por FULEKI e SILVA (1997), o de faixa de fotodiodo (Diode Array Detector, DAD), utilizados por GAO e MAZZA (1994, 1995); LASZLAVIK et al. (1995); ROMANI et al. (1996); MAZZA et al. (1999); PENG et al. (2001); PALOMINO et al. (2000); WATERHOUSE et al. (2000); REVILLA et al. (2000, 2001); ARNOUS et al. (2001).

LUNTE (1987), utilizou detectores uv-visível e eletroquímicos para classificação de estruturas de flavonóides em bebidas. MATTILA et al. (2000), determinaram alguns flavonóides de material vegetal utilizando DAD e detector eletroquímico.

A identificação de certos compostos por CLAE, baseado em tempo de retenção e algumas características espectrais, requer padrões autênticos, o que é difícil de obter (GAO e MAZZA, 1994). Por outro lado, a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear e a Espectrometria de Massa com bombeamento instantâneo de elétrons, consegue obter resultados mais fiéis, mas ainda são técnicas muito caras e não facilmente disponíveis. COSTA et al. (2000), utilizaram DAD e espectrometria de massa; KIM et al. (1996) e POLLNITZ et al. (2000), utilizaram cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massa; VIÑAS et al. (2000), compararam limites de detecção entre o DAD e o detector de fluorescência acoplados em CLAE; KRUEGER et al. (2000), caracterizaram ésteres de taninos condensados de extratos de semente de uva utilizando CLAE acoplada a espectrômetro de massa; SOUQUET et al. (2000), caracterizaram a composição fenólica de galhos de uvas utilizando CLAE acoplada a espectrômetro de massa e Ressonância Magnética Nuclear.

### 2.3. OBJETIVOS

- Quantificar as quatro principais classes fenólicas por espectrofotometria dos extratos das frações das uvas Riesling Itáliaico e Cabernet Sauvignon e em seus respectivos vinhos;
- Quantificar os taninos totais contidos nas frações das uvas Riesling Itáliaico e Cabernet Sauvignon e em seus respectivos vinhos por reação colorimétrica;
- Quantificar as antocianinas totais contidas na casca e polpa da uva Cabernet Sauvignon e em seu respectivo vinho por diferencial de pH;
- Obtenção de cromatogramas desenvolvidos em CLAE para uma breve visualização do perfil fenólico dos extratos das frações das uvas e vinhos citados anteriormente.

## **2.4. METODOLOGIA**

### **2.4.1. Extração de polifenóis**

A uvas Riesling Itálico e Cabernet Sauvignon foram fracionadas manualmente em casca, semente e polpa. Em seguida estas frações foram liofilizadas. A extração de polifenóis das frações foi realizada utilizando 0,5 a 4,0 gramas aproximadamente das frações para cada 30 mL do solvente extrator, no caso acetona:água (70:30). Este sistema foi homogeneizado em erlenmyer por cinco minutos, utilizando para tal o triturador de haste de aço MARCONI. Em seguida, foi mantido em repouso por 25 minutos. O extrato fenólico foi separado da parte sólida através de filtração a vácuo em kitasatos utilizando funil de büchner e filtro de papel Whatman nº 1. O sistema solvente foi então evaporado à pressão reduzida e a 37°C em sistema rota-vapor (FISATON). Assim os compostos fenólicos foram recuperados em água:etanol (90:10) e o volume foi aferido em balões âmbar de 100 mL, quando então a amostra já estava pronta para as análises posteriores. Quando necessário, as amostras foram diluídas em água:etanol (90:10), bem como os vinhos.

### 2.4.2. Avaliação dos taninos

As amostras preparadas como descrito acima foram analisadas de acordo com a metodologia descrita por SUN et al. (1998) com ligeira modificação.

A 1,0 mL do extrato fenólico foi adicionado 2,5 mL de vanilina 1,0 % (p/v) em solução metanólica e 2,5 mL de ácido sulfúrico 25 % (v/v) em metanol. A reação foi desenvolvida em tubos de ensaio em banho-maria por 15 minutos à temperatura de 30 °C no escuro, e as leituras espectrofotométricas foram realizadas a 500 nm em espectrofotômetro (UV-1601 PC Shimadzu). O branco foi preparado simultaneamente do mesmo modo, exceto que a solução contendo vanilina foi substituída por metanol. Os resultados foram expressos em absortância apresentada pela amostra por grama de massa seca da fração.

### 2.4.3. Avaliação das antocianinas

As amostras foram avaliadas pelo método do pH diferencial segundo metodologia utilizada por WROLSTAD (1993).

As amostras foram diluídas em soluções tampões adequadas nos pH's 1,0 e 4,5 e então realizou-se a leitura de absorvância das amostras em 520 nm e em 700 nm em espectrofotômetro (UV-1601 Shimadzu). Calculou-se a diferença de absorvâncias de acordo:

$\Delta A = (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH\ 1,0} - (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH\ 4,5}$ . De acordo com a equação a seguir, obteve-se a concentração de antocianinas expressa em malvidina-3-glicosídeo equivalente.

$$C = \frac{\Delta A \times 10^3 \times MM \times Fd}{e \times L}$$

onde:

C – Concentração equivalente em mg/L da antocianina definida;  
 $\Delta A$  – Diferença de absorvâncias apresentadas pelas amostras;  
MM – Massa molecular da antocianina definida (g/mol);  
Fd – Fator de diluição utilizado;  
 $\epsilon$  – coeficiente de absorvidade molar da antocianina definida  
L – comprimento do caminho ótico da cubeta utilizada para a leitura espectrofotométrica (cm).

#### **2.4.4. Avaliação espectrofotométrica das classes fenólicas**

Esta análise foi realizada segundo metodologia (Glories descrita por ROMANI et al., 1996, e MAZZA et al., 1999) com modificações.

Para cada 0,25 mL do extrato hidroalcoólico foi adicionado 0,25 mL de HCl 0,1 % em etanol 95,0 % e 4,55 mL de HCl 2,0 %. As soluções foram agitadas e mantidas por 15 minutos no escuro. As leituras espectrofotométricas das amostras foram desenvolvidas em espectrofotômetro (UV-1601 PC Shimadzu) nos comprimentos de onda 280, 320, 340 e 360 nm. A absorvância em 280 nm foi utilizada para expressar fenólicos totais, em 320 e em 340 nm para ésteres tartáricos e em 360 nm para flavonóis.

Os padrões utilizados para representar as classes fenólicas foram, ácido gálico em etanol 10 % para fenóis totais, ácido cafeico em etanol 10 % para os ésteres tartáricos e quercetina em etanol 95 % para expressar os flavonóis.

#### **2.4.5. Cromatogramas das amostras**

Utilizou-se o cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca SHIMADZU, SCL 10A VP, equipado com detector UV-Visível, coluna RP 18 MERCK (Li Chrospher 100, partículas de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, 250 x 4 mm) para análises diretas dos extratos e vinhos à temperatura ambiente

( $25 \pm 2$  °C). Utilizou-se a metodologia descrita por MATILLA et al. (2000) com algumas modificações.

A fase móvel empregada consistia de 50 mM  $H_3PO_4$ , pH 2,5 (solução A) e acetonitrila (solução B). O perfil de eluição se desenvolveu como seguinte: eluição isocrática 95%A/5%B, 0-5 min; gradiente linear a partir de 95%A/5%B para 80%A/20%B, 5-50 min; em seguida de 80%A/20%B para 60%A/40%B, 50-90 min, posteriormente de 60%A/40%B para 0%A/100%B, 90-120 min e finalmente de 0%A/100%B para 95%A/5%B, 120-140 min. O fluxo da fase móvel foi de 0,9 mL/min, e os volumes de injeção foram de 50  $\mu$ L para as amostras dos extratos e vinhos. Os extratos foram preparados conforme citado anteriormente, contanto que foram utilizados nas concentrações de 1,0 % das frações em massa seca. O vinhos foram injetados diretamente sem diluições. Os cromatogramas foram obtidos nos comprimentos de onda 280, 320, 360 e 520 nm, permitindo-se portanto avaliar os fenólicos totais, os ésteres tartáricos, os flavonóis e as antocianinas, respectivamente.

## **2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.5.1. Concentrações das classes fenólicas**

O Quadro 4 mostra os dados das concentrações das classes de compostos fenólicos dos diversos extratos preparados e vinhos. Os resultados estão expressos em: mg do polifenol equivalente à classe por 100 gramas de massa seca da fração ou dos vinhos. Os valores apresentados na quantificação de procianidinas são relativos e comparativos, estão expressos em absorvância obtida pela reação, dividida pela massa seca em gramas da fração ou vinho utilizado.

As médias seguidas por uma mesma letra em cada coluna não diferem entre si estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quadro 4 – Avaliação espectrofotométrica dos fenólicos totais, ésteres tartáricos, flavonóis e antocianinas dos diferentes componentes das uvas Riesling Itália e Cabernet Sauvignon e seus respectivos vinhos.

	*Fenólicos Totais (mg ácido gálico, 280 nm)	*Ésteres Tartáricos (mg ácido caféico, 320 nm)	*Ésteres Tartáricos (mg ácido caféico, 340 nm)	*Flavonóis (mg quercetina, 360 nm)	*Antocianina (mg malvidina-3-gli, 520 nm)	<sup>a</sup> Procianidina (Abs/massa seca)
Casca Riesling	1037,3 ± 38,3d	152,8 ± 7,9c	316,5 ± 18,4cd	182,0 ± 11,6cd	n.d.	28,3 ± 0,8b
Casca Sauvignon	2038,2 ± 33,9c	253,7 ± 5,0b	551,9 ± 12,7b	301,8 ± 6,7b	1025,3 ± 40,5a	35,1 ± 2,3b
Polpa Riesling	181,6 ± 11,3f	36,8 ± 2,8d	77,8 ± 6,3e	40,0 ± 3,8f	n.d.	2,7 ± 0,1c
Polpa Sauvignon	324,2 ± 14,2ef	51,9 ± 3,9d	115,5 ± 8,3e	63,3 ± 5,1ef	152,4 ± 3,4c	1,9 ± 0,2c
Semente Riesling	4737,4 ± 169,5a	264,2 ± 30,5b	395,5 ± 74,3c	234,1 ± 50,0bc	n.d.	162,6 ± 4,4a
Semente Sauvignon	4664,5 ± 206,9a	171,4 ± 14,8c	226,5 ± 25,5d	130,7 ± 15,8de	n.d.	161,4 ± 4,3a
Vinho Riesling	646,6 ± 14,5e	231,6 ± 5,5b	392,5 ± 9,5c	95,0 ± 2,1ef	n.d.	0,06 ± 0,01c
Vinho Sauvignon	4163,5 ± 30,7b	670,6 ± 6,5a	1132,3 ± 12,9a	489,5 ± 8,1a	697,5 ± 4,4b	6,9 ± 0,03c

\*Os valores estão expressos em média ± desvio-padrão (n=3) e em mg/100g da fração seca das uvas ou dos vinhos.

<sup>a</sup>Representa o valor de absorvância por grama da fração seca analisada.

O conteúdo fenólico para as classes testadas foram maiores em extratos e vinho provenientes da uva Cabernet Sauvignon, com exceção do extrato da semente da uva Riesling Itálico, apresentando conteúdo fenólico ligeiramente superior em todas classes analisadas quando comparado com o extrato da semente da uva Cabernet Sauvignon. Estas diferenças podem ser parcialmente devidas a vários fatores como a maturação dos frutos, o clima, ataque de patógenos, poluição, forma de colheita, os tratos culturais, inerente à espécie e o tipo de processo utilizado para a elaboração dos vinhos.

O Quadro 5 compara os métodos de Folin Denis (SHAHIDI e NACZK, 1995) e de Glories (ROMANI et al., 1996, e MAZZA et al., 1999) quanto ao teor de polifenóis totais expressos em ppm de AGE (base seca).

Quadro 5 – Valores de concentrações médias de polifenóis em ppm (AGE) obtidos por metodologias distintas nos extratos.

	<b>Casca</b>	<b>Casca</b>	<b>Semente</b>	<b>Semente</b>	<b>Polpa</b>	<b>Polpa</b>	<b>Vinho</b>	<b>Vinho</b>
	<b>RI</b>	<b>CS</b>	<b>RI</b>	<b>CS</b>	<b>RI</b>	<b>CS</b>	<b>RI</b>	<b>CS</b>
(Glories)	1037,3	2038,2	4737,4	4664,5	181,6	324,2	646,6	4163,4
(Folin Denis)	1458,7	2670,4	5097,6	5120,2	168,6	216,6	561,8	5309,9
Correlação	<b>0,9907</b>							

### 2.5.2. Perfis cromatográficos dos extratos e vinhos

As figuras de 13 a 24 ilustram os perfis cromatográficos desenvolvidos. Observando-se que os cromatogramas em cor verde ilustram os extratos e vinhos provenientes da uva Riesling Itálico e os

cromatogramas em cor roxa representam os extratos e vinhos provenientes da uva Cabernet Sauvignon. Os cromatogramas estão representados em cada figura pelos comprimentos de onda 280 nm (expressando fenólicos totais), 320 nm (expressando ésteres tartáricos), 360 nm (expressando flavonóis) e 520 nm (pigmentos antociânicos).

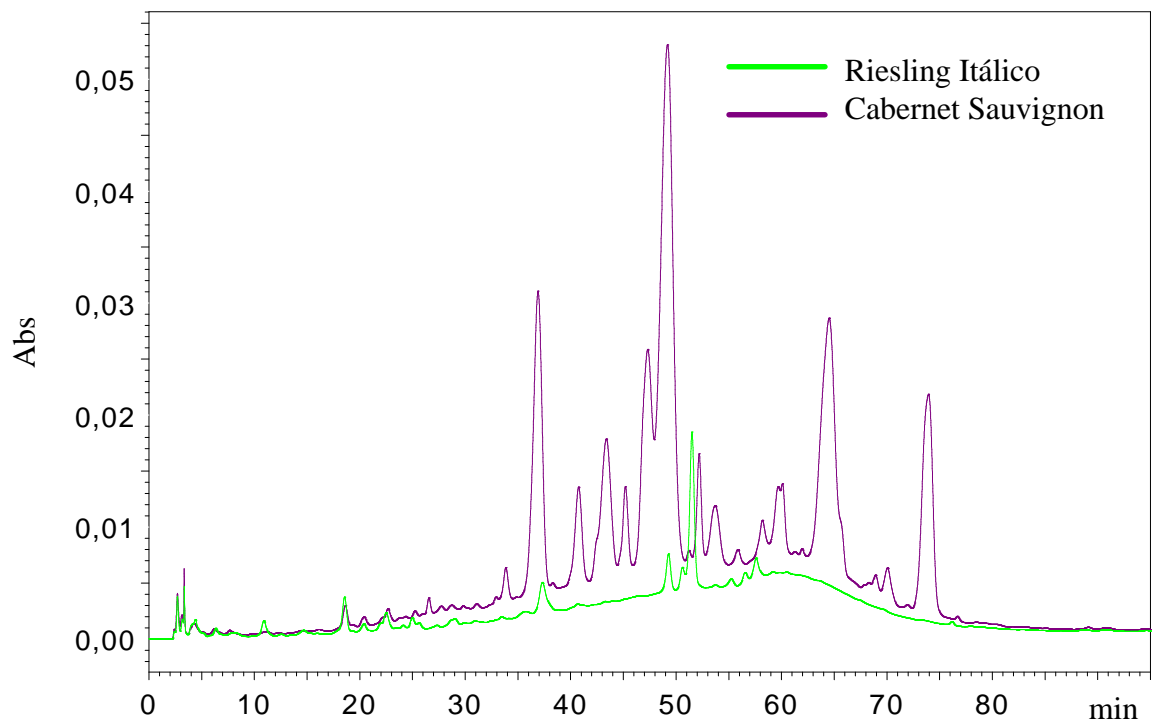


Figura 13 -Perfis cromatográficos dos extratos das cascas das uvas a 280 nm (fenólicos totais).

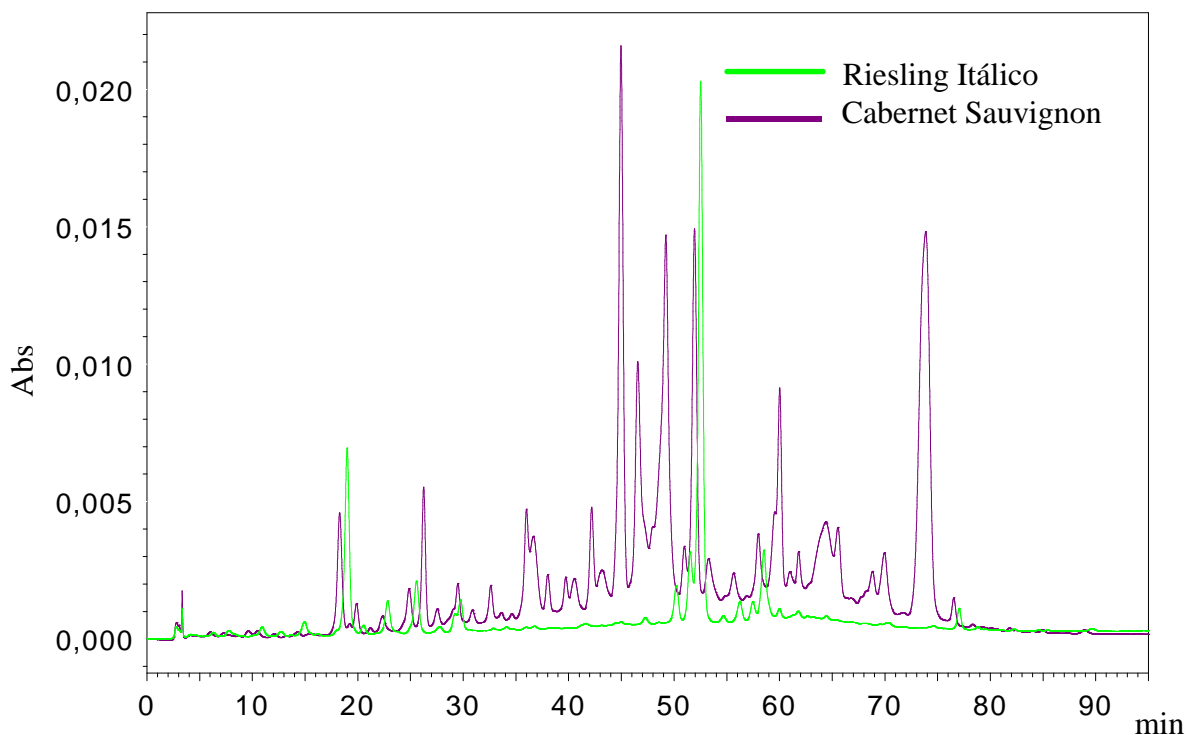


Figura 14 -Perfis cromatográficos dos extratos das cascas das uvas a 320 nm (ésteres tartáricos).

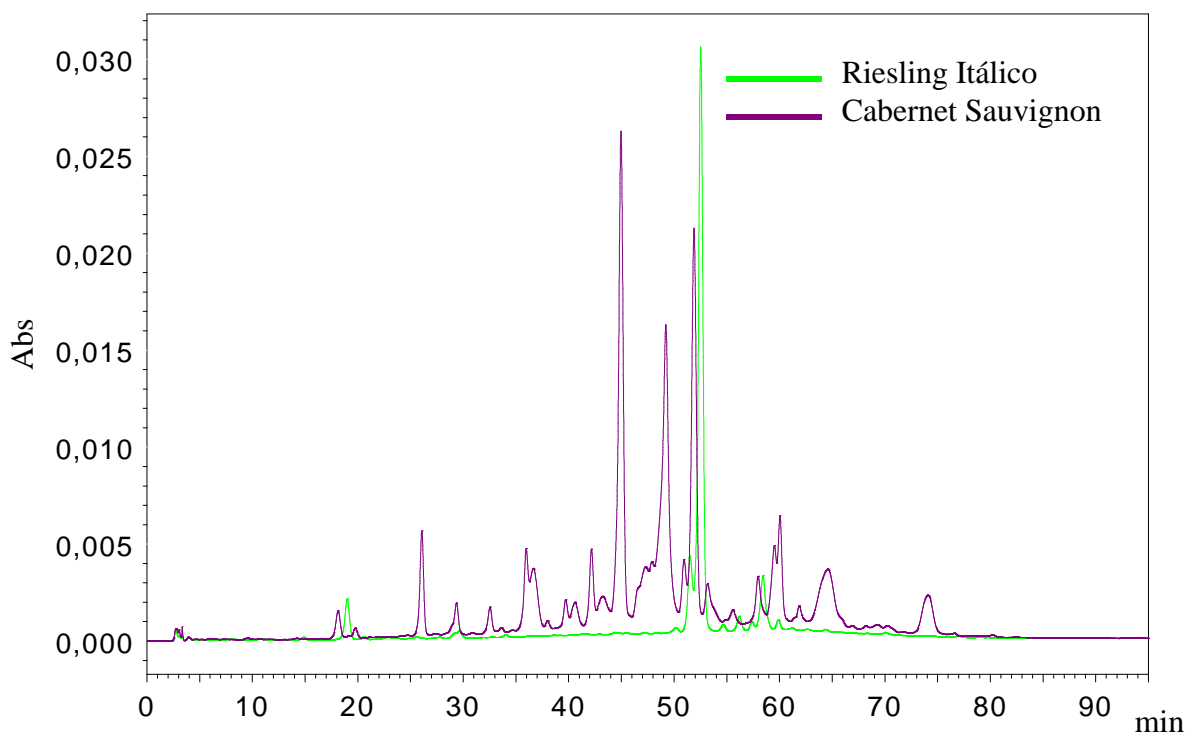


Figura 15 -Perfis cromatográficos dos extratos das cascas das uvas a 360 nm (flavonóis).

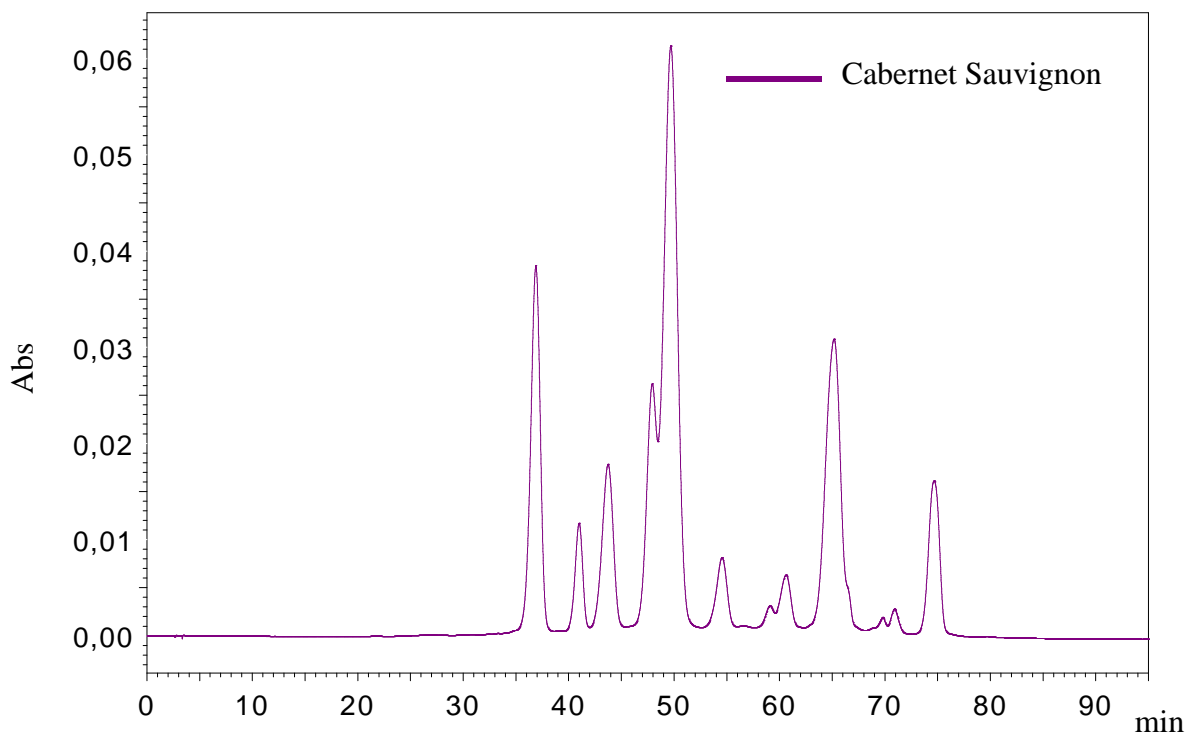


Figura 16 -Perfil cromatográfico do extrato da casca da uva Cabernet Sauvignon a 520 nm (pigmentos antociânicos).

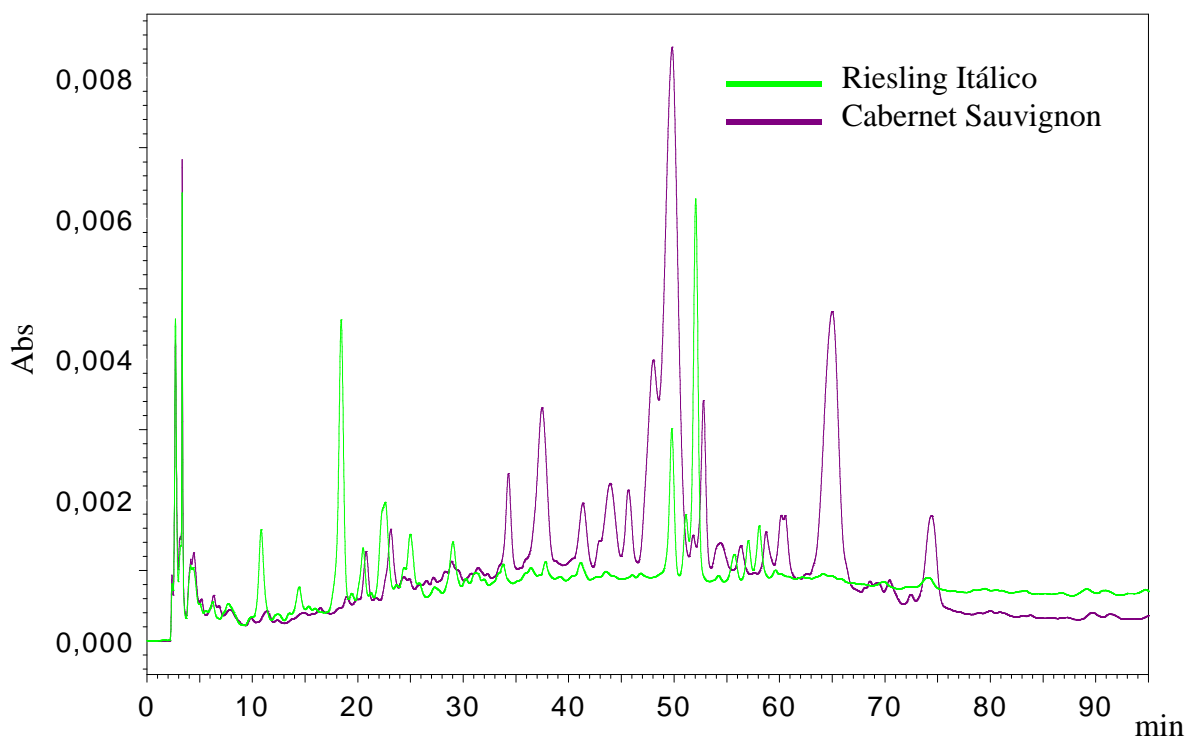


Figura 17 -Perfis cromatográficos dos extratos das polpas das uvas a 280 nm (fenólicos totais).

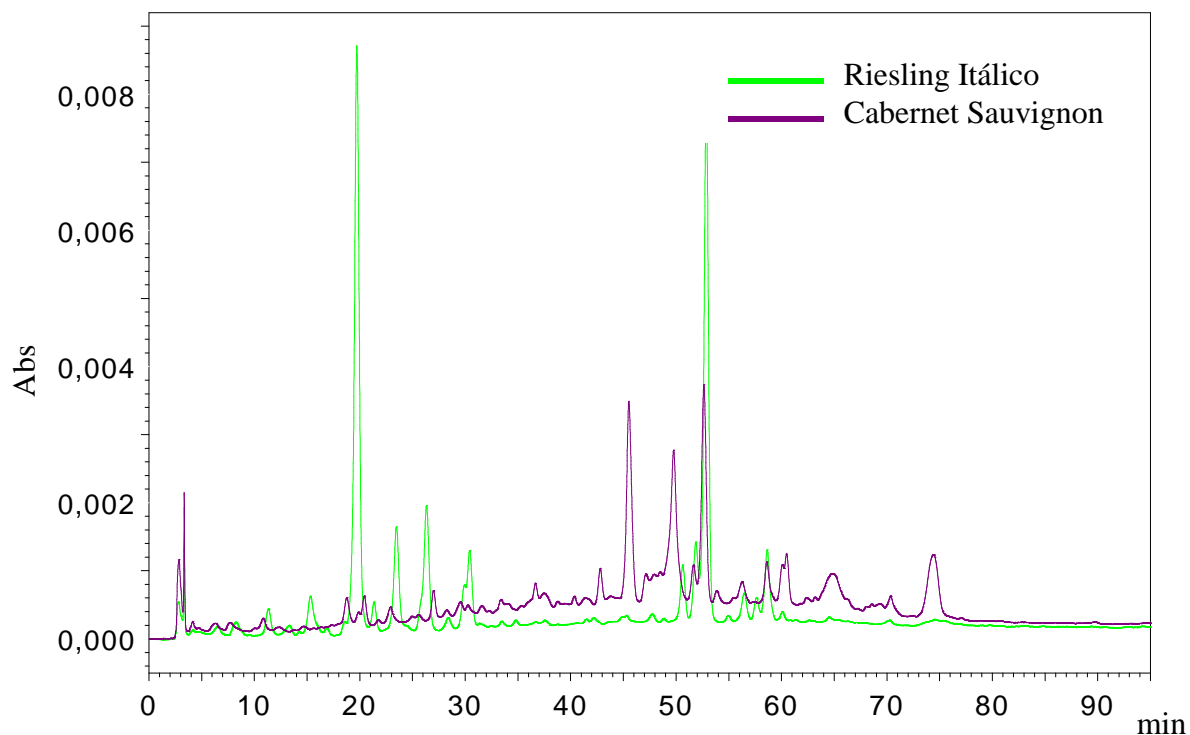


Figura 18 -Perfis cromatográficos dos extratos das polpas das uvas a 320 nm (ésteres tartáricos).

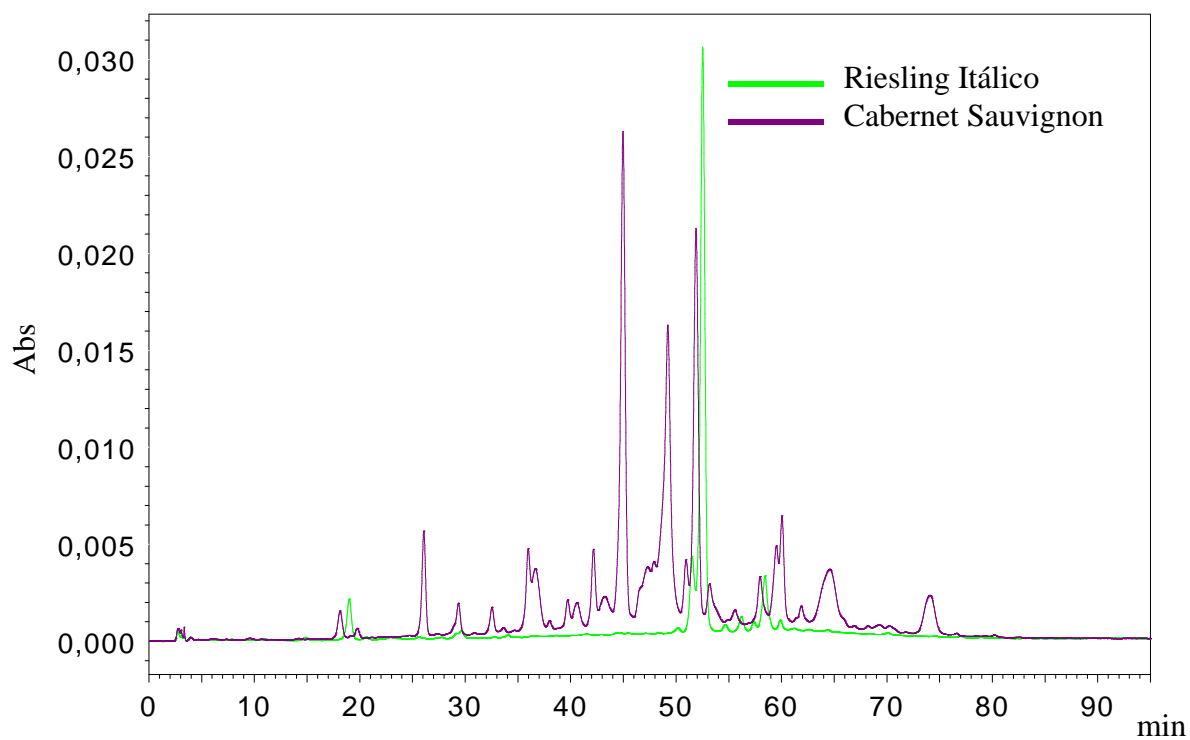


Figura 19 -Perfis cromatográficos dos extratos das polpas das uvas a 360 nm (flavonóis).

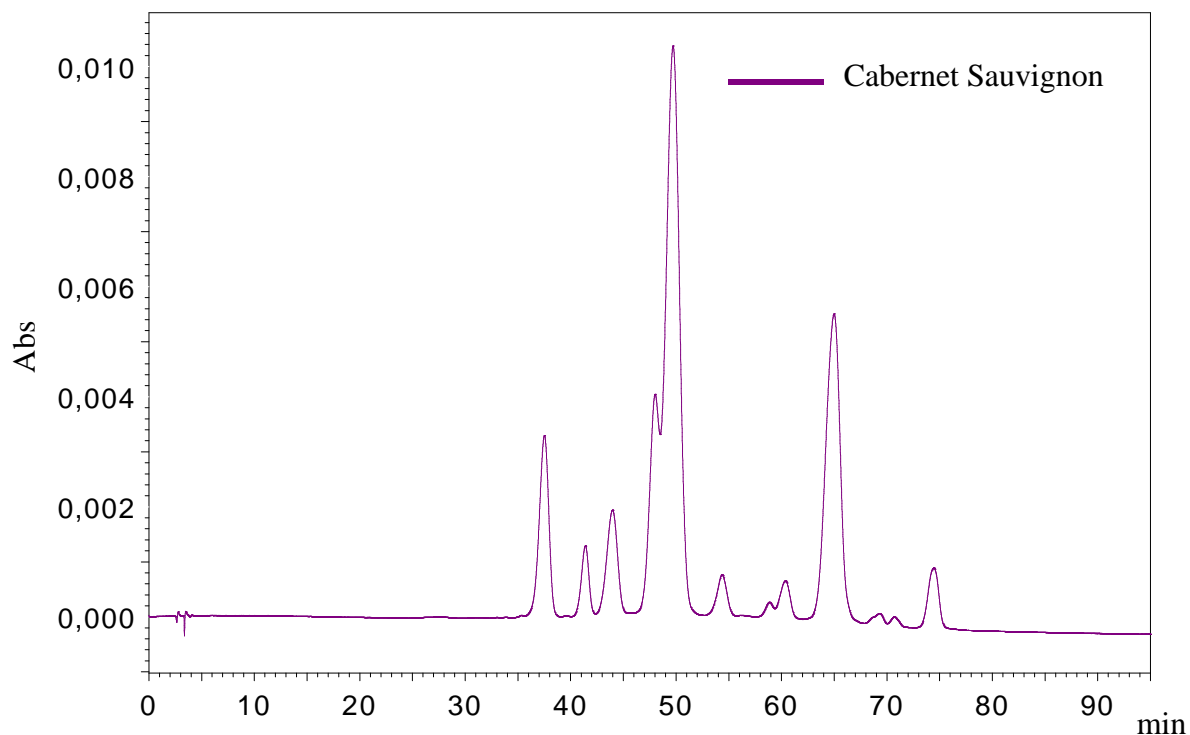


Figura 20 - Perfil cromatográfico do extrato da polpa da uva Cabernet Sauvignon a 520 nm (pigmentos antociânicos).

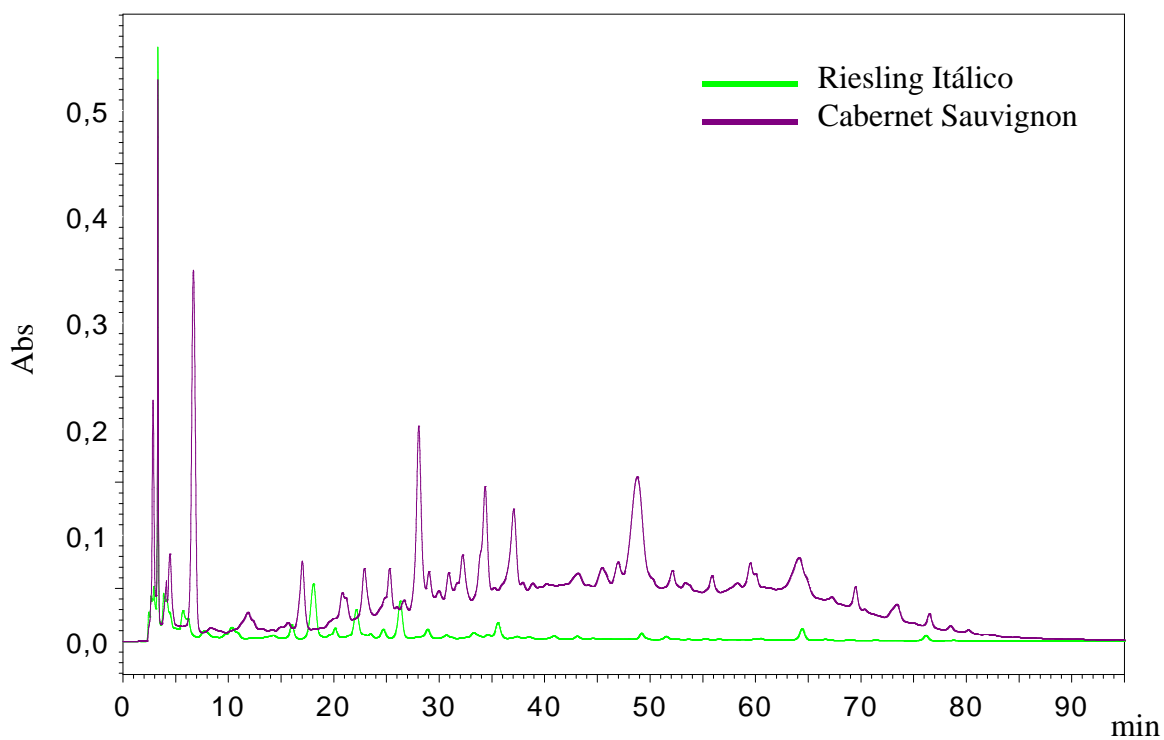


Figura 21 - Perfis cromatográficos dos vinhos a 280 nm (fenólicos totais).

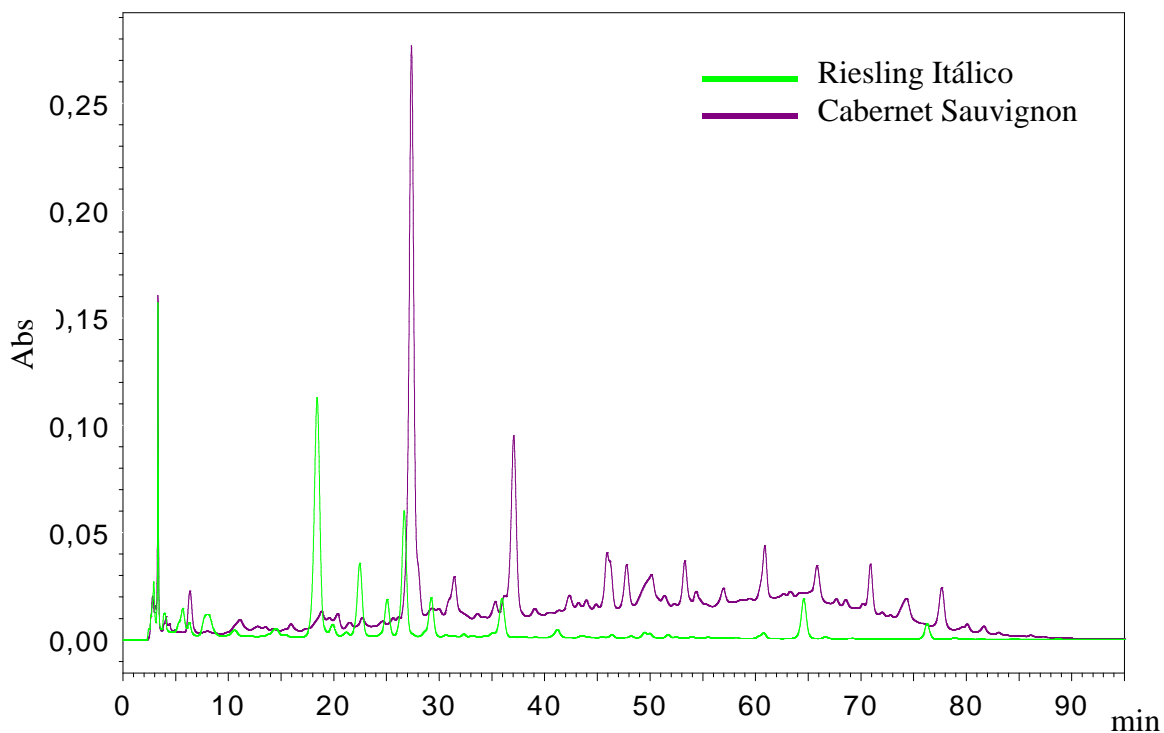


Figura 22 -Perfis cromatográficos dos vinhos a 320 nm (ésteres tartáricos).

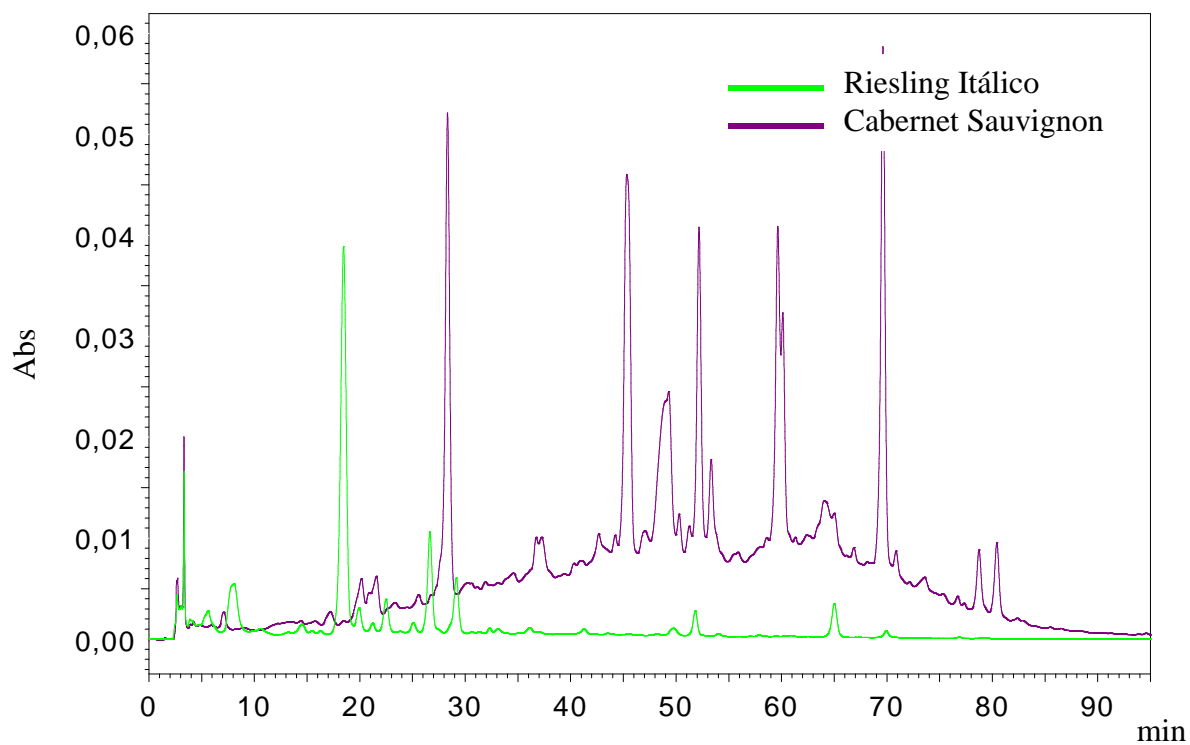


Figura 23 -Perfis cromatográficos dos vinhos a 360 nm (flavonóis).

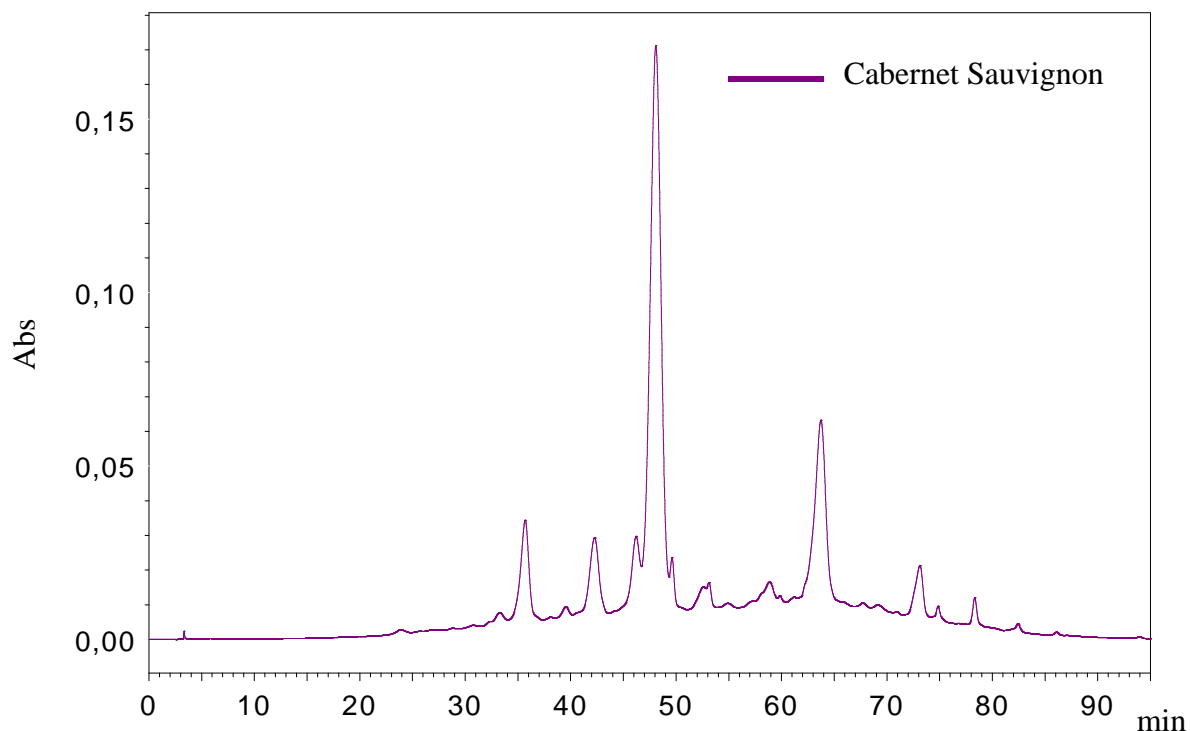


Figura 24 -Perfil cromatográfico do vinho Cabernet Sauvignon a 520 nm (pigmentos antociânicos).

Pôde-se obter uma correlação positiva de 96,9%, 96,3%, 89,7%, 87,3% e de 69,4% para as classes de fenólicos totais, ésteres tartáricos, flavonóis, procianidinas e antocianinas respectivamente testadas pelo método espectrofotométrico descrito por ROMANI et al. (1996) e por CLAE descrito por MATTILA et al. (2000).

Uma discussão mais detalhada dos componentes fenólicos dos extratos poderia ser melhor entendida se houvesse padrões disponíveis para o presente experimento, necessitando de uma grande variedade destes, e também se não houvessem interferentes nas amostras.

Entretanto, algumas comparações puderam ser obtidas. Partindo-se dos vinhos, nota-se que o vinho da uva Cabernet Sauvignon possui uma maior gama de polifenóis, quantitativamente e qualitativamente (ver figura 21). A maior parte destes compostos fenólicos se encontram a partir do tempo de retenção de trinta minutos, onde se encontram as classes fenólicas

compostas por 15 carbonos, como flavonóis (figura 23), antocianinas (figura 24), flavan-3-óis (figura 23) e seus polímeros.

Para o vinho proveniente da uva Riesling Itálico nota-se que a maioria dos compostos fenólicos eluem anteriormente aos trinta minutos, sugerindo-se que esta fração seria composta em sua maioria por compostos mais polares e de menor cadeia carbônica como os ácidos fenólicos e ésteres tartáricos (figura 18). Contudo que esta fração se encontre em menor quantidade quando comparada com a fração presente no vinho tinto, proporcionalmente ao conteúdo de fenólicos totais esta fração é bem maior nos vinhos brancos, sendo as classes fenólicas mais representativas nestes tipos de vinhos. Fato este pode ser observado nos cromatogramas dos extratos da polpa da uva Riesling Itálico, sendo esta a única fração do fruto da uva (polpa) empregada para a elaboração do respectivo vinho branco pelo método tradicional.

Esta discussão sobre os cromatogramas se equipara positivamente quando são comparados com os dados obtidos por espectrofotometria.

## 2.6. CONCLUSÕES

A técnica espectrofotométrica utilizada para a quantificação de classes fenólicas se apresentou como sendo muito rápida e sem maior preparo das amostras a serem analisadas. Neste experimento não foi realizada a comparação com outros métodos para que fosse avaliado o seu desempenho, entretanto uma avaliação do teor de polifenóis totais foi realizada utilizando o reativo de Folin Denis em outra extração, obtendo-se assim um alto valor de correlação entre as médias das amostras analisadas pelos dois métodos.

Os valores de correlação entre as médias dos teores das classes fenólicas dos diversos extratos e das áreas apresentadas nos cromatogramas desenvolvidos por CLAE também foram obtidos, sendo: fenólicos totais (96,9%); ésteres tartáricos (96,3%); flavonóis (89,7%), procianidinas (87,3%) e antocianinas (69,4%).

Verifica-se nos cromatogramas um bom desempenho da separação dos compostos fenólicos dos extratos e vinhos pela CLAE. Contudo a presença de interferentes ainda é muito grande devido ao fato de que os extratos não foram submetidos a nenhum processo de pré-purificação, fato este pode ser melhor observado nos cromatogramas que foram desenvolvidos em comprimento de onda de 280 nm. Como alternativas,

sugere-se uma pré-purificação das amostras, tentando separar a classe ou compostos os quais se deseja estudar, ou aumentar o número de pratos teóricos, seja pela utilização de outra coluna cromatográfica em série ou pelo uso de um gradiente mais trabalhado (ternário por exemplo).

Portanto faz se necessário o estudo de técnicas que possibilitem a identificação e a quantificação acurada dos compostos fenólicos provenientes das uvas e dos vinhos sem que haja danos nas estruturas destes, ou seja, que sejam menos manipulados. Assim sendo, torna-se interessante o desenvolvimento de técnicas mais rápidas e baratas em que se tenha uma correlação alta com técnicas mais discriminatórias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNOUS, A; MAKRIS, D. P; KEFALAS, P. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. **J. Agric. Food Chem.** n.49, p.5736-5742, 2001.
- COSTA, C. T; DERECK, H; MARGOLIS, S. A. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A.** v.881, p.403-410, 2000.
- de FREITAS, V. A. P; GLORIES, Y; MONIQUE, A. Developmental changes of procyanidins in grapes of red *Vitis vinifera* varieties and their composition in respective wines. **Am. J. Enol. Vitic.** n.4, v. 51, p.397-403, 2000.
- FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.). **Anthocyanins as food colors.** Academic Press, 1982. cap. 7, p.182-204.
- FULEKI, T; SILVA, J. M. R. Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. **J. Agric. Food Chem.** n.45, p.1156-1160, 1997.
- GAO, L; MAZZA, G. Characterization, quantitation, and distribution of anthocyanins and colorless phenolics in sweet cherries. **J. Agric. Food Chem.** n.43, p.343-346, 1995.

- GAO, L; MAZZA, G. Rapid method for complete chemical characterization of simple and acylated anthocyanins by high-performance liquid chromatography and capillary gas-liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.** n.42, p.118-125, 1994.
- GIRARD, B; MAZZA, G. Functional grape and citrus products. In: MAZZA, G. (Ed). **Functional foods: Biochemical & processing aspects.** Technomic publishing CO. INC. Lancaster, 1998. cap. 5, p.139-191.
- GUPTA, R. K; HASLAN, E. Vegetable Tannins – structure and biosynthesis. In: HULSE, J. H. (Ed.). **Polyphenols in cereals and legumes.** IDRC Publication, 1979, p.15-24.
- KIM, K. R; KIM, J. H; CHEONG, E; JEONG, C. Gas chromatographic amino acid profiling of wine samples for pattern recognition. **Journal of Chromatography A.** v.772, p.303-309, 1996.
- KRUEGER, C. G; DOPKE, N. C; TREICHEL, P. M; FOLTS, J; REED, J. D. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of polygalloyl polyflavan-3-ols in grapes seed extract. **J. Agric. Food Chem.** n.48, p.1663-1667, 2000.
- LARRAURI, J. A; RUPEREZ, P; CALIXTO, F. S; Antioxidant activity of wine pomace. **Am. J. Enol. Vitic.** v.47, n.4, p.369-372, 1996.
- LASZLAVIK, M; GÁL, L; MISIK, S; ERDEI, L. Phenolic compounds in two hungarian red wines matured in *Quercus tobur* and *Quercus petrea* barrels: HPLC analysis and diode array detection. **Am. J. Enol. Vitic.** v.46, n.1, p.67-72, 1995.
- LEE, H. S. Cromatographic analysis of anthocyanins. **Journal of Chromatography.** v.624, p.221-234, 1992.
- LUNTE, S. Structural classification of flavonoids in beverages by liquid chromatography with ultraviolet-visible and electrochemical detection. **Journal of Chromatography.** v.384, p.371-382, 1987.

- MATTILA, P; ASTOLA, J; KUMPULAENEN, J. Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections. **J. Agric. Food Chem.** n.48, p.5834-5841, 2000.
- MAZZA, G; FUKUMOTO, L; DELAQUIS, P; GIRARD, B; EWERT, B. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. **J. Agric. Food Chem.** n.47, p.4009-4017, 1999.
- PALOMINO, O; GÓMEZ-SERRANILLOS, M. P; SLOWING, K; CARRETERO, E; VILLAR, A. Study of polyphenols in grape berries by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A.** v.870, p.449-451, 2000.
- PEÑA, A; GARCIA, V; ROMERO, M. L; CAPELLA, S. Reversed-phase ion-pair chromatography of anthocyanins in red wines. **Journal of Chromatographic science.** v.35, p.161-164, 1997.
- PENG, Z; HAYASAKA, Y; ILAND, P. G; SEFTON, M; HOJ, P; WATERS, E. J. Quantitative analysis of polymeric procyanidins (tannins) from grape (*Vitis vinifera*) seeds by reverse phase high-performance liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.** n.49, p.26-31, 2001.
- PETERSON, J; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition research.** v.18, n 12, p.1995-2018, 1998.
- POLLNITZ, A. P; PARDON, K. H; SEFTON, M. A. Quantitative analysis of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiaicol in red wine. **Journal of Chromatography A.** v.874, p.101-109, 2000.
- REVILLA, E; GARCÍA-BENEYTEZ, E; CABELLO, F; MARTÍN-ORTEGA, G; RYAN, J. M. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. **Journal of Chromatography A.** v.915, p.53-60, 2001.

- REVILLA, E; RYAN, J. M. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. **Journal of Chromatography A**. v.881, p.461-469, 2000.
- RIBÉREAU-GAYON, P. The anthocyanins of grapes and wines. In: MARKAKIS, P. (Ed.). **Anthocyanins as food colors**. Academic Press, 1982. cap. 8, p.210-232.
- ROMANI, A; MANCINI, P; TATTI, S; VINCIERI, F. F. Polyphenols and polysaccharides in tuscan grapes and wines. **Ital. J. Food Sci.** n.1, p.13-24, 1996.
- SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: estructura y clasificación. Presencia en alimentos y consumo. Biodisponibilidad y metabolismo. **Alimentaria** 2002; p.19-27.
- SAUCIER, C; MIRABEL, M; DAVIAUD, F; LONGIERAS, A; GLORIES, Y. Rapid fractionation of grape seed proanthocyanidins. **J. Agric. Food Chem.** n.49, p.5732-5735, 2001.
- SCHNEIDER, R. Evaluation of small amounts of flavonoid phenols in white wines by colorimetric assays. **Am. J. Enol. Vitic.** v.46, n.2, p.274-277, 1995.
- SHAHIDI, F; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. 1. ed. Lancaster: Technomic Publishing Co, Inc., 1995.331p.
- SINGLETON, V.L. Wine phenols. In: LINSKENS, H. F; JACKSON, J. F. (Ed.). **Modern methods of plant analysis: wine analysis**. Springer-Verlag, 1988. v.6, p.173-206.
- SOMERS, T. C; VÉRETTE, E. Phenolic composition of natural wine types. In: LINSKENS, H. F; JACKSON, J. F. (Ed.). **Modern methods of plant analysis: wine analysis**. Springer-Verlag, 1988. v.6, p.219-250.

- SOUQUET, J. M; LABARBE, B; GUERNEVÉ, C. L; CHEYNIER, V; MOUTOUNET, M. Phenolic composition of grape stems. **J. Agric. Food Chem.** n.48, p.1076-1080, 2000.
- STRINGHETA, P. C. **Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocianinas extraídas da inflorescência de capim gordura (*Melinis minutiflora*, Pal de Beauv).** Campinas, UNICAMP, 1991. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, 1991.
- SUN, B; SILVA, J. M. R; SPRANGER, I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. **J. Agric. Food Chem.** n.46, p.4267-4274, 1998.
- VIDAL, S; CARTALADE, D; SOUQUET, J. M; FULCRAND, H; CHEYNIER, V. Changes in proanthocyanidin chain length in winelike model solutions. **J. Agric. Food Chem.** n.50, p.2261-2266, 2002.
- VILLENEUVE, F; ABRAVANEL, G; MOUTOUNET, M; ALIBERT, G. General scheme of analysis of phenolic compounds in plant extracts by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A.** v.234, p.131-140, 1982.
- VIÑAS, P; LÓPEZ-ERROZ, C; MARÍN-HERNÁNDEZ, J. J; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A.** v.871, p.85-93, 2000.
- WATERHOUSE, A.L; IGNELZI, S; SHIRLEY, J. R. A comparison of methods for quantifying oligomeric proanthocyanidins from grape seed extracts. **Am. J. Enol. Vitic.** n.4, v. 51, p.383-389, 2000.
- WROLSTAD, R. E. Color pigment analysis in fruit products. **Station Bulletin of Agricultural Experiment Station** from Oregon State University, n.624, p.1-15, 1993.
- ZOECKLEIN, B. W; FUGELSANG, K. C; GUMP, B. H; NURY, F.S. Phenolic compounds and wine color. In: ZOECKLEIN, B. W; FUGELSANG, K. C; GUMP, B. H; NURY, F.S. (Eds.). **Wine analysis**

**and production.** The Chapman hall enology library, 1995. cap. 3, p.53-75.

## CAPÍTULO 3

### **AVALIAÇÃO *in vitro* DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DAS FRAÇÕES DAS UVAS RIESLING ITÁLICO E CABERNET SAUVIGNON E DE SEUS RESPECTIVOS VINHOS**

#### **3.1. INTRODUÇÃO**

Oxigênio, um componente vital para a sobrevivência da espécie humana, está presente na atmosfera como um birradical triplete estável ( $^3\text{O}_2$ ). Uma vez inalado, ele sofre um processo gradual de redução até ser metabolizado em água. Neste processo, como sempre, uma pequena quantidade de intermediários reativos, como o radical superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ), e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) são formados. Essas espécies reativas (radicais livres), coletivamente denominadas espécies reativas de oxigênio, podem facilmente iniciar a peroxidação dos lipídios componentes das membranas celulares, resultando na acumulação de peróxidos de lipídeos. Os produtos da peroxidação e outros de oxidações secundárias, como o malonaldeído e o 4-hidroxinonal, são altamente

reativos; eles reagem com substratos biológicos como proteínas, aminas e ácidos desoxirribonucléico (DNA). Estes processos resultam no desenvolvimento de algumas doenças degenerativas, e podem ter uma contribuição significativa para o envelhecimento humano e o risco do câncer (SATO et al., 1996).

O envelhecimento da célula, dos tecidos e do organismo como um todo, é uma ação destes radicais livres, que por possuírem um elétron livre na última camada são muito instáveis, reativos. Para se estabilizar eles podem ganhar um elétron (reação de redução) ou perder um elétron (reação de oxidação). Os seus efeitos sobre o organismo são, de uma maneira geral, nocivos e estão relacionados há cerca de 60 condições clínicas, entre elas a catarata, a aterosclerose, o câncer, isquemia, alterações no sistema nervoso, entre outras (LANGSETH, 1995).

O próprio organismo gera radicais livres, como nas inflamações, na isquemia, estresse físico e ou emocional. Mas o organismo também pode obtê-los de fontes externas, como na radiação ultravioleta proveniente do sol e outras radiações ionizantes (raios X, radioterapia), poluição, cigarro, dentre outras.

A maioria das espécies vivas possui sistemas eficientes de defesa para protegê-las contra o estresse oxidativo induzido pelas espécies reativas de oxigênio. A capacidade dos sistemas de proteção, entretanto, decresce gradualmente com o envelhecimento, resultando em distúrbios no equilíbrio normal redox estabelecido nos sistemas saudáveis (SATO et al., 1996).

Os responsáveis pelo combate à ação nociva dessas substâncias no organismo são os varredores de radicais livres ou antioxidantes. Existem algumas substâncias que são excelentes antioxidantes naturais, como a vitamina E, a vitamina C e os compostos fenólicos.

O próprio organismo humano possui uma gama de mecanismos protetores que controlam a peroxidação e rapidamente eliminam ou inativam os radicais livres. Enzimas com habilidades sequestrantes e antioxidantes primários e secundários como vitamina E e C podem ser fornecidas pela dieta (KINSELLA et al., 1993). O corpo humano também produz algumas enzimas que têm efeitos antioxidantes, como a superoxidismutase, catalase e a glutathiona peroxidase (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SHAHIDI, 1997).

Um aumento de evidências epidemiológicas associadas com dietas ricas em frutas e vegetais e um reduzido risco de doenças do coração, câncer e outras doenças crônicas tem ocorrido recentemente (MOYER et al., 2002). Podendo-se observar que um grande benefício da dieta pode ser conseguido com o aumento do consumo de antioxidantes, incluindo carotenóides, ascorbatos, tocoferóis e compostos fenólicos.

Existe atualmente um interesse considerável das indústrias de alimentos (ALONSO et al., 2002 a) e da medicina preventiva no desenvolvimento de “antioxidantes naturais” provenientes de material vegetal. Os tecidos vegetais são os principais sistemas biológicos que sintetizam o  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico e carotenóides, sendo também ricos em uma ampla variedade de compostos fenólicos.

Alimentos comuns como uva e seus produtos derivados contém uma grande variedade de compostos fenólicos em quantidades variando de traços a alguns gramas por quilograma do alimento fresco. Tem sido relatado que estes compostos tem demonstrado possuir múltiplos efeitos biológicos como atividade antioxidante, ação antiinflamatória, inibição da agregação de plaquetas nos vasos sanguíneos e atividade antimicrobiana (MAZZA et al., 1999).

Fitoquímicos, especialmente aqueles encontrados em vinhos, podem também ser fatores críticos na redução da mortalidade provocada

por doenças coronarianas de específicos segmentos da população da França. Um estudo comparativo iniciado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) tem mostrado diferenças marcantes na mortalidade e enfermidades a partir de doenças do coração entre, especialmente, populações da França e Estados Unidos. Apesar de uma dieta rica em ácidos graxos saturados a níveis comparáveis do conteúdo de colesterol no plasma sanguíneo, os indivíduos franceses mostraram-se menos susceptíveis a doenças coronárias que os indivíduos norte-americanos. Usando análises multivariadas, Renaud e de Lorgeril em 1992, postularam que o consumo de vinho foi o único fator responsável por esta discrepância, sendo comumente referido como o “Paradoxo Francês”.

Como visto, o interesse em compostos fenólicos em alimentos alcançou um novo patamar nos últimos anos. Subtraindo o interesse acadêmico usual na biologia e química de descoberta e identificação de compostos fenólicos na natureza, tem se notado que a ciência, juntamente ao interesse comercial, está buscando acentuar estudos e trabalhos sobre estes compostos, de modo a agregar um valor a mais ao alimento, principalmente com efeitos que tragam benefícios à saúde.

## **3.2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.2.1. Antioxidantes e saúde**

Nos organismos vivos, a oxidação está relacionada com a produção de energia, associada com a degradação de glicídeos, lipídeos e proteínas, com a detoxificação de muitos xenobióticos e com a resposta imunológica através dos radicais livres gerados (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1996). Portanto o processo de oxidação é essencial para a vida e é regulado, geralmente, por via enzimática. Sabe-se que para manter o equilíbrio fisiológico do organismo, os sistemas de oxidação e os sistemas de proteção antioxidante devem atuar de forma controlada sobre os substratos susceptíveis de oxidação (SÁNCHEZ-MORENO, 2002). Fatores de meio ambiente, dietéticos ou fisiológicos podem provocar um desequilíbrio neste balanço favorecendo a oxidação, originando o que se conhece como “stress oxidativo” (GUTTERIDGE e HALLIWELL , 1996), contribuindo em maior ou menor grau para o aparecimento de enfermidades como câncer, artrites reumatóides, enfermidades inflamatórias, ateroscleroses, cataratas, diabetes, enfermidades renais, pancreatites, escleroses múltiplas, Mal de Parkinson, disfunções pulmonares, reações com fármacos ou lesões dérmicas (SÁNCHEZ-MORENO, 2002). Os centros alvos destas espécies

reativas são, fundamentalmente, alguns constituintes intra e extracelulares de indiscutível importância vital, como as proteínas, os glicídeos, os lipídeos, as enzimas, o ácido desoxirribonucléico (DNA) e o ácido ribonucléico (RNA), sendo a oxidação dos ácidos graxos insaturados o processo oxidativo mais frequentemente ocorrido no organismo humano (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1996).

Os antioxidantes são substâncias que quando presentes em alimentos ou no corpo humano em baixas concentrações quando comparados com a concentração de substratos oxidáveis, nitidamente retarda ou previne a oxidação de certas substâncias (SHAHIDI, 1997).

Os mecanismos de atuação dos antioxidantes podem ser diferenciados. Seus efeitos consistem na inativação dos radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução dos hidroperóxidos para produtos incapazes de formar radicais livres e produtos de decomposição (SHAHIDI e NACZK, 1995).

Os compostos fenólicos se incluem principalmente na categoria de sequestradores de radicais livres, ainda que também possam exercer sua ação antioxidante através de outros mecanismos, como quelantes de íons metálicos que catalisam reações de oxidação (SÁNCHEZ-MORENO, 2002). Estes compostos interferem na oxidação dos lipídeos e de outras moléculas por uma rápida doação de um átomo de hidrogênio aos radicais livres. Os radicais fenóxidos formados são intermediários bastante estáveis (ressonância com o anel benzênico) e dificilmente iniciam uma nova reação em cadeia. Estes radicais intermediários fenóxidos atuam reagindo com outros radicais livres, culminando com a terminação das reações de propagação (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

A eficiência dos compostos polifenólicos como antioxidantes depende, em grande parte, de sua estrutura química. O fenol por si só é inativo como antioxidante, entretanto, os compostos *orto* e *para*-

difenólicos possuem atividade antioxidante, a qual é aumentada com a substituição de seus átomos de hidrogênio por grupos *etila-* ou *n-butila* e a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e seus ésteres depende do número de grupos hidroxila na molécula, (FUKUMOTO e MAZZA, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Os compostos fenólicos do vinho tinto são derivados das cascas das uvas, bem como das sementes, engaços e polpa. Todos são importantes fontes de flavonóides que são transferidos para o vinho durante a permanência conjunta com o suco da uva no primeiro estágio da fermentação (FURHMAN et al., 2001). Por outro lado, os vinhos brancos são usualmente feitos do suco corrente livre, ou seja, sem um contato significativo com as cascas e sementes da uva.

Uma das grandes diferenças entre vinhos tintos e brancos é o conteúdo de compostos fenólicos. Atividades antioxidantes mais baixas em vinhos brancos podem ser resultado de um baixo conteúdo de polifenóis derivado da casca da uva, pois no processo de elaboração de vinho branco (vinificação em branco) a etapa de maceração não é significativa como na vinificação das uvas tintas, a qual resulta da permanência das cascas da uva no mosto por um certo período e posterior fermentação, resultando, então, em uma maior extração de polifenóis, principalmente os taninos e pigmentos antociânicos.

Atualmente na Europa existe o chamado “vinho saúde”, que são vinhos tintos elaborados com um maior conteúdo de polifenóis; entretanto para vinhos brancos este processo ainda não é bem aceito, visto que aspectos como a estabilidade oxidativa, sensoriais como sabor e cor (turbidez) principalmente, comprometem significamente o consumo de tal bebida. ARUOMA et al. (2001) e FUHRMAN et al. (2001), sugerem que um processamento do vinho branco, de modo que seja aumentado o conteúdo fenólico deste, resultará em um aumento da capacidade

antioxidante do vinho, propiciando melhores benefícios à saúde do consumidor, como já demonstrado para o vinho tinto.

Compostos fenólicos, especialmente antocianinas, flavonóis, catequinas e outros flavonóides têm uma importante função na qualidade do vinho. Eles contribuem para as características sensoriais, particularmente cor e adstringência, e recentemente diversos efeitos bioquímicos e farmacológicos tem sido apresentados pelos vinhos, inculindo-se efeitos anticarcinogênico, antiaterogênico, antiinflamatório, antimicrobiológico e atividades antioxidantes (MAZZA et al., 1999).

Os efeitos saudáveis de bebidas alcoólicas à saúde permitiram a condução de estudos epidemiológicos os quais demonstraram que doenças coronarianas são menos prevalentes nas populações que consomem quantidades regulares e moderadas de vinho. Em um dos mais famosos estudos, Renaud e De Lorgerial sugeriram uma explanação de um fenômeno favorável, particularmente para a população da França, com especial enfoque para doenças cardiovasculares, conhecido como o “Paradoxo Francês”. Os resultados do programa Monica, um sistema organizado de dados sobre doenças artero-coronarianas da Organização Mundial da Saúde (OMS), confirmaram que os níveis de mortalidade provocado por essas doenças são muito menores na França que em outros países industrializados, embora o consumo de gorduras saturadas na França seja alto e os níveis de colesterol sanguíneo sejam geralmente maiores. Além do mais, outros fatores associados com o risco destas doenças, como pressão arterial sanguínea, peso corpóreo, e número de fumantes não são baixos na França quando comparado com outros países.

O “Paradoxo Francês” atribui a baixa incidência de eventos cardiovasculares ao regular consumo do vinho tinto em uma região específica da França.

A ingestão de vinho tinto foi associada com uma crescente atividade antioxidante do plasma sanguíneo e um aumento na resistência da oxidação do LDL *ex vivo* (FUHRMAN et al., 2001). A hipótese de que a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) é a maior causa da aterosclerose, acarreta em uma investigação intensa nas funções antioxidantes contra a oxidação do LDL (FUHRMAN et al., 2001). Este mesmo autor tem demonstrado que o consumo de vinho tinto ou catequina purificada (flavanol) ou quercetina (flavonol) resulta em uma reduzida susceptibilidade do LDL para a oxidação e em uma atenuada progressão da aterosclerose em ratos ateroscleróticos deficientes em apolipoproteína E.

Os danos causados por radicais livres podem ter um papel importante na formação da aterosclerose mediante à oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (SÁNCHEZ-MORENO, 2002). Estes LDL oxidados são facilmente adsorvidos por macrófagos e formam células espumosas que, ao crescerem dão lugar às placas ateroscleróticas que obstruem os vasos, impedindo o fluxo sanguíneo ou sofrendo uma ruptura, o que desencadeia em uma trombose (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

LANDRAULT et al. (2001), citam que a inibição da oxidação do LDL humano foi demonstrada pela adição de polifenóis provenientes do vinho. Sendo que o vinho tinto diluído 1000 vezes inibiu a oxidação *in vitro* do LDL humano significativamente mais que o  $\alpha$ -tocoferol.

Segundo LANDRAULT et al. (2001), os flavonóides apresentam uma relativa lipofilicidade dentre os antioxidantes naturais, ainda que bem menos que o  $\alpha$ -tocoferol. O  $\alpha$ -tocoferol parece estar localizados na membrana lipídica da bicamada fosfolipídica, já os flavonóides estão provavelmente localizado principalmente na superfície polar da bicamada. Os radicais livres, que são hidrofílicos, são transportados na parte aquosa do sangue, o plasma, sendo assim seriam capturados mais facilmente pelos flavonóides que pelo  $\alpha$ -tocoferol (menos acessível).

Assim, os flavonóides poderiam ser encontrados próximos à superfície membranosa das partículas de LDL, prontos para capturar os radicais livres. Desta maneira eles preveniriam o consumo do  $\alpha$ -tocoferol lipofílico e assim, retardariam a oxidação dos lipídeos contidos no LDL (LANDRAULT et al., 2001).

Todas as propriedades e estudos relatados reforçam as presentes hipóteses para explanação do reduzido risco de mortalidade por doenças cardiovasculares e outras em consumidores regulares e moderados de vinho (em particular vinho tinto).

### **3.2.2. Metodologias antioxidantes *in vitro***

Vários são os métodos para testar a atividade antioxidante (MIURA et al., 2002), podendo ser usados para compostos isolados e extratos. Estes métodos podem ser testados *in vitro* e *in vivo*. Não existe um método satisfatório que consiga avaliar a atividade antioxidante total de uma amostra, pois existem vários mecanismos antioxidantes que podem ocorrer (OU et al., 2002), sendo sequestro de radicais, habilidade redutora, complexação de íons metálicos e outros. Também há uma dificuldade de comparar estes métodos, devido à complexidade e princípios diferentes das reações. Alguns métodos antioxidantes produzem resultados diferentes ou mesmo contraditórios, tornando-se algumas vezes impossível qualquer comparação entre eles (ALONSO et al., 2002 b).

Os métodos antioxidantes *in vitro*, onde não se avalia a interação fisiológica entre o organismo a substância analisada, podem ser considerados como avaliações potenciais, também pelo fato de que um determinado composto poderá ser efetivo ou não no organismo humano quando também é avaliada a sua biodisponibilidade. No caso do uso de antioxidantes diretamente em alimentos, para efeitos tecnológicos, a avaliação *in vitro* se bem conduzida é satisfatória.

Ainda que a composição fenólica dos vinhos seja bem conhecida, seus efeitos fisiológicos e biodisponibilidade ainda não estão bem definidos (MARTIN-CARRON et al., 1997).

LANDRAULT et al. (2001), avaliaram a atividade antioxidante de vinhos brancos e tintos, sendo que alguns vinhos brancos com conteúdo fenólico maior foram obtidos por processo de vinificação diferente do tradicional. A ingesta de alguns polifenóis específicos também foi avaliada, concluindo que alguns vinhos brancos obtidos por este processo especial de vinificação foram comparáveis a alguns vinhos tintos.

Tem sido demonstrado que a ingesta de compostos que tenham atividade antioxidante é muito importante, e vários métodos químicos, biológicos e eletroquímicos têm sido propostos para avaliar o poder antioxidante de compostos como os polifenóis (BRENNA e PAGLIARINI, 2001).

BRENNA e PAGLIARINI (2001), e ALONSO et al. (2002 b), utilizaram métodos eletroquímicos para avaliar o poder antioxidante de vinhos, comparando vinhos tintos e brancos, e produtos derivados de uvas respectivamente. Essas análises são baseadas na oxidação de compostos em eletrodos onde é submetida uma diferença de potencial, assim há a formação de uma corrente elétrica resultante da oxidação dos compostos sendo esta então medida. Outros métodos envolvem a produção de radicais de substâncias contidas no meio (geralmente são cromóforos) pelo estímulo elétrico e o seu aparecimento pode ser retardado por substâncias contidas neste meio as quais tenham efeito antioxidante.

LARRAURI et al. (1998), ESPÍN et al. (2000), LEBEAU et al. (2000), FUHRMAN et al. (2001), PUKALSKAS et al. (2002), GERMANÒ et al. (2002), MIURA et al. (2002) e SINGH et al. (2002), estudaram a atividade antioxidante de vários compostos através de sua capacidade em sequestrar radicais DPPH (1,1-difenil-2-picril hidrazil). Foram avaliadas as

atividades antioxidantes de compostos fenólicos isolados ou em extratos de diversas fontes. O princípio do método é a redução do radical estável DPPH (colorido) em meio alcoólico pelos pressupostos antioxidantes, formando assim um produto (DPPH reduzido) sem cor.

PIETTA et al. (1998), ESPÍN et al. (2000), LANDRAULT et al. (2001) e PUKALSKAS et al. (2002), avaliaram a capacidade sequestrante de radicais ABTS (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato) de extratos de plantas medicinais, extratos antociânicos de frutas, vinhos e extratos de gramíneas respectivamente. Este método é baseado na formação do radical ABTS<sup>•+</sup> pelo radical ferrilmioglobina gerado pela reação entre a metmioglobina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de peroxidase. Outros agentes oxidantes podem ser utilizados. Há portanto a formação de um radical cromóforo (ABTS<sup>•+</sup>), onde a atividade antioxidante é avaliada pela supressão da cor do radical quando substâncias antioxidantes são adicionadas no meio.

CHUNG et al. (1997), ARNOUS et al (2001), NODA et al. (2002) e SINGH et al. (2002), avaliaram a atividade sequestrante de radicais hidroxilas de extratos de diversas fontes. Os princípios da reação são variados, podendo o radical ser formado através do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por radiação ultravioleta, calor e agentes químicos. A atividade antioxidante pode ser medida pela reação de radicais hidroxilas diretamente com alguns reagentes específicos por espectrofotometria, alguns deste reagentes podem conter o borato, onde teremos a quimioluminescência podendo ser medida através de fluorímetros. Ainda pode se obter a oxidação de certas substâncias como a deoxiribose pelos radicais hidroxilas e sendo então capazes de reagirem com o ácido tiobarbitúrico, formando então um composto colorido, podendo então ser medido indiretamente através de espectrofotômetro.

Vários outros ensaios de atividade antioxidante que empregam radicais podem ser encontrados. Alguns outros radicais como o superóxido e formas radicalares do nitrogênio são usados. Alguns autores como NODA

et al. (2002), utilizaram vários radicais para estes tipos de avaliação, já outros autores como WANG et al. (1996), utilizaram o método ORAC (capacidade de absorver o oxigênio radical), sendo considerado como avaliação da capacidade antioxidante total.

A medida do poder redutor apresentada por alguns compostos também é considerada uma medida de atividade antioxidante. Geralmente utiliza-se ensaios onde a redução do íon férrico é avaliada por meios colorimétricos e medida em espectrofotômetros. YEN e CHEN (1995) e ARNOUS et al. (2001), utilizaram técnicas similares.

A avaliação da inibição de formação de peróxidos através da prevenção da oxidação de substâncias lipídicas também é caracterizada como avaliação antioxidante. Como fontes lipídicas pode-se usar o ácido linoléico, a lipoproteína de baixa densidade (LDL) bem como microsomas de fígado e cérebro. Pode-se utilizar o calor como causador de oxidação ou alguma substância química como o sulfato de cobre. Os malonaldeídos formados a partir da peroxidação do ácido linoléico, LDL e suspensões microsomais podem ser quantificados pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um composto colorido. Outro método seria a reação destes malonaldeídos com o íon ferroso e o tiocianato de amônio, formando também um composto colorido. LARRAURI et al. (1996), FURHMAN et al. (2001), GERMANÒ et al. (2002), HUNG e YEN (2002) e SINGH et al. (2002), utilizaram alguns destes métodos para avaliação da atividade antioxidante de extratos de uvas, vinhos e de outras fontes.

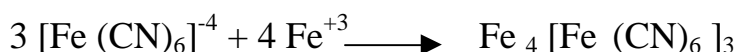
Outras metodologias acompanham o branqueamento do sistema  $\beta$ -caroteno-linoleato pela oxidação provocada pelos radicais hidroxilas formados a partir do  $H_2O_2$ . Em FUKUMOTO e MAZZA (2000), e SINGH et al. (2002), essa metodologia está bem explicitada utilizando técnicas diferentes de avaliação.

Ainda que em diversos trabalhos o conteúdo fenólico de certos extratos e vinhos está bem correlacionado com a atividade antioxidante, o conteúdo fenólico total não tem sido o único fator determinante da atividade, e outras substâncias não fenólicas contidas poderiam também exercer tal atividade (LARRAURI et al. 1996).

ARNOUS et al. (2001), mostraram que os flavanóis foram a classe de compostos fenólicos de vinhos tintos envelhecidos que obtiveram um alto desempenho quanto a atividade sequestrante de radicais hidroxilas, e com menor ênfase para a atividade antiradical e habilidade redutora, considerando que houve uma baixa correlação entre o conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante e somente uma fraca correlação com o conteúdo antociânico. O autor ainda cita que há fraca associação entre compostos isolados e atividade antioxidante, sugerindo que a atividade antioxidante seria uma consequência do sinergismo entre vários compostos fenólicos presentes no vinho.

### **3.2.2.1. Avaliação da atividade redutora**

Este ensaio baseia-se na reação de oxi-redução conhecida como método “Azul da Prússia”



Os polifenóis que possuem poder redutor reagirão com o ferricianeto  $\text{Fe} (\text{CN})_6^{-3}$  e serão oxidados, e o ferricianeto será reduzido a íon ferrocianeto  $\text{Fe} (\text{CN})_6^{-4}$ . O ferrocianeto formado reagirá com o cloreto férrico formando ferrocianeto férrico  $\text{Fe}_4[\text{Fe} (\text{CN})_6]_3$ , que pode ser quantificado espectrofotometricamente (coloração azul esverdeada).

### **3.2.2.2. Determinação da inibição da formação de peróxidos**

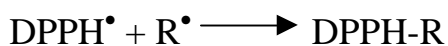
Este ensaio baseia-se na oxidação do íon ferroso a íon férrico, causada por hidroperóxidos com formação de tiocianato férrico. Este composto apresenta coloração rósea e pode ser medido espectrofotometricamente.



De acordo com OLIVEIRA (2000), este método mede a quantidade de peróxidos formados nos estágios iniciais da oxidação de lipídios. O método é recomendado para análises de amostras contendo pequenas quantidades de peróxidos.

### **3.2.2.3. Avaliação da capacidade sequestrante de radicais DPPH**

Este método baseia-se na redução dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>) através da doação de um átomo de hidrogênio pelo polifenol à molécula do radical. A redução do radical é acompanhada pelo decréscimo em sua absorvância (comprimento de onda característico) em solução metanólica à medida que os radicais estão sendo reduzidos pelos polifenóis (ARUOMA et al., 1997).



### **3.3. OBJETIVOS**

- Avaliar o poder redutor dos extratos em concentrações padronizadas de polifenóis;
- Avaliar a inibição de formação de peróxidos pelos extratos em concentrações padronizadas de polifenóis;
- Avaliar a cinética do sequestro do radical DPPH pelos extratos em concentrações padronizadas de polifenóis;
- Avaliar a percentagem de radical DPPH sequestrado em tempo fixo de reação com os extratos a 50 ppm de polifenóis expressos em AGE;

## **3.4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.4.1. Extração de polifenóis**

A uvas Riesling Itálico e Cabernet Sauvignon foram fracionadas manualmente em casca, polpa e semente. Em seguida estas frações foram liofilizadas. A extração de polifenóis das frações foi realizada utilizando 0,5 a 4,0 gramas aproximadamente das frações para cada 30 mL do solvente extrator, no caso acetona:água (70:30). Este sistema foi homogeneizado em erlenmyer por cinco minutos, utilizando para tal o triturador de haste de aço MARCONI. Em seguida foi mantido em repouso por 25 minutos. O extrato fenólico foi separado da parte sólida através de filtração a vácuo em kitasatos utilizando funil de buchner e filtro de papel Whatman nº 1. O sistema solvente foi então removido por evaporação à pressão reduzida e a 37°C em sistema rota-vapor (FISATON). Assim os compostos fenólicos foram recuperados em água:etanol (90:10) e diluídos adequadamente para obtenção das concentrações de 1000, 600, 400, 200 e 50 ppm de polifenóis totais expresso em ácido gálico equivalente (AGE) determinado pelo método Folin-Denis o qual está descrito no capítulo 1 (SHAHIDI e NACZK, 1995). O mesmo procedimento de concentração e

obtenção das concentrações foi utilizado para os vinhos Riesling Itálico e Cabernet Sauvignon.

### **3.4.2. Avaliação do poder redutor**

A avaliação do poder de redução dos extratos foi realizada de acordo com a metodologia descrita em YEN e CHEN (1995), com modificações.

As amostras foram diluídas em concentrações de 50, 10 e 1 ppm de polifenóis totais expresso em AGE, e de cada uma foi retirada uma alíquota de 1,0 mL para tubos de ensaio de 25,0 mL. A esta alíquota foi adicionado: 2,5 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6); 2,5 mL de  $K_3[Fe(CN)_6]$  (1%). A mistura foi incubada em banho termostático a 45 °C por 20 minutos. Logo em seguida uma volume de 2,5 mL de ácido tricloroacético (10%) foi adicionado à solução no tubo de ensaio, com posterior agitação. Uma quantidade de 2,5 mL desta mistura foi pipetada e transferida para outro tubo de ensaio, no qual foram adicionados 1,5 mL de água destilada, 1,0 mL de álcool etílico (95%) e 0,5 mL de  $FeCl_3$  (0,1%). Assim, realizou-se as leituras de absorvância a 700 nm em espectrofotômetro (UV-1601 PC Shimadzu). Uma elevada absorvância indica grande poder redutor. Foi realizado o mesmo método utilizando o ácido ascórbico como amostra padrão em diversas concentrações, com a finalidade de expressar o poder redutor dos extratos fenólicos e vinhos em ácido ascórbico equivalente. As reações foram realizadas em triplicata.

### **3.4.3. Avaliação da Inibição de Formação de Peróxidos**

A avaliação da inibição da formação de peróxido dos extratos foi realizada de acordo com a metodologia descrita em LARRAURI et al., (1996), com modificações.

Uma mistura de 0,5 mL do extrato, 0,5 mL de ácido linoléico 2,51% (p/v) em etanol 99,5 %, 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0) e 0,5 mL de água destilada, foi colocada em um tubo de ensaio com tampa rosqueável à 40°C em banho termostático no escuro. A cada 24 horas, para 0,1 mL da mistura acima, os seguintes reagentes foram adicionados: 9,7 mL de etanol 75%, 0,1 mL de tiocianato de amônio 30 %, e 0,1 mL de cloreto ferroso 0,02 M em HCl 3,5 %. Após três minutos e vigorosa agitação a absorvância da amostra foi medida a 500 nm em espectrofotômetro (UV-1601 PC Shimadzu). O teste foi realizado em quadruplicata.

O índice de oxidação (IO) foi calculado como indicado abaixo:

$$IO = \left( \frac{\text{Absorbância}_t}{\text{Absorbância}_{t=0}} \right)$$

A atividade antioxidante (AA) foi expressa como a percentagem de inibição relativa do controle usando a seguinte equação:

$$AA = 100 - \left( \frac{\text{Índice Oxidação Extrato}_{t=96h}}{\text{Índice Oxidação Controle}_{t=96h}} \times 100 \right)$$

#### **3.4.4. Avaliação da capacidade sequestrante de radicais DPPH**

A avaliação da atividade sequestrante de radicais DPPH dos extratos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por ESPÍN et al. (2000) e PUKALSKAS et al. (2002) com modificações, sendo analisado a cinética da reação em concentrações maiores de polifenóis, e a percentagem de moléculas de radical DPPH sequestrado após determinado tempo pelos extratos a 50 ppm de polifenóis expressos em AGE.

#### **3.4.4.1. Análise cinética da capacidade sequestrante de radicais DPPH**

Foi preparada previamente uma solução metanólica 50 % de DPPH• (0,1 mM) e misturada imediatamente em cubeta de quartzo com extratos das frações das uvas e vinhos nas proporções de 1 para 3,5 respectivamente em temperatura ambiente. Foram então realizadas leituras da absorbância apresentada pela mistura em 517 nm em espectrofotômetro (UV-1601 PC Shimadzu) em intervalos de 0,1 segundos até a estabilização da absorbância. Um branco foi preparado contendo as mesmas concentrações de todos componentes, exceto o DPPH radical.

Partindo-se de que a reação dos polifenóis com o radical DPPH é de primeira ordem (ESPÍN et al., 2000), foram plotados gráficos expressando a queda da concentração do radical pelo tempo. O tempo de meia vida apresentado pelas amostras foi obtido através da inclinação (k) da reta obtida pela regressão dos dados experimentais de acordo com a equação abaixo:

$$\ln [DPPH \bullet] = \ln [DPPH \bullet]_o - k t$$

#### **3.4.4.2. Análise da percentagem de moléculas de radicais DPPH sequestrado**

A análise foi realizada como citado anteriormente, somente os extratos e vinhos diluídos a 50 ppm de polifenóis expresso em AGE foram utilizados. Após a mistura, foi determinado a leitura de absorbância inicial e após 240 segundos de reação no escuro à temperatura ambiente. A análise foi realizada de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ atividade sequestrante} = \left( 1 - \frac{[DPPH \bullet]_f}{[DPPH \bullet]_o} \right) \times 100$$

## **3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.5.1. Avaliação do Poder Redutor**

O poder redutor tem sido utilizado como método de avaliação da atividade antioxidante de diversas substâncias por vários autores.

Observa-se no Quadro 6 uma correlação muito alta entre a concentração dos compostos fenólicos dos extratos expressos em ácido gálico equivalente e o seu respectivo poder redutor expresso em ácido ascórbico equivalente.

As médias seguidas por uma mesma letra em cada linha não diferem entre si estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quadro 6 – Valores médios do poder redutor apresentado pelos extratos e vinhos expressos em ácido ascórbico equivalente (ppm).

Extratos	Casca	Casca	Polpa	Polpa	Semente	Semente	Vinho	Vinho
	Riesling	Sauvignon	Riesling	Sauvignon	Riesling	Sauvignon	Riesling	Sauvignon
1,0 ppm*	2,1a	2,1a	1,6a	2a	2,2a	2,3a	1,8a	2,1a
10,0 ppm*	14,8abc	13,5c	14,5abc	12,9c	15,6ab	15,8a	13,7bc	13,5c
50,0 ppm*	65,2bc	60,5cd	70ab	57,5d	69,9ab	73,6a	63,3c	60,6d
Correlação	0,9998	1	1	0,9999	1	1	0,9999	1

\*Concentrações de polifenóis (expresso em AGE) dos extratos obtidos por diluição.

Nota-se que o efeito redutor apresentado pelos extratos tem o mesmo comportamento crescente ao ácido ascórbico nas três concentrações utilizadas, ainda que o poder redutor dos extratos se apresentou ligeiramente superior ao apresentado pelo ácido ascórbico utilizado.

Portanto, os extratos obtiveram um ótimo desempenho quanto à doação de elétrons e podem reagir com radicais livres para convertê-los a produtos mais estáveis bloqueando então a reação em cadeia (YEN e CHEN, 1995).

### 3.5.2. Avaliação da Inibição de Formação de Peróxidos

Este método é utilizado para quantificar o teor de peróxidos formados nos estágios iniciais da oxidação lipídica.

A Figura 25 mostra a percentagem de atividade antioxidante relativa ao controle dos diferentes extratos das frações das uvas e dos vinhos quanto à Inibição de Formação de Peróxidos.

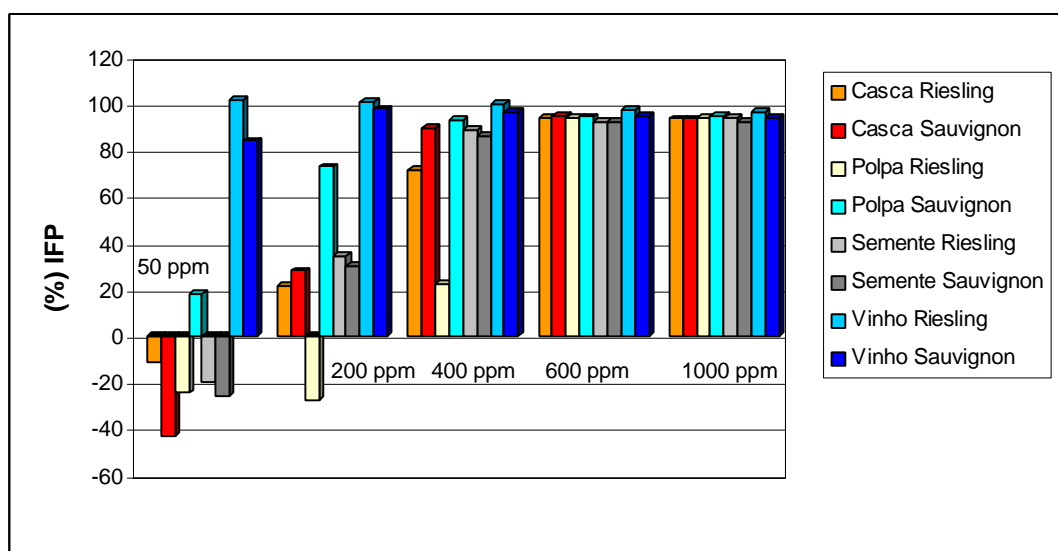


Figura 25 - Percentagem de atividade antioxidante dos extratos quanto à inibição de formação de peróxidos.

Os valores de percentagem de atividade antioxidante para as diferentes concentrações dos extratos podem ser vistos no Quadro 7 a seguir:

Quadro 7 – Valores das percentagens da atividade antioxidante dos extratos e vinhos a 96 horas de reação pela inibição de formação de peróxidos.

AGE (ppm)	Casca Riesling	Casca Sauvignon	Polpa Riesling	Polpa Sauvignon	Semente Riesling	Semente Sauvignon	Vinho Riesling	Vinho Sauvignon
50	-11,6d	-43,3g	-24,7ef	18,0c	-20,1e	-26,0f	101,8a	83,8b
200	21,2e	27,8d	-27,8f	72,6b	34,0c	30,3cd	101,0a	97,7a
400	71,6e	89,3cd	22,5f	92,9bc	88,8cd	86,2d	100,1a	96,6ab
600	93,7b	94,6ab	94,1ab	94,3ab	92,4b	91,9b	96,9a	94,9ab
1000	93,4bc	93,3bc	94,2b	94,5b	93,9b	91,8c	96,7a	94,1b

As médias seguidas por uma mesma letra em cada linha não diferem entre si estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Nota-se que em baixas concentrações algumas amostras tenderam a comportarem-se como pró-oxidantes quanto à inibição de formação de peróxidos, e a partir de 600 ppm em AGE todas amostras possuem uma atividade de inibição semelhante. Os valores negativos para a % de atividade antioxidante podem ser hipoteticamente explicados pela extração de compostos que provavelmente se oxidariam preferencialmente ao ácido graxo e resultaria num impulsionamento da reação de peroxidação por radicais previamente formados. As semente, por exemplo, contém um nível elevado de óleo. A partir de certa concentração de compostos fenólicos não mais se observa tal comportamento, talvez nestas concentrações haveria um equilíbrio favorável à estabilidade entre formação de peróxidos e teor de polifenóis.

Verifica-se um bom comportamento dos vinhos por toda a faixa de concentração analisada, principalmente do vinho Riesling Itálico. Talvez pode-se equiparar este resultado ao parágrafo anterior à medida que os vinhos diferem dos extratos por serem um extrato seletivo, já a extração de compostos das frações das uvas foi realizada de maneira a extrair quase que a totalidade de compostos presentes.

### **3.5.3. Avaliação da capacidade sequestrante de radicais DPPH**

De outra maneira, a capacidade de sequestro de radicais livres previamente formados é considerada como uma atividade antioxidante.

Os valores médios dos tempos de meia vida analisados para a redução da concentração dos radicais DPPH pelos extratos das frações das uvas e vinhos estão apresentados no Quadro 8, calculados a partir das curvas representadas no Quadro 1A do Apêndice.

Quadro 8 – Valores médios dos tempos de meia vida em segundos.

AGE (ppm)	Casca Riesling	Casca Sauvignon	Polpa Riesling	Polpa Sauvignon	Semente Riesling	Semente Sauvignon	Vinho Riesling	Vinho Sauvignon
1000	3,94c	5,81a	5,11ab	4,43bc	1,18e	1,46e	5,58a	2,93d
600	5,88c	4,47d	8,41b	3,99d	1,66f	1,50f	9,34a	3,02e
400	7,41c	4,07d	12,09b	3,94d	1,76e	4,07d	15,81a	3,80d
200	12,86c	6,28e	22,53b	8,32d	2,66f	2,56f	40,86a	7,86d

As médias dos tempos de meia vida seguidas por uma mesma letra em cada linha não diferem entre si estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Alguns inconvenientes apresentados por esta técnica foram a presença de açúcares nos extratos e nos vinhos. Sendo assim, uma das modificações foi a redução do conteúdo metanólico da solução de radicais DPPH, sem contudo interferir na ordem da reação.

O Quadro 9 mostra os valores relativos em percentagem do decréscimo da concentração de radicais DPPH pelos extratos das uvas e vinhos a 50 ppm de polifenóis totais expresso em AGE após 240 segundos de reação.

Quadro 9 - Valores médios em percentagem da concentração de radicais DPPH sequestrados pelos extratos e vinhos a 50 ppm de polifenóis (AGE).

Casca Riesling	Casca Sauvignon	Polpa Riesling	Polpa Sauvignon	Semente Riesling	Semente Sauvignon	Vinho Riesling	Vinho Sauvignon
86,5c	88,5b	68,7f	76,5e	88,4b	90,7a	49,5g	80,5d

As médias seguidas por uma mesma letra em não diferem entre si estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Pode-se observar nos quadros acima que os extratos e vinho provenientes da uva Cabernet Sauvignon de modo geral apresentaram um efeito superior na capacidade sequestrante de radicais DPPH quando comparado com aqueles provenientes da uva Riesling Itálico.

Os extratos das sementes se apresentaram como sendo os mais eficientes quanto a este tipo de ensaio antioxidante seguido pelos extratos das cascas e vinho tinto.

Comparando com os resultados do capítulo anterior, confirma-se a idéia de que os taninos, pigmentos e flavonóis (presente em abundância nas amostras que obtiverem melhor desempenho para o presente teste) se apresentam como eficientes agentes redutores, principalmente para a redução de radicais já formados.

Tentou-se avaliar a atividade sequestrante de radicais hidroxilas, e uma das etapas da reação era a reação do malonaideído formado a partir da deoxi-ribose oxidada com o ácido tiobartitúrico (TBA) formando um complexo colorido. No entanto, os açúcares presentes nos extratos possivelmente reagiram com o TBA, mascarando a avaliação. Sendo assim, recomenda-se o uso da técnica em amostras que não contenham interferentes, devendo-se, portanto, conhecer as possíveis substâncias reativas ao TBA, antes de se efetuar este tipo de avaliação.

### 3.6. CONCLUSÕES

Pode-se verificar que existem diferenças no comportamento dos extratos quando avaliados por métodos de diferentes princípios de atividade antioxidante (AA), concluindo que há diferenças na composição dos compostos fenólicos das amostras analisadas.

Quanto ao poder redutor, nota-se que todas as amostras possuem equivalência semelhante ao ácido ascórbico, sendo ligeiramente superior a este. Os extratos das sementes, tanto da uva Riesling Itálico como Cabernet Sauvignon obtiveram a melhor performance redutora.

Na avaliação da inibição de formação de peróxidos, houve uma diferença marcante entre os vinhos e os extratos. Nas concentrações mais baixas dos extratos não houve inibição, ou melhor, houve uma atividade pró-oxidante quando comparada com o controle. Possivelmente este resultado se deve à extração de certos compostos que se oxidariam nas condições do experimento mais facilmente que o ácido linoléico, e que provocaria o aparecimento de radicais livres e, conseqüentemente, um estímulo na oxidação do ácido graxo. A partir da concentração de 600 ppm de polifenóis expressos em AGE dos extratos, nota-se uma significativa inibição da formação de peróxido, possivelmente pelo equilíbrio entre a quantidade de polifenóis dos extratos e radicais livres possivelmente

formados. Os vinhos se apresentaram como os melhores inibidores, mesmo quando diluídos à mais baixa concentração utilizada no experimento, com destaque para o vinho Riesling Itálico. Isto reforça a hipótese de que há um sinergismo entre os polifenóis dos vinhos, apresentando estes como extratos de compostos fenólicos selecionados em concentrações adequadas à inibição de formação de peróxidos.

Os extratos das sementes se apresentaram como melhores sequestradores de radicais DPPH por toda faixa de concentração analisada. Tanto os extratos quanto os vinhos obtidos da uva Cabernet Sauvignon obtiveram um melhor desempenho quando comparado com os obtidos da uva Riesling Itálico.

Sendo assim, conclui-se que quanto à doação de elétrons para a redução de íons metálicos, todas as amostras obtiveram resultados bastante semelhantes, com ligeira superioridade para os extratos das sementes.

Quando à inibição de formação de peróxidos, o vinho Riesling Itálico obteve o melhor desempenho, e uma grande diferença estaria na sua composição, sendo a maior parte dos polifenóis presentes, composta por ácidos fenólicos e ésteres tartáricos. Obtendo assim uma atividade antioxidante com um perfil mais profilático que corretivo.

Quanto à redução de radicais já formados (DPPH), os extratos e vinhos com maior conteúdo de polifenóis de cadeias maiores (semente, casca e vinho tinto) obtiveram um melhor desempenho, atuando como antioxidantes mais corretivos que preventivos, obtendo um comportamento similar ao ácido ascórbico.

Há que se considerar que vários são os métodos *in vitro* para se caracterizar a AA de um composto ou extrato, e cada método utiliza um ou mais princípios da atividade antioxidante. Um conhecimento prévio dos mecanismos do método e da composição da amostra a ser analisada é fundamental para que se consiga avaliar algo de modo fiel e preciso. Os

métodos mais complexos, que empregam muitos reagentes e várias operações são os mais sujeitos a erros e necessitam de maior controle. Não existe um método satisfatório que consiga avaliar a AA em todos os seus aspectos, apesar de alguns métodos serem encontrados na literatura como AA total. Para tal finalidade, o melhor procedimento seria a escolha de métodos que se adequem às amostras a serem analisadas e que possam explicar os diversos mecanismos antioxidantes de maneira simples.

Sendo assim, a comparação da AA entre vinhos e extratos de uvas roxas e brancas só é efetiva quando utilizado vários ensaios com os diversos mecanismos antioxidantes. Cada mecanismo de AA será favorecido por uma ou mais classes de compostos, podendo ter um efeito sinergista.

As AA apresentadas pelos extratos nem sempre se correlacionam significativamente com aquelas apresentadas pelos vinhos, dependendo do método analisado e da composição fenólica. Entretanto, este trabalho consegue mostrar a potencialidade da uva branca resultar em um vinho branco onde se possa ter uma AA comparável ao vinho tinto. Bastando-se para tal, a condução de um processo tecnológico de vinificação adequado, onde se consiga reunir algumas classes fenólicas sem comprometimento da característica do produto, alcançando portanto tal objetivo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, A, M; GUILLÉN, D. A; BARROSO, C. G; PUERTAS, B; GRACÍA, A. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. **J. Agric. Food Chem.** n.50, p.5832-5836, 2002 a.
- ALONSO, A. M; DOMÍNGUEZ, C; GUILLÉN, D. A; BARROSO, C. G. Determination of antioxidant power of red white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. **J. Agric. Food Chem.** n.50, p.3112-3115, 2002 b.
- ARNOUS, A; MAKRIS, D. P; KEFALAS, P. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. **J. Agric. Food Chem.** n.49, p.5736-5742, 2001.
- ARUOMA, B; VOLKOVA, N; SURASKI, A; AVIRAM, M. White wine with red wine – like properties: Increased extraction of grape skin polyphenols improves the antioxidants capacity of the derived white wine. **J. Agric. Food Chem.** n. 49, p.3164-3168, 2001.
- ARUOMA, O. I; HALLIWELL, B; WILLIAMSON, G. L. *In vitro* methods for characterizing potential prooxidant and antioxidant actions of nonnutritive substance in plant foods. In: ARUOMA, O. I; CUPPETT, S. L. (Eds.). **Antioxidant methodology *In vivo* and *In vitro* concepts**. AOCS Press, 1997. cap. 10, p.173-204.

- BRENNA, O. V; PAGLIARINI, E. Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wine. **J. Agric. Food Chem.** n.49, p.4841-4844, 2001.
- CHUNG, S-K; OSAWA, T; KAWAKISHI, S. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). **Biosci. Biotech. Biochem.** v.61, n.1, p.118-123, 1997.
- ESPÍN, J. C; SOLER-RIVAS, C; WICHERS, H. J; GARCÍA-VIGERA, C. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **J. Agric. Food Chem.** n.48, p.1588-1592, 2000.
- FERREIRA, A. L. A; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.** V. 43, n.1, p.61-68, 1997.
- FUHRMAN, B; VOLKOVA, N; SURASKI, A; AVIRAM, M. White wine with red wine-like properties: increased extraction of grape skin polyphenols improves the antioxidant capacity of the derived white wine. **J. Agric. Food Chem.** n.49, p.3164-3168, 2001.
- FUKUMOTO, L. R; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activity of phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.** v. 8, n.48, p.3597-3604, 2000.
- GERMANÒ, M. P; PASQUALE, R. D; D'ANGELO, V; CATANIA, S; SILVARI, V; COSTA, C. Evaluation of extracts and isolated fraction from *Capparis spinosa* L. buds as an antioxidant source. **J. Agric. Food Chem.** n.50, p.1168-1171, 2002.
- GUTTERIDGE, J. M. C; HALLIWELL, B. Antioxidants: elixirs of life or media hype? In: GUTTERIDGE, J. M. C; HALLIWELL, B. (Eds.). **Antioxidants in nutrition, health, and disease.** Oxford University Press, 1996. cap. 3, p.40-81.
- HUNG, C-Y; YEN, GC. Antioxidant activity of phenolic compounds isolated from *Mesona procumbens* Hemsl. **J. Agric. Food Chem.** n.50, p.2993-2997, 2002.

- KINSELLA, J. E; FRANKEL, E; GERMAN, B; KANNER, J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. **Food Technology**. v. 47, n 4 , 1993.
- LANDRAULT, N; POUCHERET, P; RAVEL, P; GASE, F; CROS, G; TEISSEDE, P. L. Antioxidant capacities and phenolics level of french wines from different varieties and vintages. **J. Agric. Food Chem.** n.49, p.3341-3348, 2001.
- LANGSETH, L. Oxidants, antioxidants, and disease prevention. In BRACCO, U. **ILSI Europe concise monograph series**. Washington ILSI Press. 1995, v. (--), n. (--).
- LARRAURI, J. A; RUPEREZ, P; CALIXTO, F. S; Antioxidant activity of wine pomace. **Am. J. Enol. Vitic.** v.47, n.4, p.369-372, 1996.
- LARRAURI, J. A; SÁNCHEZ-MORENO, C; SAURA-CALIXTO, F. Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels. **J. Agric. Food Chem.** n.46, p.2694-2697, 1998.
- LEBEAU, J; FURHMAN, C; BERNIER, J-L; DURIEZ, P; TEISSIER, E; COTELLE, N. Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. **J. Agric. Food Chem.**v. 29, n.09, p.900-912, 2000.
- MARTIN-CARRON, N; GARCIA-ALONSO, A; GOÑI, I; SAURA-CALIXTO, F. Nutricional and physiological properties of grape pomace as a potential food ingridient. **Am. J. Enol. Vitic.** v.48, n.3, p.328-332, 1997.
- MAZZA, G; FUKUMOTO, L; DELAQUIS, P; GIRARD, B; EWERT, B. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. **J. Agric. Food Chem.** n.47, p.4009-4017, 1999.
- MIURA, K; KIKUZAKI, H; NAKATANI, N. Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* l.) measured by the oil stability index method. **J. Agric. Food Chem.** n.50, p.1845-1851, 2002.

- MOYER, R. A; HUMMER, K. E; FINN, C. E; FREI, B; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium, Rubus, and Ribes*. **J. Agric. Food Chem.** n.50, p.519-525, 2002.
- NODA, Y; KANEYUKI, T; MORI, A; PACKER, L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. **J. Agric. Food Chem.** n.50, p.166-171, 2002.
- OLIVEIRA, C. P. **Avaliação “in vitro” da atividade antioxidante de produtos da reação de maillard.** Viçosa, MG: UFV, 2000. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- OU, B; HUANG, D; HAMPSCH-WOODILL, M; FLANAGAN, J. A; DEEMER, E. K.. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **J. Agric. Food Chem.** n.--, p.--, 2002.
- PIETTA, P; SIMONETTI, P; MAURI, P. Antioxidant activity of selected medicinal plants. **J. Agric. Food Chem.** n.46, p.4487-4490, 1998.
- PUKALSKAS, A; BEEK, T. A. V; VENSKUTONIS, R. P; LINSSEN, J. P. H; VELDHUIZEN, A. V; De GROOT, A.. Identification of radical scavengers in sweet grass (*Hierochioe odorata*). **J. Agric. Food Chem.** n.50, p.2914-2919, 2002.
- SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. Atividade antioxidante. **Alimentaria** 2002; p.29-40.
- SATO, M; RAMARATHNAM, N; SUZUKI, Y; OHKUBO, T. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. **J. Agric. Food Chem.** n.44, p.37-41, 1996.

SHAHIDI, F; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. 1. ed. Lancaster: Technomic Publishing Co, Inc., 1995.331p.

SHAHIDI; F. Natural antioxidantes. An overview. In: SHAHIDI, F. (Ed.). **Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications**. Newfoundland: AOCS Press, 1997. cap. 1, p.1-11.

SINGH, R. P; MURTHY, K. N. C; JAYAPRAKASHA, G. K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. **J. Agric. Food Chem.** n.50, p.81-86, 2002.

WANG, H; CAO, G; PRIOR, R. L. Total antioxidant capacity of fruits. **J. Agric. Food Chem.** n.44, p.701-705, 1996.

YEN, G.-C; CHEN, H. Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **J. Agric. Food Chem.**, v.67, p.415-420, 1995.

## RESUMO E CONCLUSÕES

Na busca de estabelecer uma comparação entre atividades antioxidantes *in vitro* de uvas roxas e brancas e de seus respectivos vinhos elaborados, avaliou-se o poder redutor, a inibição de formação de peróxidos e a capacidade sequestrante de radicais DPPH de extratos das frações das uvas Riesling Itálico e Cabernet Sauvignon (casca, polpa e semente) e dos seus respectivos vinhos elaborados, em concentrações padronizadas de polifenóis. Caracterizou-se ainda a contribuição em massa de cada fração em percentagem ao fruto, o teor de polifenóis totais (PT) nas frações e vinhos e teores de diversas classes fenólicas.

Os teores de PT nas sementes das uvas brancas e roxas foram os maiores dentre as frações seguido das cascas e polpa. O teor de PT foi significativamente muito maior no vinho tinto quando comparado com o vinho branco.

O conteúdo fenólico em vinhos tintos é geralmente maior que nos brancos, sendo averiguado neste trabalho. Entretanto, a contribuição de polifenóis de menor massa molecular (ácidos fenólicos) é encontrado em maior proporção nos vinhos brancos comparado com os tintos, possivelmente pela pouca contribuição fenólica das cascas e sementes das uvas brancas no processo de vinificação. Estes perfis puderam ser checados

através de CLAE, pela simples distribuição dos compostos ao longo de sua eluição na coluna cromatográfica.

Quanto ao poder de redução, todas as amostras possuíam equivalência semelhante ao ácido ascórbico em reduzir o íon  $\text{Fe}^{+3}$ .

Os vinhos se apresentaram como os melhores inibidores da formação de peróxidos, com destaque para o vinho Riesling Itálico na mesma proporção de polifenóis totais expressos em AGE quando comparado ao vinho Cabernet Sauvignon. Quanto aos extratos, estes só foram efetivos em concentrações maiores que 400 ppm de PT expressos em AGE.

Foi avaliado o desempenho cinético quanto a capacidade sequestrante de radicais DPPH, ou seja, a velocidade em doar um átomo de hidrogênio ao radical. Os extratos das sementes obtiveram o melhor desempenho na capacidade de sequestrar radicais livres entre todos os extratos e vinhos utilizados. O vinho Cabernet Sauvignon foi superior ao vinho Riesling Itálico. Quando este ensaio foi avaliado em igual tempo fixo para todos os tratamentos, percebe-se que os extratos e vinhos que continham uma proporção maior de fenólicos de alto peso molecular, conseguiram sequestrar maior concentração de DPPH radical.

Portanto, percebe-se que a atividade antioxidante dos extratos e vinhos está fortemente condicionada ao conteúdo fenólico destes, pela quantidade e principalmente pelo tipo de classes de polifenóis presentes. Os vinhos obtiveram uma satisfatória performance através dos ensaios antioxidantes e os extratos serviram para comparações de diferentes fontes potenciais de polifenóis durante o processo de vinificação. O vinho branco por possuir baixo nível de polifenóis de cadeias maiores (resultante do processo tradicional de vinificação) somente não mostrou uma satisfatória atividade sequestrante de radicais livres previamente formados quando

comparado com o vinho tinto nas mesmas proporções de polifenóis totais expressos em AGE.

Talvez a ingestão de quantidades maiores de vinho branco poderia resultar em efeitos semelhantes aos vinhos tintos, entretanto, o maior fator que ainda contribui para a não recomendação da ingestão de vinhos pela maioria de médicos cardiologistas não é tanto devido aos possíveis benefícios apresentados por estes à saúde, mas por se tratar de uma terapia alcoólica, o que pode resultar em outros problemas.

Sugere-se então a necessidade de uma modificação adequada no processo tecnológico de vinificação em branco. De modo que haja uma participação efetiva de cascas e sementes no mosto para maior extração de polifenóis de cadeias maiores, sem contudo interferir significativamente nas propriedades sensoriais tradicionais apresentadas pelos vinhos brancos. Outra possibilidade seria a obtenção de um novo produto “vinho branco enriquecido de polifenóis” como já é apresentada por alguns autores, para que se tenha um efeito comparativo aos vinhos tintos e conseqüentemente conseguindo impulsionar e alavancar novamente as vendas deste tipo de produto no mercado.

Inúmeras são as variedades de uvas brancas, assim abre-se um campo enorme para tal tipo de pesquisa. Este trabalho foi realizado com apenas uma das mais representativas uvas para elaboração de vinhos finos.

Há que se considerar, que os tipos de AA a avaliar, podem se dar por algum mecanismo de especial interesse ou devem ser representativos para uma enorme faixa de efeitos fisiológicos e farmacológicos.

## PERSPECTIVAS

Determinar metodologias que avaliem a atividade antioxidante de compostos de modo simples, rápido e principalmente confiável. Sendo menos complexas, maior será a possibilidade de entender o mecanismo de ação dos compostos em estudo;

Uso dos dados de atividade antioxidante para condução de experimentos *in vivo*, realizando-se portanto ensaios biológicos para o controle de colesterol, atividade antiinflamatória, atividade anti-tumoral e demais atividades atribuídas aos compostos com propriedades ou alegação de antioxidantes;

Isolamento de substâncias para que se possa entender melhor o seu mecanismo de ação;

Formulação de produtos pilotos (alimentos, bebidas, cápsulas), avaliando-se portanto o seu potencial antioxidante, servindo-se então como fonte saudável e eficaz.

**“Moderadamente bebido, o vinho é o medicamento que rejuvenesce os velhos, cura os envermos e enaltece os pobres”.**

**Platão (427 a.C. – 347 a.C.)**

## **APÊNDICE**

## APÊNDICE

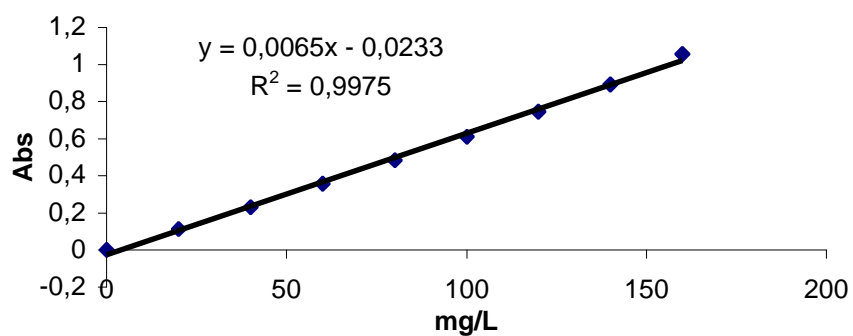


Figura 1A - Curva padrão de polifenóis totais obtida pelo reativo Folin Denis expressa em ácido gálico equivalente.

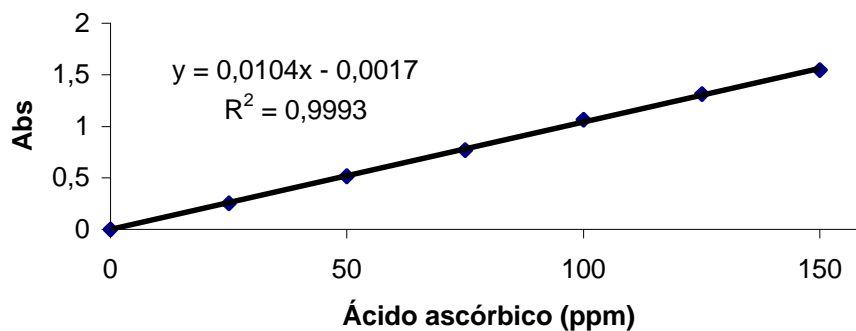


Figura 2A - Curva padrão do Poder Redutor expressa em ácido ascórbico equivalente.

Figura 3A – Curvas padrões de algumas classes fenólicas obtidas por espectrofotometria.

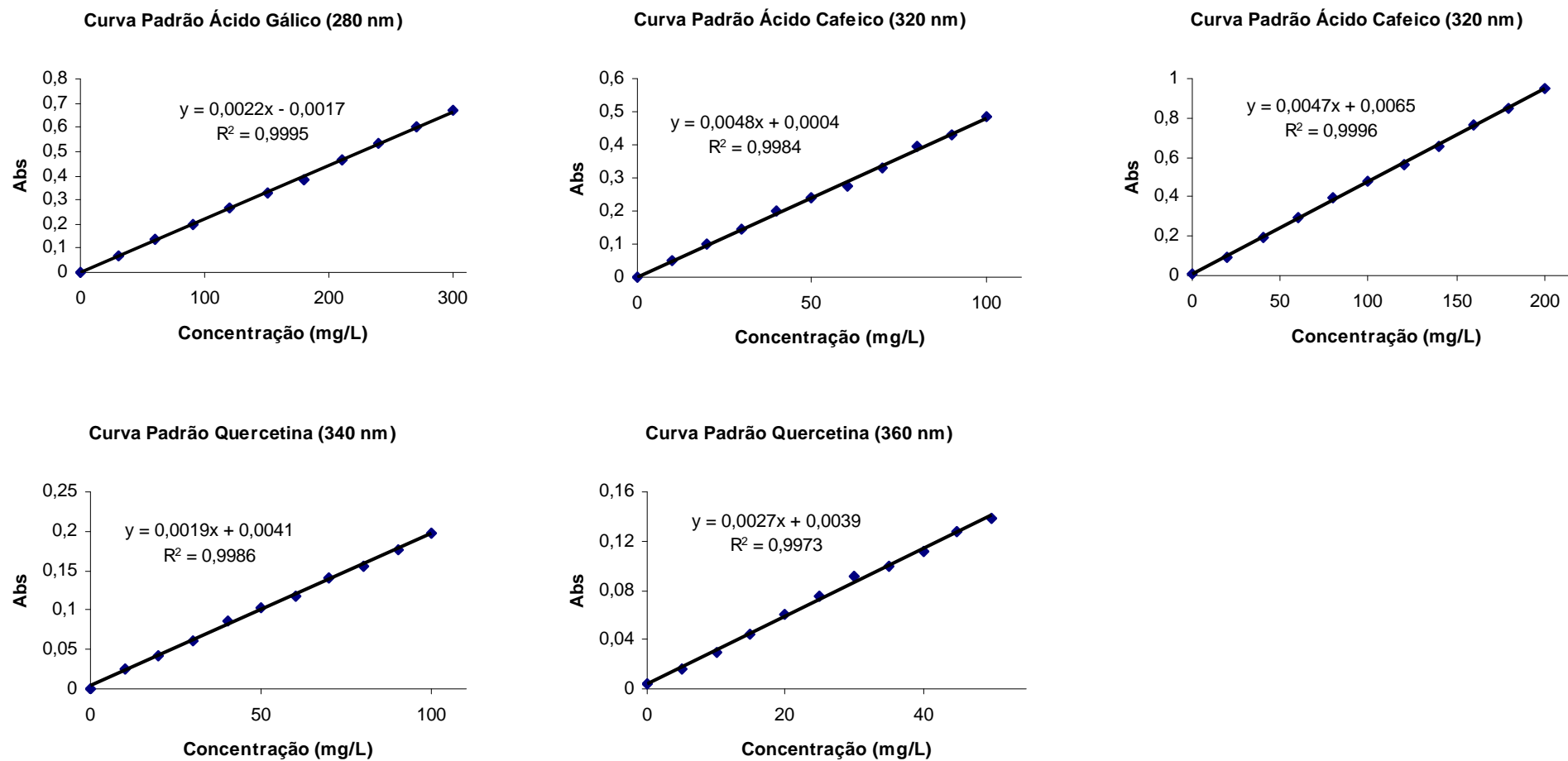
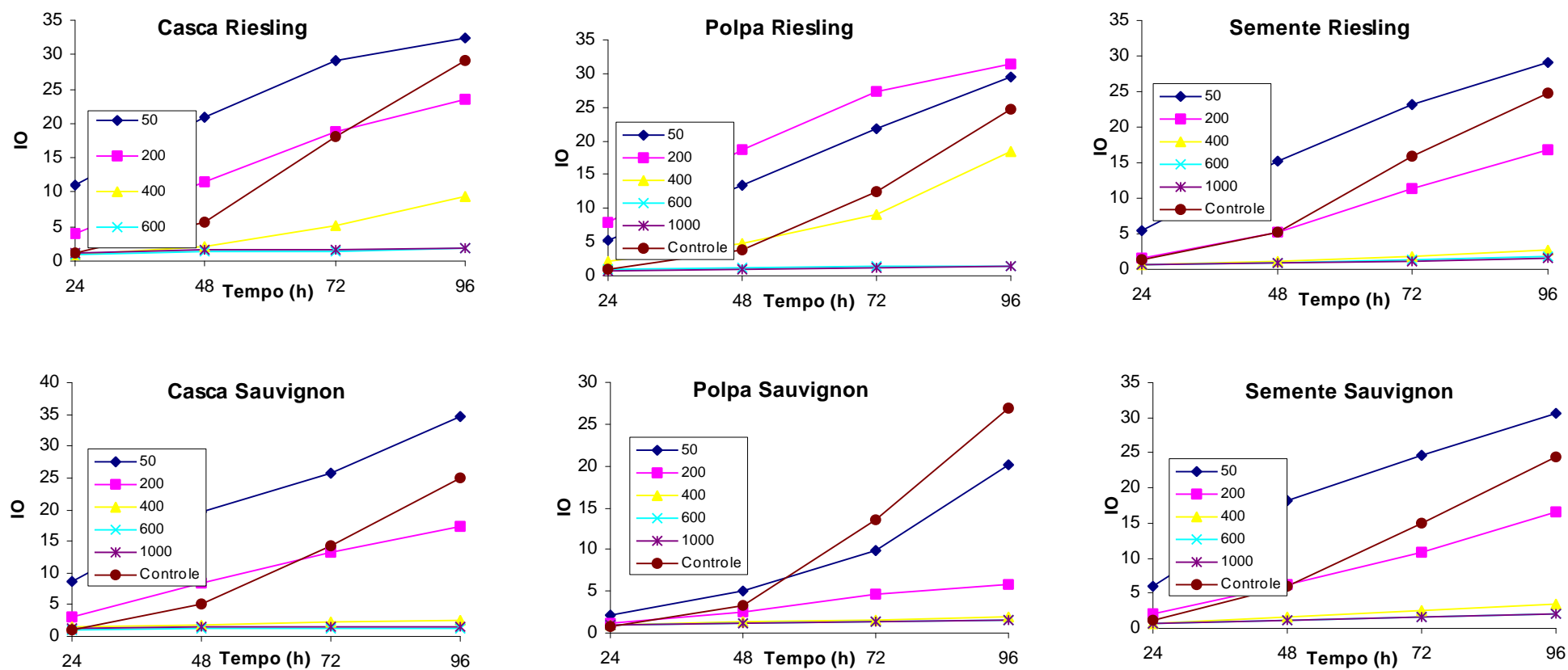


Figura 4A – Perfil da evolução do índice de oxidação apresentado pelos extratos pela inibição de formação de peróxidos.



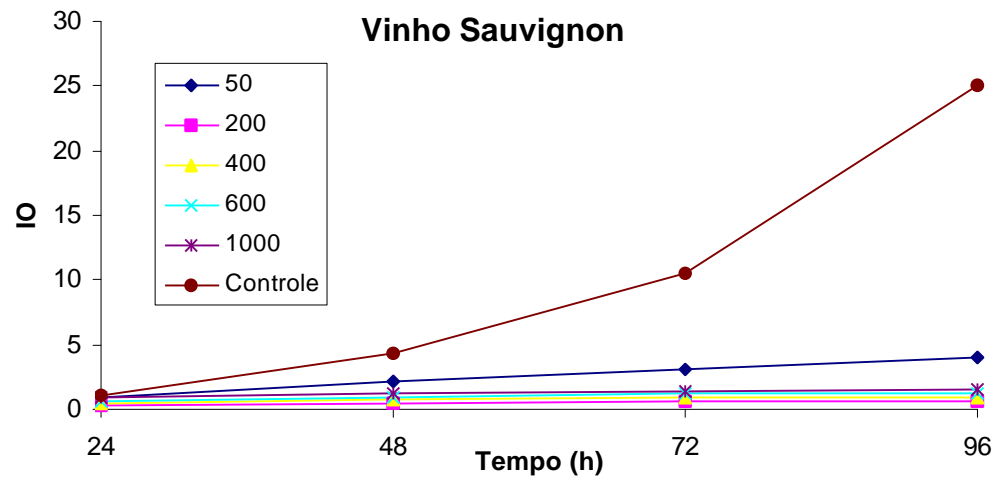
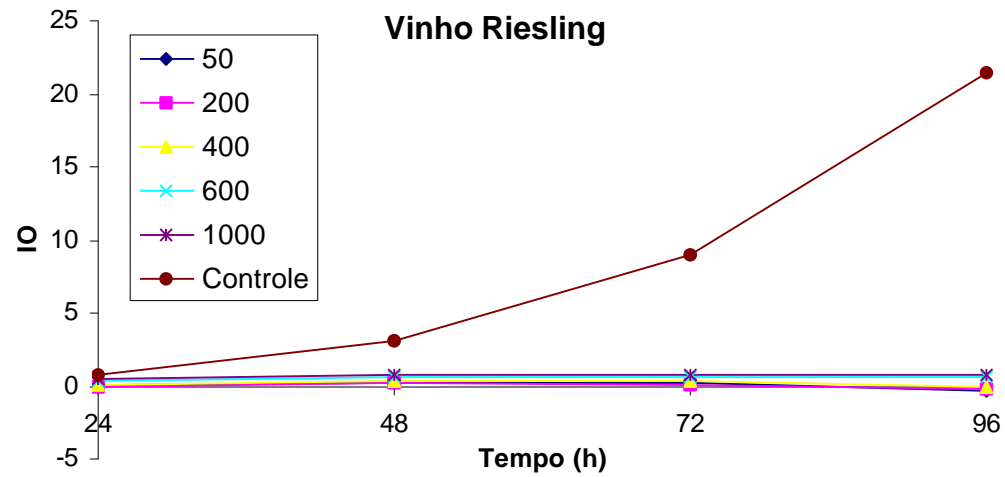


Figura 5A - Perfil da evolução do índice de oxidação apresentado pelos vinhos pela Inibição de formação de peróxidos.

As Figuras de 6A a 13A apresentam o comportamento cinético da redução do radical DPPH pelos extratos das diferentes frações das uvas e vinhos.

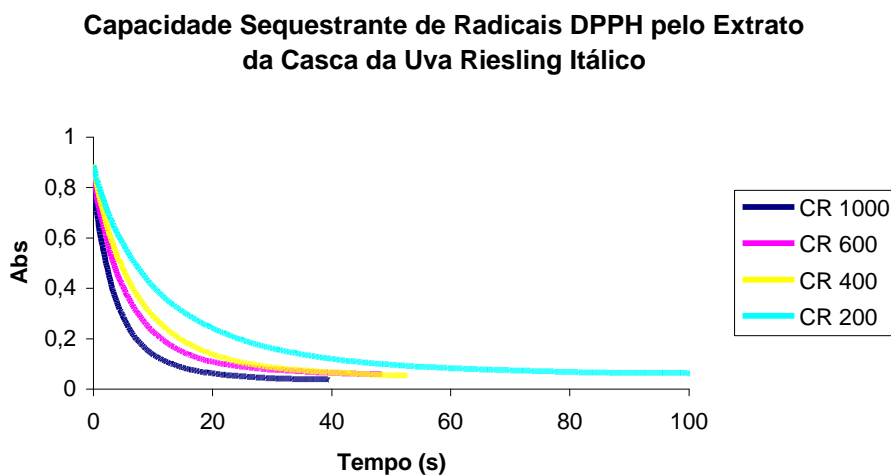


Figura 6A – Comportameto cinético dos valores de absorvância pela redução dos radicais DPPH pelo extrato da casca da uva Riesling Itáliaico.

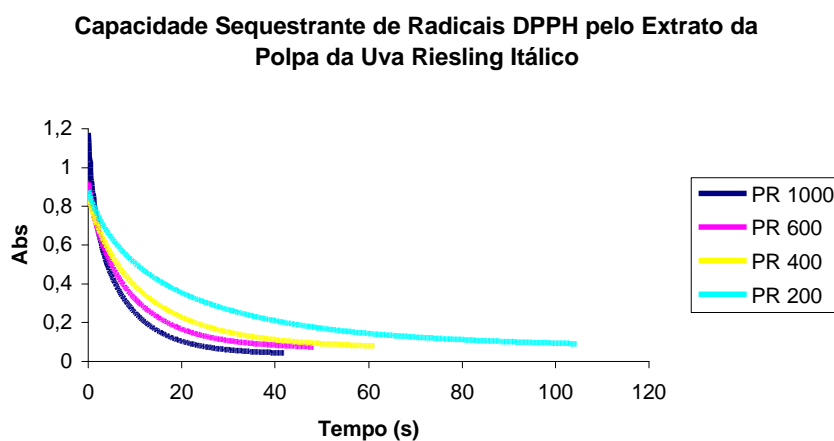


Figura 7A – Comportameto cinético dos valores de absorvância pela redução dos radicais DPPH pelo extrato da polpa da uva Riesling Itáliaico.

**Capacidade Sequestrante de Radicais DPPH pelo Extrato da Semente da Uva Riesling Itálico**

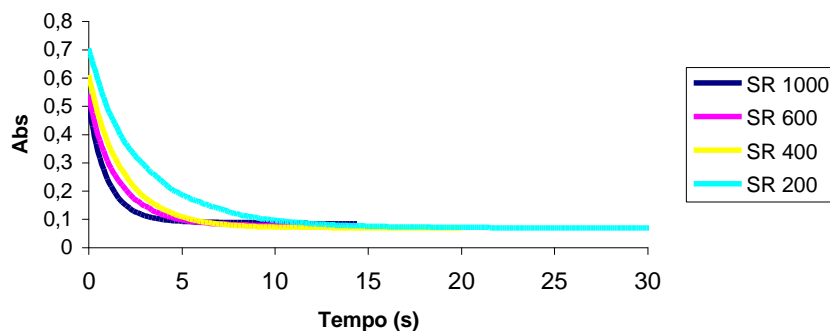


Figura 8A – Comportamento cinético dos valores de absorvância pela redução dos radicais DPPH pelo extrato da semente da uva Riesling Itálico.

**Capacidade Sequestrante de Radicais DPPH pelo Vinho da Uva Riesling Itálico**

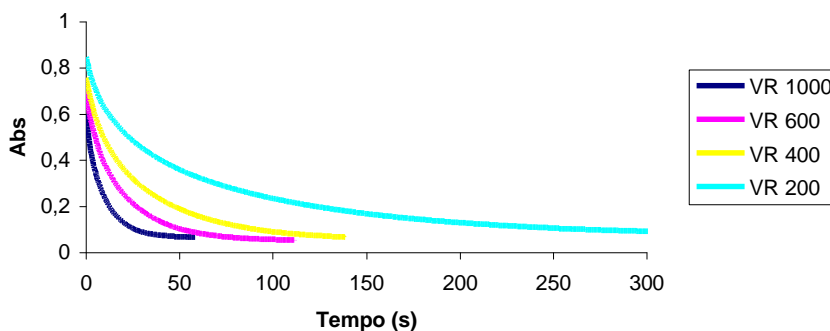


Figura 9A – Comportamento cinético dos valores de absorvância pela redução dos radicais DPPH pelo extrato do vinho da uva Riesling.

**Capacidade Sequestrante de Radicais DPPH pelo Extrato da Casca da Uva Cabernet Sauvignon**

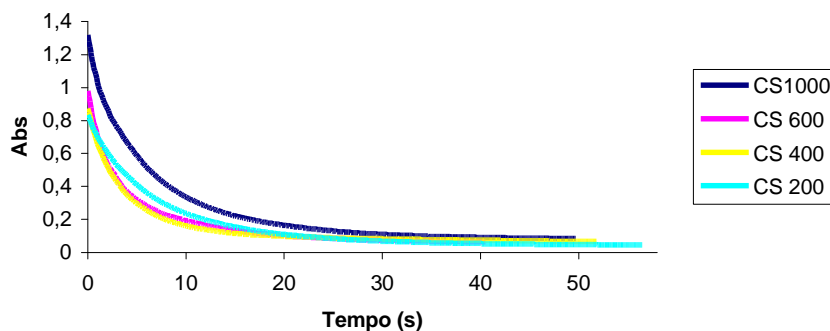


Figura 10A – Comportamento cinético dos valores de absorvância pela redução dos radicais DPPH pelo extrato da casca da uva Cabernet Sauvignon.

**Capacidade Sequestrante de Radicais DPPH pelo Extrato da Polpa da Uva Cabernet Sauvignon**

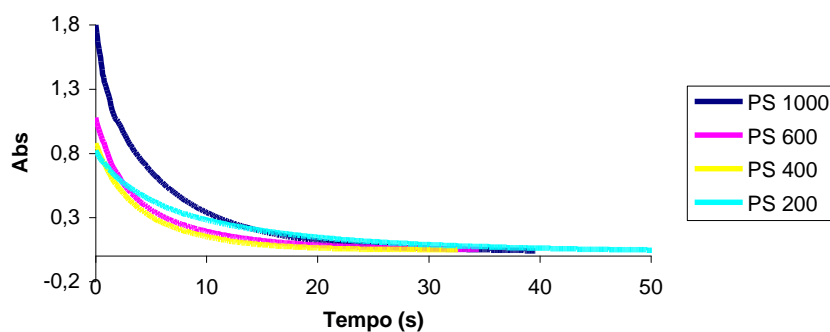


Figura 11A – Comportamento cinético dos valores de absorvância pela redução dos radicais DPPH pelo extrato da polpa da uva Cabernet Sauvignon.

**Capacidade Sequestrante de Radicais DPPH pelo Extrato da Semente da Uva Cabernet Sauvignon**

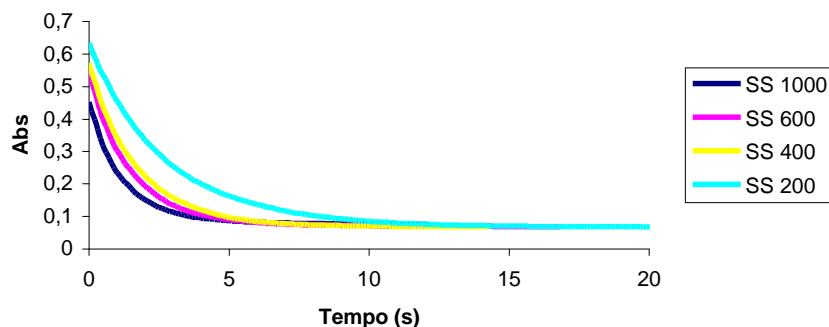


Figura 12A – Comportamento cinético dos valores de absorvância pela redução dos radicais DPPH pelo extrato da semente da uva Cabernet Sauvignon.

**Capacidade Sequestrante de Radicais DPPH pelo Extrato do Vinho Cabernet Sauvignon**

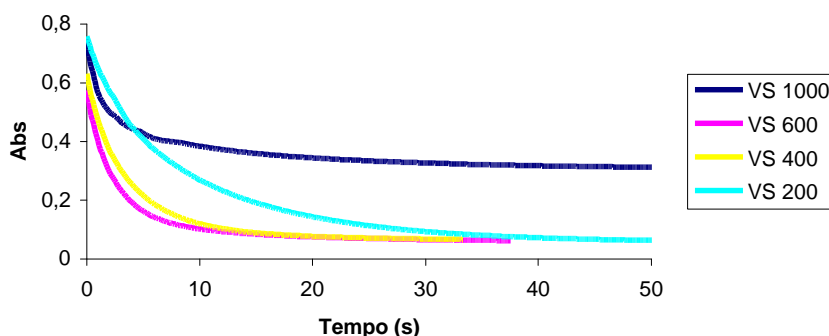


Figura 13A – Comportamento cinético dos valores de absorvância pela redução dos radicais DPPH pelo extrato do vinho da uva Cabernet Sauvignon.

O Quadro 1A mostra as equações obtidas por  $\ln(C/C_0)$  versus tempo (s), sendo C e  $C_0$  as concentrações de DPPH radical final e inicial respectivamente.

Quadro 1A – Equações das regressões para obtenção do tempo de meia vida.

<b>CASCA RIESLING</b>			<b>CASCA SAUVIGNON</b>	
AGE (ppm)	Regressão	R <sup>2</sup>	Regressão	R <sup>2</sup>
1000	Y=-0.1758X-0.098	0.9917	Y=-0.1194X-0.1632	0.9883
600	Y=-0.1139X-0.1149	0.9899	Y=-0.1553X-0.2408	0.9598
400	Y=-0.0934X-0.1202	0.9907	Y=-0.1702X-0.1472	0.9819
200	Y=-0.0539X-0.1651	0.9829	Y=-0.1104X-0.1075	0.9916
<b>POLPA RIESLING</b>			<b>POLPA SAUVIGNON</b>	
AGE (ppm)	Regressão	R <sup>2</sup>	Regressão	R <sup>2</sup>
1000	Y=-0.1380X-0.2152	0.9769	Y=-0.1547X-0.1900	0.9841
600	Y=-0.0825X-0.1643	0.9868	Y=-0.1738X-0.1543	0.9803
400	Y=-0.0573X-0.1486	0.9866	Y=-0.1758X-0.1059	0.9902
200	Y=-0.0308X-0.2098	0.9767	Y=-0.0833X-0.1666	0.9834
<b>SEMENTE RIESLING</b>			<b>SEMENTE SAUVIGNON</b>	
AGE(ppm)	Regressão	R <sup>2</sup>	Regressão	R <sup>2</sup>
1000	Y=-0.5887X-0.0838	0.9849	Y=-0.4764X-0.0937	0.9817
600	Y=-0.4193X-0.0863	0.9867	Y=-0.4617X-0.0733	0.9905
400	Y=-0.3941X-0.0531	0.9945	Y=-0.4132X-0.0609	0.9932
200	Y=-0.2605X-0.0706	0.9912	Y=-0.2706X-0.0514	0.9951
<b>VINHO RIESLING</b>			<b>VINHO SAUVIGNON</b>	
AGE(ppm)	Regressão	R <sup>2</sup>	Regressão	R <sup>2</sup>
1000	Y=-0.1243X-0.2105	0.9785	Y=-0.2400X-0.0267	0.9917
600	Y=-0.0743X-0.1844	0.9849	Y=-0.2305X-0.1218	0.9811
400	Y=-0.0438X-0.2277	0.9789	Y=-0.1828X-0.1136	0.9862
200	Y=-0.0170X-0.3406	0.9627	Y=-0.0882X-0.1175	0.9859

As Figuras de 14A a 34A ilustram os perfis cromatográficos dos extratos das diferentes frações das uvas e vinhos desenvolvidos em CLAE.

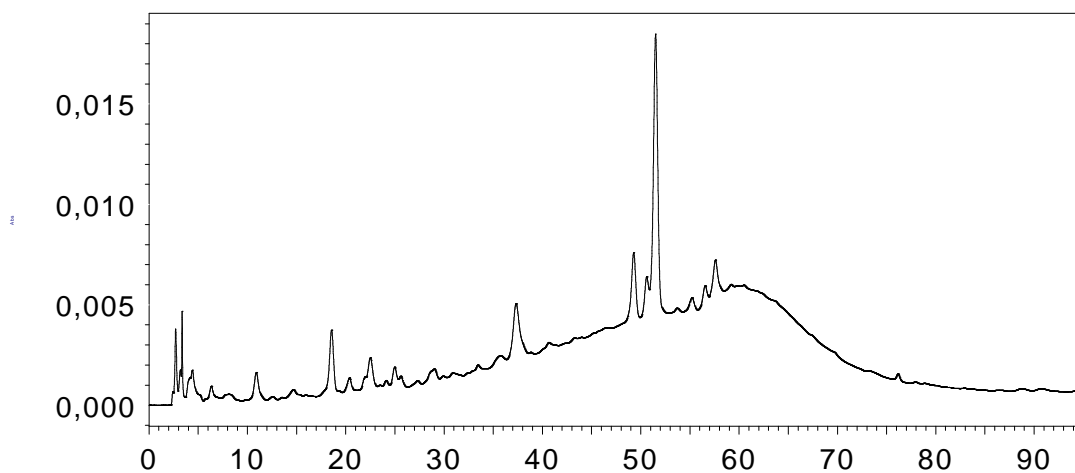


Figura 14A – Perfil cromatográfico do extrato da casca da uva Riesling Itálico a 280 nm.

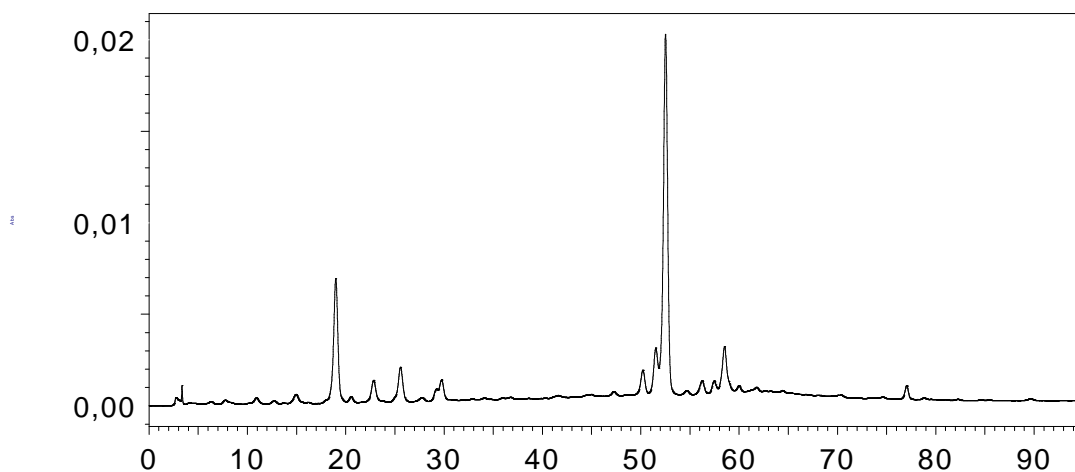


Figura 15A – Perfil cromatográfico do extrato da casca da uva Riesling Itálico a 320 nm.

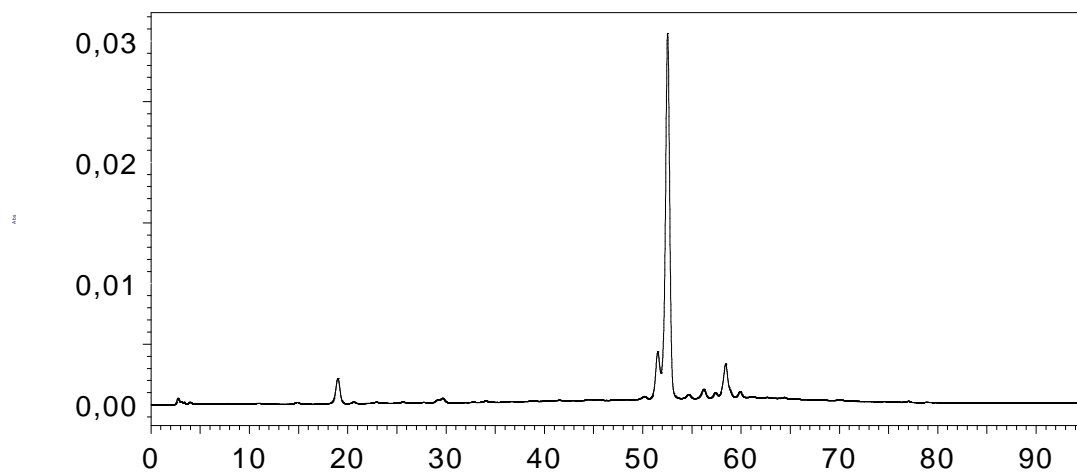


Figura 16A – Perfil cromatográfico do extrato da casca da uva Riesling Itálico a 360 nm.

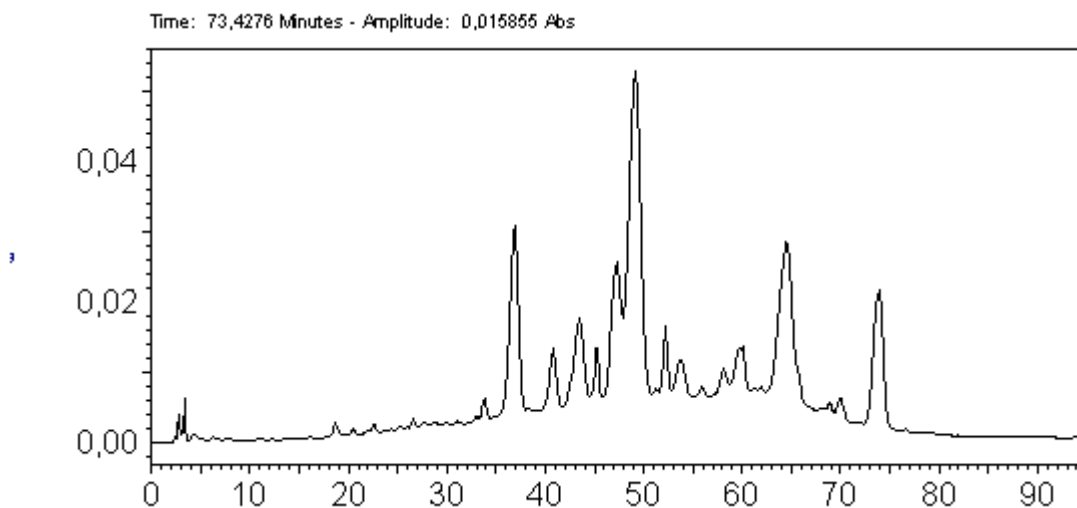


Figura 17A – Perfil cromatográfico do extrato da casca da uva Cabernet Sauvignon a 280 nm.

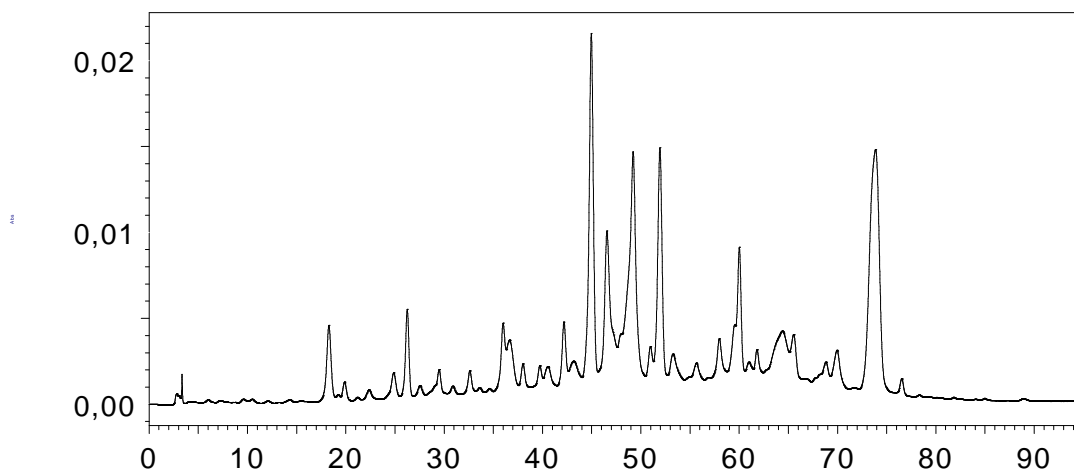


Figura 18A – Perfil cromatográfico do extrato da casca da uva Cabernet Sauvignon a 320 nm.

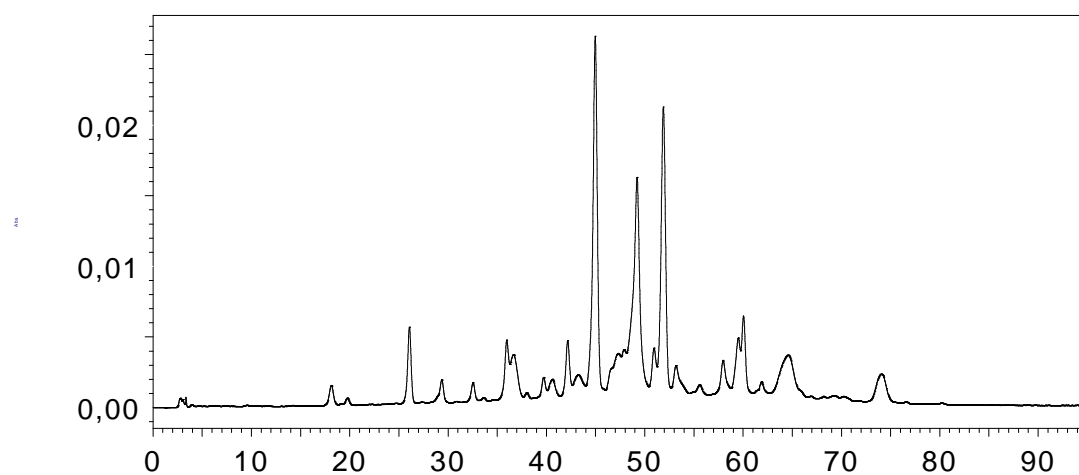


Figura 19A – Perfil cromatográfico do extrato da casca da uva Cabernet Sauvignon a 360 nm.

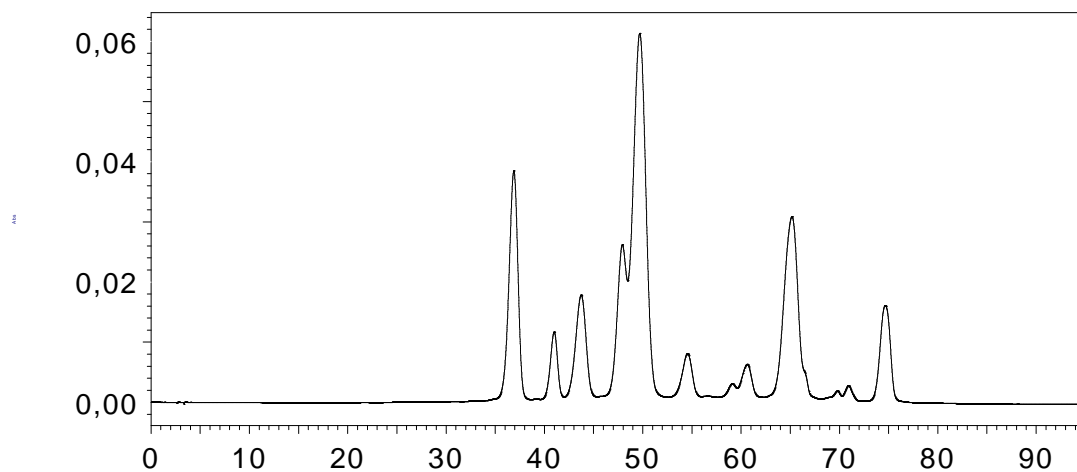


Figura 20A – Perfil cromatográfico do extrato da casca da uva Cabernet Sauvignon a 520 nm.

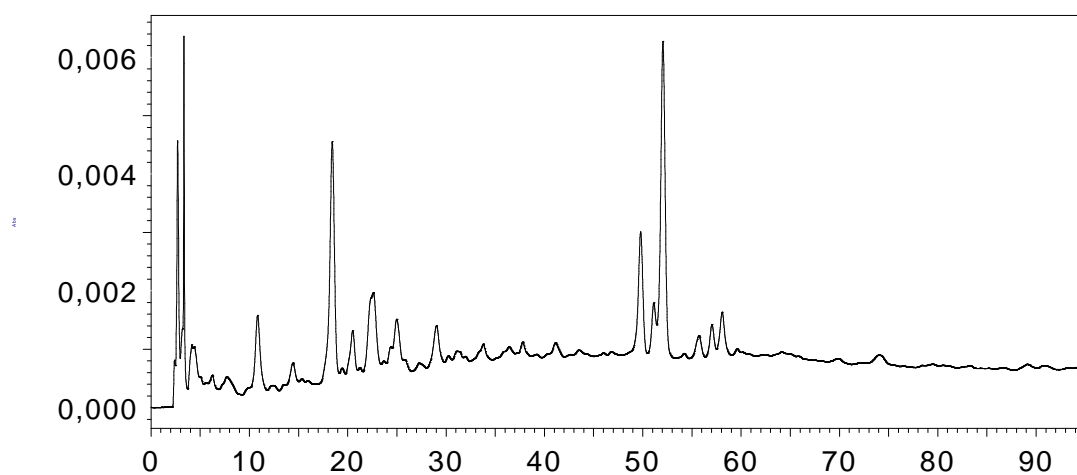


Figura 21A – Perfil cromatográfico do extrato da polpa da uva Riesling Itálico a 280 nm.

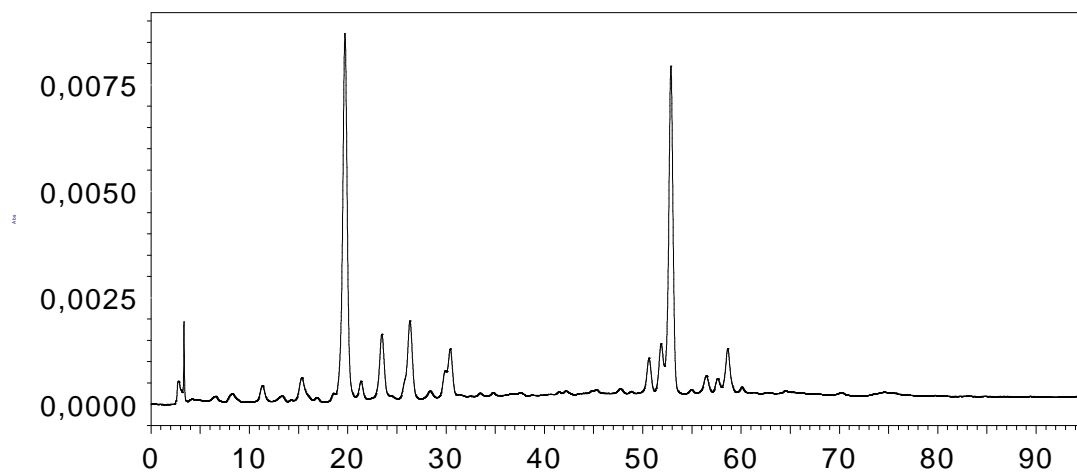


Figura 22A – Perfil cromatográfico do extrato da polpa da uva Riesling Itálico a 320 nm.

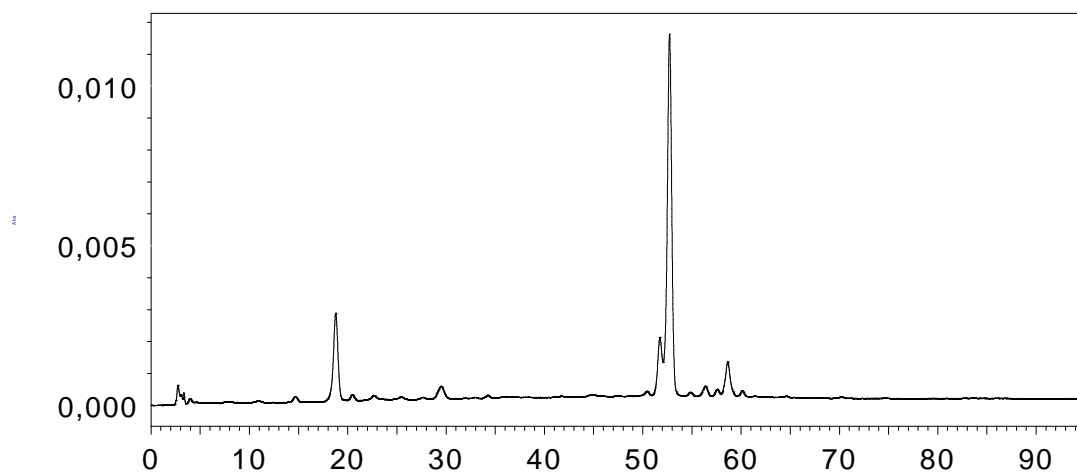


Figura 23A – Perfil cromatográfico do extrato da polpa da uva Riesling Itálico a 360 nm.

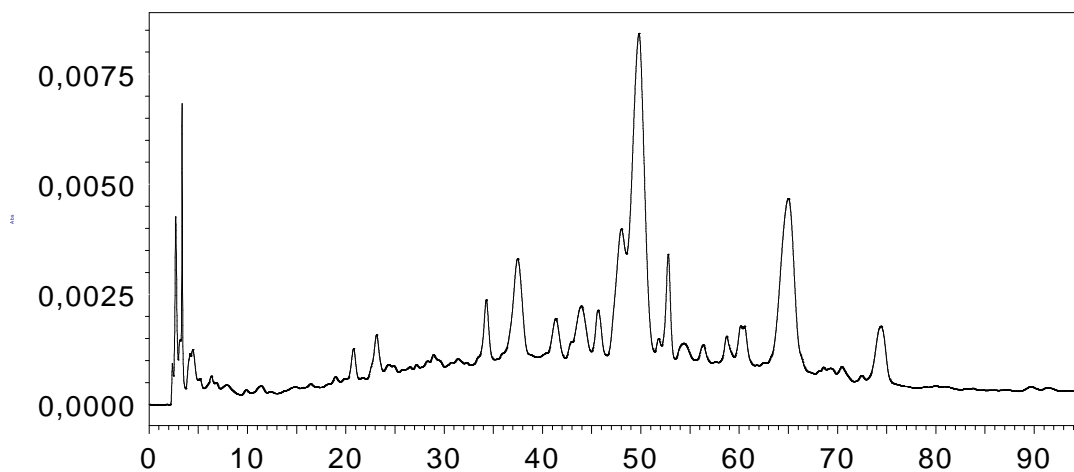


Figura 24A – Perfil cromatográfico do extrato da polpa da uva Cabernet Sauvignon a 280 nm.

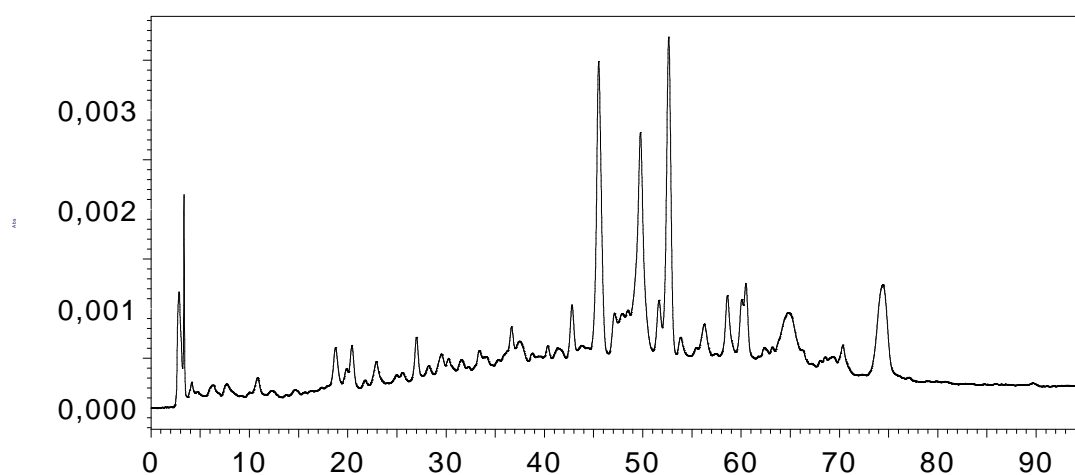


Figura 25A – Perfil cromatográfico do extrato da polpa da uva Cabernet Sauvignon a 320 nm.

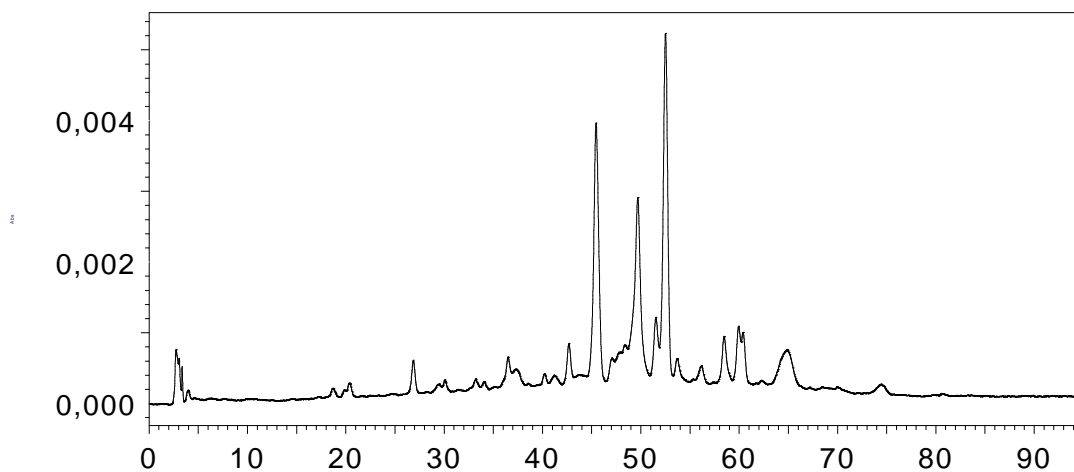


Figura 26A – Perfil cromatográfico do extrato da polpa da uva Cabernet Sauvignon a 360 nm.

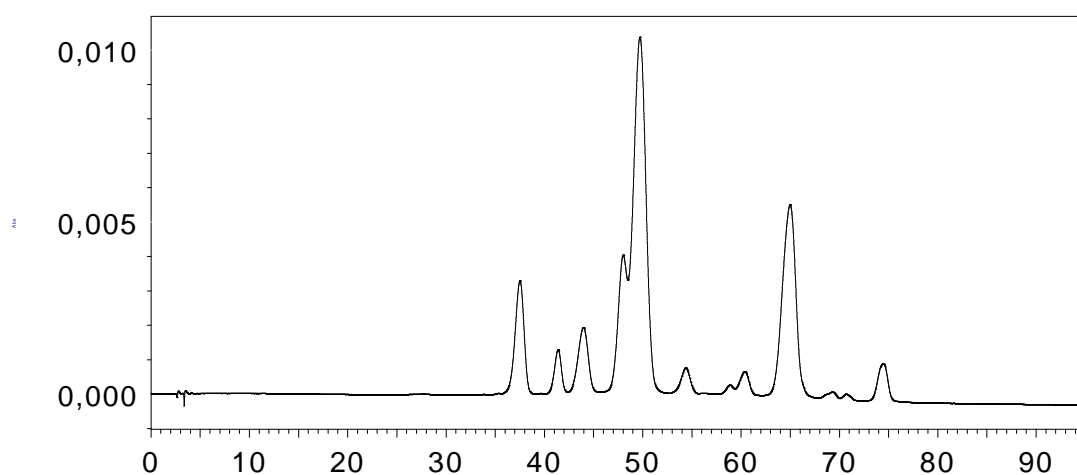


Figura 27A – Perfil cromatográfico do extrato da polpa da uva Cabernet Sauvignon a 520 nm.

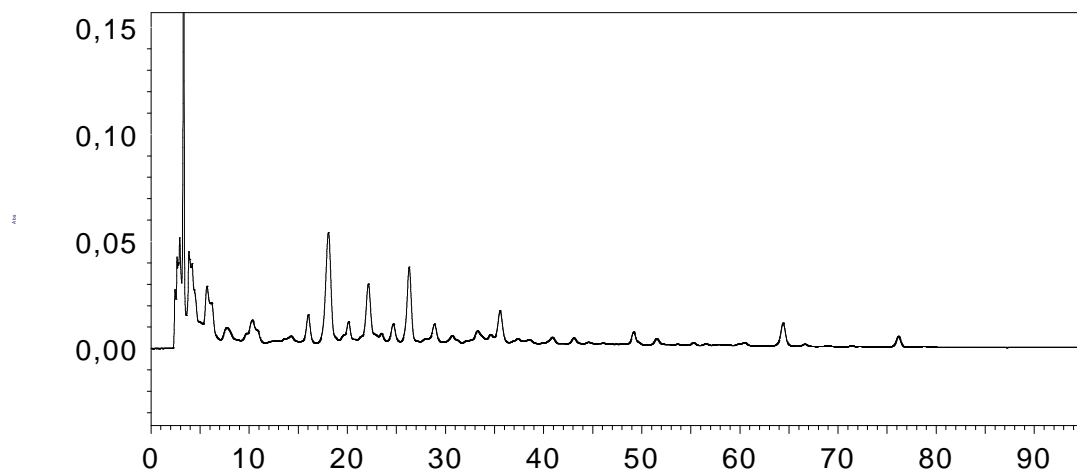


Figura 28A – Perfil cromatográfico do vinho da uva Riesling Itálico a 280 nm.

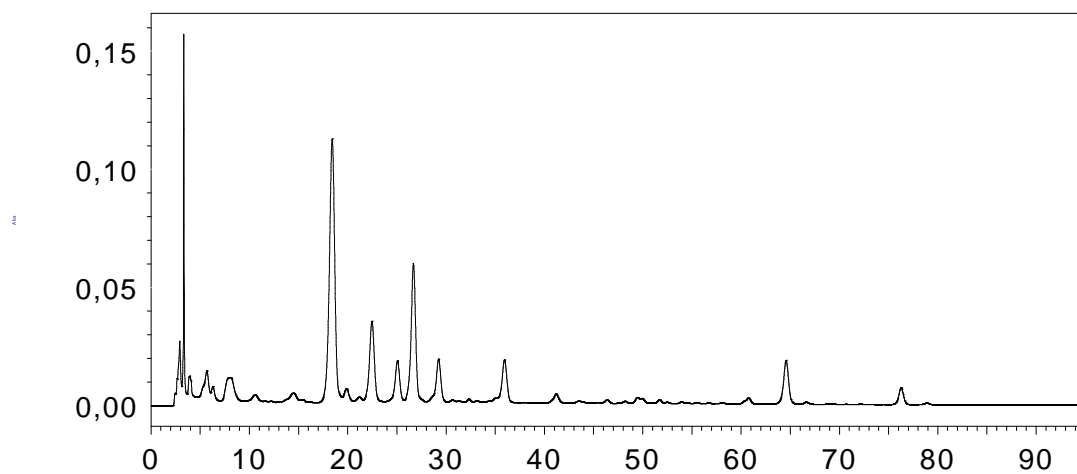


Figura 29A – Perfil cromatográfico do vinho da uva Riesling Itálico a 320 nm.

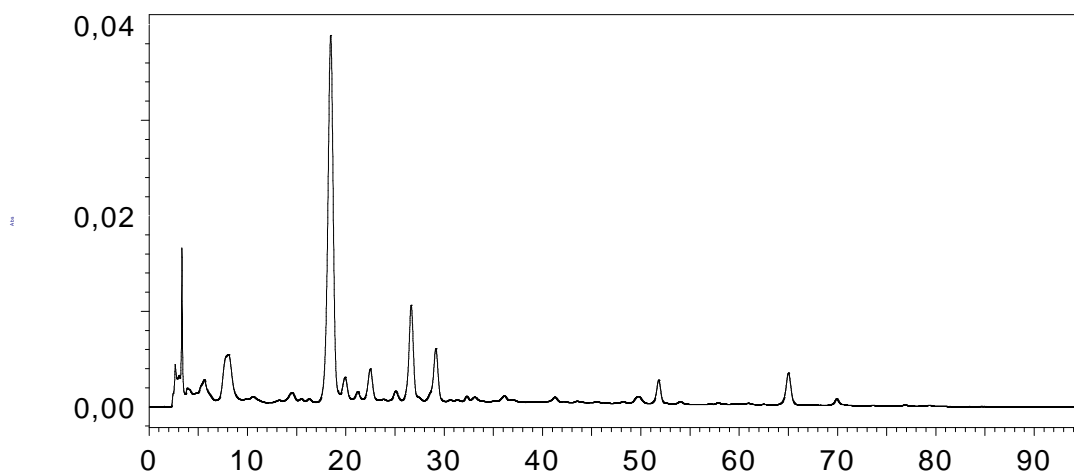


Figura 30A – Perfil cromatográfico do vinho da uva Riesling Itálico a 360 nm.

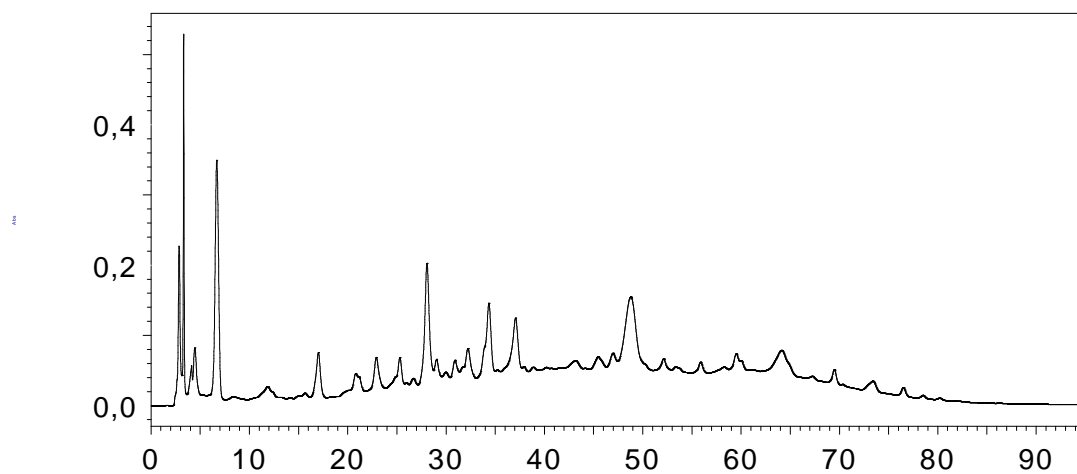


Figura 31A – Perfil cromatográfico do vinho da uva Cabernet Sauvignon a 280 nm.

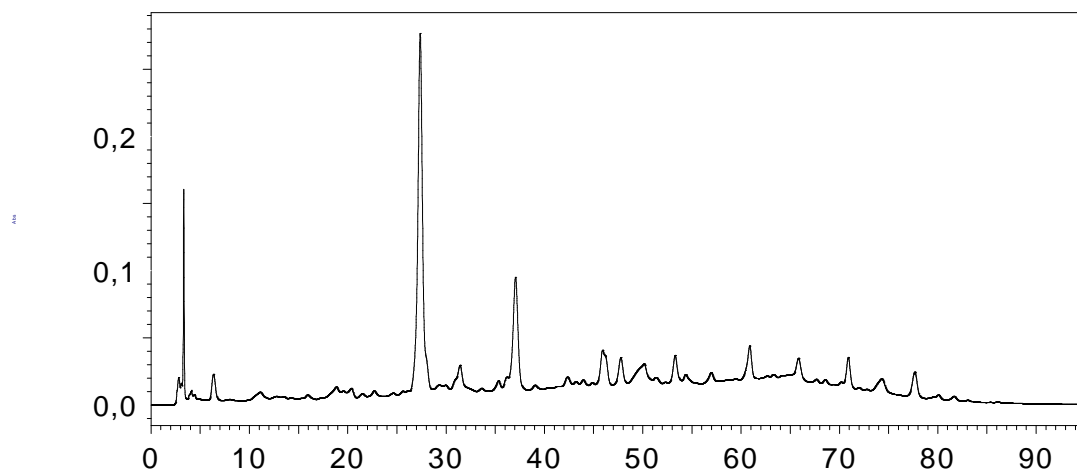


Figura 32A – Perfil cromatográfico do vinho da uva Cabernet Sauvignon a 320 nm.

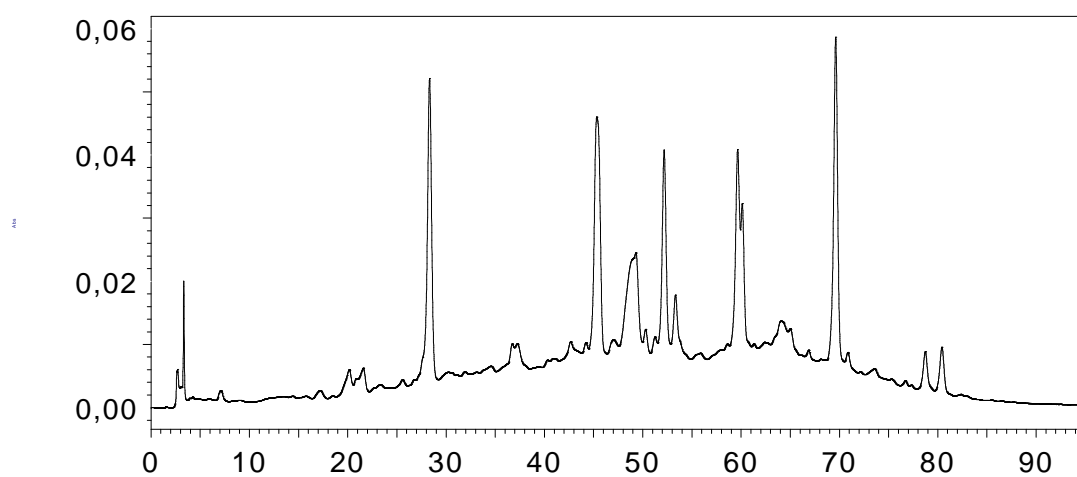


Figura 33A – Perfil cromatográfico do vinho da uva Cabernet Sauvignon a 360 nm.

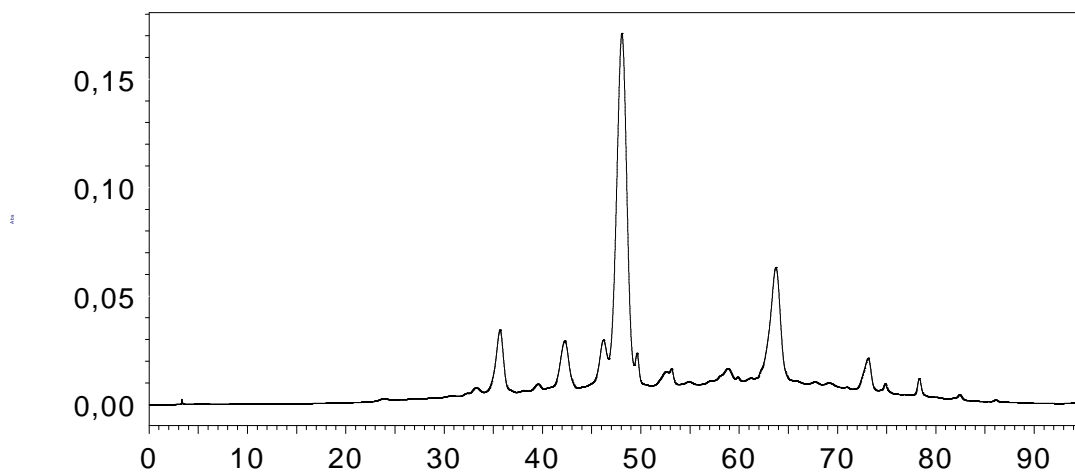


Figura 34A – Perfil cromatográfico do vinho da uva Cabernet Sauvignon a 520 nm.