

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS CAMPO MOURÃO-PARANÁ
CORDENAÇÃO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARIA ISABELLA ONO

**ESTUDO *IN VITRO* DA COMPOSIÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM VINHOS FINOS TINTOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2014

MARIA ISABELLA ONO

**ESTUDO *IN VITRO* DA COMPOSIÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM VINHOS FINOS TINTOS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Engenharia de Alimentos da Coordenação de Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Campo Mourão, como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk

CAMPO MOURÃO
2014



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Campo Mourão
Coordenação de Alimentos
Engenharia de Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO

ESTUDO *IN VITRO* DA COMPOSIÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM VINHOS FINOS TINTOS

por

MARIA ISABELLA ONO

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 06 de março de 2014 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos. A candidata foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk
Orientador

Prof. Dr. Augusto Tanamati

Prof. Dr. Paulo Henrique Março

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a Deus, por todas as bênçãos, pela força que me concede todos os dias, pela sabedoria e por estar sempre presente ao meu lado guiando meus passos.

A minha família, em especial, aos meus pais Jorge Hiroshi Ono e Narlene Cavalcante Costa, pelo apoio, educação e pelo amor incondicional. Pai e Mãe, vocês são responsáveis por tudo que sou hoje, eu amo vocês.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela oportunidade de realização do curso.

Ao orientador Professor Doutor Charles Windson Isidoro Haminiuk expresse minha gratidão pelo incentivo, orientação, oportunidade e pelos conhecimentos transmitidos.

A todos os professores da Coordenação de Engenharia de Alimentos e demais professores de outras coordenações, pelos ensinamentos repassados, assim como aos professores da banca examinadora pelas contribuições referentes a este estudo.

Aos meus amigos Amanda, Laís, Luiz Arthur, Raphael e Valéria que tanto me apoiaram durante essa caminhada. Obrigada por fazerem parte da minha vida e pela amizade sincera compartilhada durante esses anos. Espero sempre tê-los perto de mim.

O meu mais sincero muito obrigada a todos vocês que trilharam esse caminho comigo e que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste sonho.

RESUMO

ONO, Maria Isabella. **Estudo *in vitro* da composição de compostos fenólicos e capacidade antioxidante em vinhos tintos**. 2014. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

Compostos fenólicos são responsáveis pela cor, sabor e aroma dos vinhos, além da presença dos mesmos estarem associados a alguns benefícios a saúde humana. Este trabalho teve como objetivo avaliar a composição de compostos fenólicos e atividade antioxidante de amostras de vinhos tintos de diferentes cultivares. O conteúdo de compostos fenólicos totais variou de 1277,33 a 2850,66 mg EAG.L⁻¹. Já o conteúdo de flavonóides totais variou de 513,75 a 962,50 mg EC.L⁻¹. Os resultados de concentração de antocianinas totais variaram de 38,07 a 207,90 mg de cianidina 3-glicosídeo por litro de vinho. Através do método de DPPH• pode se encontrar resultados significativos para a atividade antioxidante onde a maior capacidade antioxidante observada (3,57 mg.L⁻¹) foi em uma amostra de vinho elaborado com a uva Merlot. Através dos resultados obtidos por CLAE pode se observar que Ácido Gálico, Catequina, Ácido Vanílico, Ácido p-cumárico, Quercetina, Resveratrol e Miricetina foram identificados em quase todas as amostras de vinhos. Através de análise estatística, pelo teste de Shapiro Wilk's, Levene, ANOVA, teste das médias de Fisher LSD e análise de correlação utilizando o teste de Person, foi possível notar correlações entre os testes aplicados como também de alguns compostos fenólicos identificados por CLAE. A análise estatística multivariada, utilizando os teste de ACP (análise de componentes principais) e AHA (análise hierárquica de agrupamentos), possibilitou agrupar as amostras com suas características mais relevantes. De maneira geral os vinhos analisados apresentaram resultados significativos no conteúdo de compostos fenólicos e capacidade antioxidante. Pode-se concluir que a uva utilizada para a produção de um vinho participa ativamente na composição fenólica do vinho resultante. Sendo assim, o vinho, quando consumido em doses regulares, pode ser uma boa fonte de compostos bioativos, podendo trazer os benefícios que esta classe proporciona.

Palavras-chave: Vinho tinto. Compostos fenólicos. Atividade antioxidante. CLAE. Análise multivariada.

ABSTRACT

ONO, Maria Isabella. ***In vitro* study of the composition of phenolic compounds and antioxidant capacity in red wines.** 2014. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

Phenolic compounds are responsible for the color, flavor and aroma of the wine, and the presence of them being associated with some benefits to human health. This study aimed to evaluate the composition of phenolic compounds and antioxidant activity of samples of red wines of different cultivars. The content of total phenolic compounds ranged from 1277,33 to 2850,66 mg EAG.L⁻¹. The contents of total flavonoids ranged from 513.75 to 962.50 mg EC.L⁻¹. The results of concentration of total anthocyanins ranged from 38.07 to 207.90 mg of cyanidin 3- glucoside per liter of wine. Through the method of DPPH• can find significant results for antioxidant activity where the highest antioxidant capacity observed (3.57 mg L⁻¹) was in a sample of wine made from the Merlot grape. The results obtained by HPLC shows that Gallic Acid, Catechin, Vanillic acid, p-coumaric acid, Quercetin, Myricetin and Resveratrol were identified in almost all the samples of wine. Through statistical analysis, using the test Shapiro Wilk 's, Levene ANOVA, averages test by Fisher LSD and correlation analysis using the Person test, it was possible to observe correlations between the tests applied as well as some phenolic compounds identified by HPLC. Multivariate analysis, using the PCA (principal component analysis) and HCA (hierarchical cluster analysis) test, allowed classification of the samples with its outstanding features. Generally the wines analyzed showed significant results in the content of phenolic compounds and antioxidant capacity. It can be concluded that the grapes used for the production of a wine actively participates in the phenolic composition of the resulting wine. Thus, the wine when consumed in regular doses, can be a good source of bioactive compounds that can bring the benefits provided this class .

Keywords: Red wine. Phenolic compounds. Antioxidant activity. HPLC. Multivariate analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura dos principais compostos flavonoides	18
Figura 2 - Estrutura dos principais compostos não flavonoides	20
Figura 3 - Teste de correlação de Pearson	41
Figura 4 - Gráfico de dispersão simples (Fator 1 X Fator 2) sobre as principais fontes de variabilidade de vinhos.....	43
Figura 5 - Dendrograma para os vinhos obtido pela análise hierárquica de agrupamentos (AHA).....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização dos vinhos	21
Tabela 2– Concentrações da análise de DPPH	25
Tabela 3– Concentração de compostos fenólicos totais nas amostras de vinhos.....	28
Tabela 4 – Concentração de flavonoides totais nas amostras de vinhos.....	30
Tabela 5 - Concentração de antocianinas totais nas amostras de vinhos.....	32
Tabela 6 - Atividade antioxidante (AA%) das amostras de vinhos determinadas pelo método DPPH	35
Tabela 7- CE ₅₀ das amostras de vinhos pelo método DPPH	36
Tabela 8- Compostos fenólicos identificados por CLAE.....	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 RADICAIS E ESTRESSE OXIDATIVO.....	14
3.2 ANTIOXIDANTES	15
3.3 VINHO E O PARADOXO FRANCÊS	16
3.4 COMPOSIÇÃO FENÓLICA DO VINHO	17
3.4.1 Flavonoides	18
3.4.1.1 Flavonóis	19
3.4.1.2 Flavanóis	19
3.4.1.3 Antocianinas	19
3.4.2 Compostos não-flavonoides	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 AMOSTRAS	21
4.2 MÉTODO DE EXTRAÇÃO	22
4.3 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	22
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS.....	23
4.5 DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS TOTAIS.....	23
4.6 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	24
4.6.1 DPPH	24
4.7 ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS ISOLADOS	25
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
5.1 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	28
5.2 FLAVONOIDES TOTAIS.....	29
5.3 ANTOCIANINAS TOTAIS.....	31
5.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	33
5.4.1 Método DPPH	33
5.5 ANÁLISES DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLAE	38

5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
5.6.1 Teste de correlação de Person	40
5.6.2 Análises multivariadas: ACP e AHA	42
6 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

O interesse crescente em compostos fenólicos é, principalmente, devido seu potencial antioxidante e a associação entre o seu consumo e a prevenção de certas doenças. Os benefícios para a saúde destes fitoquímicos estão diretamente ligados a um consumo regular e sua biodisponibilidade (HAMINIUK, 2012).

O vinho, em especial o vinho tinto, é uma fonte rica de compostos fenólicos, como flavonóides, antocianinas, proantocianidinas oligoméricas e poliméricas, ácidos fenólicos, estibenos e outros. Muitos desses compostos são relatados por suas várias atividades biológicas, incluindo propriedades cardioprotetora, antiinflamatória, anticancerígenas, antivirais e antibacterianas (SERUGA, NOVAK & JAKOBEK, 2011).

O vinho é considerado um alimento funcional, pois contém componentes que exercem efeitos benéficos para a saúde do consumidor desde que ingeridos em doses fisiologicamente equilibradas. Um desses efeitos benéficos é a capacidade de neutralização de espécies químicas consideradas oxidantes, ou seja, a atividade antioxidante (RODRIGUES, 2011).

Antioxidantes são substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retardam ou inibem a oxidação desse substrato, impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo e o consequente dano celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

Compostos fenólicos são responsáveis pelos efeitos saudáveis do consumo moderado de vinho. Esses compostos bioativos apresentam propriedades antioxidantes, uma vez que, podem eliminar os radicais, e por isso, minimizar os danos do estresse oxidativo (VILLANO et al., 2006).

A identificação de compostos específicos, ou família de compostos fenólicos, responsáveis por propriedades antioxidantes do vinho tinto merecem muita atenção (GRANATO, KATAYAMA & CASTRO, 2010). Deve se considerar que nem todos os compostos fenólicos têm a mesma atividade biológica. Além disso, a composição fenólica de vinhos tintos pode ser afetada pela variedade de uva tanto quantitativa como qualitativamente (ALÉN-RUIZ et al., 2009).

As uvas contêm uma grande quantidade de diferentes compostos fenólicos em casca, polpa e sementes, estes são os principais compostos responsáveis pela

cor, sabor, oxidação e outras reações químicas em vinho (MULERO, PARDO & ZAFRILLA, 2010).

Os resultados de diversos estudos sugerem que o consumo regular e moderado de vinho tinto reduzem a incidência de muitas doenças. Fitoquímicos naturais, incluindo compostos fenólicos do vinho tinto, podem ser substâncias promissoras para bloquear, inverter, retardar ou impedir o processo de carcinogênese (RUSSO, 2007).

Cada vez mais os consumidores estão em busca de alimentos que apresentem efeitos positivos a saúde. A identificação de fontes com alta capacidade antioxidante é de extrema importância. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo verificar a variabilidade dos compostos fenólicos e atividade antioxidante de vinhos tintos de diferentes cultivares.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição de compostos fenólicos e capacidade antioxidante em diferentes amostras de vinhos finos tintos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificação dos compostos fenólicos totais;
- Determinação de flavonoides totais;
- Determinação de antocianinas totais;
- Avaliação da capacidade antioxidante pelo método de DPPH•;
- Identificação de compostos fenólicos individuais por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar através de técnicas exploratórias multivariadas as amostras de vinhos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 RADICAIS E ESTRESSE OXIDATIVO

Os radicais são classificados como átomos, moléculas ou íons altamente instáveis devido a sua estrutura atômica ou molecular. Estes tipos de compostos apresentam grande tendência para capturar um elétron de outra espécie química de modo a recuperar sua estabilidade. Neste processo, a molécula vizinha torna-se um radical, e assim, provocam uma reação em cadeia que, caso não seja interrompida, pode provocar alterações celulares associadas a algumas patologias (RODRIGUES, 2011).

Diversas reações oxidativas e o processo respiratório, que ocorrem nas células aeróbias, levam a formação de radicais. Estes, por sua vez, podem causar danos ao organismo contribuindo para o aparecimento de algumas doenças como: inflamações, tumores malignos, mal de Alzheimer e doenças cardiovasculares, bem como aceleram o processo de envelhecimento (SILVA, et al., 2010).

Quando a geração de radicais é maior que a sua degradação pelas defesas antioxidantes, produz-se um desequilíbrio no organismo, chamado estresse oxidativo, que pode levar a danos, dependendo da extensão, da duração e do tipo de oxidante implicado. Há uma forte evidencia de que o estresse oxidativo tem um papel importante na patogênese de muitas doenças (LIMA, 2008).

Os agentes antioxidantes têm sido revelados como o principal mecanismo de defesa frente a atuação dos radicais no organismo humano, existindo um esforço constante para a manutenção de um equilíbrio entre ambos. Quando os radicais se encontram em excesso relativamente a quantidade de antioxidantes presentes, o organismo entra em estado de estresse oxidativo, que persistindo pode dar origem a uma série de patologias (RODRIGUES, 2011).

3. 2 ANTIOXIDANTES

Antioxidante é qualquer substância que quando presente em baixas concentrações, em comparação com as de um substrato oxidável atrasam significativamente ou evitam a oxidação do referido substrato. Estes agem de várias maneiras, incluindo a atividade catalítica de íons metálicos, eliminação de radicais e decomposição de peróxidos (HALLIWELL, 2007).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que são capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo esses serem enzimáticos ou não enzimáticos (GRIS, 2010).

Além dos antioxidantes clássicos presentes em concentrações consideradas relativamente baixas, existem compostos que possuem atividade antioxidante em concentrações relativamente altas, e podem contribuir para capacidade antioxidante total, dentre eles destacam-se os compostos fenólicos (GRIS, 2010).

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas na natureza onde mais de 8000 desses compostos já foram detectados e se encontram largamente distribuídos nas plantas. Esse grande e complexo grupo faz parte dos constituintes de uma variedade de vegetais, frutas e produtos industrializados. Podem ser pigmentos, que dão aparência colorida aos alimentos, ou produtos do metabolismo secundário, normalmente derivados de reações de defesa das plantas contra agressões do ambiente. Esses compostos atuam como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também pelos seus radicais intermediários estáveis, impedirem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídio (SILVA et al., 2010).

Os compostos fenólicos se enquadram na categoria de neutralizadores de radicais, sendo eficientes na prevenção da autooxidação. São responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa em alimentos. As suas principais fontes são frutas cítricas como limão, laranja e tangerina, além de outras frutas como cereja, uva, ameixa, pêra, maçã e mamão, sendo encontrados em maior quantidade na polpa do que no suco da fruta (ROCKENBACH, 2008).

Em geral os compostos fenólicos são multifuncionais como antioxidantes, pois atuam de várias formas: combatendo os radicais, quelando metais de transição, interrompendo a reação de propagação dos radicais na oxidação lipídica,

modificando o potencial redox do meio e reparando a lesão a moléculas atacadas pelos radicais (LIMA, 2008).

Os compostos fenólicos atuam por mecanismos variados, dependendo da sua concentração e do tipo de composto presente no alimento. Se apresentam amplamente distribuídos entre as distintas partes das plantas, porém sua maior concentração está nas frutas, hortaliças e em seus derivados, tais como: azeite virgem de oliva, vinho tinto, chás e cerveja. Os diferentes alimentos de origem vegetal contêm diferentes tipos de compostos fenólicos, em concentrações variáveis (LIMA, 2008).

3.3 VINHO E O PARADOXO FRANCÊS

O vinho é uma bebida resultante da fermentação alcoólica, total ou parcial, de uvas frescas, esmagadas ou não, ou do seu mosto, por intervenção de processos tecnológicos permitidos por lei (GUERRA, 2005). Do ponto de vista nutricional, os principais constituintes do vinho são água, etanol, açúcares, minerais, vitaminas, ácidos orgânicos, aminas bioativas e traços de proteínas (SCHLEIER, 2004).

Cada grupo de constituintes do vinho é composto por dezenas ou até mesmo centenas de compostos químicos. Esta composição está intimamente ligada com a origem das uvas, ou seja, o tipo de solo, clima, região onde são cultivadas e o tipo de tratamento pelos quais estas são submetidas durante o processo de produção e conservação do vinho (DIAS, 2010).

A produção de uvas, no Brasil, está localizada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Constitui-se em atividade consolidada, com importância socioeconômica, no Estado do Rio Grande do Sul, que responde por 97% da produção nacional de vinhos (FREITAS, 2006). A região sul é o maior pólo vitivinícola do Brasil, sendo o Estado do Rio Grande do Sul o principal produtor (GRIS, 2010).

O vinho é uma bebida muito apreciada e desempenha papel importante na economia de diversos países do mundo. Entre os muitos componentes que atribuem qualidade e valor nutricional estão os flavonóides, fenólicos não-flavonóides, lantanídeos, cálcio, cromo, cobalto, potássio, selênio e zinco. O vinho pode ser considerado uma das mais importantes fontes de antioxidantes polifenólicos

cientificamente aceita, e recebe atenção especial devido aos seus efeitos inibitórios contra a oxidação do colesterol LDL, além do potencial inibidor do desenvolvimento de certos tipos de câncer e doenças inflamatórias (GRANATO, 2011).

O conteúdo fenólico de vinho tinto pode explicar o paradoxo francês, ou seja, o fato de que os franceses, que consomem vinho tinto diariamente, têm baixa incidência de doenças coronárias, apesar de ter uma dieta rica em gordura e sendo fumantes pesados (MINUSSI et al., 2003).

Apesar dos franceses possuírem hábitos alimentares pouco recomendáveis, como alta ingestão de gorduras saturadas e sedentarismo, a incidência de doenças cardiovasculares na população em geral era relativamente baixa. Este fato foi atribuído ao consumo regular de vinho pelos franceses (DIAS, 2010).

3.4 COMPOSIÇÃO FENÓLICA DO VINHO

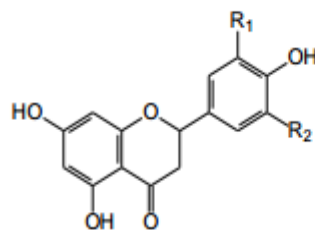
O vinho possui uma elevada quantidade de compostos com características antioxidantes, a maior parte deles proveniente da uva (RODRIGUES, 2011). A uva apresenta diversas substâncias com relevante atividade antioxidante, notavelmente os compostos polifenólicos. Grande parte da estrutura e da cor dos vinhos deve-se a essa família de compostos presentes nas grainhas, na polpa e na película das uvas (DIAS & MENEGON, 2012).

Segundo Granato (2011), os compostos fenólicos encontrados em uvas e vinhos podem ser separados em duas categorias: flavonóides e não flavonóides. Os flavonóides mais comuns em vinhos, em ordem crescente de concentração são os flavonóis (quercetina, caempferol e mircetina), flavan-3-óis (catequina, epicatequina e os taninos) e as antocianinas. Dentro da classe dos não-flavonóides estão os derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos, encontrados, frequentemente, na forma de ésteres de ácido tartárico.

3.4.1 Flavonoides

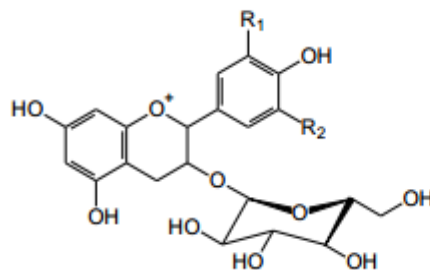
Os flavonoides constituem o maior grupo de compostos fenólicos de plantas, são pigmentos de coloração amarela que se caracterizam por um esqueleto básico e comum do tipo C6-C3-C6, consistindo em dois anéis aromáticos unidos por um anel pirano. Esta classe de compostos fenólicos pode-se dividir em famílias que se distinguem pelo grau de oxidação do anel pirano: flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavanóis, antocianinas, proantocianidinas e flavononas (RODRIGUES, 2011).

Flavonóis



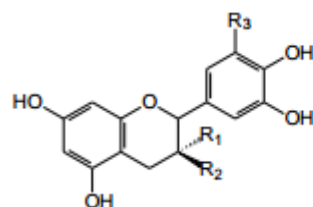
R ₁ = H	R ₂ = H	Camferol
R ₁ = OH	R ₂ = H	Quercetina
R ₁ = OH	R ₂ = OH	Miricetina

Antocianinas



R ₁ = OH	R ₂ = H	Cianidina
R ₁ = OH	R ₂ = OH	Delfinidina
R ₁ = OCH ₃	R ₂ = H	Peonidina
R ₁ = OH	R ₂ = OCH ₃	Petunidina
R ₁ = OCH ₃	R ₂ = OCH ₃	Malvidina

Flavan-3-óis



Procianidinas		Unidade monomérica
R ₁ = OH	R ₂ = H	R ₃ = H (+) - Catequina
R ₁ = H	R ₂ = OH	R ₃ = H (-) - Epicatequina
Prodelfinidinas		
R ₁ = OH	R ₂ = H	R ₃ = OH (+) - Galocatequina
R ₁ = H	R ₂ = OH	R ₃ = OH (-) - Epigallocatequina

Figura 1 - Estrutura dos principais compostos flavonoides

Fonte: Gris (2010).

3.4.1.1 Flavonóis

Os flavonóis são compostos caracterizados pela presença de uma insaturação no anel heterocíclico e um grupamento hidroxila na posição 3, e estão presentes nas cascas de uvas brancas e tintas (GRIS, 2010). Dentre os flavonóis isolados de vinhos tintos, com conhecida atividade biológica, estão a quercetina, miricetina, e campferol, que são compostos que possuem atividade antioxidante e antiestamínica (GRANATO, 2011).

3.4.1.2 Flavanóis

Entre os flavonoides destacam-se ainda os flavanóis cuja estrutura é idêntica aos flavonóis, com exceção de não possuírem um grupo cetona no anel pirano. Os principais flavanóis monoméricos encontrados nos vinhos são os isômeros (+)-catequina e a (-)-epicatequina, responsáveis por características de acidez. Os flavanóis poliméricos compreendem as proantocianidinas e os taninos condensados, de extrema importância organoléptica uma vez que são responsáveis pelas qualidades de adstringência do vinho (RODRIGUES, 2011).

3.4.1.3 Antocianinas

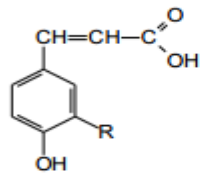
Representam uma parte muito importante, tanto quantitativamente como qualitativamente, dos flavonoides das uvas das variedades tintas. As antocianinas são pigmentos responsáveis pela coloração vermelha, azul e roxa das cascas das uvas e também do vinho tinto (GRIS, 2010). As antocianinas oriundas da uva são glicosiladas, e podem ser esterificadas por diferentes ácidos orgânicos. As antocianinas das uvas viníferas são 3-glicosídeos de cinco principais antocianidinas da uva: malvidina, cianidina, peonidina, delphinidina e petunidina, sendo a primeira a

mais importante, representando, no mínimo, 50,0% do conteúdo total de antocianinas presentes na uva, e, conseqüentemente no vinho (MANFROI, 2007).

3.4.2 Compostos não-flavonoides

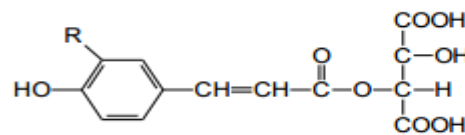
Os principais compostos não flavonoides são os fenóis ácidos, como os ácidos benzóicos e ácidos cinâmicos, além dos estibenos (resveratrol). Nas uvas, os ácidos fenólicos são principalmente os ácidos hidroxicinâmicos que se encontram nos vacúolos da célula da película e da polpa, sob a forma de ésteres tartáricos. Os ácidos fenólicos se encontram distribuídos na casca e na polpa da uva, e seus teores diminuem com o amadurecimento, podendo ser utilizados para discriminação de variedades. Nos vinhos, esses compostos fenólicos têm sido frequentemente associados com o aroma e adstringência (GRANATO, 2011).

Ácidos hidroxicinâmicos



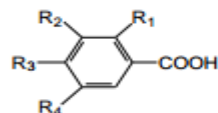
R = H Ác. *p*-cumárico
R = OH Ác. cafeico
R = OMe Ác. ferrúlico

Ácidos hidroxicinâmicos (hidroxicinamatos)



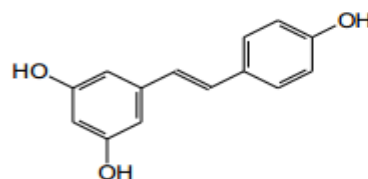
R = H Ác. cutárico
R = OH Ác. caftárico
R = OMe Ác. fertárico

Ácidos hidroxibenzóicos



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

Trans-resveratrol



Tirosol

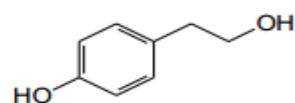


Figura 2 - Estrutura dos principais compostos não flavonoides
Fonte: Gris (2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

As amostras de vinhos foram adquiridas em comércio local de Campo Mourão. Foram analisados os vinhos das variedades Ancellota, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Carmenère, Malbec, Merlot, Pinot Noir, Shiraz, Tannat e Tempranillo, totalizando dez amostras. Todos os vinhos são provenientes da região vinícola do Rio Grande do Sul, Brasil. Na Tabela 1 constam as informações disponíveis acerca dos vinhos analisados.

Tabela 1 - Caracterização dos vinhos

Amostras	Casta	Ano	Grau alcoólico (% vol)	Tipo de vinho
Vinho 1	Ancellota	2010	12,8	Tinto seco
Vinho 2	Cabernet Franc	2012	12,5	Tinto seco
Vinho 3	Cabernet Sauvignon	2011	13,5	Tinto seco
Vinho 4	Carmenère	2011	12	Tinto seco
Vinho 5	Malbec	2010	12,8	Tinto seco
Vinho 6	Merlot	2011	13	Tinto seco
Vinho 7	Pinot Noir	2011	13	Tinto seco
Vinho 8	Shiraz	2010	13	Tinto seco
Vinho 9	Tannat	2012	13,5	Tinto seco
Vinho 10	Tempranillo	2010	12	Tinto seco

4.2 MÉTODO DE EXTRAÇÃO

Para a realização da extração dos compostos fenólicos 5 mL de cada amostra foram diluídas em 20 mL de etanol 40% e agitadas por 24 horas em homogeneizador de sangue.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada em triplicata através do método de Folin Ciocalteu – Colorimétrico utilizando ácido gálico como padrão (10-250 ppm), de acordo com a metodologia Singleton & Rossi (1965), onde 100 µL de amostra é misturada com 5000 µL de água destilada e 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, 1500 µL de solução de carbonato de sódio anidro 15% (Na_2CO_3) é adicionado e completa-se o volume de 10 mL com água destilada. Deixa-se reagir por 1 hora a temperatura ambiente. A absorbância é medida em 765 nm utilizando água destilada como branco.

As concentrações foram calculadas a partir da curva padrão de ácido gálico, onde foram utilizadas as concentrações de 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 µL para defini-la, onde gerou um coeficiente de determinação obtida pelo ajuste linear (R^2) de 0,986 e a equação da reta conforme apresentada na Equação 1.

Os resultados são expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por litro de vinho (mg EAG.L^{-1}).

$$y = 0,0009x - 0,0534 \quad (1)$$

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS

A quantificação de flavonoides totais seguiu o método colorimétrico, proposto por Chang et al. (2002), onde 250 µL de extrato é misturado com 1250 µL de água destilada e 75 µL de solução de nitrito de sódio 5% (NaNO₂). Adiciona-se após 6 minutos 150 µL de solução de cloreto de alumínio 10% (AlCl₃) é adicionado e espera-se 5 minutos para a reação. É adicionado ainda 500 µL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) e 275 µL de água destilada. A absorbância é medida em 510 nm utilizando água destilada como branco. As análises foram realizadas em triplicata.

As concentrações foram calculadas a partir da curva padrão de catequina, onde foram utilizadas as concentrações de 0; 20,06; 40,12; 60,12; 80,24; 100,30; 120,36; 140,42; 160,48; 180,54; 200,60; 304,91; 401,20; 505,51 e 601,80 µL para defini-la, onde gerou um coeficiente de determinação obtida pelo ajuste linear (R²) de 0,999 e a equação da reta conforme apresentada na Equação 2.

Os resultados são expressos em miligramas equivalente de catequina por litro de vinho (mg EC.L⁻¹).

$$y = 0,0031x + 0,0124 \quad (2)$$

4.5 DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS TOTAIS

A determinação de antocianinas totais foi realizada em triplicata, utilizando o método de diferencial de pH proposta por Giusti & Wrolsted (2001). Esse método exige a preparação de duas soluções tampão, cloreto de potássio (KCl) a 0,025 mol/L e pH = 1,0 e acetato de sódio (CH₃COONa) a 0,4 mol/L e pH= 4,5. As amostras são diluídas na proporção 1:30 (65 µL de amostra em 1935 µL de solução tampão). A absorbância é medida a 520 e 700 nm, utilizando os tampões pH 1,0 e 4,5, e etanol 40% como branco nas leituras.

Os resultados são expressos como miligramas de cianidina 3-glicosídeo equivalentes por litro de amostra.

Para os cálculos foi usada a equação 3 e para a determinação de concentração de pigmentos de antocianinas monomérica (MA), usou-se a equação 4.

$$A = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5} \quad (3)$$

$$MA = \frac{A \times M \times DF \times 1000}{\epsilon \times \lambda} \quad (4)$$

Onde:

M= 449,2 g/mol (massa molar da cianidina-3-glucosídio)

DF= 4,0 fator de diluição

ϵ = 26900 L⁻¹mol⁻¹cm⁻¹ (coeficiente de extensão molar)

λ = 1 cm (comprimento caminho óptico da cubeta)

4.6 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante foi determinada pelo método de DPPH e expressa pelo valor de CE₅₀ (concentração efetiva de amostra para sequestrar 50% de radicais livres).

4.6.1 DPPH[•]

A eficácia anti-radical foi avaliada pelo método DPPH[•], proposto por Mensor et al. (2001), onde uma alíquota de 2,5 mL de cada amostra é misturado com 1 mL do reagente de DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), após 30 minutos da reação em ambiente escuro, sendo a absorbância medida em 518 nm. Para cada amostra há um branco, que contém a amostra analisada com etanol 40%. Como controle negativo será utilizado 1 mL de solução DPPH com 2,5 mL de etanol. Os controles positivos são aqueles que utilizam as soluções padrão. A equação do cálculo da

capacidade seqüestrante de radicais pelo método de DPPH* é apresentado na equação 5.

$$AA \% = 100 - \left[\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}} \right] \quad (5)$$

As concentrações utilizadas para a realização do CE₅₀ são apresentadas em mg/L na Tabela 2.

Tabela 2– Concentrações da análise de DPPH

mg/L	A	B	C	D	E
1	1800	1500	1100	800	500
2	1500	1200	900	600	300
3	1300	1000	700	400	100
4	1000	800	600	400	100
5	2100	1800	1500	1200	900
6	1300	1000	700	400	100
7	900	700	500	300	100
8	2100	1800	1500	1200	900
9	1500	1200	900	600	300
10	1300	1000	700	400	100

As leituras das absorvâncias de todos os testes foram efetuadas em espectrofotômetro UV-Vis, duplo feixe, T-80 (PG Instruments Limited, Beijing, China) no comprimento de onda específico para cada método.

4.7 ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS ISOLADOS

Para que sejam obtidos resultados que expressem quantitativamente e qualitativamente os compostos fenólicos encontrados nas amostras de vinhos, foi

realizada uma análise cromatográfica de compostos fenólicos individuais utilizando o cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção por sistema de arranjo de diodos (CLAE-DAD/UV-Vis) com sistema Ultimate 3000 CLAE (Dionex, Idstein, Alemanha), equipado com uma bomba Ultimate 3000, coluna do compartimento de amostra Ultimate 3000, detector de fotodiodo e software Chromeleon (Coluna de fase reversa Acclaim® 120, C18 5 mm 120 A (4,6 mm x 250 mm)). A coluna foi mantida a 40°C em todas as análises e os comprimentos de onda utilizados para detecção foram 280, 300 e 320 nm. Ácidos fenólicos e flavonóis são normalmente detectados em comprimentos de onda entre 210 e 320 nm. O volume injetado foi de 10 µL utilizando-se como fases móveis água acidificada com ácido fosfórico 1% e metanol. A eluição dos compostos fenólicos foi realizada através de gradiente entre as duas fases móveis : 0-15 % B em 2 min, 15-25 % B em 5 min, 25-30 % B em 10 min, 30-35 % B em 15 min, 35-50 % B em 25 min, 50-60 % B em 30 min, 60-80 % B em 35 min, 80-100 % B em 45 min e 100-5 % B em 60 min. Os padrões utilizados para este estudo são: ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferrúlico, rutina, trans-cinâmico) e flavonóis (rutina, miricetina, quercitina e caempferol). As soluções padrões foram preparadas em metanol e as curvas de calibração foram obtidas a partir de injeções em duplicatas de pelo menos cinco concentrações. Na análise em CLAE, os compostos fenólicos são identificados comparando o tempo de retenção com os dos padrões puros.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados estão apresentados como média e desvio padrão (DP). Todas as variáveis foram submetidas a análise de normalidade pelo teste de Shapiro Wilk's e a análise de homogeneidade de variância pelo teste de Levene para confirmação do teste de hipóteses. As amostras foram ainda conduzidas ao teste de variância ANOVA, e com as amostras que apresentaram diferença significativa entre si, aplicou-se o teste das médias de Fisher LSD. Foi feito também uma análise de correlação utilizando o teste de Person.

Com o intuito de padronizar as variáveis e agrupá-las quanto as características químicas mais relevantes entre as amostras, foi realizado uma

análise multivariada utilizando os teste de ACP (análise de componentes principais) e AHA (análise hierárquica de agrupamentos). Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software Statistica 7.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Os compostos fenólicos são componentes importantes na qualidade de vinhos, contribuindo para as características sensoriais como cor, sabor, adstringência e dureza (SCHLEIER, 2004).

A Tabela 3 apresenta o conteúdo de compostos fenólicos totais, expresso em miligramas equivalente de ácido gálico por litro de vinho. São apresentados também os resultados do teste das médias que demonstra se há diferença significativa entre as amostras e os valores dos desvios padrões.

Tabela 3– Concentração de compostos fenólicos totais nas amostras de vinhos

Amostras	Concentração (mg EAG.L ⁻¹)	DP
Vinho 1	2348,44 ^b	139,51
Vinho 2	1970,66 ^{cd}	166,67
Vinho 3	1850,66 ^{cd}	236,74
Vinho 4	1490,66 ^{ef}	197,31
Vinho 5	2850,66 ^a	256,56
Vinho 6	1761,77 ^{de}	43,77
Vinho 7	1277,33 ^f	213,51
Vinho 8	2686,22 ^{ab}	186,66
Vinho 9	2152,88 ^{bc}	264,89
Vinho 10	1868,44 ^d	111,64
p(value)*		0,20
p(value)**		<0.001

*p(value) – Teste de homogeneidade de variâncias por Levene

**p(value) - one way ANOVA

Letras diferentes representam que as amostras são diferentes a um nível de significância de $p \leq 0,05$, no teste de Fischer LSD, $n=3$

O conteúdo de compostos fenólicos totais variou de 1277,33 a 2850,66 mg EAG.L⁻¹. A amostra que apresentou maior valor corresponde ao vinho 5 e a de menor valor vinho 7.

Em geral todos os vinhos analisados apresentaram bons teores de compostos fenólicos totais alcançando os resultados esperados. Os vinhos que apresentaram maiores valores de conteúdo fenólico, em ordem crescente, foram os referentes as variedades Ancellota, Shiraz e Malbec. Já os menores valores, em ordem crescente, foram verificados nas variedades Pinot Noir, Carmenère e Merlot.

Em um estudo, de acordo com Minussi et al. (2003), amostras de vinhos tintos comerciais apresentaram conteúdo de compostos fenólicos totais que variaram de 1615 a 2133 mg EAG.L⁻¹, e uma média de 1920 mg EAG.L⁻¹.

Segundo Granato, Katayama & Castro (2010), o teor de compostos fenólicos totais em vinhos tintos brasileiros variou de 1041,63 a 1958,78 mg EAG.L⁻¹.

Neste teste as amostras 1, 5, 7 e 10 apresentaram diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$).

A composição fenólica do vinho depende do tipo de uva usada para vinificação, extração do suco, processo de vinificação e de reações químicas que ocorrem durante o envelhecimento (SCHLEIER, 2004).

A quantidade de compostos fenólicos varia consideravelmente em diferentes tipos de vinho, dependendo da variedade de uva, fatores ambientais na vinha e as técnicas de processamento de vinho (MINUSSI et al., 2003).

Os resultados encontrados confirmaram uma variação de compostos fenólicos totais entre as amostras de vinhos analisados estando de acordo com a literatura disponível.

5.2 FLAVONOIDES TOTAIS

A maioria dos flavonoides tem a capacidade de reagir com radicais e exercer funções antioxidantes no organismo. Os flavonoides constituem o maior grupo de compostos fenólicos de plantas. São polifenóis que ocorrem naturalmente em

alimentos de origem vegetal e são comuns em dietas do mundo inteiro. (ROCKENBACH, 2008).

Os flavonoides vêm despertando um crescente interesse devido aos estudos que mostram uma relação inversa entre o seu consumo e o risco de doenças crônicas não-transmissíveis (GRANATO, KATAYAMA & CASTRO, 2010).

A Tabela 4 apresenta o teor de flavonoides totais expressos em miligramas equivalente de catequina por litro de vinho. São apresentados também os resultados do teste das médias que demonstra se há diferença significativa entre as amostras e os valores dos desvios padrões.

Tabela 4– Concentração de flavonoides totais nas amostras de vinhos

Amostras	Concentração (mg EC.L⁻¹)	DP
Vinho 1	902,50 ^a	56,63
Vinho 2	726,25 ^b	55,99
Vinho 3	783,75 ^b	26,01
Vinho 4	546,25 ^{de}	59,62
Vinho 5	710,00 ^b	29,12
Vinho 6	613,75 ^{cd}	17,36
Vinho 7	513,75 ^e	8,03
Vinho 8	962,50 ^a	30,67
Vinho 9	746,25 ^b	38,14
Vinho 10	645,00 ^c	12,50
p(value)*		0,10
P(value)**		<0.001

*p(value) – Teste de homogeneidade de variâncias por Levene

**p(value) - one way ANOVA

Letras diferentes representam que as amostras são diferentes a um nível de significância de $p \leq 0,05$, no teste de Fischer LSD, $n=3$

De acordo com a Tabela 4, pode-se notar que o conteúdo de flavonoides totais variou de 513,75 a 962,50 mg EC.L⁻¹, sendo o maior teor encontrado no vinho

8, enquanto o menor no vinho 7, sendo referentes as variedades Shiraz e Pinot Noir, respectivamente.

Segundo Granato, Katayama & Castro (2010), em um estudo utilizando vinhos de 5 diferentes variedades de uvas (Cabernet Sauvignon, Malbec, Merlot, Pinot Noir e Shiraz), o conteúdo de flavonoides totais variou de 520,36 a 1794,91 mg EC.L⁻¹, sendo o maior teor encontrado no vinho da variedade Malbec e o menor na variedade Cabernet Sauvignon.

As concentrações de flavonoides em vinhos tintos, determinadas por Li et al. (2009), variaram de 396 a 1596 mg EC.L⁻¹, e uma média de 873 mg EC.L⁻¹.

Pode se observar que as amostras 2, 3, 5 e 9 não apresentaram diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$), assim como as amostras 1 e 8.

Uvas e vinhos contêm grandes quantidades de compostos fenólicos, principalmente altas concentrações de flavonóides (ROCKENBACH, 2008).

Os resultados do presente estudo se aproximaram, mas não atingiram os valores máximos encontrados na literatura.

5.3 ANTOCIANINAS TOTAIS

As antocianinas são pigmentos responsáveis pela coloração vermelha, azul e roxa de uma grande variedade de flores e muitas frutas escuras como a framboesa, amora, cereja e uva (GRANATO, 2011). Estão presentes também em diferentes alimentos, com destaque para os vinhos tintos, sendo um constituinte comum na dieta humana (ROCKENBACH, 2008).

As antocianinas são os principais compostos fenólicos envolvidos na cor de vinhos tintos e são efetivos agentes antioxidantes (GRIS, 2010).

As antocianinas junto com as proantocianidinas são as principais substâncias responsáveis pela coloração dos vinhos tintos, e esta característica é um dos parâmetros que mais qualifica o vinho, do ponto de vista sensorial (MANFROI, 2007).

A Tabela 5 apresenta a concentração de antocianinas totais expressa em miligramas equivalentes de cianidina 3-glicosídeo por litro de amostra. São

apresentados também os resultados do teste das médias que demonstra se há diferença significativa entre as amostras e os valores dos desvios padrões.

Tabela 5- Concentração de antocianinas totais nas amostras de vinhos

Amostras	Concentração (mg.L⁻¹)	DP
Vinho 1	42,08 ⁱ	4,65
Vinho 2	146,28 ^c	5,84
Vinho 3	207,90 ^a	11,02
Vinho 4	38,07 ⁱ	3,82
Vinho 5	57,11 ^g	3,79
Vinho 6	100,69 ^e	5,30
Vinho 7	52,60 ^g	0,76
Vinho 8	131,75 ^d	3,51
Vinho 9	181,85 ^b	9,58
Vinho 10	71,63 ^f	2,65
p(value)*		0,13
p(value)**		<0.001

*p(value) – Teste de homogeneidade de variâncias por Levene

**p(value) - one way ANOVA

Letras diferentes representam que as amostras são diferentes a um nível de significância de $p \leq 0,05$, no teste de Fischer LSD, $n=3$

Os resultados de concentração de antocianinas totais variaram de 38,07 a 207,90 mg de cianidina 3-glicosídeo por litro de vinho. O maior conteúdo pode ser observado no vinho 3, elaborado com a uva Cabernet Sauvignon, e o menor conteúdo no vinho 4, elaborado com a uva Carmenère.

Granato, Katayama & Castro (2010) encontraram valores de antocianinas totais que variaram de 9,35 a 237,31 mg de cianidina 3-glicosídeo por litro de vinho em amostras de vinhos de cultivares Cabernet Sauvignon, Malbec, Merlot, Pinot Noir e Shiraz.

Grande parte das amostras de vinhos apresentou diferença significativa entre si ($p \leq 0,05$). Apenas as amostras de vinho 1 e 4 e as amostras 5 e 7, não apresentaram diferença significativa.

As antocianinas são responsáveis pelas diferenças de cor nos vinhos tintos, a quantidade e composição das antocianinas em uvas tintas variam com a espécie, cultivar, maturação, condições sazonais e nível de radiação solar (FREITAS, 2006).

5.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

5.4.1 Método DPPH^{*}

Um dos métodos mais utilizados para verificar a capacidade antioxidante consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila, de coloração púrpura, que absorve em um comprimento de onda de 517 nm. Por ação de um antioxidante, o DPPH^{*} é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela, com conseqüente decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante (quantidade de DPPH^{*} consumida pelo antioxidante) ou sequestradora de radicais e/ou a porcentagem de DPPH^{*} remanescente no meio reacional. O mecanismo de reação é baseado na transferência de elétrons, enquanto a abstração de átomo de hidrogênio é uma reação marginal, pois a mesma acontece lentamente em solventes que estabelecem fortes ligações de hidrogênio. O método é influenciado pelo solvente e pelo pH das reações, sendo considerado fácil e útil para análise de substâncias puras e amostras complexas como o vinho ou extratos vegetais (GRANATO, 2011).

A maioria dos métodos de determinação de atividade antioxidante *in vitro* aplicados tem como base a formação de radicais, os quais são capturados ao ser adicionado o composto antioxidante, ou por inibir a formação de radicais, ou então do consumo de oxigênio por esta e/ou a formação de produtos de oxidação (ROCKENBACH, 2008).

A Tabela 6 apresenta os valores das médias das duplicatas das amostras de vinhos, referentes a atividade antioxidante (AA%) pelo método DPPH', calculado através da equação 5, para cada uma das cinco concentrações determinadas para efetuar o cálculo de CE_{50} .

Tabela 6 - Atividade antioxidante (AA%) das amostras de vinhos determinadas pelo método DPPH'

	Amostra	AA%	DP		Amostra	AA%	DP
Vinho 1	V1-1	99,20	0,77	Vinho 2	V2-1	94,03	0,17
	V1-2	93,90	0,51		V2-2	94,03	0,86
	V1-3	91,53	0,08		V2-3	86,72	0,17
	V1-4	77,71	0,17		V2-4	78,31	1,03
	V1-5	76,00	0,17		V2-5	71,49	0,86
Vinho 3	V3-1	92,87	1,46	Vinho 4	V4-1	88,18	6,89
	V3-2	92,08	0,68		V4-2	87,51	1,98
	V3-3	81,79	1,29		V4-3	84,22	1,63
	V3-4	73,32	1,72		V4-4	76,97	1,20
	V3-5	60,59	1,63		V4-5	67,90	0,43
Vinho 5	V5-1	93,05	0,34	Vinho 6	V6-1	94,64	0,34
	V5-2	92,69	0,86		V6-2	93,60	0,60
	V5-3	87,75	0,77		V6-3	89,28	1,20
	V5-4	81,05	1,11		V6-4	81,91	1,29
	V5-5	76,43	1,11		V6-5	76,30	0,43
Vinho 7	V7-1	96,77	1,29	Vinho 8	V8-1	91,71	0,51
	V7-2	92,57	0,17		V8-2	90,92	0,08
	V7-3	78,07	1,37		V8-3	88,42	1,03
	V7-4	62,97	3,78		V8-4	84,40	1,89
	V7-5	51,46	5,77		V8-5	76,97	0
Vinho 9	V9-1	93,36	0,43	Vinho 10	V10-1	95,00	1,37
	V9-2	83,55	0,17		V10-2	91,65	1,63
	V9-3	77,34	4,65		V10-3	76,61	5,16
	V9-4	65,65	1,20		V10-4	71,01	9,99
	V9-5	54,08	0,68		V10-5	49,93	0,34

Na tabela 7 estão contidos os valores médios do cálculo de CE_{50} expressos em miligramas por litro de vinho, calculados a partir da equação de regressão ajustado para cada duplicata das amostras de vinhos. São apresentados também o resultado do teste das médias que demonstra se há diferença significativa entre as amostras, os desvios padrões e coeficientes de coeficientes de determinação obtidos pelo ajuste não linear.

Tabela 7- CE_{50} das amostras de vinhos pelo método DPPH'

Amostras	CE_{50} (mg/L)	DP	R^2
Vinho 1	144,85 ^c	3,87	0,90
Vinho 2	79,56 ^e	9,07	0,95
Vinho 3	51,07 ^f	2,72	0,95
Vinho 4	16,04 ^g	9,28	0,93
Vinho 5	266,68 ^a	13,74	0,96
Vinho 6	3,57 ^f	0,06	0,93
Vinho 7	113,95 ^d	17,03	0,91
Vinho 8	181,12 ^b	11,14	0,94
Vinho 9	275,95 ^a	3,25	0,96
Vinho 10	111,34 ^d	18,01	0,93
p(value)*		0,17	
P(value)**		<0.001	

*p(value) – Teste de homogeneidade de variâncias por Levene

**p(value) - one way ANOVA

Letras diferentes representam que as amostras são diferentes a um nível de significância de $p \leq 0,05$, no teste de Fischer LSD, $n=2$

Conforme os resultados apresentados na Tabela 7 pode-se observar que a amostra com maior concentração efetiva necessária para sequestrar 50% dos radicais foi o vinho 9 (275,95 $mg.L^{-1}$) e a de menor concentração o vinho 6 (3,57 $mg.L^{-1}$). Com base nesses valores, as amostras que apresentaram maiores concentrações (vinho 9 e 5) possuem capacidade sequestrante de radicais menores quando comparadas as outras amostras.

Em comparação com os resultados de compostos fenólicos totais pode-se notar que a amostra 5, que apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos (2850,66 mg EAG.L⁻¹) está entre as amostras que apresentaram menor capacidade antioxidante. Isto pode ser explicado pelo fato de que uma grande quantidade de ácidos fenólicos presentes na amostra não atuarem como antioxidantes. Já as amostras que apresentaram maior atividade antioxidante (vinho 6 e vinho 4) não apresentaram os maiores valores encontrados de compostos fenólicos totais.

O fator que participa na capacidade antioxidante dos vinhos é a casta utilizada para a sua produção. De fato os vinhos produzidos a partir das castas Merlot e Carmenère encontram-se no grupo de vinhos que revelam uma elevada atividade antioxidante, indicando que a utilização destas castas traduz-se em vinhos com propriedades antioxidantes importantes.

Em relação as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as amostras, pode se observar que as amostras 3 e 6, 5 e 9, 7 e 10, não apresentaram diferença significativa entre si enquanto as demais apresentaram.

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE₅₀), também chamada de concentração inibitória (CI₅₀). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE₅₀ e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al, 2007).

Quanto menor o valor de CE₅₀ apresentado pelo extrato, menor quantidade de extrato será necessária para reduzir 50% do radical DPPH*, e maior será sua atividade antioxidante (LIMA, 2008).

Existem demonstrações que o vinho tinto possui um grande potencial antioxidante, devido aos seus compostos fenólicos, os quais estão presentes em quantidades suficientes para garantir uma diminuição da atividade dos radicais (ZORZAN, 2006).

O vinho tinto é rico em compostos fenólicos com atividade antioxidante, capazes de inativar espécies reativas de oxigênio minimizando danos celulares do estresse oxidativo (GRANATO, 2011).

A concentração dos compostos fenólicos contribui sobremaneira para a atividade antioxidante dos vinhos. Entretanto, diferenças nas características dos

polifenóis, podem determinar uma diferente capacidade antioxidante (MANFROI, 2007).

5.5 ANÁLISES DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLAE

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica cromatográfica que permite separar os compostos presentes em uma amostra de acordo com sua estrutura química, nomeadamente o seu peso molecular e sua polaridade. A análise dos cromatogramas consiste não só na identificação dos compostos eluídos, por comparação com padrões analisados nas mesmas condições, mas também na quantificação dos compostos presentes na amostra injetada (RODRIGUES, 2011).

Os compostos fenólicos individuais encontrados nas amostras de vinhos através da análise cromatográfica são apresentados na Tabela 8. As amostras de vinhos estão nomeadas de 1 a 10.

Tabela 8- Compostos fenólicos identificados por CLAE

	Ác. gálico (mg/L)	Catequina (mg/L)	Ác. Vanílico (mg/L)	Ác. síringico (mg/L)	Ác. p-cumárico (mg/L)	Quercetina (mg/L)	Resveratrol (mg/L)	Miricetina (mg/L)	Ác. trans-cinâmico (mg/L)	Rutina (mg/L)	Total (mg/L)
1	8,25	17,49	0,89	0,93	3,11	3,12	1,33				35,12
2	7,66	43,16	2,06		0,25	1,62		1,45			56,2
3	7,3	31,31	1,96	0,79	0,5	1,79	0,57	2,13			46,35
4	4,07	29,51			0,97	0,89	0,35	1,16			36,95
5	6,79	11,59			1,44	1,84	2,32	2,8	23,54		50,32
6	7,27	33,35	1,34				0,77			3,46	46,19
7	3,13		1,12			0,89	1,37				6,51
8	8,45		2,29			2,09	1,2	0,76			14,79
9	7,65	39,95	1,82		0,43	2,33	0,97	2,43			55,58
10	7,51	49,76	1,56		1,31	1,08	0,4	1,71			63,33

n=2

Através dos resultados obtidos pode se observar que Ácido Gálico, Catequina, Ácido Vanílico, Ácido p-cumárico, Quercetina, Resveratrol e Miricetina foram identificados em quase todas amostras de vinhos. Em estudo realizado por Rodrigues (2011) foram identificados ácido gálico, ácido cafêico, resveratrol e a quercetina em vinhos tintos.

Neste grupo de compostos fenólicos encontrados nos vinhos analisados, alguns componentes são conhecidos por sua atividade anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana e anticancerígena, onde além da rutina e catequina, também estão inclusos, a quercetina, miricetina e caempferol (ROS, 2010).

O maior conteúdo de compostos fenólicos individuais foi observado na amostra 10, correspondendo ao vinho elaborado com a uva Tempranillo. Os resultados mostraram que dentre os constituintes fenólicos dos vinhos a catequina é mais abundante seguido do ácido gálico, exceto para a amostra 5.

Diferentes flavonóis podem ser encontrados nos vinhos, incluindo quercetina, caempferol, miricetina, sendo encontrados principalmente nas cascas de variedades de uvas *Vitis Vinifera* (ARCARI, 2010).

Resveratrol é um composto antioxidante encontrado nas uvas e produtos derivados como o vinho. Pesquisas têm evidenciado efeitos biológicos benéficos deste composto para saúde humana, incluindo atividade anticancerígena, cardioprotetora e antiinflamatória. A atividade antioxidante está frequentemente associadas ao conteúdo de polifenóis totais e a composição de compostos fenólicos individuais (ARCARI, 2010). Assim como o resveratrol, a quercetina possui várias atividades biológicas. Esta substância protege a oxidação do LDL do colesterol (DIAS, 2010).

A presença de substâncias fenólicas e/ou flavonóides no vinho contribuem para a melhoria da saúde humana. Dentre estes compostos encontrados nos vinhos pode-se destacar o resveratrol, catequina, epicatequina e quercetina (ARCARI, 2010).

5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

5.6.1 Teste de correlação de Person

Por meio da análise estatística de correlação de Person foi possível observar através dos resultados que as análises realizadas obtiveram correlação significativa entre si. Estas correlações são apresentadas na Figura 3.

	Fenólicos	Flavonóides	Antocianinas	DPPH	Ácido gálico	Catequina vanílico	Ácido p-Cumárico	Quercetina	Resveratrol	Mirretina	
Fenólicos	1,000000										
Flavonóides	0,791471	1,000000									
Antocianinas	0,164823	0,327227	1,000000								
DPPH	0,736376	0,398049	0,099245	1,000000							
Ácido gálico	0,729282	0,808023	0,465294	0,320483	1,000000						
Catequina	-0,203687	-0,202344	0,327541	-0,266960	0,27268	1,000000					
Ácido vanílico	0,052501	0,419624	0,773702	-0,025699	0,526699	0,207503	1,000000				
Ácido p-Cumárico	0,368401	0,342432	-0,500797	0,168834	0,218318	0,013404	-0,491112	1,000000			
Quercetina	0,696410	0,813368	0,178391	0,566747	0,511409	-0,180848	0,120253	0,586033	1,000000		
Resveratrol	0,529301	0,179752	-0,333570	0,677522	-0,058285	-0,718608	-0,452215	0,291213	0,316077	1,000000	
Mirretina	0,434661	0,055211	0,422694	0,472201	0,208750	-0,346056	-0,049425	-0,003952	0,238929	0,108770	1,000000

Figura 3- Teste de correlação de Pearson

A análise de compostos fenólicos apresentou correlação positiva quanto a análise de flavonóides totais ($r=0,7914$), análise de antioxidante por DPPH ($r=0,7363$), assim como de alguns compostos identificados por CLAE como ácido gálico ($r=0,7292$) e quercetina ($r=0,6964$). A análise de flavonóides totais se correlacionou com alguns compostos identificados por CLAE como ácido gálico ($r=0,8080$) e quercetina ($0,8133$). A análise de antocianinas teve correlação positiva apenas com ácido vanílico ($r=0,7737$). O método de DPPH apresentou correlação

positiva com o composto resveratrol ($r=0,6775$). O composto catequina se correlacionou com o resveratrol ($r=0,7186$).

5.6.2 Análises multivariadas: ACP e AHA

A análise de componentes principais (ACP) é uma técnica normalmente utilizada para a redução de dados em reconhecimento estatístico de padrões e processamento de sinais, e para a seleção ou extração de características. A seleção de características se refere a um processo no qual um espaço de dados é transformado em um espaço de características que tem a mesma dimensão que o espaço original de dados. O conjunto de dados sofre uma redução de dimensionalidade, onde um número reduzido de características retém a maioria do conteúdo da variância original dos dados (HAYKIN, 2001).

A Análise de Componentes Principais (ACP) representa uma das ferramentas quimiométricas mais utilizadas, principalmente, devido às suas características muito atraentes. ACP é uma técnica não-supervisionada, que reduz a dimensionalidade da matriz original de dados mantendo o máximo de variabilidade, e permite a visualização do arranjo original das amostras em um espaço n -dimensional, através da identificação das direções em que a maior parte da informação é mantida, permitindo que a relação entre as variáveis e as observações a serem estudadas, bem como o reconhecimento da estrutura de dados. É, por conseguinte, possível para explicar as diferenças nas várias amostras, por meio dos fatores obtidos a partir da matriz de correlação generalizada dos conjuntos de dados e ao mesmo tempo para determinar quais as variáveis que mais contribuem para a diferenciação de tais. A Figura 4 apresenta o gráfico de dispersão simples sobre as principais fontes de variabilidade de vinhos.

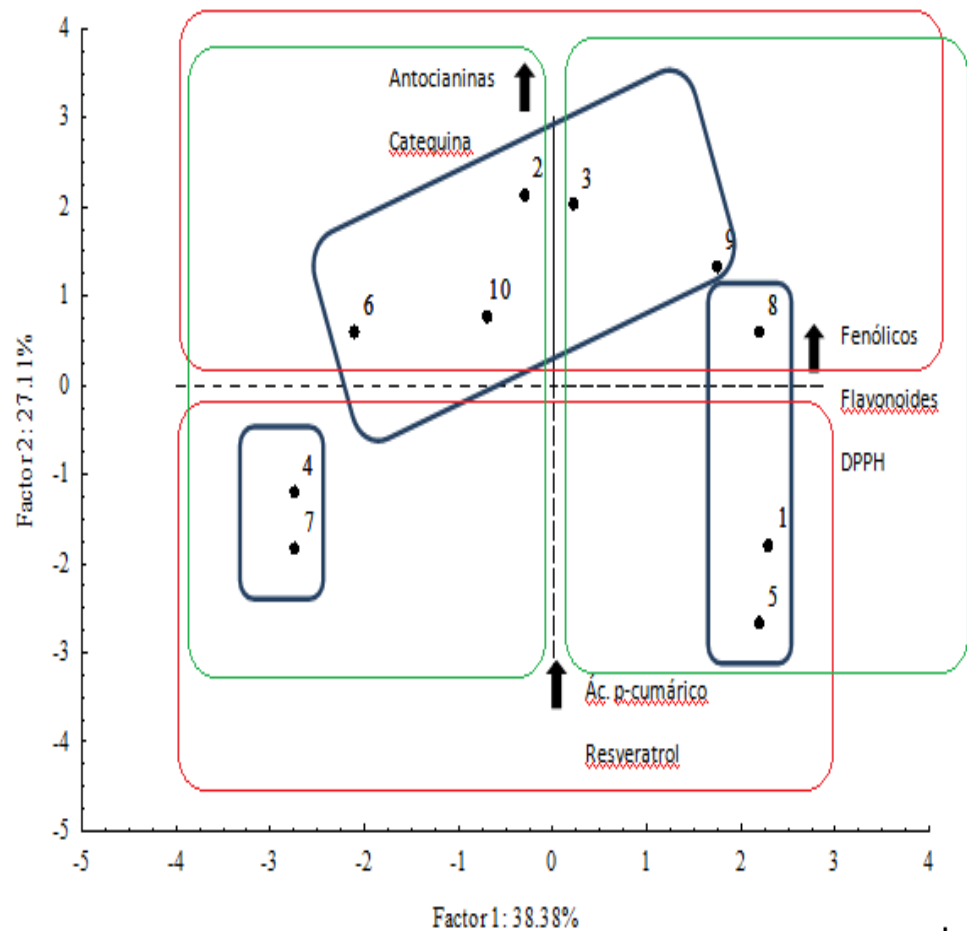


Figura 4 Gráfico de dispersão simples (Fator 1 X Fator 2) sobre as principais fontes de variabilidade de vinhos

A ACP foi aplicada em ordem de avaliar os dados dos principais compostos fenólicos determinados por CLAE, fenóis totais, flavonoides totais, antocianinas monoméricas totais e atividade antioxidante por DPPH para dez diferentes vinhos comercializados no Brasil. O primeiro fator foi capaz de explicar 38,38% da variância total e o segundo explicou 27,11%, totalizando 65,49%. As amostras foram separadas ao longo do primeiro fator pelas diferenças observadas nos fenólicos totais, flavonoides totais, DPPH, e ácido gálico. O segundo fator separou as amostras relacionadas as antocianinas, catequina, ácido p-cumárico e resveratrol.

O gráfico de dispersão simples sugere a localização dos vinhos em relação à composição fenólica e a atividade antioxidante e foi possível observar a formação de três grupos. As amostras localizadas ao longo do lado positivo do fator 1 estão

relacionadas aos maiores teores de fenólicos, flavonoides, DPPH e ácido gálico. Vinhos relacionados ao lado negativo do fator 2 estão relacionado a valores elevados de ácido p-cumárico e resveratrol, enquanto que ao lado positivo do fator 2 ao maior conteúdo de antocianinas e catequina.

A similaridade das amostras também foi avaliada usando análise hierárquica de agrupamentos (AHA) e três grupos foram sugeridos (Figura 5), no qual corroboram com os resultados encontrados pela ACP.

Por meio da separação dos grupos pela AHA, é possível observar que no Cluster 1, estão incluídas as amostras 1,8 e 5 e compreendem as amostras que apresentam maiores teores de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, baixas concentrações de antocianinas e menor capacidade antioxidante.

No Cluster 2, está contido a maioria das amostras que apresentam valores intermediários de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, altos teores de antocianinas totais e maior capacidade antioxidante.

O Cluster 3 foi formado pelas amostras 4 e 7 e representa as amostras com menores concentrações de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, antocianinas e valores intermediários de capacidade antioxidante.

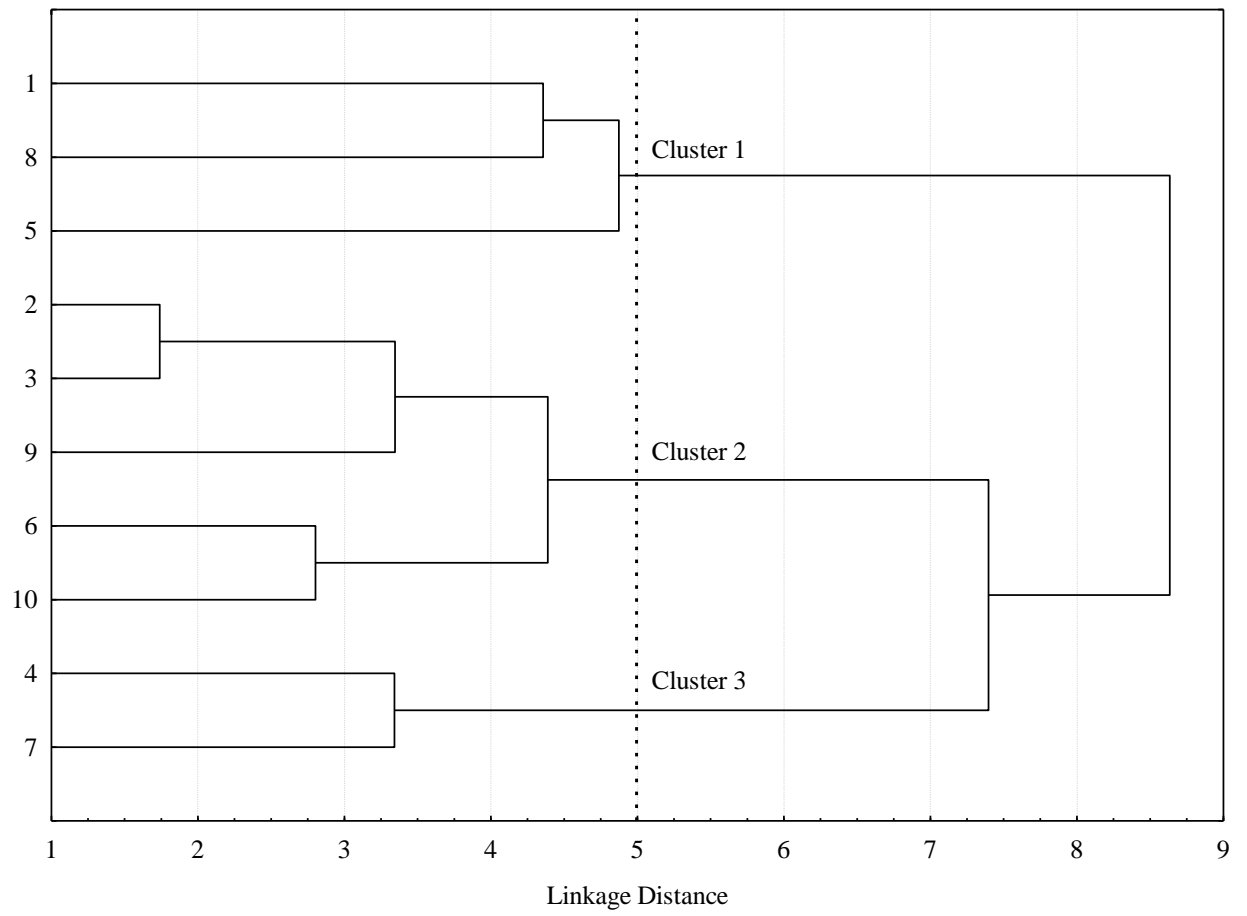


Figura 5 - Dendrograma para os vinhos obtido pela análise hierárquica de agrupamentos (AHA)

6 CONCLUSÃO

De maneira geral os vinhos analisados apresentaram variação no conteúdo de compostos fenólicos e capacidade antioxidante. Sendo assim, pode-se concluir que a uva utilizada para a produção de um vinho participa ativamente na composição fenólica do vinho resultante. Os vinhos das diferentes cultivares analisados apresentaram resultados significativos na composição de compostos fenólicos e capacidade antioxidante demonstrando assim, que o vinho, quando consumido em doses regulares, pode ser uma boa fonte de compostos bioativos, podendo trazer os benefícios que esta classe proporciona.

O conteúdo de compostos fenólicos totais atingiu 2850,66 mg EAG.L⁻¹. A amostra que apresentou maior valor corresponde ao vinho elaborado com a uva Malbec. A análise de flavonóides totais apresentou valor máximo de 962,50 mg EC.L⁻¹, sendo o maior teor encontrado no vinho da variedade Shiraz. O conteúdo de antocianinas atingiu 207,90 mg de cianidina 3-glicosídeo por litro de vinho, sendo maior conteúdo observado no vinho elaborado com a uva Cabernet Sauvignon. Através do método de DPPH pode se encontrar resultados significativos para a atividade antioxidante onde a maior capacidade antioxidante observada (3,57 mg.L⁻¹) foi em uma amostra de vinho elaborado com a uva Merlot.

Os resultados obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência demonstraram que todas amostras possuem ácido gálico em sua composição e grande parte das amostras apresentam concentrações de catequina em maior quantidade em relação aos outros compostos identificados.

As análises estatísticas demonstraram correlações significativas entre os testes químicos e entre alguns dos compostos identificados por CLAE.

A nível de perspectivas futuras um aspecto interessante seria um estudo sobre a variação da composição fenólica em vinhos tintos usando uma gama maior de variedades de uvas.

REFERÊNCIAS

- ALÉN-RUIZ, F.; GARCÍA-FALCÓN, M.S.; PÉREZ-LAMELA, M. C.; MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; SIMAL-GÁNDARA, J. Influence of major polyphenols on antioxidant in Mencía and Brancellao red wines. **Food Chemistry**, v.113, p.53-60, 2009.
- ARCARI, S. G. **Caracterização química de vinhos fortificados produzidos em diferentes regiões do Brasil**. 2010. 198 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. 2010
- CHANG, C.C.; YANG, M.H.; WEN, H.M.; CHERN, J.C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, p. 178-182, 2002.
- DIAS, S. P.; MENEGON, R. F. Comparação do teor de fenólicos totais e da ação antioxidante de sucos industrializados de uva e de vinhos tinto. **Revista Univap**, v.18, n. 32, p.125-133, 2012.
- DIAS, F. S. **Determinação de compostos fenólicos em vinhos e caracterização de vinhos elaborados na região do Vale do São Francisco Pernambuco**. 2010. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração Química Analítica). Universidade Federal da Bahia. 2010
- FREITAS, D. M. **Variação dos compostos fenólicos e de cor dos vinhos de uvas (*Vitis vinifera*) tintas em diferentes ambientes**. 2006. 56 f. Dissertação (Doutorado em agronomia) – Programa de pós-graduação em Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal. Universidade de Santa Maria, Santa Maria, 2006
- GIUSTI, M. M.; WROLSTED, R. E. Anthocyanins: characterization and measurement with UV–visible spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry** (edited by R.E. Wrolstad & S.J. Schwartz). New York: Wiley, p. 1–13, 2001.
- GRANATO, D. **Associação entre atividade antioxidante *in vitro* e características químicas, sensoriais, cromáticas e comerciais de vinhos tintos Sul-Americanos**. 2011. 140 f. Dissertação (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Faculdade de ciências farmacêuticas - Universidade de São Paulo, 2011
- GRANATO, D., KATAYAMA, F. C. U., & CASTRO, I. A. Assessing the association between phenolic compounds and the antioxidant activity of Brazilian red wines using chemometrics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, 1542 e 1549, 2010.

GRIS, E. F. **Perfil fenólico e atividades antioxidantes e hipolipemiante de vinhos de variedades *Vitis vinifera* cultivadas em São Joaquim – SC – Brasil.** 2010. 157 f. Dissertação (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

GUERRA, N. J. M. **Análise do processo de decisão de compra do consumidor de vinho.** 2005. 275 f. Dissertação (Mestrado em Gestão de empresas). Departamento de gestão de empresas – Universidade de Évora. 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radical in biology and medicine.** 3. ed. Oxford: Clarendon. p. 936, 2000.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions.** v.35. p. 1147–1149, 2007.

HAYKIN, S. **Redes Neurais: Princípios e Prática.** 2ª edição. Porto Alegre: Bookman, 2001. 900p.

HAMINIUK, C. W. I.; MACIEL, G. M.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; PERALTA, R. M. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science & Technology,** v. 47, n. 10, p. 2023–2044, out. 2012.

LI, H.; WANG, X.; LI, Y.; LI, P.; WANG, H. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. **Food Chemistry.** v.112, p. 454-460, 2009.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb).** 2008 p. 182. Dissertação (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

MANFROI, V. **Taninos enológicos e goma arábica na composição e qualidade sensorial do vinho Cabernet Sauvignon.** 2007. 133f. Dissertação (Doutorado em Ciências) Universidade Federal de Pelotas, 2007.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITAO, G. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research,** v. 15, p. 127–130, 2001.

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

MULERO, J.; PARDO, F.; ZAFRILLA, P. Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.23, p.569-574, 2010.

ROCKENBACH, I. I. **Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas**. 2008. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

RODRIGUES, J. A. **Determinação da actividade antioxidante e composição fenólica de vinhos portugueses e correlação com parâmetros de cor**. 2011. 143 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa, 2011.

ROS, M. T. M. **Encapsulación de flavonoles em ciclodextrinas: efecto em su actividad antioxidante**. Universidad Católica San Antonio (UCAM). Los Jerónimos, Guadalupe, 2010.

RUSSO, G. L. Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. **Biochemical Pharmacology**, v.74, p. 533-544, 2007.

SCHLEIER, R. **Constituintes fitoquímicos de *Vitis Vinífera L. (uva)***. 2004. 46 f. Faculdade de ciências da saúde de São Paulo – Instituto brasileiro de estudos homeopáticos, 2004

SERUGA, M., NOVAK, Y., JAKOBEK, L. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. **Food Chemistry**, v.124, p. 1208-1216, 2011.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, nº 3, p. 669-682, 2010.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158. 1965.

SOUSA, C. M.; SILVA, H. R.; JUNIOR, G. M. V.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAUJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. v. 30, nº 2, p. 351-355, 2007.

VILLANO, D.; FERNAN DEZ-PACHON, M.S.; TRONCOS, A.M.; GARCIA-PARRILLA, M.C. Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. **Food Chemistry**, v.95, p.394-404, 2006.

ZORZAN, C. **Comparação físico-química e sensorial de vinhos tintos varietais Ancellota e Tannat**. 2006. 81 f. Monografia (Tecnologia em Viticultura e Enologia). Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves. Curso Superior de Tecnologia em Viticultura e Enologia, 2006.