

Olga Brasoveanu

Caracterização do perfil fenólico e atividade biológica de sumos de uvas portuguesas

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelo Professor Doutor Artur Manuel Bordalo Machado Figueirinha e pelo Professor Doutor Fernando Ramos, e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Junho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Imagens da Capa:

BLOG DE ADEGAS E VINHOS - **pinot-noir.png (200×200)** - [Consult. 12 jun. 2018].

Disponível em <http://blog.artdescaves.com.br/hubfs/blog/pinot-noir.png?t=1528369889787>>

FIGUEIRINHA Artur - **Composição Fenólica E Actividade Anti-Inflamatória.**

Coimbra. Universidade de Coimbra, 2011

Olga Brasoveanu

Caracterização do perfil fenólico e atividade biológica de sumos de uvas portuguesas

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelo Professor Doutor Artur Manuel Bordalo Machado Figueirinha e pelo Professor Doutor Fernando Ramos, e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Junho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

"Preferi a ciência ao ouro fino porque a sabedoria vale mais que as pérolas e tudo quanto há de apetecível não lhe pode comprar."

(Anónimo)

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Artur Figueirinha, por ter aceite orientar-me, agradeço todo o apoio prestado e sublinho, de um modo especial, os ensinamentos na área da Farmacognosia que tanto me cativaram e a confiança que depositou em mim em todas as fases deste projeto.

Ao Professor Doutor Fernando Ramos, por me orientar e organizar o meu percurso pela sua disponibilidade para esclarecer e discutir todas as questões que foram surgindo e a partilha do seu espírito científico que contribuiu imenso para a elaboração deste trabalho.

A toda a equipa do laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pela extraordinária simpatia com que me acolheram, principalmente à Patrícia, que me ajudou, me apoiou e me incentivou a continuar.

À “Quinta dos Murças” pela oportunidade e experiência incrível que me proporcionaram, pela ajuda e cooperação, pela disponibilização das instalações e pela simpatia e acolhimento.

Ao Empresário Jorge Manuel Ferreira Rama da Adega J. Rama Lda. De Santa Luzia-Mealhada, pelas amostras disponibilizadas, pelo interesse e entusiasmo por este tema e pela confiança que depositaram em mim.

Às minhas “colegas de casa” e amigas, Teresa e Filipa: a ti Teresa por teres sempre seguido do meu lado o mesmo rumo, por me fazeres rir, por estares sempre disposta a ouvir, a aconselhar e pela tua leal amizade; a ti Filipa pela paciência e pela alegria, pelas histórias partilhadas, pelas conversas inacabáveis e pelo teu carinho e amizade verdadeira. Obrigada a vocês porque viveram comigo durante estes 5 anos, pelas aventuras e loucuras mas também pelo respeito e humildade.

Ao meu namorado, ao Paulo, que com tantos sorrisos por aí procurou sempre o meu, pela paciência, amor, carinho e honestidade, mas principalmente pela compreensão e por me fazeres querer cada dia ser alguém maior.

Agradeço, principalmente, aos meus amados pais que acreditaram em mim e lutaram para que eu pudesse conquistar o título de Mestre. Foram incansáveis, e por isso, tenho um enorme obrigada para lhes dizer. Estas palavras dedico também à minha irmã, Cristina, que foste sempre o meu apoio e cúmplice, desde o primeiro dia de escola até hoje porque te orgulhaste sempre da tua “mana mais nova”.

Por fim, agradeço também a todo o resto da minha família, que de longe me apoiaram e nos momentos marcantes perto estiveram para se orgulharem de mim. A todas as pessoas que durante este percurso me acompanharam, me deram força e torceram por mim e pela concretização desta etapa.

Índice

Abreviaturas	ix
Resumo	xi
Abstract	xii
Capítulo I	13
Introdução.....	13
1.1. Consumo de sumos de fruta e/ou vegetais em Portugal.....	13
1.2. Sumo de uva	14
1.3. Transformação de uvas em sumo de uva	15
1.4. Atividade antioxidante dos polifenóis	15
1.5. Classificação estrutural dos compostos fenólicos.....	16
1.5.1. Fenóis simples (C6).....	16
1.5.2. Ácidos fenólicos e derivados	17
1.5.3. Estilbenos (C6-C2-C6).....	18
1.5.4. Flavonóides (C6-C3-C6).....	19
1.5.4.1. Flavanonas e Flavanonóis	20
1.5.4.2. Flavonas e Flavonóis.....	22
1.5.4.3. Antocianidinas	22
1.5.5. Taninos.....	23
1.5.5.1. Taninos condensados.....	24
1.5.5.2. Taninos hidrolisáveis.....	25
1.5.5.3. Taninos complexos	26
1.6. Perfil fenólico e distribuição nas uvas.....	26
1.7. Atividades biológicas	31
1.7.1. Atividade antioxidante.....	32
1.7.2. Proteção cardiovascular.....	34
1.7.3. Efeitos antivirais, antibacterianos e antifúngicos	36
1.7.4. Efeito anti tumoral.....	37
1.7.5. Efeito neuroprotetor	39
1.7.6. Efeito anti-inflamatório.....	40
1.7.7. Efeito anti envelhecimento	41
1.7.8. Outros efeitos	42
1.7.8.1. Redução do dano genómico em pacientes submetidos à hemólise.....	42
1.8. Uvas Nacionais.....	42
1.9. Amostras em estudo	45
1.9.1. Fernão Pires (B)	45
1.9.2. Pinot Noir (T)	46

Capítulo 2.....	47
Capítulo 3.....	48
Experimental.....	48
Materiais e Métodos.....	48
3.1. Preparação das amostras	48
3.2. Determinação do resíduo seco.....	48
3.3. Fracionamento dos sumos de uva	48
3.4. Análise Fitoquímica.....	51
3.4.1. Dosagem de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu	51
3.4.2. Cromatografia em camada fina (TLC).....	51
3.4.3. Cromatografia líquida de alta resolução com detetor Fotodíodo (HPLC/PDA).....	52
3.4.4. Cromatografia líquida de alta resolução com detetor de espectrometria de massa (HPLC/ESI/TOF).....	53
3.5. Ensaio de determinação da atividade antioxidante	54
3.5.1. Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS.....	54
3.5.2. Determinação da atividade antioxidante pelo método 2,2- difenil-1 picril-hidrazilo (DPPH)	55
3.5.3. Poder redutor (FRAP)	56
Capítulo 4.....	57
Resultados e Discussão.....	57
4.1. Determinação do resíduo seco dos sumos das castas <i>Fernão Pires (B)</i> e <i>Pinot Noir (T)</i>	57
4.2. Dosagem de fenóis totais.....	57
4.3. Caracterização Fitoquímica dos sumos de uva de castas portuguesas <i>Fernão Pires</i> e <i>Pinot Noir</i>	58
4.3.1 Caracterização Fitoquímica das frações e subfrações obtidas do sumo de uva branca da casta <i>Fernão Pires</i>	59
4.3.2. Caracterização Fitoquímica das frações e subfrações obtidas do sumo de uva tinta da casta <i>Pinot Noir</i>	73
4.4. Avaliação da atividade antioxidante.....	84
Capítulo 5.....	87
Conclusão	87
Capítulo 6.....	89
Perspetivas Futuras	89
Capítulo 7.....	90
Bibliografia.....	90

Índice de Figuras

Figura 1. Fenóis simples.....	17
Figura 2. Exemplos de Ácidos hidroxibenzóicos.....	17
Figura 3. Ácidos hidroxicinâmicos.....	18
Figura 4. Exemplos dos principais estilbenos.....	19
Figura 5. Estrutura das flavanonas (a) e flavanonóis (b).....	20
Figura 6. Estrutura dos flavanóis.....	21
Figura 7. Exemplos de estruturas de flavanóis.....	21
Figura 8. Catequina esterificada com ácido gálico.....	22
Figura 9. Estrutura exemplo de flavonas e flavonóis.....	22
Figura 10. Estruturas de antocianidinas.....	23
Figura 11. Classificação dos taninos.....	24
Figura 12. Exemplos de taninos condensados.....	24
Figura 13. Tanino hidrolisável: 2-O-digalhoil-1,3,4,6-tetra-O-galhoil- β -D-glucopiranoose.....	25
Figura 14. Configurações dos elagitaninos.....	25
Figura 15. Acutissimina A.....	26
Figura 16. Diferentes grupos químicos de polifenóis nas diferentes partes da planta.....	27
Figura 17. Bioatividades dos polifenóis das uvas.....	32
Figura 18. Infecção fúngica por <i>Botrytis cinerea</i> em bagos.....	37
Figura 19. Oídio em folhas de <i>Vitis Vinifera</i>	37
Figura 20. Efeito de diferentes concentrações de 3,5-dimetoxi-resveratrol na transição morfogénica de fermento-hifa de <i>Candida albicans</i>	37
Figura 21. Polifenóis extraídos das uvas induzem a diferenciação de adipócitos.....	40
Figura 22. Mapa de Portugal e regiões vitivinícolas.....	43
Figura 23. Uvas da casta Fernão Pires.....	45
Figura 24. Uvas da casta Pinot Noir.....	46
Figura 25. Esquema resumo do fracionamento dos sumos de uva analisados.....	49
Figura 26. TLC em sílica gel, revelado com (A) NP/PEG a 366 nm e com (B) DPPH da fase aquosa e orgânica do sumo de uva branca. FAB-fração aquosa do sumo de uva branca; FOB-fração orgânica da extração do sumo de uva branca.....	59
Figura 27. TLC em sílica gel, revelado com (A) cloreto de ferro e com (B) ácido clorídrico da FOB.....	59
Figura 28. Cromatograma da FOB, obtido por HPLC/PDA.....	61
Figura 29. Espetros da FOB, obtidos por HPLC/PDA.....	63
Figura 30. TLC resultantes da aplicação de alíquotas das principais frações da FAB. (A) Revelação com o reagente NP/PEG (366nm) para identificação de compostos fenólicos; (B) revelação com cloreto de ferro 3% para identificação de taninos; (C) revelação com HCl 0,1N para identificação de antocianinas; (D) revelação com DPPH para observação da intensidade da atividade biológica.....	67
Figura 31. Cromatograma da subfração 4B da FAB, obtido por HPLC/PDA.....	68
Figura 32. Espetros da subfração 4B da FAB, obtido por HPLC/PDA.....	69
Figura 33. Cromatograma da subfração 5B da FAB, obtido por HPLC/PDA.....	69
Figura 34. Espetros da subfração 5B da FAB, obtidos por HPLC/PDA.....	70
Figura 35. Cromatograma da subfração 6B da FAB, obtido por HPLC/PDA.....	70
Figura 36. Espetros da subfração 6B da FAB, obtidos por HPLC/PDA.....	71
Figura 37. TLC obtida após aplicação da FAT e FOT e revelação com (A) NP/PEG a 366 nm e com (B) DPPH. FAT-fração aquosa de sumo de uva tinta; FOT-fração orgânica da extração do sumo de uva tinta.....	73
Figura 38. TLC em sílica gel, revelado com (A) cloreto de ferro e com (B) ácido clorídrico da FOT.....	74
Figura 39. Cromatograma da FOT, obtido por HPLC/PDA.....	75

Figura 40. Espectros da FOT, obtidos por HPLC/PDA.....	76
Figura 41. TLC das subfrações 4,5,6 resultantes da SPE da FAT e FOT. (A) Revelação com o reagente NP/PEG (366nm); (B) revelação com cloreto de ferro 3%; (C) revelação com HCl 0,1N; (D) revelação com DPPH.	78
Figura 42. Cromatograma da subfração 4T da FAT, obtido por HPLC/PDA.....	79
Figura 43. Espectros da subfração 4T da FAT, obtidos por HPLC/PDA.....	80
Figura 44. Cromatograma da subfração 5T da FAT, obtido por HPLC/PDA.....	81
Figura 45. Espectros da subfração 5T da FAT, obtidos por HPLC/PDA.....	81
Figura 46. Cromatograma da subfração 6T da FAT, obtido por HPLC/PDA.....	82
Figura 47. Espectros da subfração 6T da FAT, obtidos por HPLC/PDA.....	83

Índice de Tabelas

Tabela 1. Classificação estrutural dos principais flavonóides identificados nas uvas.....	20
Tabela 2. Caracterização de sumo de uva quanto ao perfil fenólico descrito por vários autores e recorrendo a ensaios distintos.....	30
Tabela 3. Resultados da medição da Temperatura e °Bé durante a fermentação de dois sumos de uva, até término da mesma.....	44
Tabela 4. Volumes corridos e volumes recolhidos na coluna C18 da fase aquosa de sumo de uva branca e tinta.....	50
Tabela 5. Gradiente utilizado no sistema HPLC para análise das amostras de sumo de uva.	52
Tabela 6. Solvente utilizado para dissolver os padrões.....	53
Tabela 7. Gradiente utilizado no sistema HPLC/ESI/TOF para análise das amostras de sumo de uva.	53
Tabela 8. Massa das alíquotas analisadas.	57
Tabela 9. Determinação do teor de fenóis totais nas alíquotas analisadas.	57
Tabela 10. Comportamento dos fitoconstituintes das frações orgânica (FOB) e aquosa (FAB) de sumo de uva branca da casta Fernão Pires em TLC com diferentes reveladores.....	60
Tabela 11. Picos do cromatograma, tempo de retenção, possível classe fenólica a que pertencem os compostos comprimentos de onda máximos dos espectros dos mesmos, presentes na FOB.....	64
Tabela 12. Tentativa de identificação de compostos presentes na FOB, resultados obtidos por HPLC/ESI/TOF.....	65
Tabela 13. Picos do cromatograma, tempo de retenção, classe fenólica e comprimentos de onda máximos dos espectros dos compostos, presentes nas várias frações aquosas do sumo de uva branco.	72
Tabela 14. Tempo de retenção e comprimentos de onda máximos dos espectros dos padrões injetados.	73
Tabela 15. Comportamento dos fitoconstituintes das frações orgânica (FOT) e aquosa (FAT) de sumo de uva tinto da casta Pinot Noir em TLC com diferentes reveladores.....	74
Tabela 16. Picos do cromatograma, tempo de retenção, classe fenólica e comprimentos de onda máximos dos espectros dos compostos, presentes na fração orgânica do sumo de uva tinta (FOT)...	77
Tabela 17. Tentativa de identificação de compostos presentes na FOT, resultados obtidos por HPLC/ESI/TOF.....	77
Tabela 18. Picos do cromatograma, tempo de retenção e comprimentos de onda máximos dos espectros dos compostos, presentes nas várias subfrações aquosas do sumo de uva tinta.....	83
Tabela 19. Comparação dos resultados para a atividade antioxidante, expressa em TEAC (mg resíduo/mL de mistura reacional), obtidos por diferentes ensaios (média ± desvio padrão dos ensaios realizados em triplicado).	84

Abreviaturas

ABTS – ácido 2,2'-azino-bis-3 etilbenzotiazolína-6-sulfónico

AD – demência por Alzheimer

AOM – azoximetano

Apo B – apolipoproteína B

Apo I – apolipoproteína A I

Apo II – apolipoproteína A II

A β – beta-amilóide

B – sumo de uva branca da casta *Fernão Pires*

BAP – Balança Alimentar Portuguesa

Bé – Baumé

CE – Comissão Europeia

c-Jun – proteína c-Jun

DCV – doença cardiovascular

DNA – ácido desoxirribonucleico

DPPH – radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EBV – vírus Epstein-Barr

Elk-1 – proteína Elk-1

ER- α – recetor alfa dos estrogénios

MS/ESI-TOF – Espectroscopia de Massa por Ionização por Eletrospray com Analisador do tipo "Time of Fly"

FICA – atividade quelante dos iões ferrosos

FRAP – poder redutor

GAE – equivalentes de ácido gálgico

GLUT 4 – transportador de glucose tipo 4

Hcy – homocisteína

HCV – vírus da hepatite C

HDL – lipoproteína de alta densidade

HDL-c – lipoproteína de alta densidade - colesterol

HIV – vírus da Imunodeficiência Humana

HPLC/PDA – Cromatografia Líquida de Alta Resolução com Detetor Fotodiodo

HSV – vírus herpes simplex

iNOS – sintase do óxido nítrico

JNK – proteína JNK
LDL – lipoproteínas de baixa densidade
LDL-c – lipoproteínas de baixa densidade - colesterol
LG – lagar
MDCK – células Madine-Darbi Canine Kidney
MIC – concentração mínima inibitória
m/z – massa/carga
NF-Kb – fator de transcrição nuclear kappa B
o- orto
PI3K – fosfoinositídeo 3-quinase
PP● – radical polifenol fenoxilo
p – para
PPAR γ – recetor ativado por proliferadores de peroxissomo gama
PPH – antioxidantes fenólicos
p38 – proteína p38
ROO● – Radical peroxilo
ROOH – Hidroperóxido de alquilo
ROS – Espécies reativas de oxigénio
RP/HPLC/DAD – cromatografia líquida de alta performance de fase reversa com detetor de fotodíodo
SARS-CoV – coronavirus
T – sumo de uvas tintas da casta *Pinot Noir*
TBARS – substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TGI – Target Group Index
TIC – corrente total de iões do ingles “*Total Ion Current*”
TNF- α – fator de necrose tumoral alfa
T° – temperatura em graus
UA – unidades arbitrárias
UV – ultravioleta
Vis – visível
% vol. – volume alcoólico
 $\lambda_{\text{máx}}$ – comprimento de onda máximo

Resumo

O presente trabalho de investigação visou, determinar, o perfil fenólico do sumo de uva proveniente de uvas nacionais e algumas das suas atividades biológicas.

Sabe-se que as uvas são frutos que contêm compostos com atividade antioxidante relevante e que o vinho produz efeitos benéficos, principalmente ao nível da saúde cardiovascular, embora o seu teor alcoólico obrigue a limitar o seu consumo. Neste sentido pretendeu-se avaliar se o sumo de uvas de origem portuguesa (*Fernão Pires* e *Pinot Noir*) apresentava os mesmos benefícios para a saúde humana, quais os compostos responsáveis por essa ação e em que proporções estavam presentes. Para tal, foram utilizadas amostras de sumo de uva congeladas desde a época das vindimas, de uma adega da região da Bairrada (Adega J. Rama, Lda.). A atividade antioxidante foi determinada por meio de ensaios químicos (DPPH, ABTS, FRAP). A caracterização fitoquímica foi realizada por HPLC/DAD/ESI/MS/TOF e por outras metodologias analíticas.

Os resultados da análise fitoquímica caracterizaram os sumos de uvas brancas e de uvas tintas em fenóis totais, com valores $520 \pm 0,003$ e $140 \pm 0,004$ mg/L, respetivamente. A atividade antioxidante, obtida pelos vários métodos, mostrou maior potencial para o sumo obtido a partir da casta *Fernão Pires*, ao invés do sumo de uva obtido da casta *Pinot Noir*.

Observou-se maioritariamente a presença de compostos polares, como são exemplo os ácidos fenólicos. Ainda foi possível identificar taninos do tipo hidrolisável e condensado, alguns flavonóides e antocianidinas.

Os compostos que parecem ter um papel mais importante na atividade antioxidante são, principalmente os ácidos hidroxibenzóicos.

Nesse sentido, o sumo de uva pode-se considerar um produto alimentar alternativo ao vinho, dado o seu potencial fitoquímico e desta forma evitar o consumo de álcool.

Palavras-chave: atividade antioxidante, caracterização fitoquímica, sumos de uvas portuguesas, *Pinot Noir*, *Fernão Pires*.

Abstract

The present research aims to determine the phenolic profile of grape juice from national grape varieties and some of their biological activities.

It is known that grapes are fruits with relevant antioxidant activity and that wine produces beneficial effects, mainly in terms of cardiovascular health, although its alcoholic content obliges to limit its consumption. In this sense, we intend to evaluate if the juice of grapes of Portuguese origin (*Fernão Pires* and *Pinot Noir*) has the same benefits for human health, the compounds responsible for this action and in what proportion are present. For this purpose, grape juice samples frozen from the grape harvest season will be used in the wineries of the Bairrada region (J. Rama, Lda.). The antioxidant activity will be determined by means of chemical tests (DPPH, ABTS, FRAP). The phytochemical characterization will be performed by HPLC/PDA/ESI/MS/TOF and other analytical methodologies.

The results of phytochemical analysis characterized the white and red grapes juices in total phenols, with values of 0.52 ± 0.003 and 0.14 ± 0.004 mg / mL, respectively. The antioxidant activity, obtained by the various methods, showed greater potential for the juice obtained from the *Fernão Pires* grape variety, instead of the grape juice obtained from the *Pinot Noir* grape variety.

The presence of polar compounds, such as phenolic acids, was observed. It was still possible to identify tannins of the hydrolyzable and condensed type, some flavonoids and anthocyanidins.

Compounds which appear to play a more important role in the antioxidant activity are mainly hydroxybenzoic acids.

In this sense, grape juice can be considered an alternative food product to wine, given its phytochemical potential and thus avoid alcohol consumption.

Key words: antioxidant activity, phytochemical characterization, grape juice of Portuguese origin, *Fernão Pires*, *Pinot Noir*.

Capítulo I

Introdução

1.1. Consumo de sumos de fruta e/ou vegetais em Portugal

Os hábitos de estilo de vida saudável estão na moda em todo o mundo e o marketing tem estimulado cada vez mais o consumo de frutas e vegetais. Esta tendência também se tem observado no nosso país uma vez que os portugueses parecem também já ter aderido ao consumo de sumos naturais.

O Target Group Index (TGI) é um grupo de estudo de origem britânica com o objetivo de identificar, conhecer e segmentar o consumidor de acordo com os seus consumos, posse de bens e serviços. Em Portugal, o universo de análise do TGI é composto pelos indivíduos com idade igual ou superior a 15 anos, residentes em Portugal Continental. A sua base amostral é constituída por cerca de 5000 entrevistas por ano e o método de amostragem utilizado é o de estratificação geográfica (Região e Distrito). A seleção do elemento amostral é feita através do método de quotas.

De acordo com os dados do estudo TGI da Marktest, 4,2 milhões de portugueses consumiram sumos de fruta ou vegetais líquidos nos últimos 12 meses do ano 2015, o que representa 48,8% dos residentes no Continente Português com idade igual ou superior a 15 anos.

As mulheres são as principais consumidoras dos sumos de fruta e vegetais, com uma percentagem igual a 51,6% contra 45,6% de consumo nos homens. Quanto à idade, é entre os 25 e os 44 anos que o consumo destes sumos é mais expressivo, sendo que os residentes na Grande Lisboa, assim como os indivíduos das classes mais elevadas também registam uma taxa de consumo superior à média, de 55,9% e 60,8%, respetivamente.¹

A conclusão da Balança Alimentar Portuguesa (BAP) entre 2012 e 2016, divulgada em 2017 pelo Instituto Nacional de Estatística, que, a partir da análise aos produtos alimentares disponíveis para consumo, permitiu calcular a forma como os portugueses se alimentaram nestes últimos anos. Sendo que o que se concluiu foi que o consumo de hortícolas representava 15% dos alimentos consumidos, em 2012, e passou para os 16,2%, em 2016; o peso dos frutos aumentou de 11,7% para 12,7% e quanto às leguminosas secas aumentaram ligeiramente de 0,5 para 0,6%.

No entanto, apesar das melhorias, cada português ingere em média quase o dobro das calorias recomendadas, isto provavelmente devido às disponibilidades alimentares para consumo no período 2012-2016 que continuam a evidenciar uma oferta alimentar excessiva e desequilibrada que tem vindo a afastar-se progressivamente do padrão alimentar mediterrânico.^{2,3}

1.2. Sumo de uva

Existem já evidências científicas consideráveis de que uma dieta rica em frutas e vegetais pode melhorar a saúde humana e proteger contra doenças crónicas. Porém, saber se os efeitos benéficos são distintos conforme o consumo de diferentes frutas e vegetais é uma questão que não está ainda totalmente esclarecida.⁴

A dieta e nutrição tem sido uma das estratégias preventivas mais efetivas na prevenção do cancro. Estudos epidemiológicos estabelecem uma correlação inversa entre a ingestão de vegetais e frutas e a incidência de cancro da mama e ainda alguns estudos experimentais substanciais indicam que muitos produtos naturais da dieta que contêm compostos bioativos como soja (genisteína e daidzeína), romã (ácidos fenólico, elagitaninos), citrinos (naringina), maçã (2 α -hidroxiurólise, polifenóis), uva (antocianinas e outros polifenóis), gengibre (6-gingerol, 6-shogaol, 6-dehigrogingerdiona), alho (compostos organosulfurados), macro fungos comestíveis (polissacarídeos), cereais (farinha de trigo germinada), etc., podem afetar o desenvolvimento e a progressão do cancro da mama. Os seus efeitos envolvem vários mecanismos de ação tais como por exemplo a regulação negativa da expressão e atividade do recetor alfa dos estrogénios (ER- α), a inibição da proliferação, a migração, a metástase e a angiogénese das células tumorais da mama, induzindo a apoptose e a prisão do ciclo celular e sensibilizando as células tumorais da mama para a radioterapia e quimioterapia.⁵

A uva constitui uma das maiores culturas de fruta do mundo depois da banana, melancia e maçã. Em 2014, a produção mundial foi de cerca de 75 milhões de toneladas, dos quais cerca de 21 milhões de toneladas de uva de mesa. Na Europa, a produção de uva de mesa (cerca de 2,3 milhões de toneladas) permanece concentrada em áreas de tipo mediterrânico e os quatro principais produtores são a Itália (62%), Espanha (14%), Grécia (13,5%) e França (2,2%).⁶

As uvas, *Vitis vinifera* constituem uma das maiores fontes de compostos fenólicos de entre os diferentes frutos, sendo considerados responsáveis por efeitos benéficos na saúde, nomeadamente em algumas doenças degenerativas.⁷

Sabe-se que as uvas são frutos com atividade antioxidante relevante e que o vinho produz efeitos benéficos, principalmente ao nível da saúde cardiovascular e que constitui o mundialmente designado “paradoxo francês”, embora o seu teor alcoólico obrigue a limitar o seu consumo.⁸ Neste sentido pretende-se avaliar se o sumo de uvas de origem portuguesa apresenta os mesmos benefícios que o vinho, para a saúde humana, quais os compostos responsáveis por essa ação e em que quantidades estão presentes.

1.3. Transformação de uvas em sumo de uva

Segundo o Regulamento (CE) n.º 1308/2013, do Parlamento Europeu e do Conselho, Anexo II - Parte IV, n.º 6, o sumo de uva é o líquido não fermentado, mas fermentescível obtido por tratamentos adequados a fim de ser consumido; a partir de uvas frescas, de mosto ou por reconstituição a partir de sumo ou mosto de uvas concentrado. Para este produto é admitido um título alcoométrico adquirido não superior a 1% vol.⁹

A transformação das uvas poderá ser feita, por exemplo, por prensagem das mesmas. A manutenção das uvas a baixas temperaturas tem-se revelado uma boa estratégia para manter as condições organoléticas e físico-químicas inalteradas. Sendo extremamente importante que, durante o processo de transformação das uvas não se inicie a fermentação do sumo, garantindo assim um título alcoométrico adquirido não superior ao valor definido pelo Regulamento mencionado anteriormente.¹⁰

1.4. Atividade antioxidante dos polifenóis

Os compostos polifenólicos constituem uma das mais vastas categorias de fitoquímicos, distribuídos de forma variada pelas plantas fazendo parte da dieta humana.¹¹ A ingestão elevada de frutas, vegetais e grãos integrais, ricos em polifenóis, tem sido associada à redução do risco de muitas doenças crónicas, nomeadamente cancro, doenças cardiovasculares, inflamação crónica e muitas doenças degenerativas.¹²

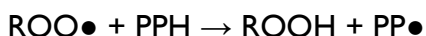
Estruturalmente são compostos contendo pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilo como substituintes que, por sua vez, podem estar na forma livre ou, comumente glicosilados ou esterificados.¹³ Estes metabolitos secundários das plantas, têm

um poder antioxidante importante e dependente da sua estrutura química podendo comportar-se como agentes redutores, como antioxidantes doadores de átomos de hidrogénio e ainda como captador de radicais livres de oxigénio.¹⁴ Alguns polifenóis atuam ainda como antioxidantes por causa das suas propriedades quelantes, consequentemente, reduzindo a capacidade de iões metálicos poderem gerar radicais livres.

Para que qualquer polifenol seja definido como antioxidante deve satisfazer as duas seguintes condições:

- Quando está em baixa concentração relativamente ao substrato a ser oxidado, este pode retardar, atrasar ou prevenir a auto oxidação ou a oxidação provocada por radicais livres.
- O radical resultante formado da captação de outro radical, deve ser estável para interromper a oxidação da cadeia de reação.

Os antioxidantes fenólicos (PPH) inibem a peroxidação lipídica por doação de um átomo de hidrogénio ao radical peróxido (ROO●) resultando na formação de hidroperóxido de alquilo (arilo) (ROOH), como ilustrado na seguinte reação:



O radical polifenol fenoxilo (PP●) produzido pode ser estabilizado por uma subsequente doação de um átomo de hidrogénio e formação de quinonas (C₆H₄O₂), ou reagindo com outro radical, inclusive outro radical fenoxilo, interrompendo assim a iniciação de uma reação em cadeia.¹¹

1.5. Classificação estrutural dos compostos fenólicos

Dado que existem inúmeros compostos fenólicos na natureza e por isso vastos grupos que os classificam, neste trabalho far-se-á uma abordagem mais genérica apenas das classes de compostos fenólicos que, segundo a literatura, são mais características da composição das uvas e seus derivados.

1.5.1. Fenóis simples (C6)

Estes são os derivados de fenóis mais comuns na natureza e a sua atividade antioxidante depende da posição do grupo hidroxilo. São, normalmente, derivados de pirogalhol e floroglucinol, tri-hidroxilados, mas também existem derivados di-hidroxilados,

tais como catecol, resorcinol e hidroquinona. Alguns estudos defendem que o grupo catecol é o que apresenta maior atividade antioxidante, seguido do grupo da hidroquinona e resorcinol.¹⁵

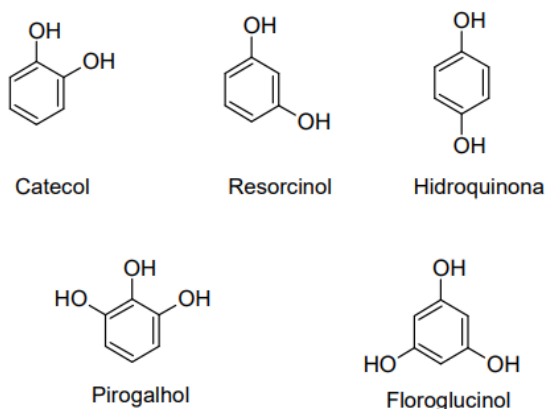


Figura 1. Fenóis simples.⁷

1.5.2. Ácidos fenólicos e derivados

Os ácidos hidroxibenzoicos (C6-C1) caracterizam-se pela presença de um grupo funcional carboxilo no anel fenólico. Este anel pode ser mono-hidroxilado (ácido *o*-hidroxibenzoico - ácido salicílico, ácido *p*-hidroxibenzoico), di-hidroxilado (ácido protocatéquico) ou tri-hidroxilado (ácido gálico), podendo-se encontrar metilados alguns hidroxilos fenólicos, como no ácido vanílico e siríngico. Os mais comuns nas plantas são o ácido gálico e o ácido protocatequico.¹⁵ Os ácidos benzoicos encontram-se frequentemente esterificados com oses, nomeadamente a glucose ou podem ocorrer sob a forma de polímeros.¹⁵

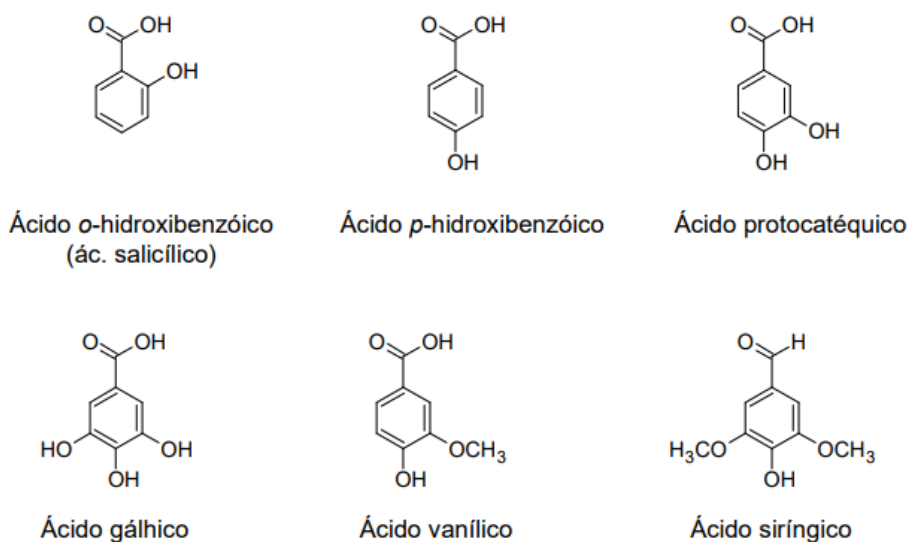


Figura 2. Exemplos de Ácidos hidroxibenzoicos.⁷

Já os ácidos hidroxicinâmicos (C6-C3) derivam do ácido cinâmico, por adição de grupos hidroxilo ao anel aromático. A existência da dupla ligação na cadeia lateral faz com que existam dois isómeros possíveis: *cis* e *trans*. São exemplo de ácidos hidroxicinâmicos: o ácido *p*-cumárico (mono-hidroxilado), o ácido cafeico (di-hidroxilado), e também derivados metoxilados, como o ácido ferúlico, ácido 5-hidroxiferúlico e o ácido sinápico. Tal como os outros ácidos fenólicos, os ácidos hidroxicinâmicos encontram-se frequentemente esterificados com hidroxilos alcoólicos ou fenólicos.¹⁵

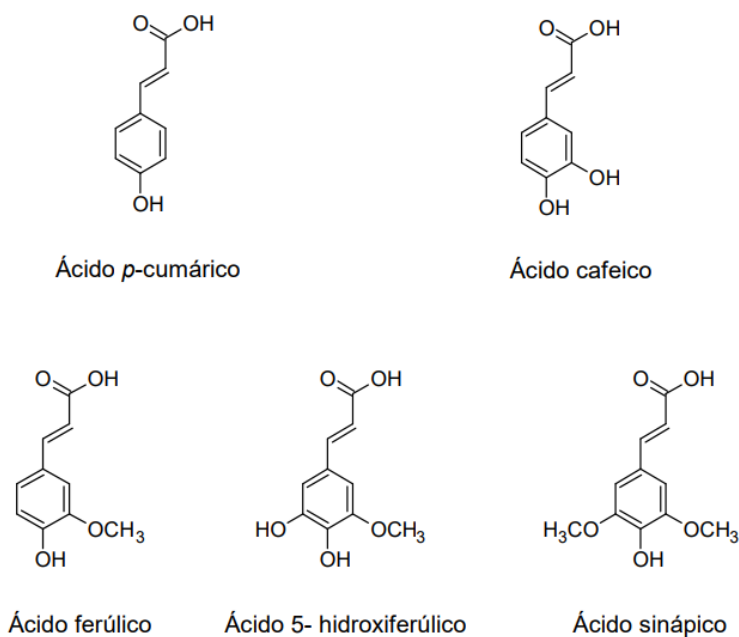


Figura 3. Ácidos hidroxicinâmicos.⁷

Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam maior atividade antioxidante que os ácidos hidroxibenzóicos com o mesmo número de grupos hidroxilo. Isto deve-se ao facto da cadeia lateral, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$, assegurar uma mais fácil doação do hidrogénio e estabilização do radical, por ressonância, do que o grupo $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ dos ácidos hidroxibenzóicos.

A atividade antioxidante dos ácidos hidroxicinâmicos depende do número de hidroxilos fenólicos. Os ácidos di-hidroxilados, como o cafeico e clorogénico, são mais ativos que os mono-hidroxilados, como o ácido cumárico. A posição dos hidroxilos também tem influência.¹⁵

1.5.3. Estilbenos (C6-C2-C6)

Os estilbenos são fitoalexinas, compostos produzidos pelas plantas em resposta ao ataque por agentes patogénicos tais como fungos, bactérias e vírus. Existem nas plantas na

forma monomérica, dimérica, trimérica e polimérica e também sob a forma de glicósidos. O estilbeno mais comum é o resveratrol, do qual existem dois isômeros: *cis* e *trans* sendo que este último ocorre, normalmente, sob a forma de um glicósido, o *trans*-resveratrol-3-O-glucósido que origina, por polimerização, as viniferinas.¹⁵

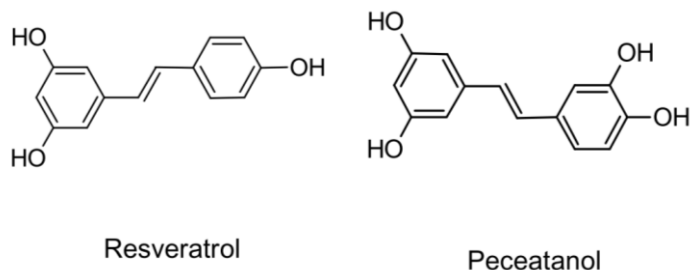


Figura 4. Exemplos dos principais estilbenos.⁷

Os estilbenos são pouco comuns nas plantas mas é o resveratrol e o seu metabolito principal, *trans*-resveratrol, que constituem os compostos mais abundantes desta classe, encontrados nas uvas e conseqüentemente no vinho.¹⁵

1.5.4. Flavonóides (C6-C3-C6)

O grupo dos flavonóides compreende compostos com estrutura C6-C3-C6, constituídos por dois anéis aromáticos (A e B) ligados por uma cadeia de 3 carbonos, que pode eventualmente formar um terceiro anel (C), sendo que este é subdividido em várias subclasses de acordo com a presença e estrutura do anel C, bem como da posição do anel B. As variações estruturais incluem a existência de saturações ou insaturações no anel C, bem como a presença de grupos hidroxilo e/ou carbonilo no mesmo anel, como se esclarece na tabela I.^{7,16} Os flavonóides têm a capacidade de associar entre si, mas também com oses e ácidos orgânicos. Nas plantas ocorrem normalmente na forma glicosilada, geralmente com a glucose ou ramnose, embora também se possam ligar com a galactose, arabinose, xilose, ácido glucurônico ou outros açúcares. O número de oses ligadas varia geralmente entre uma a três, porém já foram identificados flavonóides com quatro frações glicosiladas.¹⁶

Tabela I. Classificação estrutural dos principais flavonóides identificados nas uvas.⁷

Classe	Estrutura
Flavanonas	Anel C saturado com grupo carbonilo em C4
Flavanonóis	Anel C saturado com grupo carbonio em C4 e hidroxilado no carbono 3
Flavonas	Anel C com grupo carbonilo e dupla ligação em C2-C3
Flavonóis	Anel C com grupo carbonilo, dupla ligação em C2-C3 e hidroxilo em C3
Flavanóis	Anel C saturado, sem o grupo carbonilo e hidroxilado no carbono 3
Antocianidinas e desoxiantocianidinas	Anel C do tipo pirílio

1.5.4.1. Flavanonas e Flavanonóis

As flavanonas, também chamadas di-hidroflavonas possuem o anel C saturado, uma função carbonilo em C4 e o anel B ligado em C2. Os flavanonóis (3-di-hidroflavonóis) diferem das flavanonas pela presença de um hidroxilo na posição 3.¹⁵

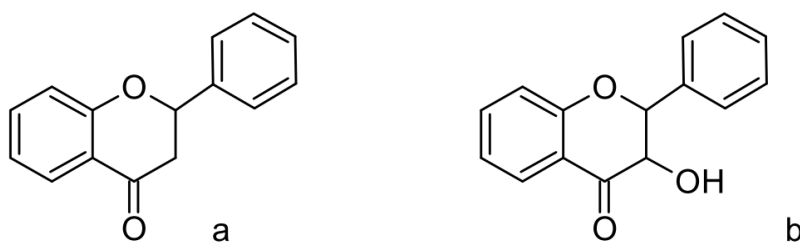


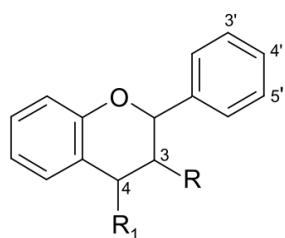
Figura 5. Estrutura das flavanonas (a) e flavanonóis (b).⁷

A ausência da dupla ligação C2-C3 característica das flavanonas faz com que estas apresentem menor atividade anti-inflamatória que outros grupos de flavonóides.

Os flavanonóis são importantes intermediários na síntese de flavonóis e de antocianinas.⁷

A atividade antioxidante dos flavanonóis é superior à das flavanonas devido à presença do hidroxilo no carbono 3.¹⁵

Os flavanóis não possuem grupo carbonilo em C4, apresentado um grupo hidroxilo em C3, em C4 ou em ambos.



R = OH, R₁ = H → 3-flavanol
 R = R₁ = OH → 3,4-flavanodiol
 R = H, R₁ = OH → 4-flavanol

Figura 6. Estrutura dos flavanóis.⁷

De entre os mais comuns, os 3-flavanóis, como o próprio nome indica, possuem apenas uma hidroxilação no anel C, em posição 3, mas são frequentemente hidroxilados no anel A (carbonos 5 e 7) e no anel B, constituindo as unidades básicas elementares da estrutura das proantocianidinas. Os 3-flavanóis com o anel A do tipo floroglucinol classificam-se, segundo o grau de hidroxilação do anel B, em afzelequina (mono-hidroxilados), catequina (di-hidroxilados) e galhocatequina (tri-hidroxilados). Cada tipo inclui quatro estereoisômeros, devido à presença dos carbonos assimétricos C2 e C3 do anel C. A estereoquímica da ligação C2-C3 pode ser *trans* (2R, 3S) ou *cis* (2R, 3R) sendo a denominação, neste último caso precedida do prefixo epi-.¹²

Os 3-flavanóis com o anel A do tipo floroglucinol, mais amplamente distribuídos, são: (+)-catequina, (+)-galhocatequina, (-)-epicatequina e (-)-epigalhocatequina (Figura 7).

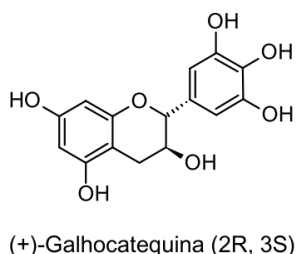
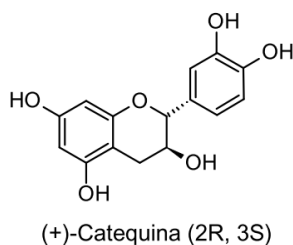


Figura 7. Exemplos de estruturas de flavanóis.⁷

Estas unidades podem ocorrer na natureza sob a forma de oligômeros e de polímeros, mas também sob a forma de ésteres, predominantemente do ácido gálico (Figura 8).

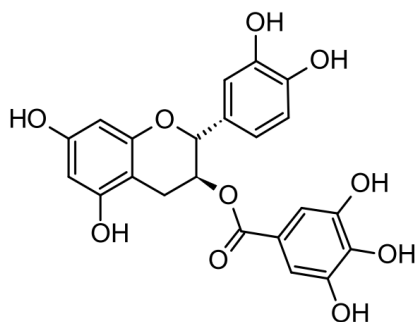


Figura 8. Catequina esterificada com ácido gálico.⁷

Os flavanóis constituem o grupo de flavonóides com maior atividade antioxidante e a razão dessa atividade é, principalmente, a presença de um maior número de hidroxilos na molécula, quando comparado com algumas outras classes de flavonóides.¹⁵

1.5.4.2. Flavonas e Flavonóis

As flavonas e os flavonóis têm em comum a existência da dupla ligação entre os carbonos C2 e C3, o anel B ligado ao carbono 2 e o grupo carbonilo em C4. Os flavonóis diferem das flavonas pela existência de um hidroxilo no carbono 3 (Figura 9).

Em geral os flavonóis possuem actividade antioxidante superior às flavonas correspondentes, uma vez que, para além da dupla ligação C2-C3 conjugada com o carbonilo do carbono 4 possuem um hidroxilo na posição 3.¹⁵

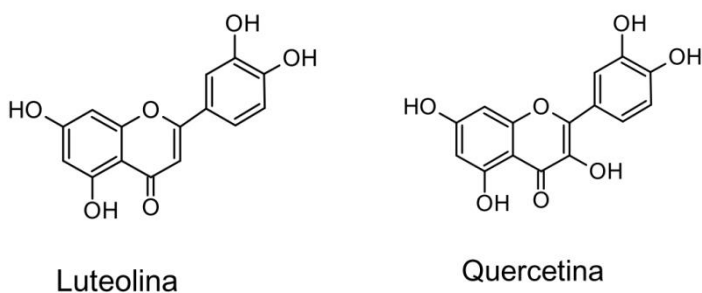


Figura 9. Estrutura exemplo de flavonas e flavonóis.⁷

1.5.4.3. Antocianidinas

As antocianidinas caracterizam-se por apresentarem uma carga positiva no anel C, formando o anel pirílio. São normalmente di-hidroxiladas no anel A, e de acordo com a substituição do anel B, classificam-se em pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina (Figura 10). Encontram-se frequentemente combinadas, principalmente na forma de glicósidos.

Existem também as 3-desoxi-antocianidinas que diferem das antocianidinas pelo facto de não possuírem o hidroxilo na posição 3, mas encontram-se mais raramente na natureza.¹⁵

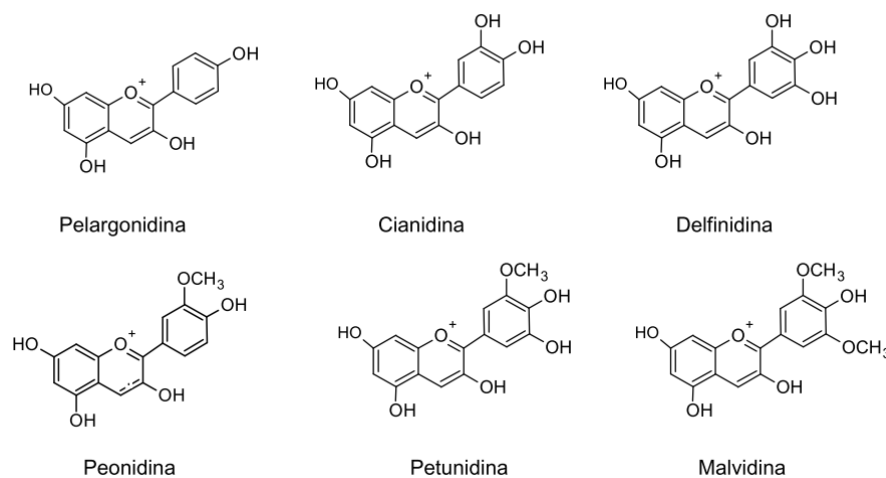


Figura 10. Estruturas de antocianidinas.¹²

As antocianinas são glicósidos das antocianidinas, sendo mais comuns as substituídas em posição 3, geralmente por glucose, galactose, ramnose e gentiobiose. Quando existe um segundo açúcar, este encontra-se normalmente na posição 5 e é quase sempre a glucose. As antocianinas também podem ser aciladas, nomeadamente com ácidos fenólicos (ácidos *p*-cumárico, cafeico ou ferúlico), que esterificam com a ose.¹⁵

As antocianinas e as antocianidinas possuem atividade antioxidante, devido à presença dos hidroxilos fenólicos, no entanto as antocianinas, por serem glicosiladas apresentam, em geral, menor atividade, principalmente se as glicosilações ocorrerem nos hidroxilos responsáveis pela atividade da molécula.¹⁵

1.5.5. Taninos

Os taninos são compostos hidrossolúveis com pesos moleculares entre 500 e 3000 Dalton e classificam-se geralmente em taninos condensados, tanino hidrolisáveis e taninos complexos.¹⁷ Resultam da polimerização de moléculas elementares com função fenólica sendo capazes de produzir combinações estáveis com proteínas e outros polímeros das plantas tais como polissacarídeos.¹⁸

Os taninos são os compostos fenólicos geralmente com maior atividade antioxidante, devido ao facto de frequentemente apresentarem estruturas oligoméricas ou então poliméricas polihidroxiladas.¹⁵

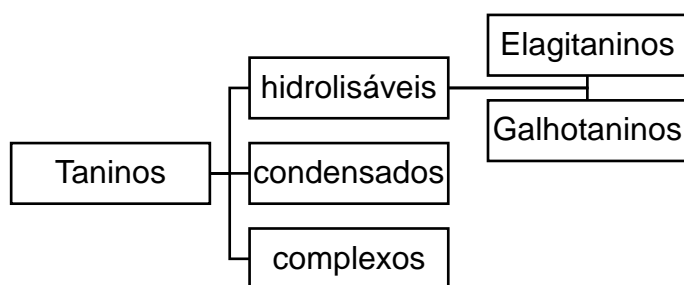


Figura 11. Classificação dos taninos.⁷

1.5.5.1. Taninos condensados

Os taninos condensados ou proantocianidinas são formados a partir de unidades de flavanóis, que por tratamento ácido e calor originam antocianidinas.

As proantocianidinas com sub-unidades superiores, 3-flavanóis, mono-hidroxiladas no anel B e di-hidroxiladas no anel A são denominadas de propelargonidinas, porque libertam pelargonidina em meio ácido a quente. Quando as unidades superiores são di-hidroxiladas no anel B e A libertam cianidina e denominam-se procianidinas, correspondendo às proantocianidinas, as mais frequentemente encontradas na natureza. As tri-hidroxiladas no anel B e di-hidroxilada no A libertam delphinidina, pelo que se designam de prodelfinidinas e quando as proantocianidinas são formadas por unidades estruturalmente diferentes designam-se de heterogéneas.

As ligações interflavânicas do tipo C-C originam as proantocianidinas do tipo B e ocorrem entre os C4-C8 ou C4-C6. Já nas proantocianidinas do tipo A ocorre a formação de uma ligação éter interflavânicas adicional, C2-O-C7.¹⁵

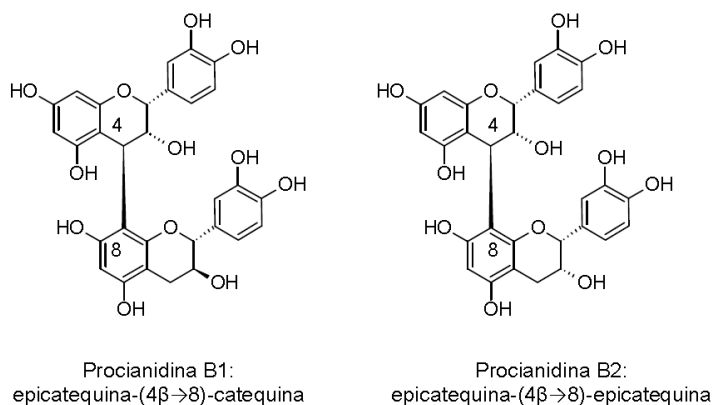


Figura 12. Exemplos de taninos condensados.⁷

1.5.5.2. Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis incluem os galhotaninos e os elagitaninos. Os galhotaninos possuem um núcleo formado por um composto poli-hidroxiado, normalmente uma ose, esterificado por vários resíduos de ácido gálico (Figura 13). A ose mais comum é a D-glucose, embora alguns galhotaninos possam conter catequinas e unidades triterpenóides, em vez de glucose.¹⁵

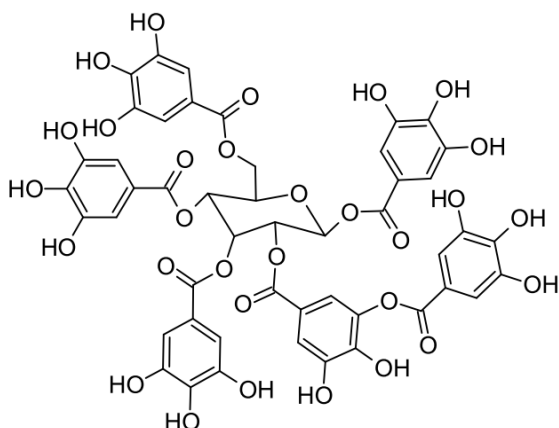


Figura 13. Tanino hidrolisável: 2-O-digalhoil-1,3,4,6-tetra-O-galhoil- β -D-glucopiranosose.⁷

Os elagitaninos são derivados da pentagalhoilglucose, e, ao contrário dos galhotaninos, contém ligações C-C adicionais entre os resíduos de ácido gálico adjacentes. Desta ligação resulta a formação de uma unidade de hexahidroxidifenoílo, que pode ter duas configurações: S e R (Figura 14). A quiralidade resulta da limitação na rotação em torno da ligação C-C, que se deve às duas ligações éster, entre os resíduos de ácido gálico e a ose, e à presença de substituintes em posição *orto*.

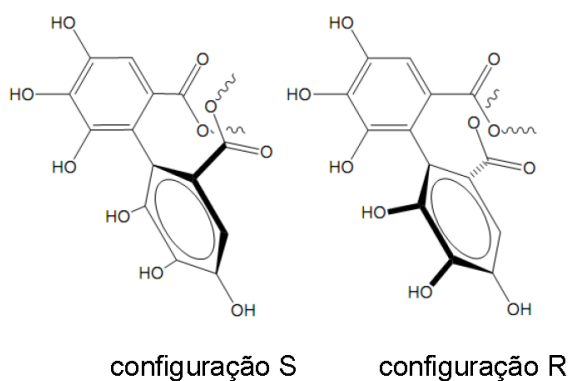


Figura 14. Configurações dos elagitaninos.⁷

O nome elagitaninos provém do ácido elágico, que se forma espontaneamente do ácido hexahidroxi-difénico, em solução aquosa, por intermédio de uma reação de esterificação intra-molecular.¹⁵

1.5.5.3. Taninos complexos

Nos taninos complexos, uma unidade 3-flavanol está ligada, por intermédio de uma ligação C-C, a galhotaninos ou a elagitaninos. Um exemplo é a acutissimina A (Figura 15), que se forma durante o envelhecimento do vinho tinto a partir da catequina das uvas e do elagitanino proveniente do carvalho das pipas. Este composto demonstrou inibir o crescimento das células cancerígenas e é considerado um possível precursor para o desenvolvimento de novos fármacos.¹⁹

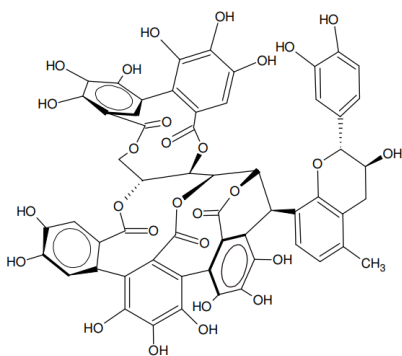


Figura 15. Acutissimina A.¹⁹

1.6. Perfil fenólico e distribuição nas uvas

As uvas contêm uma imensidão de compostos fenólicos na sua composição e de acordo com vários estudos experimentais, concluiu-se que estão distribuídos de uma vasta forma pela planta como mostra a (Figura 16).²⁰ Os ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e proantocianidinas são biossintetizados através da via fenilpropanóide.²¹

As concentrações de polifenóis no sumo de uva variam de acordo com as espécies, maturação e cultura das uvas e a tecnologia aplicada para obter o sumo. E ainda as concentrações diferem entre os tecidos de uva; assim, a polpa é rica em ácidos fenólicos e a pele é rica em flavonóides (flavonóis, flavanóis e antocianinas).²²

Os compostos fenólicos são os constituintes mais abundantes após os carboidratos e os aminoácidos. A distribuição de compostos fenólicos totais no sumo, polpa, casca e sementes é de aproximadamente 5%, 1%, 30% e 64%, respectivamente.²¹



Figura 16. Diferentes grupos químicos de polifenóis nas diferentes partes da planta.²⁰

Em termos de fenóis totais, as castas que apresentam concentrações mais elevadas são *Cabernet Sauvignon* e a *Pinot Noir*, ambas castas tintas, com elevadíssimas concentrações nas sementes e valores consideráveis na polpa. Ao compararmos castas tintas, *Pinot Noir*, com uma casta de uvas brancas *Chardonnay*, esta última apresenta valores duas vezes inferiores às uvas tintas, com concentração igual a 200 mg equivalentes ácido gálico/ 100 g peso seco.²¹ Já no sumo obtido a partir de uvas *Pinot Noir*, outros autores apresentam valores de 100 a 400 mg/L, diferenciando apenas o tempo de maceração das uvas.²³

Quando nos referimos à constituição das uvas em ácidos fenólicos e derivados, os fitoconstituintes mais comuns nas uvas são o ácido cafeico, cumárico e ferúlico. Castas como *Chardonnay*, *Riesling* e *Moscatel* apresentam 33, 45 e 38 mg de hidroxicinâmicos totais/ kg peso fresco, respetivamente. Destaca-se a casta *Tinta Negra*, em Portugal com valores hidroxicinâmicos totais de 220 mg por kg de pele seca. Os hidroxibenzóicos totais estão sempre presentes em concentrações bastante inferiores.²¹ Na análise em sumos de uvas de castas tintas observou-se que estes apresentavam concentrações de ácidos fenólicos, significativamente superiores quando comparadas às concentrações das amostras de vinho tinto, em castas brasileiras. O ácido caftárico é prontamente oxidável durante as etapas de

produção do vinho, especialmente nas fermentações, o que poderá explicar os valores mais baixos encontrados nas amostras de vinho em comparação com o sumo de uva.²⁴

Em Portugal, estudo revela o ácido caftárico como composto maioritário em várias castas tintas analisadas, com valores que oscilaram entre 566,7 e 4251,7 mg/Kg de peso seco nas castas Touriga nacional e Trincadeira, respetivamente.²⁵

Pertencente à classe dos estilbenos o composto presente nas uvas, mais descrito na literatura é o *trans*-resveratrol, predominante na maioria das castas e com variações de 0,5 a 7,6 mg / kg, enquanto o glicosídeo apresenta variações de 0,2 a 5,1 mg / kg.⁶

Quanto aos flavonóides determinam-se principalmente conjugados/glicosilados ou na forma esterificada. As três classes mais comuns nas uvas são os dihidroflavonóides, os flavonóis e os taninos (flavan-3-ol poliméricos). Sendo que em maior abundância estão os derivados da quercitina, seguida da miricetina (3'4'5'-trihidroxi) e do kaempferol (4'-hidroxi). A *Tinta Negra*, foi uma das castas em Portugal descrita como contendo 725 mg eq. quercitina/kg pele seca.²¹

Os cinco monómeros comuns do flavan-3-ol encontrados na casca da uva são (+) - catequina (C), (-) - galhocatequina (GC), (-) - epicatequina (EC), (-) - epigalhocatequina (EGC), e (-) - epicatequina 3-galato (ECG) e os dímeros comuns, como a procianidina B1 (PBI) e a procianidina B2 (PB2), também estão presentes na casca da uva. A casta que se destaca nesta classe pela sua rica composição em flavonóides é a *Pinot Noir* com cerca de 300 mg eq. catequina/100 g peso fresco.²¹ Também no sumo de uva de castas brasileiras, compostos como o ácido caftárico e a epigalhocatequina, foram descritos como compostos maioritários.²⁴

Em análise de castas portuguesas da região do Dão a epicatequina foi determinada como um dos compostos fenólicos maioritários, com valores entre 357,5 e 6372,1 mg/Kg de peso seco, nas castas *Baga* e *Monvedro*, respetivamente.²⁵

Quanto à *Fernão Pires*, esta apresenta valores próximos da unidade, expressos em mg/kg de sementes quanto ao grupo dos flavanóis, sendo as proantocianidinas na forma polimérica as mais abundantes, seguidas das que se apresentam na forma oligomérica e por último as catequinas, em pequenas percentagens.²⁶

Os alimentos mais ricos em taninos são principalmente o chá, o vinho, e os frutos, principalmente vermelhos. Quantifica-se nas uvas uma concentração até cerca de 160 mg de equivalentes catequina/g massa fresca, um dos frutos com maior concentração face à maçã,

cerejas, morangos, etc. No entanto a ingestão diária destes compostos é difícil de prever, pois depende dos hábitos de cada população e muitos outros fatores tais como disponibilidade dos alimentos, origem geográfica e condições climáticas destes, etc.²⁷ Um fato notável é que os vegetais não contribuem para a ingestão de proantocianidinas, mesmo que sejam boas fontes de outros flavonoides.²⁷

As antocianinas mais frequentes são os três monoglucosídeos de cianidina, peonidina, malvidina, petunidina e delphinidina, ou ainda, os mesmos, acilados com ácido acético, cumárico ou cafeico. Mais uma vez de entre as castas estudadas destaca-se a *Tinta Negra*, com altas concentrações na pele, na ordem dos 700 mg eq. malvidina-3-glucósido/ kg película seca. Contrariamente ao *Chardonnay* onde não foi determinada qualquer quantidade.²¹

As antocianinas são diretamente responsáveis pela cor das uvas e dos vinhos jovens, enquanto a adstringência e a estrutura dos vinhos parecem ser principalmente influenciadas por catequinas e proantocianidinas, que, além dos flavonóis, também são responsáveis pela sua amargura.²⁸ As antocianinas são pigmentos e existem principalmente em películas de uva. Os flavonóides são amplamente distribuídos em uvas, especialmente em sementes e caules, e contêm principalmente (+) - catequinas, (-) - epicatequina e polímeros de procianidina. As antocianinas são os principais polifenóis das uvas vermelhas, enquanto os flavan-3-ol são mais abundantes nas variedades brancas.²⁹

De forma sucinta, na tabela 2, estão descritos alguns dos grupos de compostos fenólicos presentes no sumo de uva, bem como a concentração determinada para várias castas de vários países, segundo vários autores.

Tabela 2. Caracterização de sumo de uva quanto ao perfil fenólico descrito por vários autores e recorrendo a ensaios distintos.

Origem do sumo	Castas	Compostos identificados	Métodos de determinação	Referências Bibliográficas
Brasil	<i>Niagara Branca;</i> <i>Trebbiano;</i> <i>Isabel e</i> <i>Cabernet</i> <i>Sauvignon</i>	<u>Fenóis totais</u> (1,6 até 9,3 g ácido gálico/100 mL) <u>Antocianinas</u> (n.d. até 3,5 g malvidina/100 mL)	Método de Singleton e Rossi Junior (1965) Espectrofotometria Di Stefano (1989)	Rev. Bras. Frutic., v. 39, n. 3: (e-579) DOI 10.1590/0100-29452017579 Jaboticabal – SP ³⁰
Brasil	<i>Isabel Precoce e BRS Cora;</i> <i>Isabel Precoce e BRS Magna;</i> <i>Isabel Precoce e BRS Violeta</i>	<u>Fenóis totais</u> (2135 a 2647 mg GAE/L) <u>Ácidos fenólicos</u> (247.1 a 410.1 mg/L), maior concentração de ácido caftárico <u>Flavonóis</u> (256.8 e 410.1 mg/L) <u>Antocianinas</u> (88.4 a 370.8 mg equivalentes malvidina-3-glucósido/L)	Folin–Ciocalteu RP-HPLC/DAD RP-HPLC/DAD Diferenças de pH no RP-HPLC/DAD	C.V.d.S. Padilha et al. / Food Chemistry 228 (2017) 106–115 ²⁴
Brasil	<i>Isabel Precoce;</i> <i>BRS Cora;</i> <i>BRS Violeta;</i> <i>Tempranillo;</i> <i>Syrah;</i> <i>Alicante</i> <i>Bouschet;</i> <i>Moscato Canelli</i>	<u>Fenóis totais</u> (7,60 a 1268,73 mg/L) <u>Antocianinas</u> (70,33 mg/L) <u>Taninos</u> (11,84 a 58,68 mg/L) <u>Flavonóis</u> (0,56 a 11,71 mg/L) <u>Ácidos fenólicos</u> (1,07 e 33,82 mg/L)	HPLC	M.M.P. Natividade et al. / Microchemical Journal 110 (2013) 665–674 ³¹
Espanha	<i>Autumn Royal;</i> <i>Grimson</i> <i>Seedless;</i> <i>Red Globe;</i> <i>Ribier</i>	<u>Fenóis totais</u> (275,1 a 564,6 mg GAE/L) <u>Antocianinas</u> (6,7 a 51,7 mg cianidina 3-glucósido/L)	Espetrofotometria (Singleton and Rossi (1965)) Diferenças de pH (Cheng and Breen 1991)	LUTZ, Mariane et al. - Phenolics and Antioxidant Capacity of Table Grape ³²
França	<i>Muscat de</i> <i>Hambourg</i>	<u>Fenóis totais</u> (166 mg GAE/100 mL)	HPLC	DÉCORDÉ, Kelly et al. (2008) ³³

A tabela 2 resume a determinação da composição fenólica, os estudos apresentados são apenas os que apresentam os valores expressos por volume de sumo de uva, as castas das uvas utilizadas para o processamento dos sumos analisados; com quantificação exclusivamente de sumos não comerciais, a partir de uvas obtidas nos mercados regionais.

1.7. Atividades biológicas

Devido à composição fenólica das uvas, muitas atividades biológicas lhes foram atribuídas, nomeadamente ao vinho e mais recentemente aos sumos. É por isso que têm sido objeto de numerosos estudos.

Teoricamente falando pode existir uma associação mais positiva entre o consumo de sumo de uva e os benefícios para a saúde humana aquando do consumo de vinho, no entanto é necessário saber de que modo os compostos responsáveis por esses benefícios atuam no nosso organismo, qual a sua biodisponibilidade e em que quantidades se encontram em cada produto derivado das uvas.

Verdadeiramente se considera que o consumo de vinho tinto possui benefícios para a saúde, mas contrariamente também são associadas inúmeras desvantagens tais como: cancro gástrico, intolerância à histamina, enxaqueca/ dores de cabeça, dependência pelo álcool, etc.³⁴

Dado que o sumo de uva não apresenta as consequências descritas anteriormente, será claramente uma alternativa mais saudável e segura ao vinho tinto.

Estudo comparativo revela que o consumo de sumo de uva tinta versus vinho tinto melhora a absorção de antocianinas, sendo que este possui quantidades equivalentes ou até superiores de flavonóides bioativos/ antocianinas que o vinho tinto. Assim como os polifenóis plasmáticos, a bioatividade das antocianinas parece ser significativamente superior após o consumo de sumo de uva em comparação com o consumo do vinho tinto.³⁵

Embora outros autores descrevam uma concentração duas vezes maior de compostos antioxidantes em vinhos tintos do que em sumos de uva tinta, esta última pode ser uma boa opção para todas as faixas etárias devido à ausência de álcool e aos efeitos potencialmente benéficos à saúde de sua composição fenólica e elevada atividade antioxidante.²²

Muitos dos flavonóides encontrados no sumo de uva, como catequina, epicatequina, quercetina e antocianinas, são conhecidos por terem efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e inibição da agregação das plaquetas, além de poder reduzir a oxidação de LDL e danos oxidativos ao DNA, tanto *in vitro* como em estudos com animais.^{36,37} A Catequina é geralmente o flavanol individual mais importante na pele e nas sementes da uva, embora a epicatequina também seja geralmente bem representada.³⁸

A mudança no estado oxidativo induzida pelos compostos presentes no sumo de uva pode favorecer uma redução no risco de doença cardiovascular, exercendo um efeito preventivo contra a oxidação do LDL-c, função endotelial, eventos aterotrombóticos, cascata inflamatória, hipertensão arterial, etc. Sendo também relatado para melhorar a função cognitiva e motora.²²

O interesse no estudo e pesquisa acerca das bioatividades dos compostos fenólicos no sumo de uva tem crescido e alguns dos principais efeitos para a saúde humana estão sumariados na seguinte figura (Figura 17).¹⁶

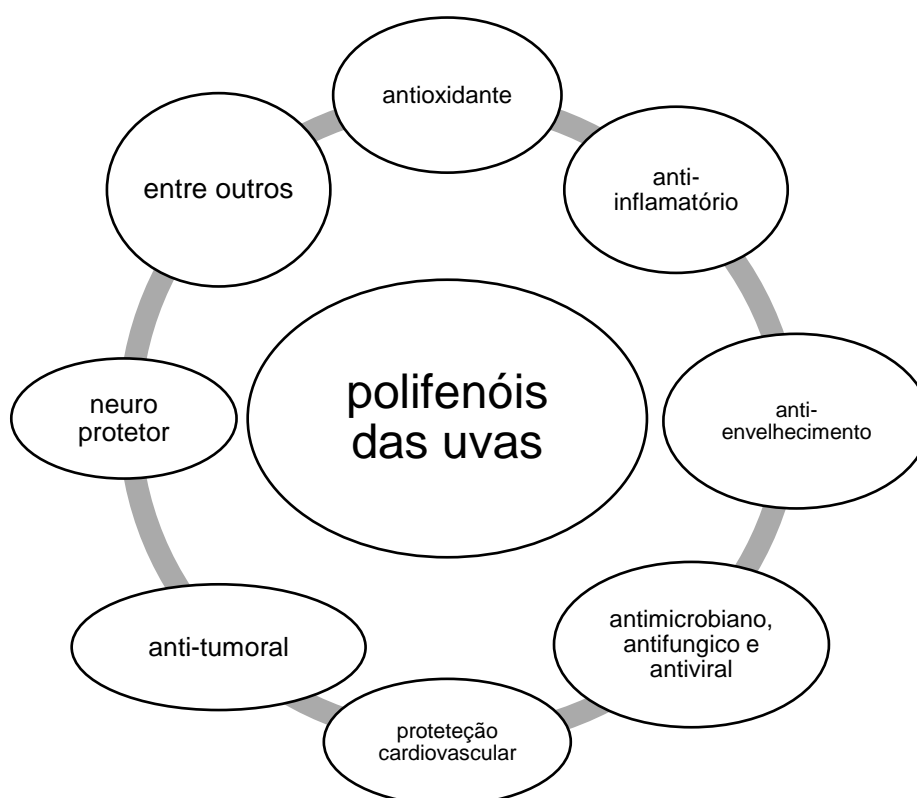


Figura 17. Bioatividades dos polifenóis das uvas.¹⁶

1.7.1. Atividade antioxidante

A atividade dos compostos fenólicos das uvas mais relevante é, claramente a antioxidante. Para avaliar essa atividade tem-se recorrido a vários métodos químicos, tais como: radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH); substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS ou ABTS); atividade quelante dos íons ferrosos (FICA); o poder de redução (FRAP); entre outras.¹⁶ Esses ensaios medem a capacidade dos antioxidantes naturais para eliminar os radicais livres usando diferentes mecanismos de reação química, seja através de transferência de elétrões ou transferência de átomos de hidrogênio. No

entanto, muitas vezes, a capacidade de eliminação de radicais livres de alimentos à base de plantas não reflete os seus benefícios para a saúde *in vivo*, uma vez que diferentes compostos bioativos podem atuar *in vivo* através de mecanismos diferentes sob condições biológicas e estes não podem ser facilmente reproduzidos usando ensaios químicos *in vitro*.²³ Nesse sentido, os modelos animais e os estudos em seres humanos são considerados mais adequados para determinar a capacidade bio protetora de alimentos à base de plantas. No entanto, são muitas vezes muito onerosos e não são adequados para a análise de um número elevado de amostras. A este respeito, os sistemas de cultura de células consideram-se uma boa alternativa a estes modelos biológicos.²³

A atividade antioxidante dos sumos de uva pode ser um indicador do nível relativo de benefício para a saúde que estes oferecem.²²

A ingestão de alimentos ricos em polifenóis (110 mg/dia) por um período de 14 dias mostrou reduzir significativamente o dano no DNA em células mononucleares do sangue periférico (PBMC). No entanto, outros estudos afirmam que numa suplementação de 6 semanas com um único flavonol (500 mg de rutina/dia) em indivíduos com a sua dieta regular não afetou significativamente a quebra endógena da cadeia de DNA, nem a resistência de PBMC a dano induzido por peróxido de hidrogénio.³⁹

Mais tarde, outros autores vêm defender que o sumo de uva diminui o dano oxidativo do DNA induzido pelo peróxido de hidrogénio em células do sangue periférico e ainda os polifenóis do sumo de uvas tintas reduzem a produção do anião superóxido. Por outro lado, aumenta a peroxidase glutaciona, o superóxido dismutase e a atividade catalítica, que tem um papel importante na supressão do *stress* oxidativo.¹⁶

Sabe-se que os fenóis das uvas exercem um efeito antioxidante sob diferentes condições em *stress* oxidativo *in vivo* podendo induzir a redução intracelular de espécies reativas de oxigénio (ROS) em diferentes tipos de células.¹⁶

A capacidade antioxidante dos ácidos hidroxibenzóicos diminui com a diminuição do grau de hidroxilação e apresenta a seguinte ordem: ácido gálico > ácido protocatéquico > ácidos o-, m- e p-hidroxibenzóicos. A atividade antioxidante dos estilbenos depende do número e localização dos grupos hidroxilo, da glicosilação e de outros substituintes sendo a ordem de atividade dos exemplos seguintes: piceatanol > resveratrol > piceatanol-3'-glucose e resveratrol-3'-glucose > trans-estilbeno (sem hidroxilos fenólicos, sem atividade antioxidante).¹⁵

Um estudo que testou as sementes de uvas mostra que, até certo ponto, o extrato de semente, considerado um suplemento nutritivo antioxidante, também pode ter atividade pro-oxidante, dependendo da dose, duração da administração e outros componentes dietéticos.³⁸

Ainda, quanto às sementes, extratos de taninos condensados atuam contra o dano oxidativo de eritrócitos, células típicas produzidas no organismo sob condições patológicas como anemias por deficiências de ferro e talassémias, obesidade, hipoxia, bem como no envelhecimento. Acredita-se que estes taninos, sendo compostos altamente polimerizados que contêm muitos grupos hidroxílicos fenólicos, são antioxidantes mais efetivos do que os flavonóides e exibem uma fraca ou inexistente ação pró-oxidativa. Além disso, existem dados que mostram que os eritrócitos ligam os polifenóis e podem aumentar a capacidade do sangue para eliminar os oxidantes.⁴⁰

Em 2014, um estudo efetuado em esperma de bovinos, *in vitro*, demonstrou o efeito antioxidante de um extrato de bagaço de uva rico em polifenóis quanto aos espermatozoides por supressão da peroxidação lipídica e, conseqüentemente, características como motilidade, viabilidade e integridade acrossomal eram protegidas.⁴¹

1.7.2. Proteção cardiovascular

A doença cardiovascular (DCV) é uma das principais causas de morte global, mas muitos dos seus fatores de risco podem ser modificados através da dieta, incluindo padrões alimentares que enfatizam frutas e vegetais.⁴²

Numerosas investigações de pesquisa básica e clínica demonstraram que os polifenóis encontrados no sumo de uva possuem bioatividade relevante para reduzir o risco de doenças cardiovasculares, nomeadamente através de mecanismos como: reduzindo o crescimento da placa aterosclerótica, por exemplo, reduzindo a expressão da molécula de adesão; limitando os processos inflamatórios; aumentando a resistência da LDL à oxidação; inibindo a agregação de plaquetas; melhorando a regulação da pressão arterial e reatividade vascular; e reduzindo o colesterol e os triglicerídeos no soro; efeitos que foram realmente comprovados em alguns modelos animais.⁴³

Visto que existe uma relação temporal de dose-resposta entre a ingestão de flavonóides e polifenóis relacionados e o risco de DCV, espera-se igualmente que esta relação se aplique ao consumo de sumo de uva ao longo de uma gama de consumos usuais

ou à sua contribuição para o consumo total de polifenóis quando adicionado às doses correntes usuais.⁴³

Um estudo *in vivo*, realizado em suínos, que consistiu administração de uma alimentação enriquecida com extratos de uvas, ricos em resveratrol, apesar de algumas limitações metodológicas, permitiu fazer uma associação positiva entre o consumo de resveratrol e a prevenção de lesões ateroscleróticas precoces nos animais, uma vez que este parece ter sido o principal composto responsável por prevenir a rutura das fibras elásticas da aorta e diminuir a sua alteração e por reduzir: a espessura da túnica íntima, a acumulação de células gordurosas e a presença de O_2^- nos tecidos aórticos.⁴⁴

Outros estudos verificam a capacidade do sumo de uva impedir a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL)¹² e ainda a melhoria do perfil das mesmas, diminuindo a sua concentração plasmática e aumentando a concentração das lipoproteínas de alta densidade (HDL), reduzindo ainda consideravelmente a concentração de LDL oxidadas no plasma.^{42,45,46}

A apolipoproteína B (apo B) é necessária para a síntese e secreção de lipoproteínas. O catabolismo das LDL que depende do reconhecimento dos recetores celulares pela apo B permite aos investigadores avaliar o risco de doenças cardiovasculares. Por outro lado, o consumo de sumo de uva tinta está associado a um rácio colesterol / HDL significativamente menor como índice aterogénico, que é comumente usado como o melhor parâmetro lipídico para determinar o risco de doença cardíaca humana. Um aumento no HDL-Colesterol é principalmente devido a um aumento da subfração HDL3. No entanto, estudos comprovam que os aumentos de apo AI e apo AII ocorrem em subfrações HDL3 e HDL2 e que as alterações na apo AI e apo AII são comparáveis e paralelas às da HDL-C.⁴⁵

O mais recente fator de risco independente para doenças cardiovasculares é o excesso de níveis de homocisteína (Hcy). Embora a hiper-homocisteinémia grave seja rara entre a população em geral, uma hiper-homocisteinémia leve foi relatada em 7% da população em geral e até 30% dos pacientes com doença vascular coronária e periférica. Níveis apenas 12% acima o limite superior da Hcy de plasma normal está associado a um aumento de 3 vezes no risco de infarto agudo do miocárdio. Estudos relataram que sumos de uva e extratos de pele de uva podem prevenir a disfunção endotelial induzida por Hcy.⁴⁵

O consumo de sumo de uva tinta, por voluntários com idades entre os 25 e os 60 anos revelou a diminuição da concentração de Hcy, e aumento das HDL e Apo I, o que seria o melhor resultado espetável, no entanto outros trabalhos semelhantes contradizem estes

resultados.⁴⁵ Esta não conformidade de resultados deve-se possivelmente às condições e parâmetros de cada estudo, e por isso, estudos de consumo prolongado e com populações estatisticamente significativas são necessários para retirar conclusões assertivas.

1.7.3. Efeitos antivirais, antibacterianos e antifúngicos

Tendo em conta os variados efeitos do extrato de sementes de uva, este tem também atividade antimicrobiana contra muitos agentes patogénicos bacterianos transmitidos por alimentos, incluindo *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, inclusive *S. aureus* resistente à metilina, *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis e *S. Typhimurium*.⁴⁷ E por essas razões, já foi investigado como um potencial antimicrobiano em filmes de embalagens destinados ao acondicionamento de alimentos juntamente com uma alga carragínófito (que funciona como polissacarídeo).⁴⁸

Quercetina e resveratrol, ambos polifenóis ativos em extratos de pele de uva têm efeitos inibitórios contra *Helicobacter pylori* com concentrações mínimas bactericidas de 256 µg/mL e 128 µg/mL, respetivamente. Os efeitos anti *H.pylori* da quercetina e do resveratrol sugerem que estes compostos podem ser úteis na prevenção e / ou tratamento da infeção por *H. pylori*.⁴⁹

Quanto aos efeitos antivirais a procianidina, um composto ativo de *V. vinifera* e outras plantas medicinais, mostrou atividade anti-influenza A, além das atividades anti Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Vírus da hepatite C (HCV), Coronavírus (SARS-CoV), HSV Vírus Herpes simplex (HSV) e Vírus Epstein-Barr (EBV).⁵⁰ O extrato de água quente (infusão) de pele de uva (100 mg/mL) mostrou atividade anti-influenza em células Madine-Darby Canine Kidney (MDCK) e esse efeito parece ser devido à presença do resveratrol.⁴⁹

O *trans*-resveratrol é um estilbeno natural produzido por várias plantas em resposta a infeções patogénicas. Apesar de estar presente num número restrito de famílias de plantas.⁵¹ Este inibe completamente a germinação conidial do fungo *Botrytis cinerea* e reduz a germinação esporângica de aproximadamente 75% do agente causal de oídio da videira, *Plasmopara viticola*.⁵¹



Figura 18. Infecção fúngica por *Botrytis cinerea* em bagos.⁵²



Figura 19. Oídio em folhas de *Vitis Vinifera*.⁵³

Dois derivados de dimetoxi-resveratrol (3,4'-dimetoxi-resveratrol e 3,5-dimetoxi-resveratrol) apresentaram atividades antimicóticas interessantes com valores mínimos de concentração inibitória (MIC) de 28 $\mu\text{g/mL}$ contra espécies de *Candida* como podemos observar na figura 20, onde o crescimento do fungo é inibido à medida que se aumenta a concentração do polifenol.⁵¹

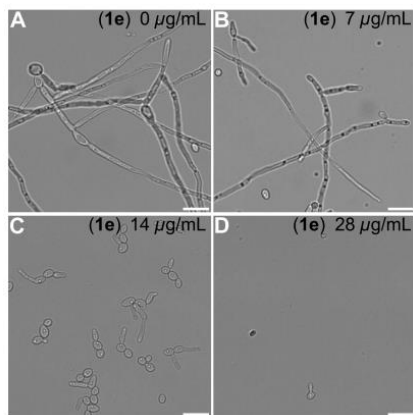


Figura 20. Efeito de diferentes concentrações de 3,5-dimetoxi-resveratrol na transição morfológica de fermento-hifa de *Candida albicans*.⁵¹

1.7.4. Efeito anti tumoral

O cancro continua a ser uma doença global, apesar do advento das melhorias tecnológicas e farmacêuticas nas últimas duas décadas. Os métodos de tratamento incluem cirurgia, radioterapia, medicamentos anticancerígenos (quimioterapia), além de outras técnicas especializadas.⁵⁴

As plantas têm sido usadas há anos como terapia complementar ou agentes dietéticos para influenciar a sinalização celular. Por exemplo, o resveratrol extraído de uvas foi empregado como um medicamento alternativo para tratar diferentes tipos de cancro. Muitos relatórios indicaram que este fornece uma ampla gama de opções preventivas e terapêuticas contra diferentes tipos de cancro, combinado com outros medicamentos quimioterapêuticos através de três mecanismos: apoptose celular, antiproliferação e anti-inflamação.⁵⁴

A carcinogénese é um processo de complexas etapas tais como alterações genéticas, epigenéticas e fenotípicas. Com o crescente conhecimento desses mecanismos, e a conclusão de que a maioria dos casos de cancro são evitáveis, tendo cuidados na dieta, por exemplo, os esforços concentram-se na identificação de agentes com potenciais propriedades anticancerígenas. O uso de polifenóis de uva contra o processo de carcinogénese parece ser uma alternativa adequada para fins preventivos e/ou terapêuticos.⁵⁵

O processo inflamatório característico da carcinogénese colo-retal é promovido por mediadores, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB), endotoxinas e alta expressão de moléculas de adesão em células endoteliais locais. Vários estudos evidenciaram que os níveis de sintase indutível do óxido nítrico (iNOS) estão aumentados em adenocarcinomas humanos e em tumores do cólon induzidos quimicamente com azoximetano (AOM) em ratos, criando um microambiente que favorece a carcinogénese do cólon.⁵⁶ O azoximetano (AOM) é comumente usado para a indução de carcinogénese colo-retal em roedores. O modelo experimental de indução de carcinogénese assemelha-se às características de cancro colo-retal esporádico em humanos.⁵⁷ Como consequência, a expressão reduzida desses genes pode interferir com a carcinogénese, deste modo num estudo recente, realizado em ratos, foi possível quantificar a evolução dos carcinomas e concluiu-se que a administração de 2% de sumo de uva antes da AOM reduziu a multiplicidade da cripta, atenuando a carcinogénese. A redução da expressão de NF-kB foi observada em animais expostos ao sumo de uva durante um período de tempo mais longo, independentemente da concentração do sumo.⁵⁶ Ainda como resultado deste estudo verificou-se que a inibição da atividade de NF-kB com sumo de uva concentrado modula os processos inflamatórios e está positivamente correlacionada com a expressão de TNF- α .⁵⁶

Outro estudo, realizado também em 2015, sob as mesmas condições confirma o efeito protetor do sumo de uva, demonstrando que este é capaz de modular a carcinogénese do cólon do rato por indução da apoptose.⁵⁷

1.7.5. Efeito neuroprotetor

Uma das investigações mais relevantes no setor das doenças neurodegenerativas tem sido na terapia combinada de polifenóis como uma nova estratégia para atrasar a conversão de comprometimento cognitivo ligeiro observado na doença de Alzheimer (AD). Nesse sentido foi administrada uma preparação de polifenóis dietéticos bioativos consistindo na combinação de três produtos (sumo de uva Concord, extrato de semente de uva e resveratrol), sendo uma nova combinação nutracêutica à qual se atribui efeitos de atraso no desenvolvimento da demência por Alzheimer.⁵⁸

Embora tenha-se tornado cada vez mais comum encontrar sobreviventes a ataques cardíacos ou cancro, não há sobreviventes de AD. Há evidências crescentes de que os polifenóis alimentares, incluindo o resveratrol, podem ter uma influência benéfica sobre AD.⁵⁸

Foram descobertos e amplamente estudados dois principais tipos de disfunções biológicas que ocorrem na AD, nomeadamente, as lesões: nas placas amilóides e os emaranhados neurofibrilares. Estas duas lesões são causadas pela disfunção e pela acumulação de duas proteínas que são, respetivamente, o péptido beta-amilóide (A β) e a proteína tau.⁵⁹

A evidência experimental sugere que o resveratrol pode beneficiar a demência por AD, promovendo a degradação de A β e diminuindo a neuroinflamação.⁵⁸

Propõe-se ainda que a aplicação de resveratrol, juntamente com outras preparações de polifenóis alimentares bioativos, modulará mecanismos da AD adicionais (por exemplo, diminuindo a agregação e síntese de A β e aumentando a sua degradação, diminuindo a hiperfosforilação de Tau e ainda a agregação de Tau), o que aumentará a probabilidade de sucesso terapêutico.⁵⁸

A ativação farmacológica do gene que codifica a proteína sirtuin I (SIRT1) com resveratrol, ainda que o estudo não tenha extraído este da planta *Vitis vinifera*, demonstra que existe uma redução significativamente na descoordenação motora de camundongos com a doença de Machado-Joseph.⁶⁰

Esta recente descoberta merece ser sondada, uma vez que esta doença é muito rara na população mundial, pelo que a investigação para o possível tratamento é escassa, pois a relevância económica a nível farmacêutico é baixa, e por isso torna-a desinteressante financeiramente para investigação.

1.7.6. Efeito anti-inflamatório

A inflamação associada à obesidade é caracterizada por uma maior abundância de macrófagos no tecido adiposo branco, levando à produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e prostaglandinas que podem causar resistência à insulina.⁶¹

Dados demonstram que o extrato de uvas em pó atenua a expressão de genes inflamatórios mediada por lipopolissacarídeos e a secreção de proteínas em macrófagos humanos, possivelmente suprimindo a ativação de JNK, p38, c-Jun, Elk-1 ou NF- κ B.⁶¹

Estudos *in vivo* futuros eram necessários para recapitular essas descobertas *in vitro* e para determinar o (s) componente (s) bioativo (s) nas uvas.

O excesso de acumulação de triacilglicerol em adipócitos produz grandes células de gordura, ou adipócitos hipertróficos, que podem tornar-se disfuncionais e resistentes à insulina devido à inflamação.⁶²

Recentemente, os polifenóis principais das uvas em pó, utilizadas no estudo em murinos incluíam quercetina-3-glucósido (8,0%), catequinas (2,3%), epicatequina (1,9%), ácido gálico (1,4%), rutina (1,2%) e resveratrol (0,53%) e os polifenóis extraídos desse pó (GPEP) parecem modular a inflamação em adipócitos humanos como a figura 21 esclarece.⁶²

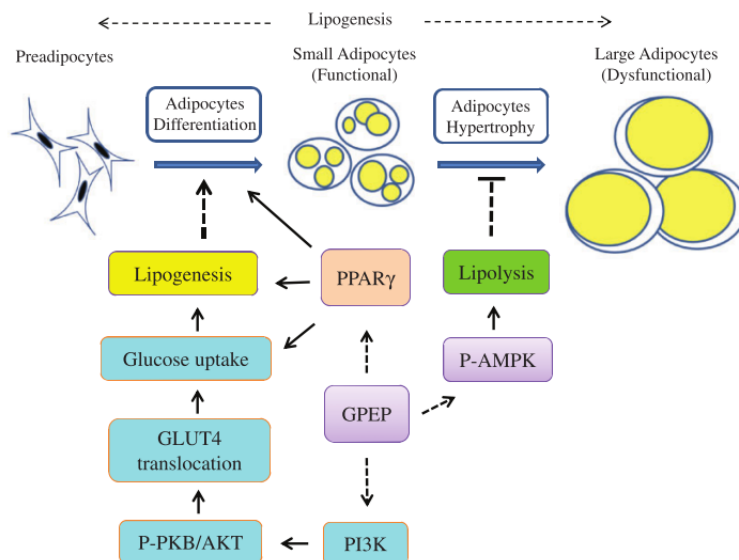


Figura 21. Polifenóis extraídos das uvas induzem a diferenciação de adipócitos.

Modelo hipotético que mostra o efeito da GPEP na lipogênese em adipócitos. O GPEP induz a diferenciação de pré-adipócitos ativando ambas as vias de sinalização PPARγ e PI3K. A ativação do PPARγ induz tanto a absorção de glicose quanto a lipogênese. Atividade da via de sinalização PI3K por resultados em fosforilação e ativação da proteína PKB / AKT que causa a translocação da proteína GLUT4 para a membrana plasmática. Em seguida, o GLUT4 facilita a absorção de glicose nos adipócitos. Por outro lado, o GPEP, ao ativar AMPK através

da fosforilação, pode ajudar a prevenir a hipertrofia adipócita. Como o principal sensor de energia dentro da célula, o AMPK induz a lipólise, impedindo assim a progressão de pequenos adipócitos funcionais em grandes adipócitos disfuncionais. A saúde ótima dos adipócitos pode ser conseguida induzindo diferenciação de adipócitos enquanto previne hipertrofia adipócita. Os pequenos adipócitos funcionais podem manter o equilíbrio energético pelo volume de ganho de gordura AMPK: proteína quinase ativada por AMP; GPEP: polifenóis extraídos do pó de uva; p-: fosforilado; PI3K: fosfatidil-inositol 3 quinase; PKB: proteína quinase B; PPARg: recetor ativado por proliferador de peroxisoma g; PKB / Akt: proteína quinase B / Akt.⁶²

Em resumo, os polifenóis das uvas e as uvas induzem a diferenciação de adipócitos, dependendo da dose, aumentando a absorção de glicose. O efeito induzido da GPEP na diferenciação de adipócitos e na absorção de glicose é mediado através de uma regulação positiva das vias de sinalização PI3K e PPARg, que estão relacionadas ao aumento da síntese e à translocação da membrana da proteína GLUT4, a principal proteína de transporte de glicose nos adipócitos que respondem à insulina.⁶²

1.7.7. Efeito anti envelhecimento

Nos estudos em animais, as antocianinas demonstraram atravessar a barreira hematoencefálica, acumular-se em várias regiões cerebrais, incluindo as essenciais para a função cognitiva, e melhorar o desempenho da memória. Num estudo experimental chave que examina o sumo de uva Concord e o desempenho cognitivo no envelhecimento, diferentes concentrações de sumo de uva produziram efeitos diferenciais, com menor dose associada à melhoria na aprendizagem e maior dosagem com melhorias no desempenho motor.⁶³

Realizou-se um estudo onde todos os indivíduos receberam avaliações de memória e humor na inspeção de pré-intervenção e novamente na final após 16 semanas de suplementação com sumo 100% de uva Concord.⁶³

Os resultados indicam que os indivíduos que consumiram sumo de uva adquiriram novas informações ao mesmo nível que aqueles que consumiram o placebo, no entanto, conseguiram reprimir a interferência de material estranho, fazendo assim melhores discriminações ao recuperar material previamente apresentado e fazendo julgamentos de memória. A ativação relativamente maior nas regiões anterior e posterior do hemisfério direito também foi observada após o consumo de sumo de uva contendo polifenóis superiores.⁶³

Estudo recente confirma que o consumo de sumo de uva melhora significativamente o tempo de reação e o estado de calma, no entanto, não observou efeitos tão semelhantes aos anteriores quanto às melhorias na memória, face ao grupo placebo.⁶⁴

1.7.8. Outros efeitos

1.7.8.1. Redução do dano genómico em pacientes submetidos à hemólise

Trinta e nove pacientes foram seguidos durante seis meses, dos quais 25 foram suplementados com sumo de uva não fermentado e 14 não. Os resultados obtidos mostraram uma diminuição significativa nos níveis subjacentes de dano oxidativo do DNA, no grupo suplementado. Quanto aos parâmetros clínicos, LDL e colesterol, foram significativamente reduzidos nos pacientes estudados após o período de suplementação, embora o colesterol também tenha diminuído nos pacientes não suplementados.²⁷ Este estudo não permite retirar uma premissa estatisticamente significativa quanto à redução do dano oxidativo no entanto evidencia o possível efeito biológico associado ao consumo regular de sumo de uva, como suplemento na alimentação humana.

1.8. Uvas Nacionais

Portugal, sempre foi conhecido pelas regiões produtoras de vinho e não pelas castas autóctones (Figura 22). A enorme variedade de castas portuguesas começou a diminuir à medida que se implementavam alguns avanços tecnológicos no sector e tornou-se necessário seleccionar as melhores castas para integrar novas vinhas. Actualmente, há castas portuguesas que se destacam pelas suas excelentes qualidades e merecem o reconhecimento internacional.⁶⁵

Regiões Vitivinícolas

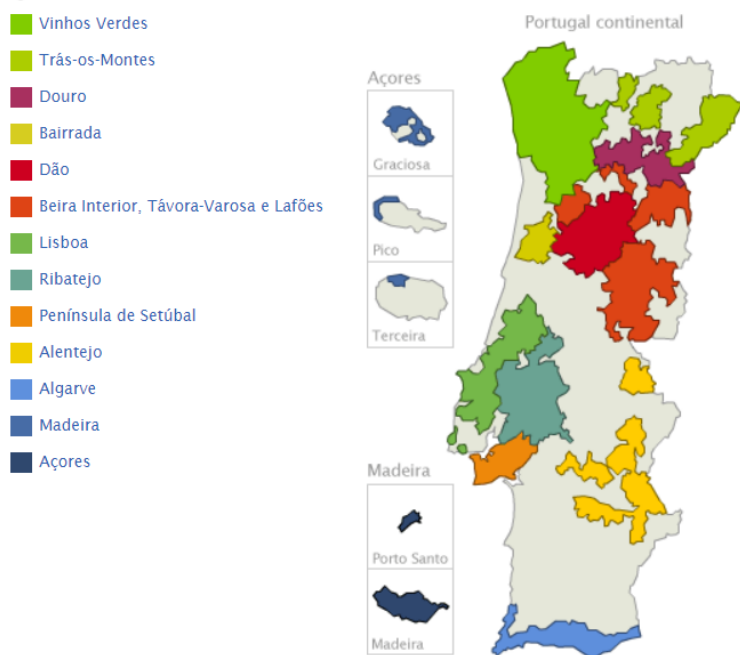


Figura 22. Mapa de Portugal e regiões vitivinícolas.⁶⁶

Alguns estudos afirmam que a ocorrência e a concentração dos vários compostos fenólicos nas bagas de uva dependem da variedade da videira e são influenciadas por fatores vitivinícolas e ambientais.²⁸

Os resultados de estudos em Portugal, realizados entre 1993 e 1994, mostraram diferenças das regiões do Oeste e do Norte do país, por exemplo, o teor de catequinas, proantocianidinas oligoméricas e poliméricas nas grainhas das uvas manteve-se aproximadamente igual em dois anos consecutivos de estudo, no entanto na película de todas as castas nacionais estudadas, com exceção da *Fernão Pires* os teores diminuíram bastante de um ano para o outro.²⁶

Na região do Douro mediu-se o índice de polifenóis totais e a intensidade corante de dois sumos, durante a sua fermentação e, observou-se que os valores se mantiveram contantes. Ambos os sumos eram constituídos pelas mesmas castas e em quantidades proporcionais, no entanto um daria origem a um vinho do Douro e outro seria um Vinho licoroso (vinho do Porto). Foi notável que independentemente da adição do álcool no vinho licoroso, este manteve as suas características quanto à cor (intensidade corante) e quanto ao índice de polifenóis totais determinadas segundo o método descrito por T.Somers, *et al.*, 1974²⁹ e T. Somers, *et al.*, 1977⁶⁷, respetivamente. Os resultados obtidos, apresentam-se na tabela 3 que se segue, após cerca de 18 dias de análise durante a fermentação.

Tabela 3. Resultados da medição da Temperatura e °Bé durante a fermentação de dois sumos de uva, até término da mesma.

Amostra/Dia de fermentação	T (°C)	Intensidade Corante	Índice de Polifenóis Totais
09/set/2017			
LG 1 (Porto)	22	17,58	63,2
LG 2 (Douro)	22	17,99	55,7
11/set			
LG 1 (Porto)	22	25,97	82
LG 2 (Douro)	18	23,88	74,2
13/set			
LG 1 (Porto)	16	25,81	99,3
LG 2 (Douro)	21	22,97	76,9
15/set			
LG 1 (Porto)	18	22,68	97,2
LG 2 (Douro)	15	19,46	73
16/set			
LG 1 (Porto)	9,5	16,25	97,2
LG 2 (Douro)	18	19,15	73,4
19/set			
LG 1 (Porto)	15,5	17,37	97,5
LG 2 (Douro)	21	18,79	75,9
21/set			
LG 1 (Porto)	18	17,61	97,5
LG 2 (Douro)	20,5	18,71	74,7
23/set			
LG 1 (Porto)	19,5	17,52	94,2
LG 2 (Douro)	21	18,5	76,4
25/set			
	Bé e T° Constante		
LG 1 (Porto)		17,56	96,4
LG 2 (Douro)		18,52	76,3
26/set			
LG 1 (Porto)		17,69	97,6
LG 2 (Douro)		18,7	76,6
27/set			
LG 1 (Porto)		18,05	97,2
LG 2 (Douro)		18,65	77,8

Na tabela anterior (Tabela 3) é possível verificar que durante a fermentação do sumo de uva, à medida que o valor Bé diminui, até valor constante, o índice de polifenóis totais não se altera em qualquer uma das amostras, o que nos permite concluir que o vinho, ao qual se atribui efeitos benéficos à saúde, terá, em termos de atividades, a mesma que o sumo de uva, uma vez que os compostos fenólicos responsáveis por essas mesmas atividades não se alteram. No entanto é importante ter em consideração possíveis interações entre os componentes do sumo e os compostos fenólicos ao serem absorvidos no organismo e o mesmo no caso do vinho e a sua biodisponibilidade.

Já na região da Bairrada, efetuaram-se vários ensaios de caracterização de sumo de uva das castas: *Fernão Pires* e *Pinot Noir*; com o objetivo de identificar o potencial do sumo de uva português, caracterizando o seu perfil fenólico. As castas avaliadas encontram-se posteriormente descritas.

1.9. Amostras em estudo

1.9.1. *Fernão Pires* (B)

A *Fernão Pires* é uma das castas brancas mais plantadas em Portugal, e representa cerca de 70% das vinhas brancas. Esta variedade é usada principalmente para produzir vinho de mesa e, em alguns casos, vinho espumante.²⁵ É mais cultivada nas zonas do centro e sul, especialmente na zona da Bairrada (onde é conhecida por Maria Gomes), Estremadura, Ribatejo e Setúbal. Na região da Bairrada as castas brancas são plantadas nos solos arenosos.⁶⁸ A casta *Fernão Pires* tem uma maturação muito precoce, por isso é uma das primeiras castas portuguesas a ser vindimada. Além disso, sendo muito sensível às geadas, desenvolve-se melhor em solos férteis de clima temperado ou quente. Esta casta possui um bom teor alcoólico e uma acidez baixa ou média, com intensos aromas florais.⁶⁹



Figura 23. Uvas da casta *Fernão Pires*.⁶⁸

1.9.2. *Pinot Noir* (T)

A Borgonha, França, foi o lar de Pinot Noir há séculos, desde que os monges cultivaram e mantiveram as vinhas. No entanto esta casta também provou ser suficientemente versátil para ser plantada em todo o mundo. As plantações intensificaram-se em França, nos Estados Unidos, Itália e Moldávia. Em termos de aroma tem uma elegante complexidade que vai desde aromas florais de violeta, pétala de rosa ou gerânio até ao aroma ácido a frutos vermelhos e bagas, cereja azeda, etc.⁷⁰



Figura 24. Uvas da casta *Pinot Noir*.⁶⁶

Capítulo 2

Objetivos

O vinho é um dos principais produtos derivados das uvas sendo uma importante fonte de compostos fenólicos responsáveis por várias atividades biológicas benéficas que resultam do seu consumo. Por outro lado, o álcool presente pode limitar o seu consumo sob pena de desencadear efeitos prejudiciais. Neste sentido, o sumo da uva pode constituir uma alternativa devido ao seu conteúdo em compostos fenólicos mas sem conter álcool.

Neste trabalho pretende-se avaliar os potenciais benefícios dos sumos de uva de duas castas de origem portuguesa, *Pinot Noir* e *Fernão Pires*, esta última, ainda pouco estudada, para a saúde humana em alternativa ao vinho.

O plano de trabalho experimental a realizar envolverá:

- Caracterização fenólica dos sumos de uva por recurso a técnicas cromatográficas (TLC, HPLC-DAD, HPLC-ESI-TOF).
- Avaliação da atividade antioxidante (FRAP, DPPH, ABTS).

Capítulo 3

Experimental

Materiais e Métodos

3.1. Preparação das amostras

Os sumos de uva foram obtidos por esmagamento das uvas, de duas castas diferentes, *Fernão Pires* e *Pinot Noir*, colhidas na altura das vindimas (agosto e setembro de 2017), dentro de uma prensa. Para a produção de 1 litro de sumo, de uva branca (B) e tinta (T) foram utilizados 2,5 quilogramas de uvas/massa fresca. As amostras foram seguidamente congeladas em alíquotas, com cerca de 10 mL até à sua análise.

3.2. Determinação do resíduo seco

Para a determinação do resíduo seco, colocaram-se 3 tubos de vidro na estufa a 100°C durante 1 hora, arrefeceram-se os tubos num exsiccador e pesaram-se. Repetiu-se o procedimento até peso constante. Pipetou-se 1 mL de amostra para cada tubo e colocaram-se os tubos na estufa até completa evaporação (+/- 24h). Após arrefecimento pesaram-se os tubos e repetiu-se o procedimento até peso constante. A diferença de peso corresponde à massa equivalente a 1ml de amostra.

3.3. Fracionamento dos sumos de uva

Uma alíquota de 20 mL de amostra de sumo de uva foi extraída duas vezes com 30ml de acetato de etilo, sob agitação por 5 minutos no vórtex. A fase orgânica das duas extrações foi evaporada num evaporador rotativo (FOB e FOT). O resíduo foi redissolvido num mililitro de metanol:água (1:1 v/v).⁷¹ A fase aquosa foi concentrada até metade do volume inicial no evaporador rotativo, a cerca de 40°C (FAB e FAT).

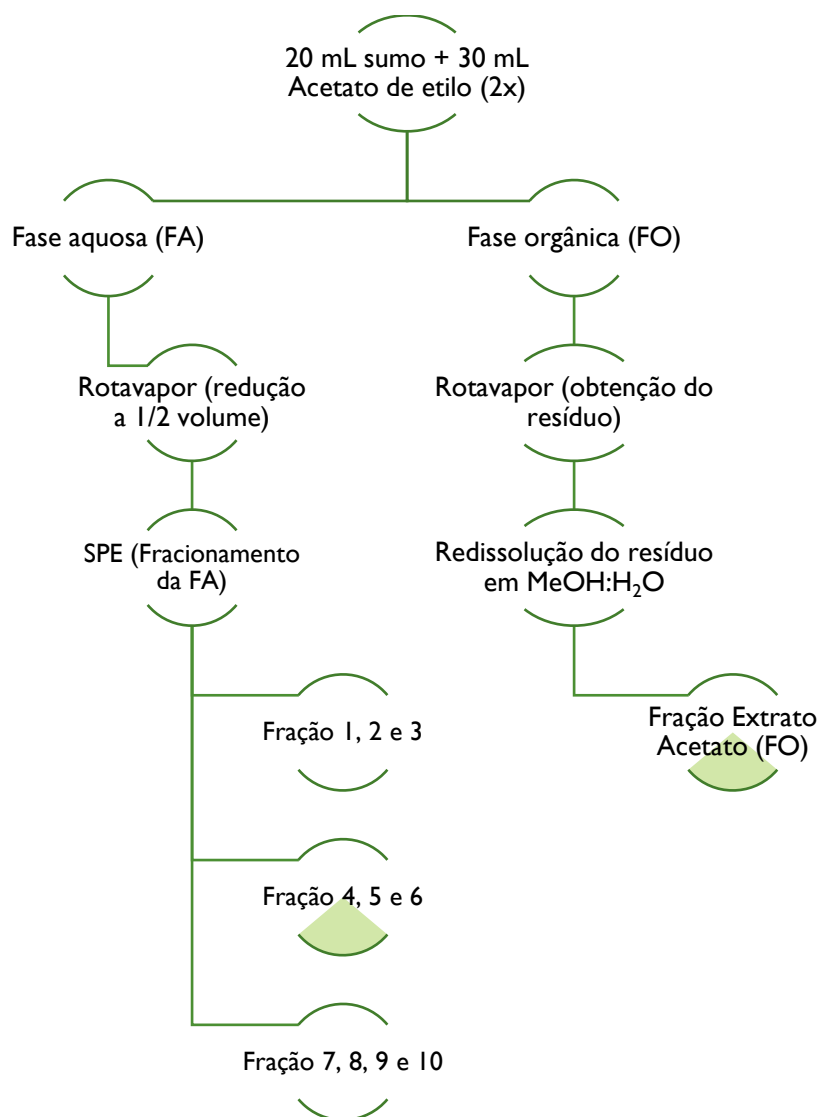


Figura 25. Esquema resumo do fracionamento dos sumos de uva analisados.

A fase aquosa obtida foi posteriormente fracionada por extração em fase sólida (Chromabond C18 (10 g/70 mL) Machery-Nagel (Düren, Germany)). Inicialmente procedeu-se à ativação da coluna com 20 mL de acetato de etilo, metanol e HCl 0,01N. A fase aquosa (cerca de 10 mL) foi eluída com 3 mL de HCl 0,01N e 3 mL de acetato de etilo controlando a saída de compostos fenólicos com uma solução de NaOH 1M.⁷¹ Após a saída dos compostos fenólicos adicionou-se 20 mL de metanol seguido de 150 mL de metanol acidificado 0,1% com HCl, até à saída de todas as bandas coradas.

No fracionamento por SPE da FA, após ativação da coluna, fez-se eluir a FA da extração líquido-líquido e os volumes foram recolhidos. Os volumes de interesse recolhidos da eluição e o volume final dessas subfrações, após serem concentradas no evaporador rotativo⁷¹ estão apresentados na seguinte tabela (Tabela 4). Esses volumes resultantes da eluição foram recolhidos no início da extração em tubos de ensaio, de seguida em

erlenmeyers, pois os volumes de solventes adicionados para eluir os compostos de interesse foram cada vez aumentando mais, e os mesmos foram estimados à medida que se determinava o término da recolha dessa fração. Para a eluição em SPE, seguimos a literatura, no entanto foi necessário aplicar alterações e dado que utilizamos uma quantidade significativa de sumo (20 mL) foi necessário triplicar os volumes de solventes utilizados.⁷¹

Tabela 4. Volumes corridos e volumes recolhidos na coluna C18 da fase aquosa de sumo de uva branca e tinta.

Subfração	Solvente	Volume (mL)
1	Amostra	10
2	HCl 0,01N	10
3	Acetato de etilo	10
4	Acetato de etilo	25
5	Metanol	20
6	Metanol	40
7	Metanol	75
8	Metanol	75
9	Metanol	75
10	Metanol 0,1% HCl	150

As subfrações 1 a 9 resultantes da SPE foram monitorizadas por TLC com observação à luz UV 366 nm para deteção de compostos fenólicos e também revelação com DPPH para avaliação da atividade antioxidante. Apenas as subfrações 1 a 6 apresentaram manchas características de compostos fenólicos e atividade antioxidante tendo sido reveladas com NP/PEG e DPPH, selecionadas para estudos subsequentes. Os resultados estão representados em “Resultados e Discussão”.

A subfração 10, eluída com metanol acidificado, correspondeu à banda de cor amarelada, pouco intensa, observada na coluna C18, tendo sido esta removida com 150 mL de metanol.

3.4. Análise Fitoquímica

3.4.1. Dosagem de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu

Este método permite determinar a concentração total de compostos que contêm hidroxilos fenólicos. Apesar de não ser conclusiva quanto ao tipo de compostos presentes, pode ter interesse na comparação de extratos de distintas amostras, identificando a de maior e menor potencial atividade. Trata-se de uma variante do método de Folin-Denis, que consiste na oxidação, em condições alcalinas, do ião fenolato e conseqüente redução do reagente fosfomolibdicotúngstico, formando-se um complexo azul. A diferença neste método consiste no sal de lítio, presente no reagente de Folin-Ciocalteu, com o intuito de evitar a formação de precipitados.^{72,73}

Para a dosagem dos fenóis totais, num balão aferido de 10 mL, de colo largo, colocaram-se 275 µL da amostra, 1,9 mL de água MiliQ e 1 mL de reagente de Foulin-Ciocalteau. De seguida agitou-se vigorosamente no vórtex por 1 minuto e adicionaram-se imediatamente 5 mL sendo o volume final de 10 mL ajustado com água MiliQ. Após agitar novamente no vórtex por 1 minuto protegeu-se o balão da luz com papel de alumínio e deixou-se decorrer a reação por 20 minutos, lendo-se a absorvência a 700 e 735 nm. A quantificação de fenóis totais foi expressa em equivalentes de ácido gálgico (mg de ácido gálgico/ml de solução usada).^{72,73}

3.4.2. Cromatografia em camada fina (TLC)

É uma técnica muito frequente utilizada anteriormente aos ensaios mais detalhados, que permite fazer um despiste da natureza química de fitoconstituintes. É rápida, versátil, realizada com pequenas quantidades de amostra e solventes e que permite uma análise simultânea de várias amostras.⁷⁴ No caso da determinação de compostos fenólicos, a celulose e a sílica gel com fases móveis como a água, metanol, acetato de etilo, entre outros, são os sistemas mais utilizados. Após o desenvolvimento, a placa é observada à luz visível e luz UV (366 nm), com ou sem reveladores adequados (NP/PEG; vapores de amónia por exemplo).⁷⁵

As amostras foram analisadas por TLC aplicando-se 10 µL de amostra numa placa de Sílica gel 60 F₂₅₄ que foi eluída numa fase móvel de acetato de etilo (AcEt), ácido fórmico (HCOOH), ácido acético (CH₃COOH) e Água (H₂O) na proporção (100:11:11:26). Após o desenvolvimento, a placa foi observada à luz UV (366 nm) antes e após a pulverização com

1% de ácido difenilborico metanoico- β -etilamino éster (difenilbioriloxietilamina) (NP), seguido por 5% de polietilenoglicol 4000 etanólico (PEG) (10 mL e 8 mL, respetivamente). O comportamento fluorescente (banda, cor e migração) é dependente da estrutura e a intensa fluorescência é produzida imediatamente ou após 15 minutos em UV-366 nm, sendo que o PEG aumenta a sensibilidade da leitura.⁷¹

3.4.3. Cromatografia líquida de alta resolução com detetor Fotodíodo (HPLC/PDA)

A análise dos polifenóis foi efetuada com o auxílio de um cromatógrafo líquido de alta resolução (HPLC) Gilson, equipado com duas bombas (modelo 305 e 306); misturador (modelo 811 B); módulo manométrico (modelo 805) e um injetor automático (Gilson 234 Autoinjeter), acoplado a um detetor de fotodíodos (PDA) (Gilson, modelo 170) e uma estação de controlo e tratamento de dados Unipoint System (Unipoint[®] 2.10).

Utilizou-se uma coluna RP18 Spherisorb Waters[®] ODS-2, com partículas de 5 μ m (4,6x250 mm), a uma temperatura de 25°C protegida por uma pré-coluna KS 30/4 Nucleosil 120-5, C-18, Marcherey-Nagel (Düren, Germany). A fase móvel consistiu de uma solução aquosa de ácido fórmico a 5% (A) e metanol (B), usada em gradiente descontínuo, a um fluxo de 1 mL/min (Tabela 4). Os solventes utilizados nesta análise foram microfiltrados com filtros NL16 (0,2 μ m; 50 mm) e desgaseificados num aparelho de ultrassons (Bransonic, modelo B-2200 E I).

Tabela 5. Gradiente utilizado no sistema HPLC para análise das amostras de sumo de uva.

	Tempo (min)	% Eluente A (Ácido fórmico 5% em água v/v)	% Eluente B (Metanol)
Gradiente	0	95	5
	10	85	15
	15	70	30
	25	65	35
	35	50	50
	40	20	80
	60	20	80

Para analisar as amostras injetou-se um volume de 100 μ L. Os espectros entre os 200 e os 600 nm, registando-se os perfis cromatográficos a 280 e 320 nm.

A identificação dos compostos presentes foi feita por recurso á análise dos espectros UV e também por comparação dos tempos de retenção com padrões de ácido cafeico, ácido

elágico, ácido gálgico, ácido siríngico, ácido vanílico, campferol, catequina, *p*-cumárico (Sigma Aldrich); e quercetina (CHR). Os solventes utilizados foram o metanol (VWR) e o ácido fórmico (Merck). Para o efeito injetaram-se 20 µL das soluções padrão (1 mg/mL) preparados com os solventes descritos na tabela 6.

Tabela 6. Solvente utilizado para dissolver os padrões.

Padrão 1mg/ml	Solvente
Ácido cafeico	Água/Metanol (2:1)
Ácido elágico	Etanol
Ácido gálgico	Água
Ácido siríngico	Água
Ácido vanílico	Água
Campferol	Metanol
Catequina	Metanol
Quercetina	Metanol
<i>p</i> _cumárico	Metanol

3.4.4. Cromatografia líquida de alta resolução com detetor de espectrometria de massa (HPLC/ESI/TOF)

A espectrometria de massa é uma técnica analítica que se baseia na deteção de iões moleculares e os respetivos fragmentos, separados de acordo com a sua relação massa/carga (*m/z*). O acoplamento de espectrómetros de massa a cromatógrafos permite uma análise estrutural eficaz, de matrizes complexas.⁷

A determinação dos polifenóis presente nas amostras de sumo de uva branca e sumo de uva tinta foi realizada com o cromatógrafo Shimadzu Nexera X2, acoplado a um detetor TOF/MS Sciex 5600. Utilizou-se uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 com tamanho de partículas 1.8 µm (2.1 mm x 50 mm). O gradiente utilizado encontra-se descrito na tabela 7.

Tabela 7. Gradiente utilizado no sistema HPLC/ESI/TOF para análise das amostras de sumo de uva.

	Tempo (min)	% Eluente A (Ácido fórmico 0,1% em água v/v)	% Eluente B (Acetonitrilo)
Gradiente	0	97	3
	2	97	3
	5	40	60
	9	0	100
	9,5	97	3

Para a interpretação dos resultados, observaram-se os espectros de massa, no modo ião negativo, tendo em atenção o tempo de retenção dos compostos, a ordem de eluição e o peso molecular do ião precursor e das perdas de fragmentos.

3.5. Ensaios de determinação da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante total (TEAC) foi determinada usando métodos baseados na capacidade de eliminar os radicais sintéticos ácido 2,2'-azino-bis-3 etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) e 2,2-difenil-1-(2, 4,6-trinitrofenil) hidrazilo (DPPH). Estes métodos têm sido frequentemente utilizados para avaliar a capacidade antioxidante de extratos de várias partes de plantas, nomeadamente sumos de uva.⁷⁶

Os resultados foram expressos em atividade antioxidante total (TAA), ou a atividade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC), mede a concentração da amostra que possui atividade antioxidante equivalente a uma solução de Trolox (análogo da vitamina E solúvel em água) de concentração 1 mM.¹⁴

3.5.1. Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS

O método de ABTS reflete a capacidade de antioxidantes eliminarem o radical catiónico ABTS^{•+}. Esta reação pode ser monitorizada medindo a absorvência a 734 nm. Os valores das absorvências foram medidos num espectrofotómetro de duplo feixe, Cintra 101 (GBC, Australia), contra o branco.

O método descrito em seguida, utiliza como substrato o persulfato de potássio para produzir o radical catiónico, na presença de ABTS, formando-se o cromóforo ABTS azul/esverdeado. Na presença de compostos antioxidantes ocorre a perda de cor e consequentemente diminuição da absorvência, logo à inibição do catião.⁷⁷

O catião radicalar ABTS foi produzido pela reação da solução de ABTS (7 mM) com persulfato de potássio 2,45 mM durante cerca de 16 horas ao abrigo da luz.

Para o ensaio, juntaram-se 2 mL de reagente ABTS com 50 µL da amostra, agitou-se a solução no vórtex. Ao fim de 4 minutos, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente mediu-se a absorvência a 734 nm. Como branco utilizou-se água MiliQ. O mesmo processo foi repetido para o trolox para poder exprimir os resultados em TEAC.⁷⁸

A atividade antioxidante das amostras também foi expressa em percentagem de diminuição da intensidade de cor relativamente ao controlo negativo, pela aplicação da seguinte equação.⁷⁶

$$\% \textit{inhibition} = \frac{A_{\textit{negative control}} - A_{\textit{sample}}}{A_{\textit{negative control}}} \times 100$$

3.5.2. Determinação da atividade antioxidante pelo método 2,2- difenil-1 picril- hidrazilo (DPPH)

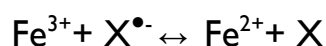
O DPPH é um radical sintético, cuja absorção a 517 nm diminui ao sofrer redução por moléculas com capacidade de captar o eletrão do radical, sendo um bom indicador do comportamento dos compostos antioxidantes na presença de outros radicais livres.⁷⁹

Para a avaliação da atividade antioxidante utilizou-se o método descrito por Blois (1958).⁸⁰ A atividade das amostras (100 µL) foi avaliada em presença de 500 µL de solução de DPPH (500 µM), tampão acetato a 100 mM, a pH 6,0 (1 mL). A mistura reacional (3 mL) foi mantida ao abrigo da luz durante 30 min à temperatura ambiente. O decréscimo do valor da absorvância foi medido a 517 nm, num espectrofotómetro de duplo feixe, Cintra 101 (GBC, Australia), contra um branco. O mesmo processo foi repetido para o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) para exprimir os resultados em valor de TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao trolox 1 mM).⁷

Além do ensaio espectrofotométrico, realizou-se também a análise bioautográfica pelo DPPH, descrita por Joshi (2012).⁸¹ Esta análise qualitativa permite avaliar quais os compostos, previamente separados por TLC, que mais contribuem para a atividade antioxidante das amostras. Para isso, após aplicação de cada fração em análise, em placas de sílica gel e eluição da fase móvel de acetato de etilo (AcEt), ácido fórmico (HCOOH), ácido acético (CH₃COOH) e Água (H₂O) na proporção (100:11:11:26), deixou-se a placa secar, pulverizando-se em seguida com solução metanólica de DPPH (500 µM) e observação da reação à luz Visível. Após a reação, os compostos que possuem atividade antioxidante, apresentam manchas amarelas resultante da redução do radical DPPH em contraste com a coloração rosa do radical.

3.5.3. Poder redutor (FRAP)

O método de redução do ferro avalia a capacidade dos extratos em reduzir o complexo hexacianoferrato (III), segundo a equação representada posteriormente, com formação do azul da Prússia onde X representa o(s) composto(s) antioxidante(s) presente(s) no extrato. Quanto maior for a intensidade da coloração, maior o poder redutor.⁷



Este ensaio fornece informação que complementa a do ensaio DPPH e ABTS por avaliar um mecanismo de ação antioxidante diferente. Nestes ensaios o efeito antioxidante ocorre por doação de átomos de hidrogénio que convertem os radicais em produtos mais estáveis, enquanto no método FRAP, o antioxidante atua como dador de eletrões, reduzindo os intermediários oxidados a produtos mais estáveis.⁷

Para a determinação da atividade redutora utilizou-se o método descrito por Benzie & Strain (1996). Neste método o reagente FRAP é preparado misturando tampão acetato 300 mM a pH 3,6 com TPTZ (2,4,6-tris (2-pyridyl) - 1,3,5-triazina) a 10 mM e uma solução de tricloreto de ferro hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a 20 mM na proporção de 250:25:25 (em volume). Num tubo de ensaio juntaram-se 3 mL do reagente FRAP com 100 μL de amostra, agitou-se no vórtex, protegeu-se da luz e leu-se a absorvência após 6 minutos a 593 nm.⁸² Os valores das absorvências foram medidos num espectrofotómetro de duplo feixe, Cintra 101 (GBC, Australia), contra o branco.

O mesmo processo foi repetido para o trolox, seguindo as mesmas condições de ensaio para que fosse possível exprimir os resultados em valores TEAC.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1. Determinação do resíduo seco dos sumos das castas *Fernão Pires (B)* e *Pinot Noir (T)*

Após realização do procedimento descrito em “Materiais e métodos” obtiveram-se 302,25 mg/mL e 245,84 mg/mL de resíduo seco para as castas *Fernão Pires* e *Pinot Noir*, respetivamente (Tabela 8). Os valores de resíduo seco são semelhantes, verificando-se valores ligeiramente superiores para a casta *Fernão Pires*.

Tabela 8. Massa das alíquotas analisadas.

Amostra	Volume (ml)	Massa do resíduo seco (mg)	Massa fresca (mg)
<i>Fernão Pires (B)</i>	1,00	302,25 ± 2,44	2500
<i>Pinot Noir (T)</i>	1,00	245,84 ± 1,68	2500

4.2. Dosagem de fenóis totais

Na determinação dos fenóis totais para o sumo de uva branca em análise, obteve-se um valor de 0,52 ± 0,003 mg de ácido gálico por mL e no caso do sumo de uva tinta um valor bastante mais reduzido, 0,14 ± 0,004 mg/mL, por interpolação na curva padrão de ácido gálico (Tabela 9). O que equivale a uma concentração de 520 mg/L e 140 mg/L para o sumo de uva branca e tinta, respetivamente.

Tabela 9. Determinação do teor de fenóis totais nas alíquotas analisadas.

Amostra	Fenóis totais (mg/L)
<i>Fernão Pires (B)</i>	520 ± 0,003
<i>Pinot Noir (T)</i>	140 ± 0,004

Os sumos de uvas tintas, na maioria dos estudos publicados, apresentaram maior teor de fenólicos totais em relação aos sumos de uvas brancas, contrariamente à determinação realizada nesta determinação de fenóis totais em sumos de uva.^{37,71} Também se verifica a presença de elevadas concentrações de fenóis totais, principalmente na casta *Pinot*

Noir, quando comparada com outras castas.²¹ Os sumos de uva tinta apresentaram uma concentração significativamente maior de fenóis totais (1177 vs. 744 mg de ácido gálico/L), flavonóides (98 vs. 63 mg catequina/L) e uma maior atividade antioxidante (9,16 vs. 2,83 meq Trolox/L) em comparação com sumos de uva branca.²²

Em estudos semelhantes sobre o conteúdo de fenóis totais em sumos de uva usando o método de Folin-Ciocalteu, os resultados para o sumo de uva *Concord* variaram entre 1654 e 1971 mg de ácido gálico/L e para sumos produzidos com maior variedade de uvas, a faixa de fenóis totais foi de 1407 a 1541 mg/L. Os mesmos autores mencionam que o conteúdo fenólico do sumo de uva pode ser influenciado pelos procedimentos aplicados na produção e reações ocorridas durante o armazenamento.³⁶

Nas castas avaliadas, tendo em conta os resultados obtidos, pode-se considerar como hipótese que o processamento das uvas para o fabrico do sumo, não terá permitido extrair a maior parte da composição fenólica, pelo que talvez melhorando o método de produção, nomeadamente aumentando a maceração das películas das uvas e de certo modo extraindo os fenóis presentes também nas sementes,²⁰ mantendo as características organolépticas favoráveis, será possível aumentar a concentração destes compostos, em proporção, dadas as castas que constituem os sumos, visto que a literatura descreve em maiores proporções nessas partes dos bagos.²⁸

4.3. Caracterização Fitoquímica dos sumos de uva de castas portuguesas *Fernão Pires* e *Pinot Noir*.

Após fracionamento do sumo de uva, obteve-se uma fase orgânica (FO) e uma fase aquosa (FA). Procedeu-se de seguida à separação da FA por SPE e recolheram-se 10 subfrações que foram monitorizadas por TLC à luz UV (366 nm), das quais as subfrações 1,2,3,7,8,9 e 10 não foram avaliadas devido à baixa concentração fenólica. Por conseguinte, durante a discussão dos resultados, trataremos apenas a FO e as subfrações 4, 5 e 6 da FA de cada amostra. Poder-se-ia discutir apenas a análise da FO, uma vez que contém a maioria dos compostos fenólicos, no entanto a FA mostrou ter atividade considerável na TLC, apresentada seguidamente no ponto 4.3.1. e 4.3.2.

4.3.1 Caracterização Fitoquímica das frações e subfrações obtidas do sumo de uva branca da casta *Fernão Pires*

Em primeiro lugar fez-se uma TLC com aplicações da FA e da FO, para deteção de compostos fenólicos (A) e análise bio-autográfica com DPPH (B) para avaliação da atividade antioxidante (Figura 26).

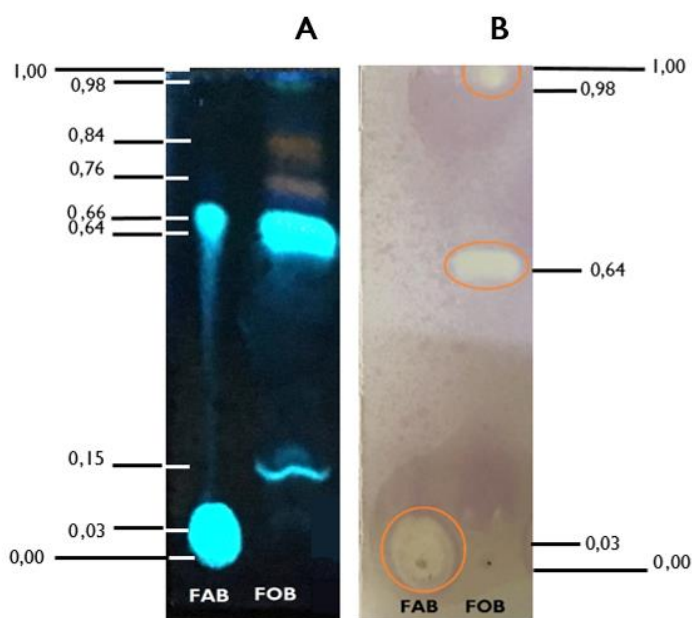


Figura 26. TLC em sílica gel, revelado com (A) NP/PEG a 366 nm e com (B) DPPH da fase aquosa e orgânica do sumo de uva branca. FAB-fração aquosa do sumo de uva branca; FOB-fração orgânica da extração do sumo de uva branca.

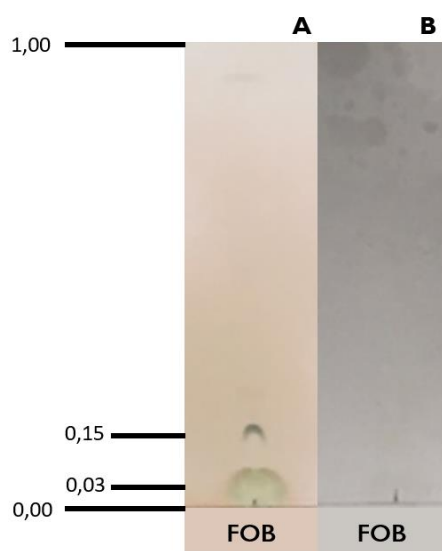


Figura 27. TLC em sílica gel, revelado com (A) cloreto de ferro e com (B) ácido clorídrico da FOB.

Para a deteção de ácidos fenólicos e flavonóides utilizou-se o reagente NP-PEG e observou-se sob luz UV a 366nm, visto que os flavonóides, nomeadamente as flavonas e os

flavonóis apresentam uma cor alaranjada ou amarelo-esverdeada, dependendo da hidroxilação dos compostos. Os derivados da apigenina emitem fluorescência amarela-esverdeada e os derivados da luteolina emitem fluorescência alaranjada. Já os ácidos fenólicos apresentam uma fluorescência azul nestas condições. Para a detecção de taninos, utilizou-se cloreto de ferro como revelador, nestas condições os taninos do tipo condensado exibem manchas de cor verde ao visível enquanto os taninos hidrolisáveis apresentam manchas de cor azul.⁸³ A fração orgânica apresentou pequenas quantidades de taninos de ambos os tipos. Para a pesquisa de antocianidinas não se observaram manchas após a aplicação de ácido clorídrico como revelador (Figura 27). Os resultados encontram-se sumariados na tabela 10. Para a fração aquosa (FAB), não se fez a aplicação, uma vez que a alta concentração de açúcares não permitiu separação dos constituintes, por isso procedeu-se à aplicação das várias subfrações aquosas, apresentadas em diante (Figura 30).

Tabela 10. Comportamento dos fitoconstituintes das frações orgânica (FOB) e aquosa (FAB) de sumo de uva branca da casta *Fernão Pires* em TLC com diferentes reveladores.

Fração	Revelação com NP/PEG			Revelação com DPPH		Revelação com cloreto de ferro		
	Rf	Cor na TLC a 366 nm	Classe fenólica	Rf	Cor na TLC	Rf	Cor na TLC	Classe fenólica
FAB	0,03	Branco azulado	Ácidos fenólicos	0,03	Amarelo	0,03	Verde	T. condensados
	0,66	Branco azulado	Ácidos fenólicos					
FOB	0,15	Branco azulado	Ácidos fenólicos	0,64	Amarelo	0,15	Azul	T. hidrolisáveis
	0,64	Branco azulado	Ácidos fenólicos					
	0,76	Alaranjado	Derivados da luteolina					
	0,84	Alaranjado	Derivados da luteolina					
	0,98	Azul esverdeado	Ácido fenólico					

Verificou-se que a FA continha compostos fenólicos polares, maioritariamente ácidos fenólicos devido à presença de manchas com fluorescência azul. A FO apresentava também manchas de coloração azulada (ácidos fenólicos) mas também manchas de cor laranja (flavonóides), com valores de Rf mais elevados correspondendo a compostos menos polares que na FA.^{84,85}

As frações FAB e FOB contêm manchas de fluorescência azul com valores de Rf baixos que correspondem provavelmente a ácidos fenólicos combinados devido à sua elevada polaridade encontrando-se por essa razão em menor quantidade ou inexistente na

fração orgânica. Na fração FOB é possível também detetar uma mancha que parece ter duas bandas também de cor azulada e intensa com um Rf igual a 0,64.

Paralelamente à deteção de compostos fenólicos por TLC, efetuou-se uma análise bioautográfica para avaliar a atividade antioxidante dos fitoconstituintes presentes nas frações FA e FB (Figura 26 B). Esta análise demonstrou que as manchas azuis são as que apresentam maior atividade antioxidante, em particular na fração FAB. Este resultado sugere que os ácidos fenólicos poderão ser um dos principais responsáveis pela atividade antioxidante.

Para complementar a análise fitoquímica fez-se em seguida a análise da FO por HPLC/PDA (Figura 28).

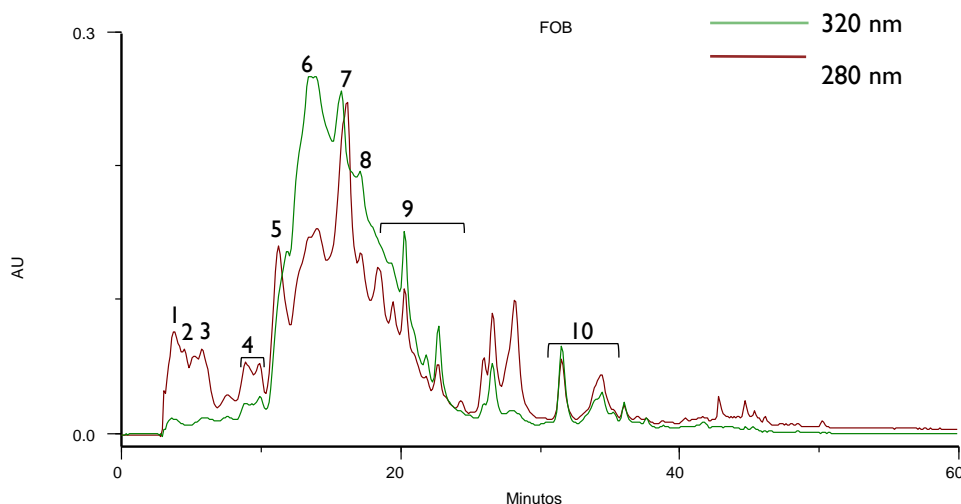


Figura 28. Cromatograma da FOB, obtido por HPLC/PDA.

Na análise por HPLC de fase reversa, a ordem de eluição dos compostos fenólicos depende principalmente, da polaridade dos mesmos, assim sendo compostos mais polares eluem no início do cromatograma. Assim, o tempo de retenção diminui à medida que aumenta o número de grupos hidroxilo no polifenol, se o polifenol contém substituintes apolares, tais como grupos metoxi, o tempo de retenção aumenta.¹³

Se as estruturas químicas dos compostos polifenólicos contiverem açúcares, os polifenóis eluem antes das correspondentes geninas, uma vez que aumentam a sua polaridade, sendo a fase estacionária apolar. Se estes açúcares são acilados, o tempo de retenção aumenta. Um efeito semelhante ocorre com o ácido cafeoilquínico e o ácido cafeo-

tartárico. Os resíduos de ácido quínico e tartárico são bastante polares e de baixo peso molecular, pelo que eluem antes do seu ácido hidroxicinâmico livre correspondente.¹³

A glicosilação afeta os tempos de retenção de maneira diferente com base na natureza do açúcar e na posição do título. Para polifenóis glicosilados nas mesmas posições de ligação, a ordem de eluição é di-*O*-glicósido, *O*-galactósido, *O*-glicósido, *O*-rutinósido, *O*-neohesperidósido, *O*-rhamnosídeo, geninas.¹³

No cromatograma da FOB, (Figura 28) observa-se uma significativa subida da linha de base entre os 15 e os 22 minutos. Este comportamento sugere a presença de compostos de elevado peso molecular que separam dificilmente em fase reversa.⁸⁶

Na figura 29 encontram-se representados os espectros correspondentes aos picos 1 a 10 do cromatograma da figura 28.

Os espectros UV correspondentes aos picos 1 a 3, representados na figura, são os compostos mais polares da fração orgânica do sumo de uva branco FOB. O espectro 1, com um máximo, característico a 270 nm poderá ser um derivado do ácido gálico, uma vez que o padrão injetado de ácido gálico apresentou um tempo de retenção diferente, nas mesmas condições.⁸⁷ Os espectros 2 e 3 parecem sugerir a presença de ácidos hidroxibenzóicos com menos hidroxilos que o ácido gálico uma vez que apresentam a banda a 260 nm ao invés de 270 nm. A maioria dos derivados do ácido benzóico têm máximos de absorção entre 246 e 262 nm, com uma inflexão a 290-315 nm, com exceção do ácido gálico e siríngeo que apresentam máximos de absorção a cerca de 270 e 275 nm, respetivamente. Os ácidos hidroxicinâmicos absorvem em duas faixas: 225-235 e 290-330 nm.¹³

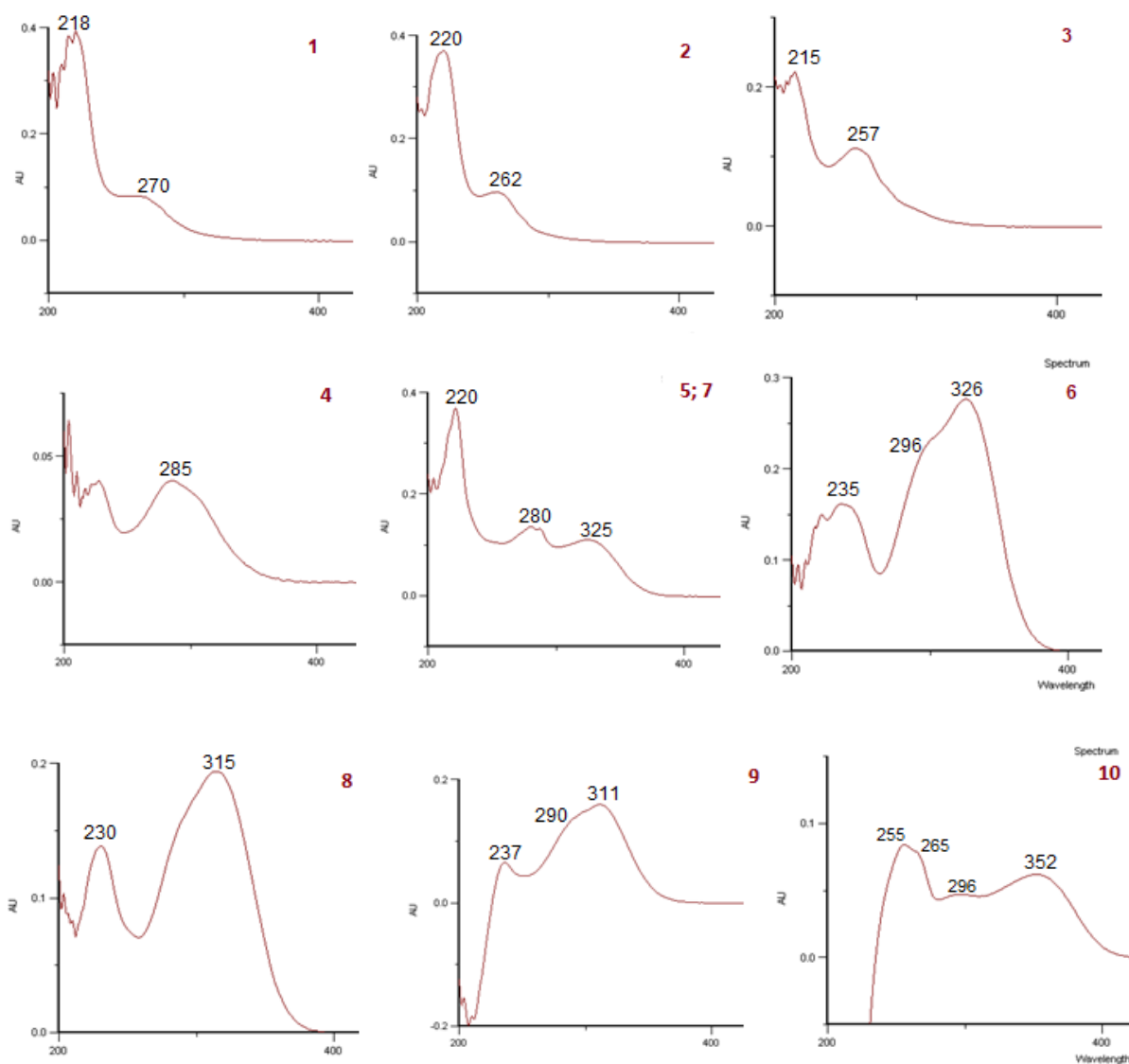


Figura 29. Espectros da FOB, obtidos por HPLC/PDA.

O pico 4 apresenta um espectro com um máximo de absorção característico de galocatequina ou de galhotanino, 285 nm.¹³

O espectro UV comum aos picos 5 e 7, localizados na zona onde ocorre uma elevação da linha de base do cromatograma, poderá corresponder a galhotaninos pelo facto de exibirem máximos de absorção a 220 e 280 nm que co-eluíram com derivados do ácido cafeico ou ferúlico, dada a presença do máximo a 325 nm.⁸⁷

O espectro do pico 6 é bastante característico de compostos derivados do ácido cafeico ou ferúlico que possuem como máximo 323 e duas inflexões, uma nos 239 e outra nos 296 nm.⁸⁸

Nos espectros correspondentes aos picos 8 e 9, com máximo de absorção a cerca de 310 nm e com perfil característico do ácido *p*-cumárico.⁸⁸ Tendo em consideração o tempo de retenção do padrão *p*-cumárico injetado nas mesmas condições, é possível afirmar que é um derivado deste ácido (tR 22,54 minutos). Quanto ao espectro que caracteriza o pico 10 do cromatograma, este é característico de um flavonol. Os espectros UV, na fase móvel metanol/água ácida, de flavonas e flavonóis exibem dois grandes picos de absorção na região 240-400 nm, comumente referidos como banda I (300-380 nm) e banda II (240-280 nm). Considera-se que a banda I está associada à absorção devida ao sistema cinamoílo do anel B e à banda II à absorção que envolve o sistema benzoílo do anel A.¹³ Neste caso trata-se provavelmente de uma quercetina glicosilada na posição 3 uma vez que apresenta a banda II com maior intensidade que a banda I que possui um máximo de absorção a cerca de 350 nm.

88

A identificação dos compostos presentes na FOB, sugerida pelos espectros UV encontra-se sumariada na tabela II.

Tabela II. Picos do cromatograma, tempo de retenção, possível classe fenólica a que pertencem os compostos comprimentos de onda máximos dos espectros dos mesmos, presentes na FOB.

Fração	tR (min)	$\lambda_{\text{máx}}$	Classe fenólica	Pico
FOB	4,00	218; 270	Derivados do ácido gálgico	1
	4,80	220; 262	Ácidos hidroxibenzóicos	2
	5,40	215; 257	Ácidos hidroxibenzóicos	3
	10,10	285	Galhocatequina/ Galhotaninos	4
	11,30	220; 280; 325	Galhotaninos com derivados do ácido cafeico ou ferúlico	5; 7
	13,40	235; 296; 326	Derivados do cafeico ou ferúlico	6
	16,90	230; 315	Derivados do ácido <i>p</i> -cumárico	8
	20,25	237; 290sh; 311	Derivados do ácido <i>p</i> -cumárico	9
	31,40	255; 265sh; 296; 352	Quercetina glicosilada na posição 3	10

Após tentativa de identificação de alguns compostos, principalmente, com recurso, aos espectros UV, e aos máximos de absorção e tempo de retenção dos padrões injetados (Tabela I4), procedeu-se a uma identificação complementar, segundo informação obtida por espectrometria de massa, com condições separativas diferentes. O cromatograma TIC obtido do HPLC/ESI/TOF apresentou um perfil semelhante ao cromatograma do HPLC/PDA

sugerindo que a ordem de eluição dos compostos se mantém em ambos os sistemas de fase reversa e permitindo também relacionar a informação obtida pelas duas análises.

Os resultados obtidos dos espectros de massa do cromatograma HPLC/ESI/TOF estão resumidos na tabela 12.

As massas do íon pseudomolecular dos espectros de massa obtidos sugerem a presença de vários ácidos orgânicos, como o ácido málico [PM 134], ácido tartárico [PM 150] e ácido cítrico [PM 192], (pico A e B), com maior abundância da classe dos ácidos fenólicos como o ácido gálico [PM 170] (pico B); o caftárico [PM 312] (pico C e M); o *p*-hidroxibenzóico [PM 138], o cafeoilquínico [PM 354] (pico D); o cumaroiltartárico [PM 295] (pico E); o feruloil-tartárico [PM 326] (pico G); o *p*-cumaroil-glucósido [PM 326] parece estar presente sob a forma de diferentes isômeros (pico K, L e O).^{89,90,91}

Tabela 12. Tentativa de identificação de compostos presentes na FOB, resultados obtidos por HPLC/ESI/TOF.

Pico	tR (min)	Íon pseudomolecular [M-H] ⁻	HPLC-ESI-TOF (m/z)	Tentativa de identificação
A	0,24	149,0		Ácido tartárico
B	0,63	179,1		Ácido cafeico
		133,0		Ácido málico
		169,0		Ácido gálico
C	1,55	191,0		Ácido cítrico
		311,0	149,008; 179,005	Ácido caftárico
D	2,30	137,0		Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico
E	3,12	353,1		Ácido cafeoilquínico
		295,0	163,040	Ácido cumaroiltartárico
F	3,40	285,0		Camferol
		465,1		Delfinidina-3-O-glucósido
G	3,48	325,1	193,050; 149,008	Ácido feruloiltartárico
H	4,18	389,1		Resveratrol glucósido
I	4,30	289,0		Catequina
J	4,37	477,2		Quercetina 3-glucuronídeo
K	5,06	325,2		<i>p</i> -cumaroil-glucósido
L	5,30	325,2	307,191	<i>p</i> -cumaroil-glucósido
		329,2	313,239	Malvidina
M	5,78	311,2	179,056	Ácido caftárico
N	6,29	265,1		<i>p</i> -cumárico eritrósido
O	7,67	325,2		<i>p</i> -cumaroil-glucósido

Identificação realizada com base na massa molecular e nos padrões de fragmentação, que estão de acordo com os autores: Boğa, Mehmet *et al.* (2016)⁹¹; Sanz, Miriam *et al.* (2012)⁹²; Pati, Sandra *et al.* (2014)⁸⁹; Seeram, Navindra *et al.* (2006)⁹⁰; Oliveira, Luciana *et al.* (2014)⁹³; Regal, Patricia *et al.* (2017)⁹⁴; Dueñas, Montserrat *et al.* (2008)⁹⁵.

A presença de flavonóides e antocianidinas parece ser bastante residual, tendo-se identificado apenas um flavonol, o camferol [PM 286], e a delphinidina-3-O-glucósido [PM 466] (pico F).^{91,93} Identificou-se ainda um flavanol, a catequina [PM 290], muito descrita pela literatura, como composto característico das uvas (pico I).⁹⁰ A quercetina 3-glucorónido [PM 478] surge aos 4,37 minutos (pico J).⁹⁵

O resveratrol glucósido [PM 390], um estilbeno, identificado por volta dos 4 minutos de tempo de retenção (pico H) hidrolisa durante a fermentação do vinho e liberta o resveratrol, que está contido em quantidades consideravelmente maiores nos vinhos tintos, e encontra-se principalmente nas peles dos bagos.⁹⁴

Para o pico N, o espectro de massas parece sugerir a presença o *p*-cumárico eritrósido [PM 266].

Os resultados obtidos por ESI/TOF são concordantes com os resultados previamente obtidos por HPLC/PDA, pois os compostos identificados pelos espectros de massa possuem espectros semelhantes aos que foram detetados por HPLC/PDA. Assim foi possível identificar compostos como: ácido gálico, ácido cafeico/ferúlico ou derivados, o ácido *p*-cumárico, a quercetina 3-O-glicósido (pico 10, Figura 29), etc. Os espectros de massa permitiram completar informação, com a identificação de compostos como: a catequina, o resveratrol glucósido, a malvidina, o ácido caftárico, entre outros e para além dos compostos semelhantes encontrados na análise dos espectros UV e dos espectros de massa, foi possível observar ainda a elevação da linha de base no cromatograma obtido por ESI/TOF, o que suporta mais uma vez a presença de compostos de elevado peso molecular.

Após tratamento dos resultados relativos à FOB, apresentaremos posteriormente os resultados da FAB. Devido ao elevado teor de açúcares presentes, esta fração teve que ser subfracionada para permitir a sua análise cromatográfica. Desta forma procedeu-se de seguida ao seu fracionamento por SPE e recolheram-se 10 subfrações que foram monitorizadas por TLC. Seguidamente as subfrações 7,8,9 e 10 de ambos os sumos foram injetadas no HPLC, no entanto como a concentração de compostos era residual, os espectros observados foram insignificantes para a amostra em estudo, o que foi de encontro aos resultados obtidos por TLC para estes compostos. Apenas as subfrações 4B (eluída com acetato de etilo), 5B e 6B (eluídas com metanol) apresentaram manchas correspondentes a compostos fenólicos e exibiram atividade antioxidante na análise bioautográfica. Na figura 30 é possível observar os resultados obtidos após análise por TLC das subfrações 4B, 5B e 6B do sumo de uva branco.

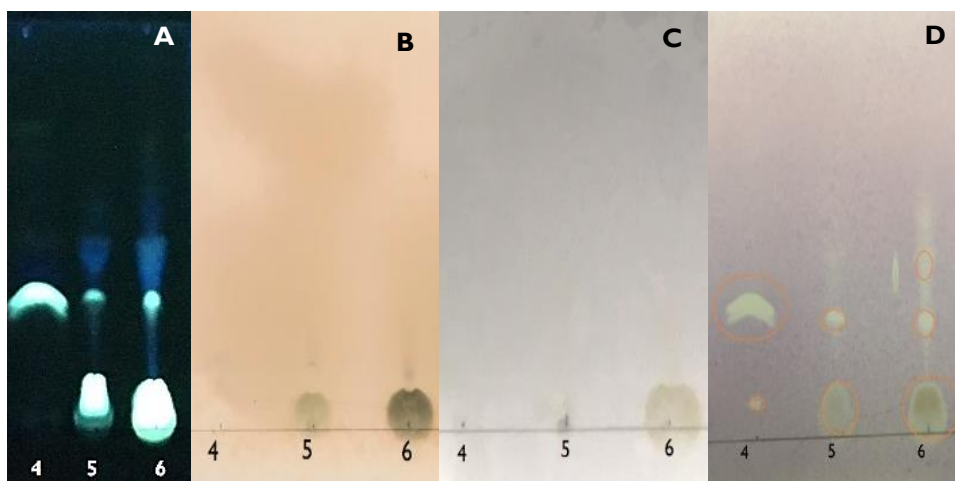


Figura 30. TLC resultantes da aplicação de alíquotas das principais frações da FAB. (A) Revelação com o reagente NP/PEG (366nm) para identificação de compostos fenólicos; (B) revelação com cloreto de ferro 3% para identificação de taninos; (C) revelação com HCl 0,1N para identificação de antocianinas; (D) revelação com DPPH para observação da intensidade da atividade biológica.

Na figura 30, observa-se que à luz UV (366 nm) após a aplicação do revelador NP/PEG a presença de alguns compostos fenólicos; todas as subfrações aquosas parecem ser ricas em ácidos fenólicos, devido à cor branca-azulada que se observa ao UV após a aplicação do revelador NP/PEG.

A revelação com cloreto de ferro, permitiu identificar a presença de taninos na amostra. Esta pesquisa foi efetuada, uma vez que, a elevação da linha de base nos cromatogramas pode ser consequência da presença de taninos de elevado peso molecular; Com este revelador, os taninos condensados exibem coloração verde, enquanto os taninos hidrolisáveis adquirem coloração azul.⁸³ Após a revelação, tanto a cor verde, como a azul foram observadas nas placas ao Visível. Não seria de esperar, uma vez que os taninos são característicos dos vinhos tintos.⁹⁶ Na subfração 6B da FAB observa-se uma mistura de cor verde e azul, na FOB a separação das cores ocorre, logo podemos presumir que teremos presença de taninos condensados e hidrolisáveis.

Sendo as antocianinas indicadores naturais de pH, a identificação destas foi feita por observação de manchas coradas após acidificação do meio com ácido clorídrico, A TLC com aplicações de 10 µL das várias subfrações da FAB, após correr a fase móvel, foi pulverizada com HCl 0,1N, que permitiu observar a subfração com a cor mais intensa (6B) e, conseqüentemente, onde as antocianinas estariam em maior abundância (Figura 30).

Na amostra de sumo de uva branca observa-se mancha amarela na subfração 6B, em compostos bastante polares.

Por último efetuou-se a análise bioautográfica para o DPPH para avaliar a contribuição dos compostos fenólicos para a atividade antioxidante (Figura 30).

Os resultados mostram que o sumo de uva branca, da casta portuguesa *Fernão Pires*, possui atividade antioxidante e que essa atividade está presente em todas as subfrações, observando-se com maior intensidade na subfração 4B.

Tal como para a fração orgânica, efetuou-se a análise das subfrações 4B, 5B e 6B da fração aquosa, por a HPLC/PDA. Os cromatogramas obtidos estão representados nas figuras 31, 33 e 35.

Das 3 subfrações analisadas, a 4B, obtida por eluição com acetato de etilo, apresenta uma maior variedade de compostos. As subfrações 5B e 6B foram eluídas posteriormente com metanol. Observam-se picos em maior quantidade na fase inicial do cromatograma, onde eluíram os compostos mais polares dessas alíquotas.

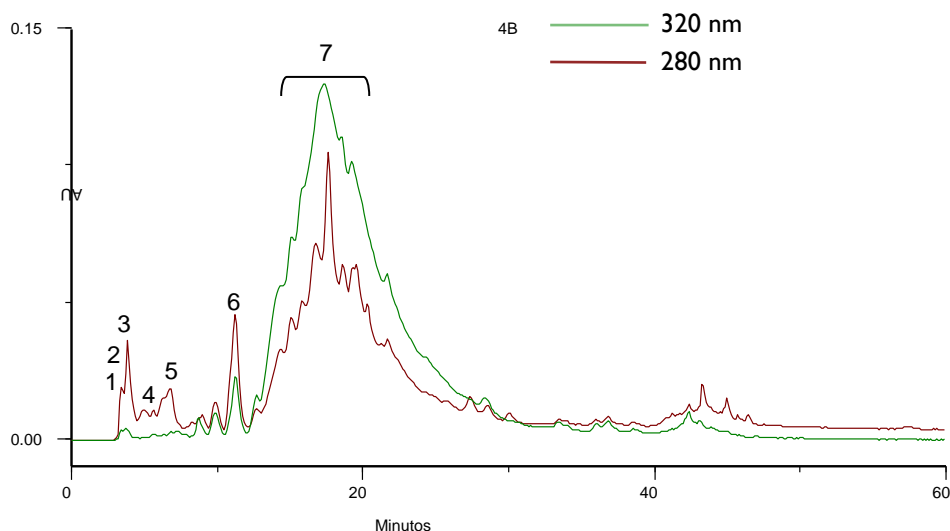


Figura 31. Cromatograma da subfração 4B da FAB, obtido por HPLC/PDA.

Tal como na FO, é visível a elevação da linha de base, facto que permitiu, naquele caso sugerir a presença de taninos de peso molecular elevado. O espectro dos picos 1; 3 e 4 são característicos de ácidos hidroxibenzóicos em face aos máximos apresentados.

A observação dos espectros obtidos mostram todavia a predominância de ácidos hidroxibenzóicos (picos 2 e 5), pela presença de máximos de absorção da ordem dos 260

nm e com apenas uma banda, correspondente a um anel fenólico.⁹⁷ O espectro do pico 6 apresenta características semelhantes às procianidinas O espectro correspondente ao pico 7 parece pertencer ao grupo dos ácidos hidroxicinâmicos como derivados do ácido cafeico ou ferúlico.¹³

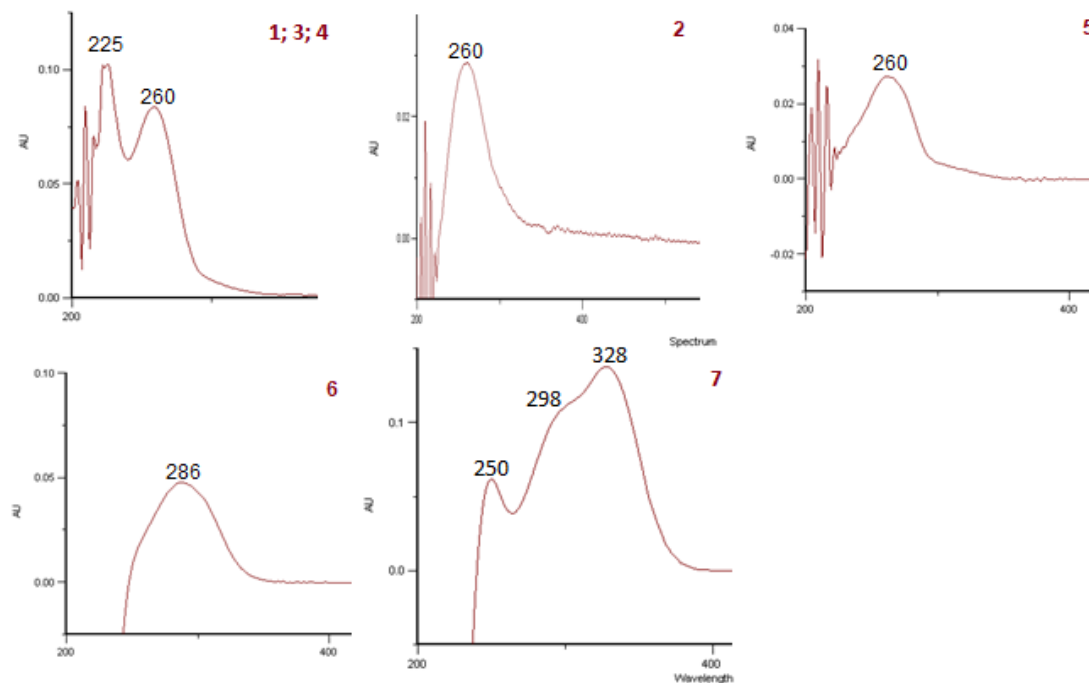


Figura 32. Espectros da subfração 4B da FAB, obtido por HPLC/PDA.

No cromatograma da subfração 5, eluída com metanol (Figura 33), destacam-se dois picos com elevada intensidade (picos 1 e 2) e outros picos minoritários.

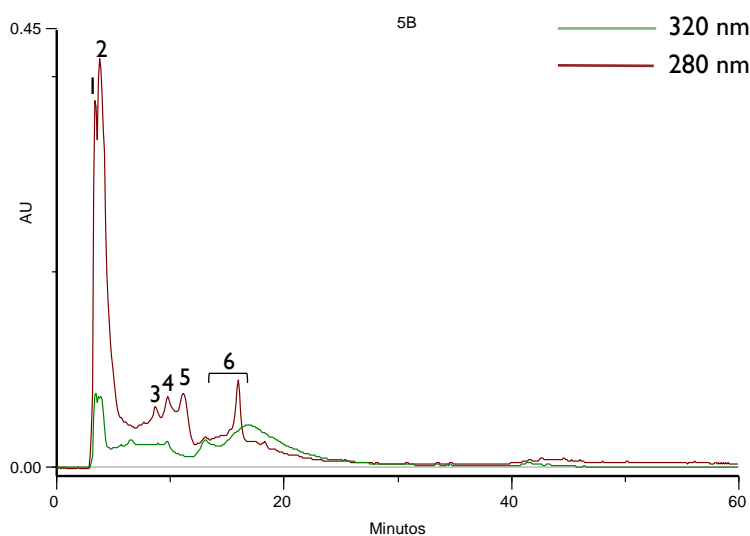


Figura 33. Cromatograma da subfração 5B da FAB, obtido por HPLC/PDA.

Os espectros dos picos 1 a 5 apresentam máximos de absorção que sugerem a presença de ácido gálgico ou derivados (galhotaninos) devido à presença de uma banda a 260/270 nm, considerando também o baixo tempo de retenção e, por isso a elevada polaridade que apresenta, comparando ao ácido gálgico padrão injetado, que apresentou tempo de retenção perto dos 5 minutos, assim como os compostos que parecem fazer parte dos picos iniciais do cromatograma 5B da FAB (Tabela 14). O espectro UV do pico 6 parece conter um derivado do ácido caféico ou feulico (326 nm) que co-eluiu com um tanino.⁹⁸

A TLC previamente efetuada mostrou a presença de proantocianidinas e elagitaninos, facto que parece estar de acordo com os resultados obtidos por HPLC/PDA.

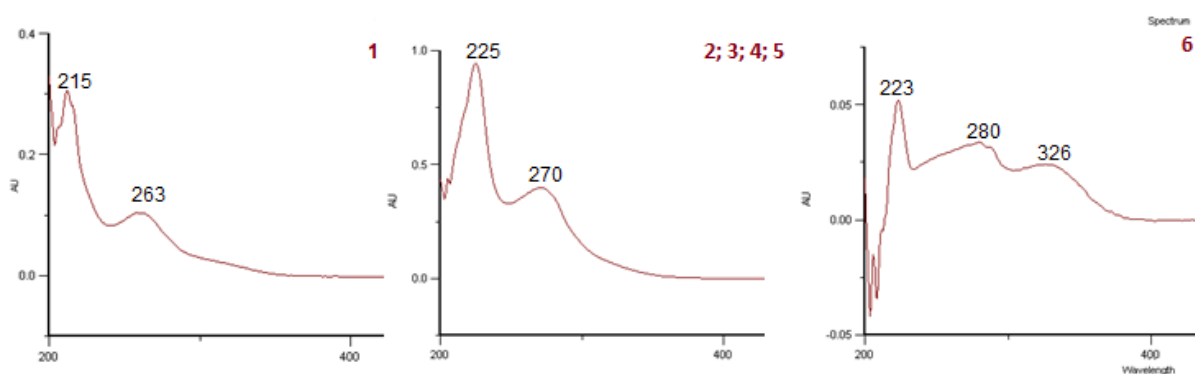


Figura 34. Espectros da subfração 5B da FAB, obtidos por HPLC/PDA.

No cromatograma da subfração 6B, eluída com metanol (Figura 35), destacam-se vários picos com elevada intensidade (picos 1, 4 e 6), para além de uma elevação da linha de base já observada em outras frações.

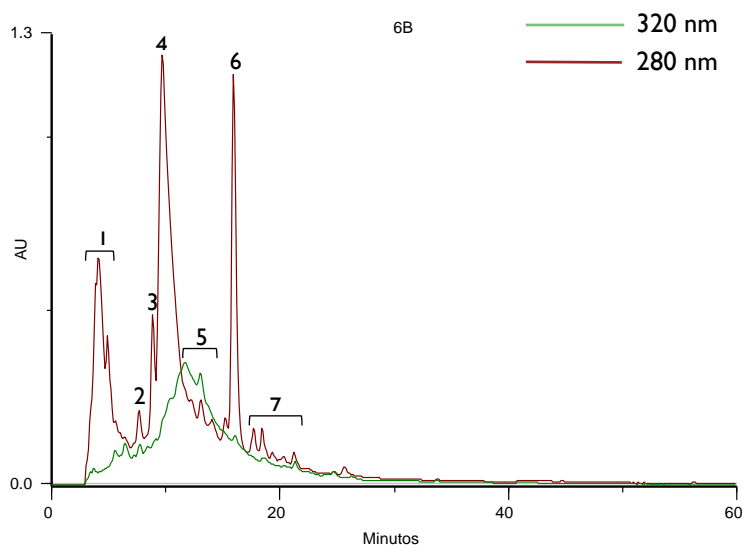


Figura 35. Cromatograma da subfração 6B da FAB, obtido por HPLC/PDA

Após análise dos espectros obtidos na subfração 6B da FAB conclui-se que os compostos dominantes são os taninos. Encontramos derivados de ácidos hidroxibenzoicos, principalmente, nos picos 1 a 3. E os espectros 4 a 7, taninos hidrolisáveis, possivelmente do tipo gálico devido aos máximos a 225 e 260 nm, com derivados do ácido cafeico ou ferúlico, dada a presença do máximo a 325 nm.^{87,98}

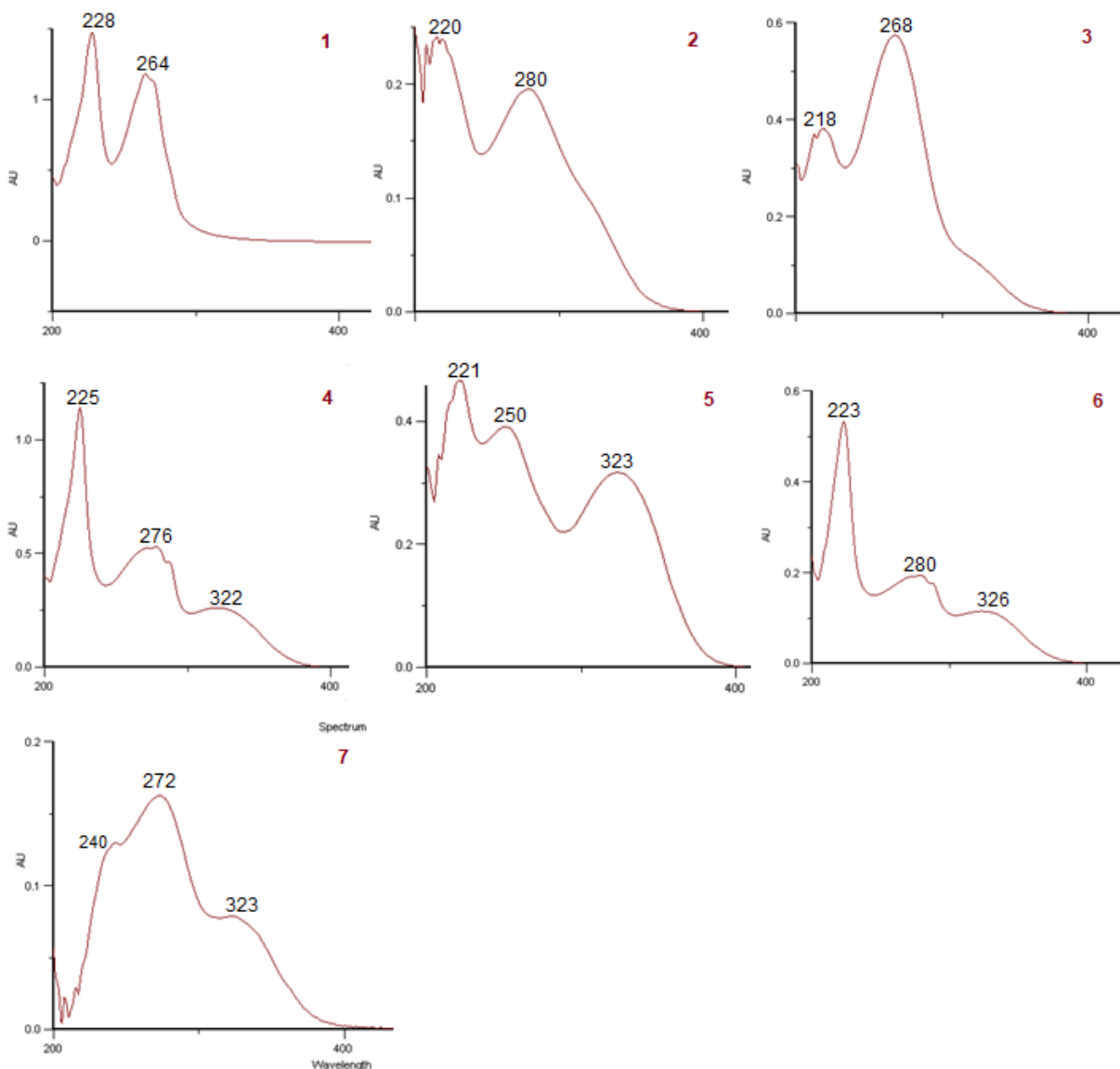


Figura 36. Espectros da subfração 6B da FAB, obtidos por HPLC/PDA.

Na tabela 13 estão resumidos os compostos fenólicos identificados na FAB.

Na FAB, segundo os resultados apresentados na tabela 13, é possível verificar a presença dos mesmos compostos identificados na FOB, no entanto, em concentrações mais elevadas no caso dos ácidos fenólicos, na subfração 5B e 6B da FA, tendo em consideração a elevada polaridade desta fração. A constituição entre as várias subfrações da FAB, é muito

idêntica, eluindo inicialmente ácidos hidroxibenzóicos e por fim os derivados do cafeico ou ferúlico, com alguns taninos também presentes.

Tabela 13. Picos do cromatograma, tempo de retenção, classe fenólica e comprimentos de onda máximos dos espectros dos compostos, presentes nas várias frações aquosas do sumo de uva branco.

Fração	tR (min)	$\lambda_{\text{máx}}$	Classe fenólica	Pico
4 B	3,46	260	Ácidos hidroxibenzóicos	2
	3,79	225; 260	Ácidos hidroxibenzóicos	1; 3; 4
	8,00	260	Ácidos hidroxibenzóicos	5
	11,30	285	Procianidina	6
	17,35	250; 298sh; 328	Derivados do cafeico ou ferúlico	7
5 B	4,82	215; 263	Galhotaninos	1
	5-12	225; 270 (225; 272)	Galhotaninos	2; 3; 4; 5
	15,00	223; 280; 326	Derivados do ácido cafeico ou ferúlico e taninos	6
6 B	0,00 a 7,00	228; 264	Derivados do ácidos hidroxibenzóicos	1
	7,60	220; 280	Derivados do ácidos hidroxibenzóicos	2
	8,90	218; 268	Derivados do ácidos hidroxibenzóicos	3
	10,50	225; 276; 322	Galhotaninos e derivados de ácido cafeico ou ferúlico	4
	12,30	221; 250; 323	Galhotaninos e derivados de ácido cafeico ou ferúlico	5
	16,40	223; 280; 326	Galhotaninos e derivados de ácido cafeico ou ferúlico	6
	18,50	240; 272; 323	Galhotaninos e derivados de ácido cafeico ou ferúlico	7

Para auxiliar na identificação de compostos, por análise de cromatogramas e espectros obtidos por HPLC, os mesmos foram comparados com as características dos padrões de compostos fenólicos conhecidos, como descrito na tabela 14, a partir da qual foi possível identificar os máximos de absorção dos derivados do ácido cafeico ou ferúlico, da quercetina, do ácido *p*-cumárico e do ácido gálico, presentes na amostra. Ainda os tempos de retenção foram úteis para interpretar a ordem de eluição dos compostos das várias alíquotas.

Tabela 14. Tempo de retenção e comprimentos de onda máximos dos espectros dos padrões injetados.

Padrão (1 mg/mL)	tR (min)	$\lambda_{\text{máx}}$
Ácido cafeico	18,60	320
Ácido elágico	39,50	254sh; 300sh; 354sh; 268
Ácido gálico	5,80	262sh; 229; 273
Ácido siríngico	18,70	228; 275; 292sh
Ácido vanílico	17,30	227; 260; 292
Campferol	43,26	246sh; 265; 295sh; 319sh; 366
Catequina	14,00	234; 279; 286sh
Quercetina	41,90	255; 300sh; 370
p_cumárico	22,54	231; 298sh; 310

4.3.2. Caracterização Fitoquímica das frações e subfrações obtidas do sumo de uva tinta da casta *Pinot Noir*

Para determinar a composição química do sumo da uva da casta *Pinot Noir*, fez-se o fracionamento de acordo com o descrito no material e métodos e seguidamente as frações obtidas (FAT e FOT) foram submetidas a análise por TLC para detecção de compostos fenólicos (Figura 37A) e análise bioautográfica com DPPH (Figura 37B) para avaliação da atividade antioxidante.

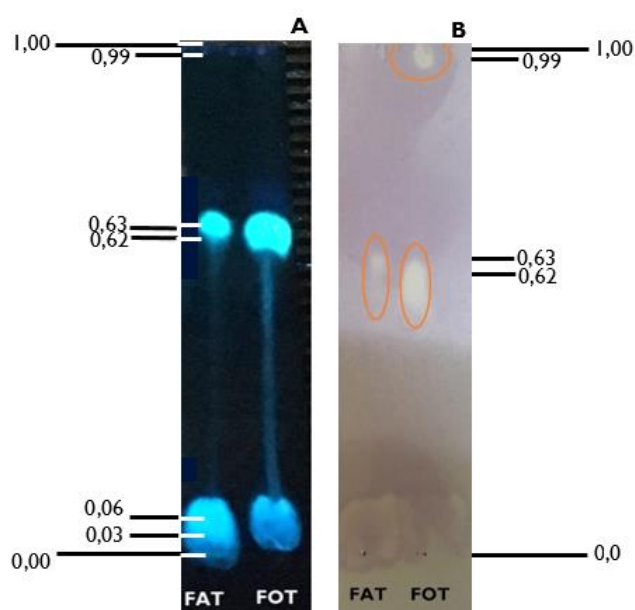


Figura 37. TLC obtida após aplicação da FAT e FOT e revelação com (A) NP/PEG a 366 nm e com (B) DPPH. FAT-fração aquosa de sumo de uva tinta; FOT-fração orgânica da extração do sumo de uva tinta.

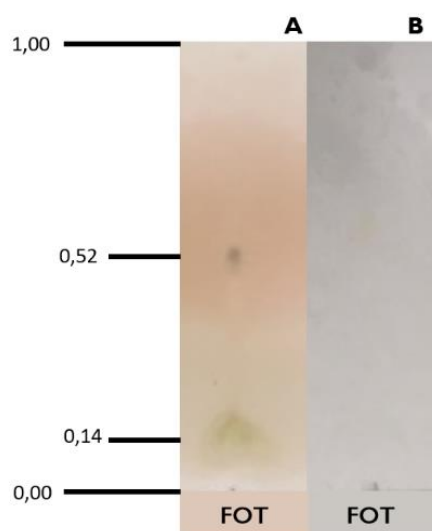


Figura 38. TLC em sílica gel, revelado com (A) cloreto de ferro e com (B) ácido clorídrico da FOT.

Os fatores de retenção, cores das manchas após revelação com NP/PEG, DPPH, FeCl_3 3% e HCl 0,1N e respetiva interpretação encontram-se descritos na tabela 15.

Tabela 15. Comportamento dos fitoconstituintes das frações orgânica (FOT) e aquosa (FAT) de sumo de uva tinto da casta *Pinot Noir* em TLC com diferentes reveladores.

Fração	Revelação com NP/PEG			Revelação com DPPH		Revelação com cloreto de ferro		
	Rf	Cor na TLC a 366 nm	Classe fenólica	Rf	Cor na TLC	Rf	Cor na TLC	Classe fenólica
FAT	0,03	Branco azulado	Ácidos fenólicos					
	0,63	Branco azulado	Ácidos fenólicos	0,63	Amarelo			
FOT	0,06	Branco azulado	Ácidos fenólicos			0,14	Verde	T. condensados
						0,52	Azul	T. hidrolisáveis
	0,62	Branco azulado	Ácidos fenólicos	0,62	Amarelo			
	0,99	Branco azulado	Ácidos fenólicos	0,99	Amarelo			

A análise por TLC revelou a presença de compostos muito polares (Rf 0 - 0,06), outros de polaridade intermédia (Rfs cerca de 0,6) em ambas as frações. A fração FOT exibiu ainda pequena quantidade de compostos de polaridade baixa (Rf 0,99). A cor azul das manchas à luz UV (366 nm) após a revelação com NP/PEG é um indicador da presença de ácidos fenólicos (Figura 37).

Para a detecção de taninos com revelador cloreto de ferro como revelador observaram-se manchas de cor verde (Rf 0,14) e de cor azul (Rf 0,52) indicadoras da presença de taninos condensados e hidrolisáveis, respetivamente.⁸³

A pesquisa de antocianidinas com ácido clorídrico não detetou a presença destes compostos na FOT, pois não se observa manchas coradas de rosa, resultado espectável para o sumo de uva tinta da casta *Pinot Noir* (Figura 38).

A análise bioautográfica com DPPH demonstrou que são os compostos de polaridade média e baixa os que mais contribuem para a atividade antioxidante (Figura 37).

Para obter mais informação acerca da estrutura dos compostos presentes, procedeu-se á análise das amostras por HPLC/PDA cujo cromatograma se encontra representado na figura 39.

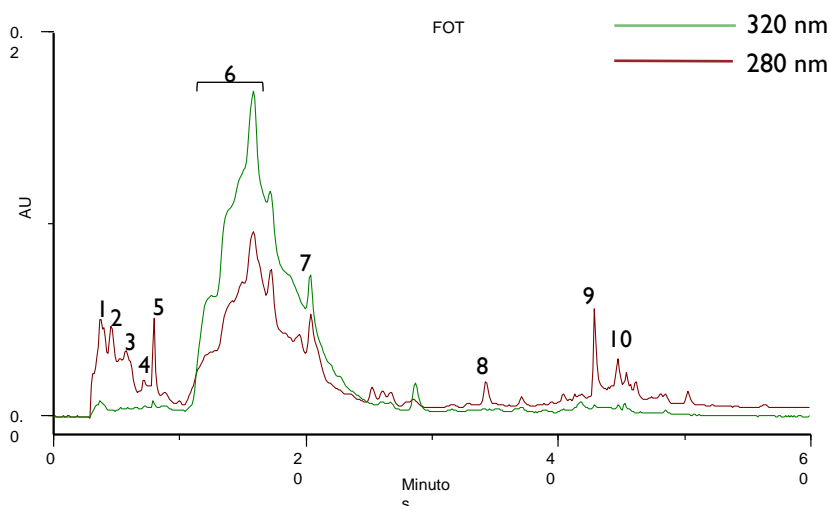


Figura 39. Cromatograma da FOT, obtido por HPLC/PDA.

O cromatograma da FOT apresenta características semelhantes ao cromatograma da FOB (Figura 28). Com um aumento da linha de base do cromatograma na mesma zona de tempos de retenção. No entanto nesta amostra parece existir menor variedade de compostos fenólicos que na FOB, dado que foram detetados apenas seis espectros distintos (Figura 40).

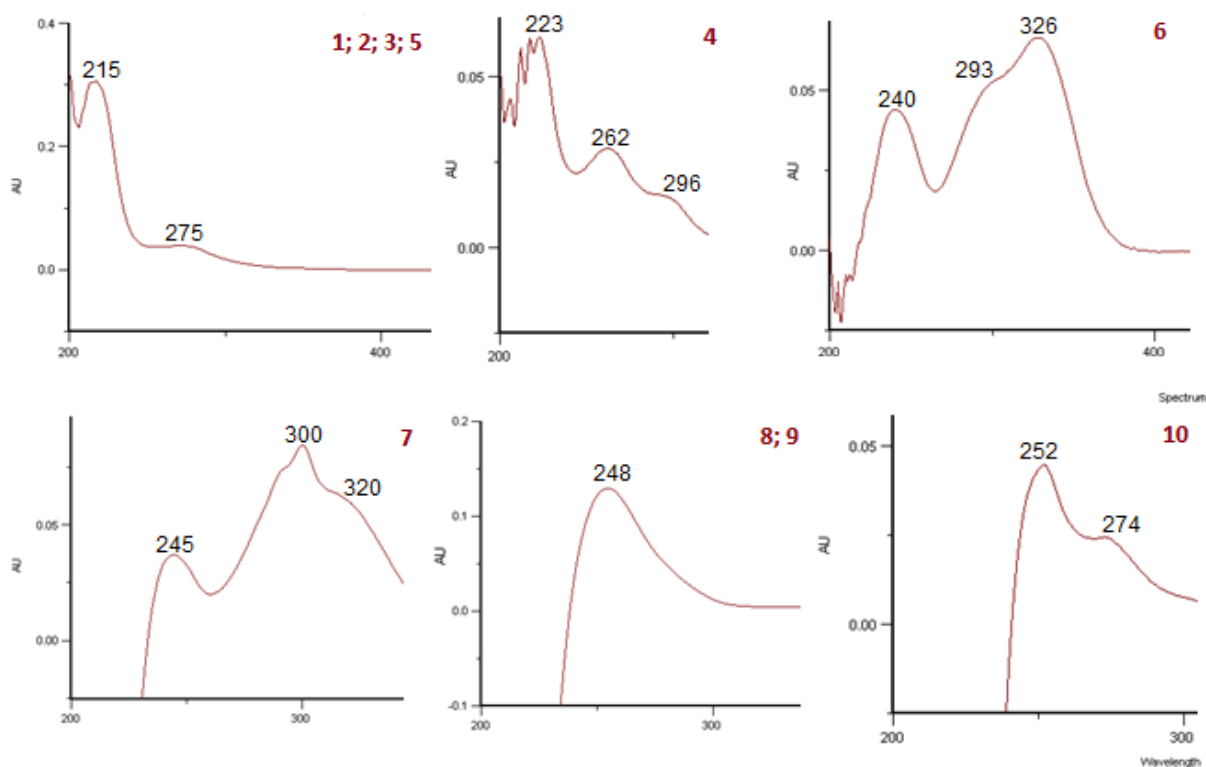


Figura 40. Espectros da FOT, obtidos por HPLC/PDA.

Os picos 1, 2, 3 e 5 do cromatograma da figura 39 apresentam o mesmo perfil espectral que, embora resultem muito provavelmente de co-eluição de compostos, é possível visualizar máximos de absorção que correspondem aos mesmos ácidos hidroxibenzoicos que foram identificados na FOB, nomeadamente ácido gálico entre outros. O espectro 4 parece corresponder a derivados do ácido vanílico ou protocatéquico uma vez que apresenta dois máximos de absorção (260 nm e 290 nm). O espectro 6 apresenta um perfil e máximos de absorção que são característicos de ácidos hidroxicinâmicos, mais concretamente do tipo ácido cafeico ou ferúlico. O perfil espectral do composto 7 apresenta alguma complexidade, não se assemelhando a nenhum composto fenólico, no entanto é possível identificar máximos de absorção de ácidos hidroxicinâmicos do tipo cafeico ou ferúlico (320 nm) que pode co-eluir com outros compostos não identificados. Os espectros dos picos 8, 9 e 10 apresentam características semelhantes a espectros de taninos hidrolisáveis do tipo elágico porque apresenta um máximo característico (250 nm).⁸⁷

Os resultados da identificação estrutural efetuada por HPLC/PDA encontram-se resumidos na tabela 16.

Tabela 16. Picos do cromatograma, tempo de retenção, classe fenólica e comprimentos de onda máximos dos espectros dos compostos, presentes na fração orgânica do sumo de uva tinta (FOT).

Fração	tR (min)	$\lambda_{\text{máx}}$	Classe fenólica	Pico
FOT	3,50/8,50	215; 275 (225; 265)	Ácidos hidroxibenzóicos	1; 2; 3; 5
	5,30	215; 260	Ácidos hidroxibenzóicos	1; 2; 3; 5
	7,10	223; 262; 296sh	Ácido vanílico ou protocatéquico	4
	12,40 a 17,00	240; 293sh; 326	Derivados do ácido cafeico ou ferúlico	6
	20,44	245; 300; 320	Derivados do ácido cafeico ou ferúlico	7
	34,20	248	Elagitaninos	8; 9
	42,80	255	Elagitaninos	8; 9
	45,30	252; 274	Elagitaninos	10

A informação obtida pela análise das TLC e dos espectros UV obtidos por HPLC/PDA permitem a identificação de algumas classes de compostos fenólicos embora tenham algumas limitações na identificação dos compostos individuais. Assim para complementar a informação obtida efetuou-se a análise da fração FOT por HPLC/ESI/TOF.

Como se analisa, resumidamente na tabela 17, por análise dos espectros de massa da FOT, foi possível apenas identificar alguns dos ácidos orgânicos habitualmente presentes nas uvas, e são eles: o ácido tartárico [PM 150] (pico A), o málico [PM 134] e o quínico [PM 192] (pico B)⁹¹, alguns ácidos fenólicos ou derivados como isómeros do ácido caftárico [PM 312] (pico C e D)⁹⁹ e isómeros do cutárico [PM 296] (pico E, F e G) e ainda o ácido feruloil tartárico [PM 326] (pico H).^{89,100}

Tabela 17. Tentativa de identificação de compostos presentes na FOT, resultados obtidos por HPLC/ESI/TOF.

Pico	R _t (min)	Ião precursor [M-H] ⁻	HPLC/ESI/TOF m/z	Tentativa de identificação
A	0,24	149,0		Ácido tartárico
B	0,59	133,0		Ácido málico
		191,0		Ácido quínico
C	1,51	311,0		Ácido caftárico (isómero)
D	1,94	311,0		Ácido caftárico (isómero)
E	2,45	295,1		Ácido cutárico (isómero)
F	2,90	295,1		Ácido cutárico (isómero)
G	3,16	295,0		Ácido cutárico (isómero)
H	3,60	325,1		Ácido feruloil tartárico

Identificação realizada com base na massa molecular e nos padrões de fragmentação, que estão de acordo com os autores: Boža, Mehmet *et al.* (2016)⁹¹; Pati, Sandra *et al.* (2014)⁸⁹; Barros, Ana *et al.* (2014)⁹⁹.

Muitos dos compostos identificados por ESI/TOF apresentam espectros UV, obtidos por HPLC/PDA, concordantes.

Tal como aconteceu com o sumo de uva branca, a fração aquosa de uva tinta (FAT) continha um elevado teor de açúcares que obrigou a efetuar o fracionamento por SPE antes de proceder à análise estrutural. Das 10 subfrações recolhidas e monitorizadas por TLC, também a subfração eluída com acetato de etilo (4T) e as seguintes eluídas com metanol (5T e 6T) apresentaram maior teor de compostos fenólicos e de atividade antioxidante e por essa razão foram analisadas por TLC com reveladores específicos para deteção de compostos fenólicos, taninos, antocianinas e atividade antioxidante. Os resultados estão representados na figura 41.

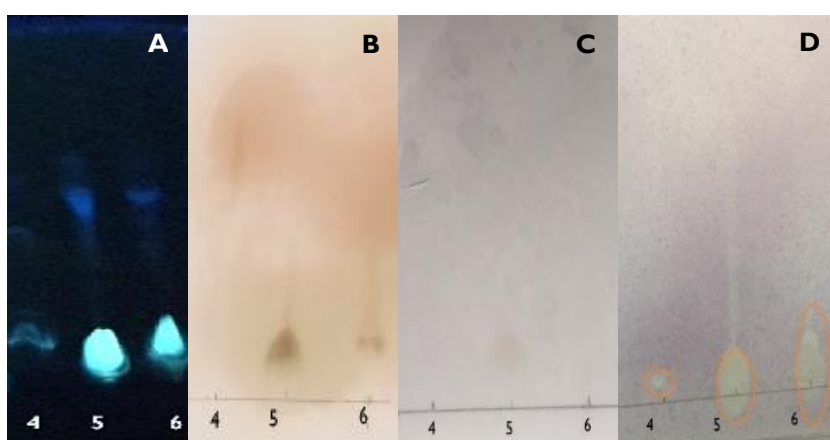


Figura 41. TLC das subfrações 4,5,6 resultantes da SPE da FAT e FOT. (A) Revelação com o reagente NP/PEG (366nm); (B) revelação com cloreto de ferro 3%; (C) revelação com HCl 0,1N; (D) revelação com DPPH.

Em todas as subfrações (4, 5 e 6), observadas a 366 nm, é perfeitamente perceptível a presença de ácidos fenólicos, devido à cor branca-azulada presente em todas as bandas embora as suas concentrações pareçam menores que nas mesmas subfrações do sumo de uva branca.

A TLC pulverizada com o revelador cloreto de ferro 3% e observou-se, quais as cores que caracterizavam os taninos em cada subfração (Figura 41). Observaram-se ambas as cores na placa, no entanto, em comparação com a placa do sumo de uva branca, realizada nas mesmas condições, a casta *Pinot Noir* parece apresentar uma concentração baixa de taninos, tanto do tipo hidrolisáveis, como do tipo condensado. Não seria de esperar, uma vez que os taninos são característicos dos vinhos tintos, mas é preciso ter em consideração o modo de preparação da amostra, que neste caso, não permitiu a extração dos taninos que aparecem principalmente nas sementes e películas dos bagos.⁹⁶ Nestas amostras, a prensa

permitiu apenas que o sumo da polpa fosse extraído e portanto a amostra não contém os constituintes da película e das grainhas das uvas.

Na amostra de sumo de uva tinta é a subfração 5T a que contém maior abundância destes compostos, observando-se uma mancha azul esverdeada, a observação da placa permite sugerir a presença de dois tipos de taninos, condensados e hidrolisáveis, nas subfrações 5T e 6T.

Para avaliar a presença de antocianinas foi realizada uma TLC para avaliar a subfração com maior concentração dos compostos. Na amostra de sumo de uva tinta a mancha rosa, apesar de esvanecida, aparece na subfração 5T, com baixo Rf. Nas restantes subfrações não é observável qualquer mancha.

Os resultados mostram que o sumo de uva tinta, da casta *Pinot Noir*, possui atividade antioxidante e que essa atividade está presente em todas as frações, observando-se com maior intensidade na subfração 5T.

Tal no sumo de uva branca, também para o tinto se efetuou a análise das subfrações 4, 5 e 6 por a HPLC/PDA. Os cromatogramas obtidos estão representados nas figuras 42, 44 e 46. É possível observar uma grande semelhança entre os cromatogramas 5T e 6T, sendo possível que tenham uma composição semelhante. O pico I dos três cromatogramas apresenta o mesmo espectro UV podendo tratar-se do mesmo composto ou de estrutura semelhante.

O cromatograma da FA 4T, que eluiu na SPE com acetato de etilo, parece ser constituído por maior variedade de compostos (Figura 42).

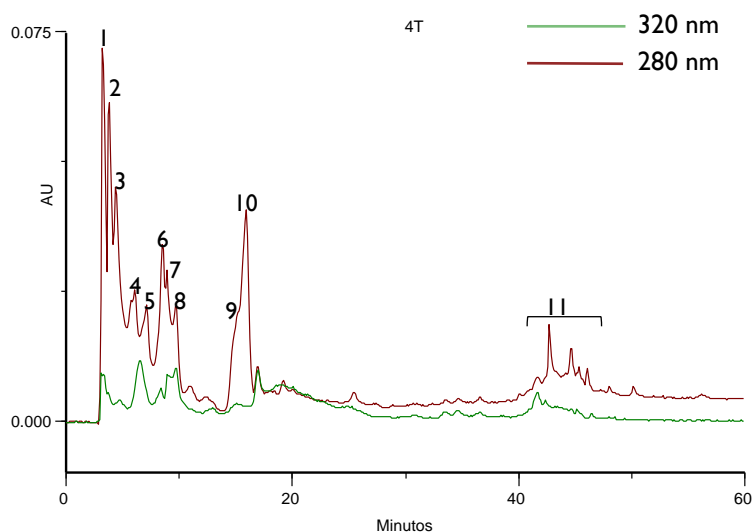


Figura 42. Cromatograma da subfração 4T da FAT, obtido por HPLC/PDA.

Os espectros obtidos estão representados na figura 43.

Os picos 1, 2 e 3 apresentam espectros UV característicos de ácido gálico ou derivados (galhotaninos). Espectros semelhantes podem também ser encontrados nas frações 5T e 6T, mas também nos picos 6; 7; 8. O espectro do pico 4 sugere presença de ácidos hidroxibenzoicos.⁸⁸

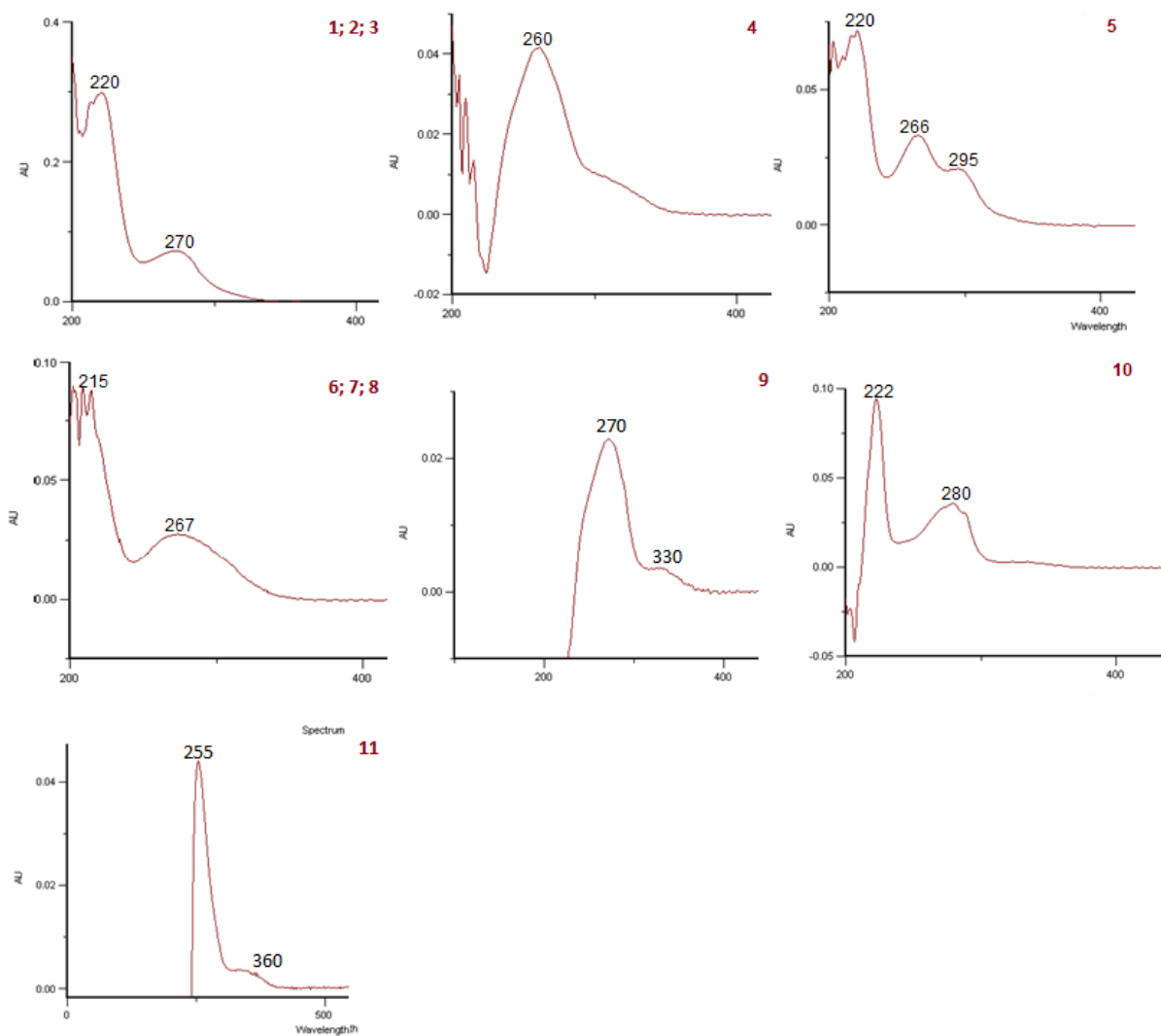


Figura 43. Espectros da subfração 4T da FAT, obtidos por HPLC/PDA.

O pico 5 sugere a presença de um ácido hidroxibenzoico, possivelmente o vanílico, com máximos a 266 e 295 nm. O espectro do pico 9 sugere a presença de taninos do tipo condensado. O pico 10 parece conter galhotaninos¹⁰¹ E por fim, o pico 11 poderá ser o ácido elágico, dado o seu tempo de retenção, após os 40 minutos, e os dois máximos característicos a 255 e 360 nm.⁸⁷

Os galhotaninos têm um espectro característico de UV-Vis com um máximo a 280 nm, enquanto os elagitaninos têm um espectro UV característico com uma absorvência máxima inferior a 279 nm.⁸⁷

A subfração 5T parece ser constituída maioritariamente por taninos, do tipo hidrolisável, tanto galhotaninos como elagitaninos. O pico 1 e 2, apresentam espectros que sugerem a presença de elagitaninos, dado que a absorvência máxima é inferior a 279 nm. No pico 3 é possível ver o espectro característico de um galhotanino, do tipo poligalhoil-glucose (Figura 45).⁸⁷ Este cromatograma está em concordância com a mancha azul esverdeada observada na TLC pulverizada com cloreto de ferro 3%, que sugeria a presença de taninos hidrolisáveis, sendo esta a subfração com maior abundância de taninos presentes, dada a intensidade de cor observada (Figura 41).

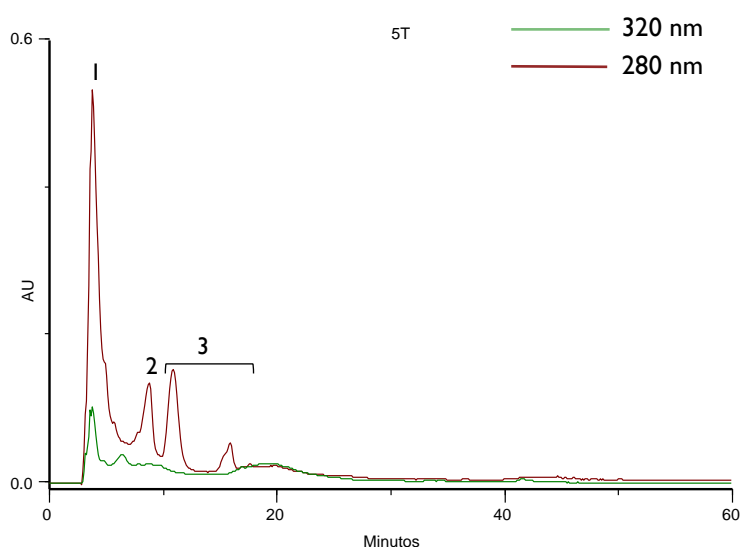


Figura 44. Cromatograma da subfração 5T da FAT, obtido por HPLC/PDA.

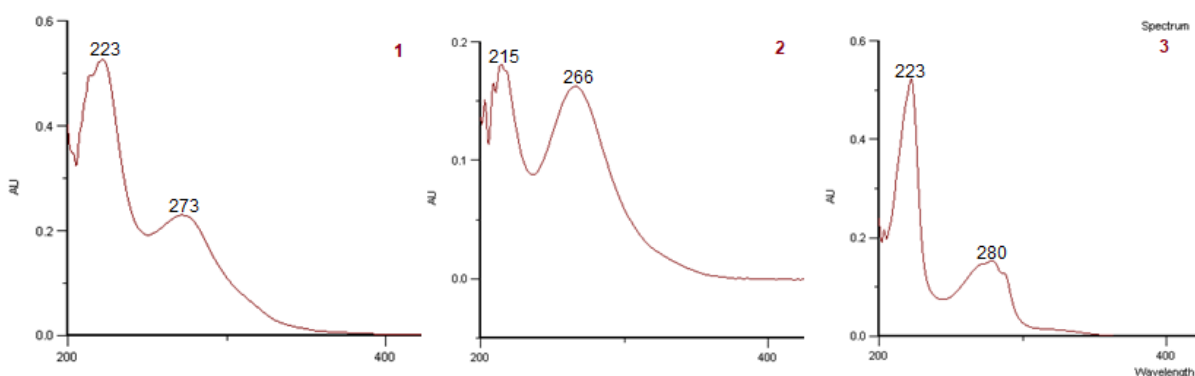


Figura 45. Espectros da subfração 5T da FAT, obtidos por HPLC/PDA.

Na subfração 6T, tal como já tinha sido observado com a subfração 6B do sumo de uva branca, os compostos mais abundantes são os taninos e as proantocianidinas, apresentando cromatogramas semelhantes (Figura 46).

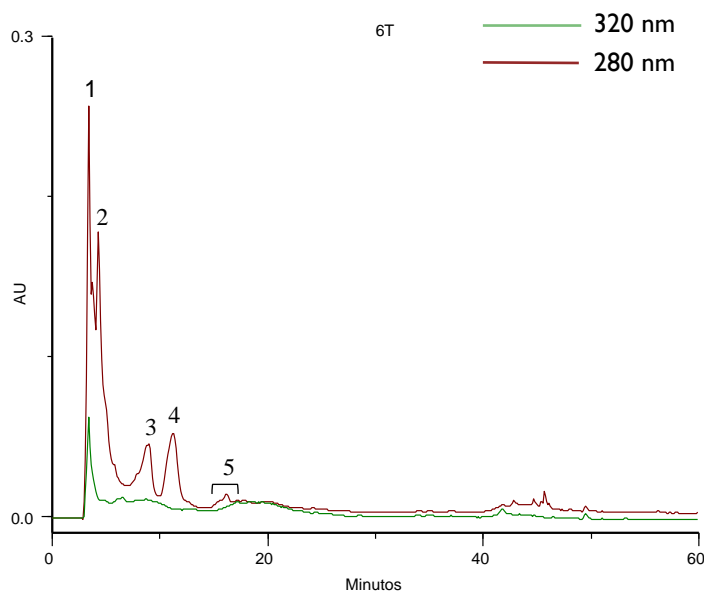


Figura 46. Cromatograma da subfração 6T da FAT, obtido por HPLC/PDA.

Estes factos são confirmados pela análise dos espectros UV que apresentam características que permitem sugerir a presença deste tipo de compostos.

Os resultados da análise por HPLC/PDA obtidos para as subfrações 4T, 5T e 6T encontram-se sumariados na tabela 18.

Nas subfrações 4T, 5T e 6T da FAT é possível identificar a alta concentração, evidente em ácidos fenólicos, principalmente ácidos hidroxibenzóicos, muito polares, que eluem logo nos primeiros minutos da corrida cromatográfica, assim como na FAB.

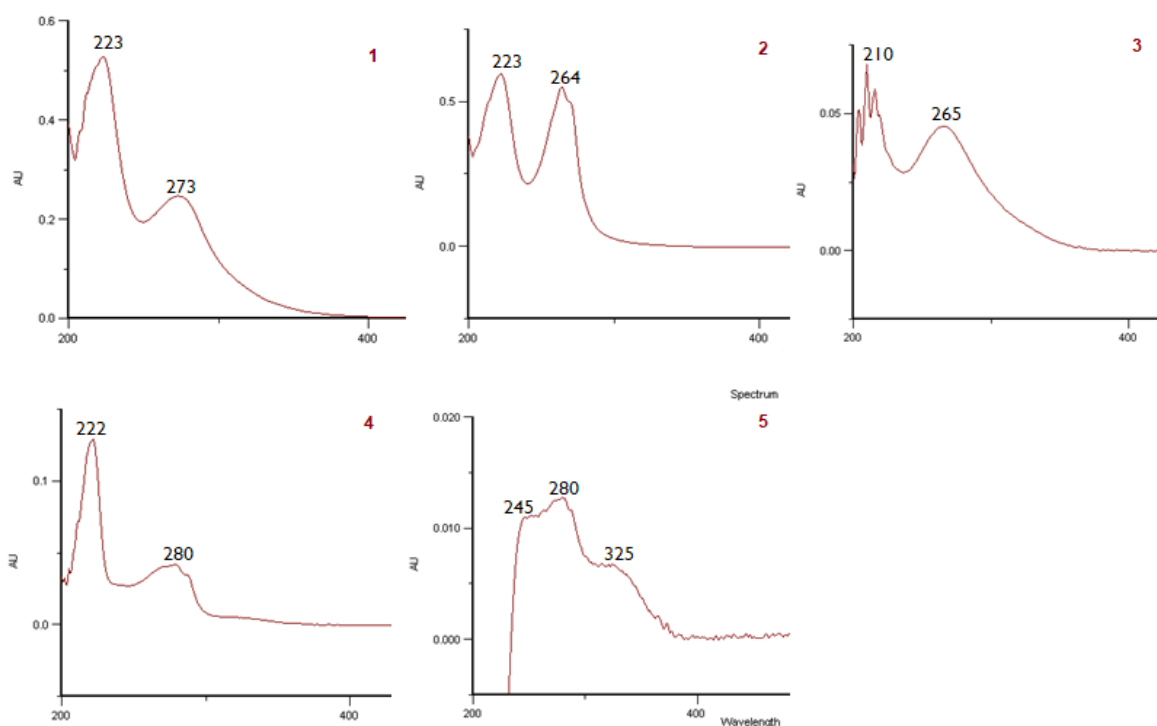


Figura 47. Espectros da subfração 6T da FAT, obtidos por HPLC/PDA.

Tabela 18. Picos do cromatograma, tempo de retenção e comprimentos de onda máximos dos espectros dos compostos, presentes nas várias subfrações aquosas do sumo de uva tinta.

Fração	tR (min)	$\lambda_{\text{máx}}$	Classe fenólica	Pico
4 T	0,00 a 5,80	220; 270	Galhotaninos	1; 2; 3
	6,22	260	Ácido hidroxibenzóico	4
	8,00	220; 266; 295	Ácido hidroxibenzóico	5
	9,00	215; 267	Galhotaninos	6; 7; 8
	14,90	270	Taninos condensados	9
	15,80	222; 280	Galhotaninos	10
	42,00	255	Ácido elágico	11
5 T	3,71	223; 273 (220; 266)	Elagitaninos	1
	6,00 a 9,00	215; 266	Elagitaninos	2
	10,00 a 17,00	223; 280	Galhotaninos (poligalhoilglucose)	3
6 T	3,30	223; 273	Taninos hidrolisáveis	1
	4,30	223; 264	Taninos hidrolisáveis	2
	8,90	215; 265	Taninos hidrolisáveis	3
	11,50	222; 280	Taninos hidrolisáveis	4
	16,20	245; 280; 325	Proantocianidinas	5

4.4. Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante constitui um bom indicador para avaliar o potencial citoprotetor de extratos contra diversas patologias nomeadamente inflamação, cancro, vários tipos de doenças metabólicas como a diabetes e doenças cardiovasculares.¹⁰²

Neste sentido e como vários mecanismos poderão estar na base desta atividade (sequestro de radicais livres, redução de metais que intervêm em reações celulares de produção de radicais, por exemplo) torna-se necessário fazer a sua avaliação por métodos diversos.

Assim sendo efetuou-se a determinação da atividade antiradicalar dos sumos de uva branca da casta *Fernão Pires* e tinta da casta *Pinot Noir* com radicais sintéticos ABTS e DPPH e a avaliação do seu poder redutor pelo método FRAP. Os resultados encontram-se resumidos na tabela 19.

Tabela 19. Comparação dos resultados para a atividade antioxidante, expressa em TEAC (mg resíduo/mL de mistura reacional), obtidos por diferentes ensaios (média \pm desvio padrão dos ensaios realizados em triplicado).

Ensaio da atividade antioxidante	Branco	Tinto
ABTS (TEAC)	7,78 \pm 0,33	14,29 \pm 1,03
DPPH (TEAC)	10,46 \pm 0,17	16,66 \pm 1,65
FRAP (TEAC)	19,23 \pm 0,35	36,73 \pm 1,51

A atividade anti-radicalar das amostras analisadas, obtida pelo ensaio ABTS-persulfato a pH neutro, por interpolação na curva Trolox, expressa em TEAC foi de 7,78 \pm 0,33 mg resíduo/mL mistura reacional para o sumo de uva branca da casta *Fernão Pires* e 14,29 \pm 1,03 mg resíduo/mL mistura reacional para o sumo de uva tinta da casta *Pinot Noir*.

Obtiveram-se os seguintes valores de IC₅₀: 12,7 μ L (3,77 mg resíduo seco) para o sumo obtido da casta *Fernão Pires* e 25,98 μ L (6,27 mg resíduo seco) para o sumo obtido da casta *Pinot Noir*. Tendo em conta estes resultados, e considerando que ambos os sumos foram preparados de modo equivalente, seria necessária uma quantidade duas vezes superior de sumo de uva tinta para obter o mesmo efeito que o sumo de uva branca.

Para pesquisar a presença de compostos antioxidantes nas amostras em estudo, utilizou-se o método do radical DPPH. Os resultados foram expressos em equivalentes Trolox obtidos por interpolação na curva de absorvência de Trolox usando quatro

concentrações de cada amostra. Obteve-se um valor de TEAC igual a $10,46 \pm 0,17$ mg resíduo/mL de mistura reacional para o sumo da casta *Fernão Pires* e $16,66 \pm 1,65$ mg resíduo/mL de mistura reacional no caso do sumo da casta *Pinot Noir*.

A quantidade em mL de sumo que reduziu em 50% os valores de absorvência quando comparados ao controlo (IC_{50}), para o sumo de uva branca foi de 25 μ L (equivalente a 7,44 mg resíduo seco) e para o sumo de uva tinta de 49,69 μ L (equivalente a 12,29 mg resíduo seco). Claramente o IC_{50} do sumo de uva branca é quase metade do valor do IC_{50} do sumo tinto. Estes resultados são convergentes aos resultados observados nas placas obtidas por TLC, reveladas com o radical DPPH; onde a amostra de sumo de uva branca apresenta várias bandas coradas de amarelo. No sumo de uva tinta também temos resultados concordantes entre ambos os ensaios em comparação, pois a atividade antioxidante deste, também nas placas de TLC apresenta ser significativamente inferior à atividade do sumo de uva branca. Todas as frações analisadas apresentam atividade, e a intensidade desta é equivalente entre elas. Os compostos que parecem contribuir mais para esta atividade, segundo os resultados, são os ácidos fenólicos, por existirem em quantidades elevadas, no entanto, não se pode excluir a contribuição de outros compostos fenólicos como os taninos.

O poder redutor do sumo, avaliado pelo ensaio FRAP e expresso em TEAC para o sumo de uva branca foi de $19,23 \pm 0,35$ mg resíduo/mL de mistura reacional e para a amostra de sumo da uva tinta $36,73 \pm 1,51$ mg resíduo/mL de mistura reacional, estes resultados foram obtidos a partir da extrapolação na curva de absorvência de Trolox com quatro concentrações de cada amostra.

Na tabela 19 podemos comparar a capacidade antioxidante entre ambos os sumos e o que é possível concluir de imediato é que o sumo de uva branca tem o dobro da atividade do sumo de uva tinta, visto que os valores TEAC, duplicam para o sumo de uva tinta, pelo que é necessário maior quantidade deste, para provocar o mesmo efeito antioxidante que o sumo de uva branca apresenta.

Como foi discutido no ponto 4.2. “Dosagem dos Fenóis Totais”, era de esperar que o sumo da casa *Pinot Noir*, sumo de uva tinta, apresentasse maior concentração de fenóis e conseqüentemente maior atividade antioxidante, que no sumo da casta *Fernão Pires*, sumo de uva branca. No entanto, verificou-se o contrário, o sumo de uva branca, apresentou maior resíduo seco e maior teor de fenóis, provavelmente por diferenças relacionadas com a casta, pela maturação das uvas ou pela quantidade de água presente nos bagos. Deste modo se explica o facto de o sumo de uva branca ter apresentado maior atividade antioxidante,

sabendo-se que existe uma correlação positiva entre a quantidade de polifenóis e a atividade antioxidante³⁶.

Estes resultados indicam que o sumo de uva é uma fonte desses compostos, fornecendo uma opção alternativa para pessoas que necessitam de evitar o álcool presente nos vinhos.

Segundo estudos, os compostos que parecem ter um papel mais importante na atividade antioxidante são, principalmente o ácido gálico, seguido de antocianidinas (malvidina, cianidina, delphinidina, etc.). Apresentando atividades com valores TEAC 250 e 180 μM trolox/100 g de peso seco para o ácido gálico e para as antocianidinas, respetivamente.^{103,104} Excetuando o ácido gálico, as antocianidinas não existem em quantidades apreciáveis nos sumos analisados. Este facto pode justificar a necessidade de enriquecer o sumo com outras partes das uvas de forma a aumentar o seu potencial antioxidante.

Capítulo 5

Conclusão

Na determinação do resíduo seco para cada amostra de sumo de uva, foi obtido um valor significativamente inferior para o sumo de uva da casta *Pinot Noir*, relativamente ao sumo de uva da casta *Fernão Pires*. Tal resultado, pode ser devido ao processo de prensagem das uvas ou ainda das próprias castas em análise.

Por recurso ao perfil espectral UV-Vis, perfil de fragmentação e comportamento na TLC foi possível identificar os principais compostos da FO e FA de cada amostra de sumo analisada. Observou-se maioritariamente a presença de ácidos fenólicos. Ainda foi possível detetar taninos do tipo hidrolisável e condensado, e por fim também da amostra fazem parte alguns flavonóides e antocianidinas, com pouca abundância. Estes eram resultados esperados, visto que os resultados obtidos por TLC sugeriam a existência reduzida de compostos da classe dos flavonóides e maior quantidade de ácidos fenólicos.

A constituição rica em ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos, essencialmente), é apoiada pela presença maioritária destes compostos na polpa das uvas, e sabido que as amostras de sumo de uva foram obtidas por prensagem, sendo espetével que sejam esses os compostos maioritários identificados.^{21,25,105}

Sabe-se que as sementes contêm maior concentração de compostos fenólicos do que na polpa²¹ e por isso é importante ter em consideração fatores que influenciam significativamente a composição dos sumos de uva em compostos fenólicos, como por exemplo: maceração, processamento/produção do sumo, fatores de crescimento e amadurecimento das uvas (altitude, temperatura, humidade, solo, etc.).¹⁰⁶

Os compostos que parecem ter um papel mais importante na atividade antioxidante dos sumos analisados são, principalmente os ácidos hidroxibenzóicos.

Para a casta *Fernão Pires*, os resultados obtidos pelos ensaios ABTS, DPPH e FRAP mostraram o dobro da atividade antioxidante quando comparada com a atividade da casta *Pinot Noir*. A casta *Fernão Pires*, de origem portuguesa, segundo os dados bibliográficos consultados na literatura, não estudada em sumos de uva, poderá apresentar um potencial superior à *Pinot Noir*, apenas por consequência das características intrínsecas da casta.

Ainda como hipótese, segundo os resultados obtidos na identificação dos compostos pelas diferentes técnicas, e dado o potencial antioxidante dos mesmos, é possível sugerir que melhorando o processo de obtenção do sumo de uva, aumentar-se-ia, provavelmente, a concentração fenólica do sumo, bem como as suas atividades biológicas. Para isso seria necessário aumentar o contacto do sumo com as películas das uvas e extrair alguns dos compostos das sementes.

Nesse sentido, o sumo de uva pode-se considerar um produto alimentar alternativo ao vinho, dado o seu potencial fitoquímico e desta forma evitar o consumo de álcool. Esta bebida poderá ter efeitos benéficos à saúde, tanto na prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, etc., como também efeito anti envelhecimento, anti-inflamatório, antiviral, entre outros.

Com este projeto foi possível expor o potencial benefício do consumo de sumo de uva, evidenciando a casta *Fernão Pires*, pouco investigada em Portugal, mas também internacionalmente, o que desencadeou bastante interesse para a continuação da sua avaliação.

Capítulo 6

Perspetivas futuras

Este trabalho permitiu confirmar o potencial antioxidante do sumo de uvas nacionais, e em particular de uma casta exclusiva portuguesa (*Fernão Pires*). No entanto, vários aspetos podem ainda ser caracterizados, nomeadamente mecanismos de ação, atividades neuroprotetoras, anti-inflamatórias, cardioprotetoras, etc.

Neste âmbito pode-se futuramente continuar a investigação no sentido de:

- Realizar ensaios adicionais nas uvas de forma a caracterizar detalhadamente as castas, perceber a origem dos constituintes e de que forma se poderá aumentar o potencial antioxidante do sumo;
- Caracterizar, com mais pormenor os constituintes de maior peso molecular, como é o caso dos taninos;
- Quantificar os constituintes fenólicos e realizar ensaios de atividade antioxidante diferentes (por exemplo em radicais celulares: superóxido, hidroxilo);
- Caso os resultados se revelarem promissores, realizar também ensaios *in vitro* em linhas celulares.

Capítulo 7

Bibliografia

1. GRUPO MARKTEST- **Sumos de fruta ou vegetais consumidos por 4,2 milhões** [Consult. 24 out. 2017]. Disponível em <http://www.marktest.com/wap/a/n/id~20ee.aspx>>
2. PUBLICO - **Alimentação. Portugueses comeram mais legumes, frutos e leguminosas secas durante a crise** [Consult. 24 out. 2017]. Disponível em <https://www.publico.pt/2017/04/07/sociedade/noticia/portugueses-comeram-mais-legumes-frutos-e-leguminosas-secas-durante-a-crise-1768039>>
3. INE - **Balança Alimentar Portuguesa 2012-2016**. 2017. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I. P. [Consult. 27 out. 2017] ISBN 9789892503899.
4. KOUTSOS, Athanasios; TUOHY, Kieran M.; LOVEGROVE, Julie A. - **Apples and cardiovascular health-is the gut microbiota a core consideration?** *Nutrients*. 7:6 (2015) 3959–3998. ISSN 20726643. doi: 10.3390/nu7063959.
5. LI, Ya *et al.* - **Dietary Natural Products for Prevention and Treatment of Breast Cancer**. *Nutrients*. 9:7 (2017) ISSN 2072-6643.728. doi: 10.3390/nu9070728.
6. AUBERT, Christophe; CHALOT, Guillaume - **Chemical composition, bioactive compounds, and volatiles of six table grape varieties (*Vitis vinifera* L.)**. *Food Chemistry*. 240:July 2017 (2018) 524–533. ISSN 18737072. doi:10.1016/j.foodchem.2017.07.152.
7. FIGUEIRINHA Artur - **Composição Fenólica E Actividade Anti-Inflamatória**. Coimbra. Universidade de Coimbra, 2011
8. HASAN, Md Mohidul; BAE, Hanhong - **An overview of stress-induced resveratrol synthesis in grapes: Perspectives for resveratrol-enriched grape products**. *Molecules*. 22:2 (2017). ISSN 14203049. doi: 10.3390/molecules22020294.
9. **REGULAMENTO (UE) N. o 1308/2013 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO**, Parlamento Europeu. [Consult. 2 nov. 2017] Disponível em https://www.portugal2020.pt/Portal2020/Media/Default/docs/Legislacao/Regulamento_1308-2013_PARLAMENTO_EUROPEU_E_DO_CONSELHO.pdf>

10. IVV - **Transformação da Produção de Uvas em Sumo de Uva** - [Consult. 21 out. 2017]. Disponível em <http://www.ivv.min-agricultura.pt/np4/680/>>
11. CADENOS, Enrique Et.al. - **Handbook of Antioxidants**, 2ªed, Inglaterra, 2006. ISBN-13: 978-0-470-01037-2 (HB)
12. TSAO, Rong - **Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols**. *Nutrients*. 2:12 (2010) 1231–1246. ISSN 20726643.doi: 10.3390/nu2121231.
13. ABAD-GARCÍA, Beatriz *et al.* - **A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry**. *Journal of Chromatography A*. 1216:28 (2009) 5398–5415. ISSN 00219673. doi: 10.1016/j.chroma.2009.05.039.
14. MAGRI, Giorgio - **Review article**. *Phonology*. 31:3 (2014) 525–556. ISSN 0952-6757.doi: 10.1017/S0952675714000244.
15. VERMERIS, W.; NICHOLSON, R. - **Phenolic compound biochemistry**. Dordrecht: Springer, 2006 ISBN-13 978-1-4020-5164-7
16. WATSON, Ronald Ross; PREEDLY, Victor; ZIBADI, Sherma - **Polyphenols in human health and disease**, Elsevier, 2014, Amesterdão. ISBN 978-0-12-398471-5
17. COSTA, Gustavo - **Cymbopogon citratus and its polyphenols as potencial phytotherapeutic products: an in vivo approach**. Coimbra, University of Coimbra, 2015
18. RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; AL., Et. - **Handbook of enology - The chemistry of wine**, Inglaterra, 2006. ISBN-13: 978-0-470-01037-2
19. TUBEROSO, Carlo I. G.; ORRÙ, Christina D. - **Phenolic compounds in food**. *Progress in Food Chemistry*. (2008) 1–45. ISSN 1436-6207.4 doi:10.1007/s00394-008-2002-2.
20. NASSIRI-ASL, Marjan; HOSSEINZADEH, Hossein - **Review of the Pharmacological Effects of Vitis vinifera (Grape) and its Bioactive Constituents: An Update**. *Phytotherapy Research*. 1403:April (2016) 1392–1403. ISSN 10991573. doi: 10.1002/ptr.5644.
21. YANG, Jun; XIAO, Yang Yu - **Grape Phytochemicals and Associated Health Benefits**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53:11 (2013) 1202–1225. ISSN

10408398. doi: 10.1080/10408398.2012.692408.

22. MORENO-MONTORO, Miriam *et al.* - **Phenolic compounds and antioxidant activity of Spanish commercial grape juices.** *Journal of Food Composition and Analysis.* 38:(2015) 19–26. ISSN 08891575. doi: 10.1016/j.jfca.2014.10.001.
23. LEONG, Sze Ying; BURRITT, David John; OEY, Indrawati - **Evaluation of the anthocyanin release and health-promoting properties of Pinot Noir grape juices after pulsed electric fields.** *Food Chemistry.* 196:(2016) 833–841. ISSN 18737072. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.10.025.
24. PADILHA, Carla Valéria Da Silva *et al.* - **Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape.** *Food Chemistry.* 228:(2017) 106–115. ISSN 18737072 doi:10.1016/j.foodchem.2017.01.137.
25. COELHO, Elisabete *et al.* - **Screening of variety- and pre-fermentation-related volatile compounds during ripening of white grapes to define their evolution profile.** *Analytica Chimica Acta.* ISSN 00032670. 597:2 (2007) 257–264. doi: 10.1016/j.aca.2007.07.010.
26. SUN, Bashan; RICARDO-DA-SILVA, J. ...; SPRANGER, M.Isabe. - **Quantification of catechins and proanthocyanidins in several Portuguese grapevine varieties and red wines.** *Ciência Técnica e Vitivinícola* 16:1 (2001) 23–34. ISSN 0254-0223.
27. CORREDOR, Zuray *et al.* - **Unfermented grape juice reduce genomic damage on patients undergoing hemodialysis.** *Food and Chemical Toxicology.* 92:(2016) 1–7. ISSN 18736351. doi: 10.1016/j.fct.2016.03.016.
28. RIVERA-DOMINGUEZ, M. *et al.* - **Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Grapes.** *Acta Horticulturae.* (2010) 1233–1240. ISSN 0567-7572. 877doi: 10.17660/ActaHortic.2010.877.168.
29. SOMERS, T.Chris; EVANS, Michael E. - **Wine quality: Correlations with colour density and anthocyanin equilibria in a group of young red wines.** *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 25:11 (1974) 1369–1379. ISSN 1097-0010. doi: 10.1002/jsfa.2740251105.

30. PACHECO, Camilla *et al.* - Fremont - lac 543: **Tangerine With Potential for the Brazilian Market**. Revista Brasileira de Fruticultura 39:2017) 1–7. doi: 10.1590/0100-29452017.
31. NATIVIDADE, Mariana Mirelle Pereira *et al.* - **Simultaneous analysis of 25 phenolic compounds in grape juice for HPLC: Method validation and characterization of São Francisco Valley samples**. Microchemical Journal. 110:(2013) 665–674. ISSN 0026265X. doi: 10.1016/j.microc.2013.08.010.
32. LUTZ, Mariane *et al.* - **Phenolics and Antioxidant Capacity of Table Grape (*Vitis vinifera*L.) Cultivars Grown in Chile**. Journal of Food Science. 76:7 (2011) 1088–1093. ISSN 00221147. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02298.x.
33. DÉCORDÉ, Kelly *et al.* - **Phenolics from purple grape, apple, purple grape juice and apple juice prevent early atherosclerosis induced by an atherogenic diet in hamsters**. Molecular Nutrition and Food Research. 52:4 (2008) 400–407. ISSN 16134125. doi: 10.1002/mnfr.200700141.
34. TOMERA, John F. - **Current knowledge of the health benefits and disadvantages of wine consumption**. Trends in Food Science and Technology. 10:4–5 (1999) 129–138. ISSN 09242244. doi: 10.1016/S0924-2244(99)00035-7.
35. BITSCH, R. *et al.* - **Bioavailability and biokinetics of anthocyanins from red grape juice and res wine**. Biotechnology Journal | BioMed Central Journal 2004:2004) 293.
36. BURIN, Vivian Maria *et al.* - **Colour , phenolic content and antioxidant activity of grape juice**. Ciência e Tecnologia do Alimentos, 30:4 (2010) 1027–1032. ISSN 0101-2061
37. DANI, C. *et al.* - **Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally-produced grapes**. Food and Chemical Toxicology. 45:12 (2007) 2574–2580. ISSN 02786915. doi: 10.1016/j.fct.2007.06.022.
38. CHEDEA, Veronica Sanda; BRAICU, Cornelia; SOCACIU, Carmen - **Antioxidant/prooxidant activity of a polyphenolic grape seed extract**. Food Chemistry. 121:1 (2010) 132–139. ISSN 03088146. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.12.020.
39. BUB, Achim *et al.* - **Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage**. Journal of Nutritional Biochemistry. 14:2 (2003) 90–

98. ISSN 09552863.doi: 10.1016/S0955-2863(02)00255-3.
40. OLCHOWIK, Ewa *et al.* - **Stabilization of erythrocytes against oxidative and hypotonic stress by tannins isolated from sumac leaves (*Rhus typhina L.*) and grape seeds (*Vitis vinifera L.*)**. Cellular and Molecular Biology Letters. 17:3 (2012). ISSN 1689-1392.doi: 10.2478/s11658-012-0014-7.
41. SAPANIDOU, Vasiliki G. *et al.* - **Antioxidant effect of a polyphenol-rich grape pomace extract on motility, viability and lipid peroxidation of thawed bovine spermatozoa**. Journal of Biological Research (Greece). 21:1 (2014) 1–6. ISSN 22415793. doi: 10.1186/2241-5793-21-19.
42. WIGHTMAN, Jolynne D.; HEUBERGER, Roschelle A. - **Effect of grape and other berries on cardiovascular health**. Journal of the Science of Food and Agriculture. 95:8 (2015) 1584–1597. ISSN 10970010. doi: 10.1002/jsfa.6890.
43. BLUMBERG, Jeffrey B.; VITA, Joseph A.; OLIVER CHEN, C. Y. - **Concord grape juice polyphenols and cardiovascular risk factors: Dose-response relationships**. Nutrients. 7:12 (2015) 10032–10052. ISSN 20726643.doi: 10.3390/nu7125519.
44. AZORÍN-ORTUÑO, María *et al.* - **A dietary resveratrol-rich grape extract prevents the developing of atherosclerotic lesions in the aorta of pigs fed an atherogenic diet**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 60:22 (2012) 5609–5620. ISSN 00218561. doi: 10.1021/jf301154q.
45. KHADEM-ANSARI, Mohammad H.; RASMI, Yousef; RAMEZANI, Fatemeh - **Effects of red grape juice consumption on high density lipoprotein-cholesterol, apolipoprotein A1, apolipoprotein B and homocysteine in healthy human volunteers**. The open biochemistry journal. 4:(2010) 96–99. ISSN 1874091X.doi: 10.2174/1874091X01004010096.
46. VILAS BOAS, Ana Carolina *et al.* - **and Organic Acids 480 Antioxidant Activity , Boas , Content of Grape Juices Produced in Southwest of Minas**. Ciência e Agrotecnologia. 38:5 (2014) 480–486. ISSN 1413-7054.doi: 10.1590/S1413-70542014000500007.
47. JOSHI, Snehal S.; SU, Xiaowei; D'SOUZA, Doris H. - **Antiviral effects of grape seed extract against feline calicivirus, murine norovirus, and hepatitis A virus in model food systems and under gastric conditions**. Food Microbiology. 52:2015) 1–10.

ISSN 10959998. doi: 10.1016/j.fm.2015.05.011.

48. KANMANI, Paulraj; RHIM, Jong Whan - **Development and characterization of carrageenan/grapefruit seed extract composite films for active packaging.** International Journal of Biological Macromolecules. 68:(2014) 258–266. ISSN 18790003. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.05.011.

49. BROWN, J. C.; JIANG, X. - **Activities of muscadine grape skin and polyphenolic constituents against *Helicobacter pylori*.** Journal of Applied Microbiology. 114:4 (2013) 982–991. ISSN 13645072. doi: 10.1111/jam.12129.

50. DAI, Jianping *et al.* - **High-Throughput Screening for Anti-Influenza A Virus Drugs and Study of the Mechanism of Procyanidin on Influenza A Virus-Induced Autophagy.** Journal of Biomolecular Screening. 17:5 (2012) 605–617. ISSN 1087-0571. doi: 10.1177/1087057111435236.

51. HOUILLÉ, Benjamin *et al.* - **Antifungal activity of resveratrol derivatives against *Candida* Species.** Journal of Natural Products. 77:7 (2014) 1658–1662. ISSN 15206025. doi: 10.1021/np5002576.

52. BUENOS AIRES WINE TOUR - **What does «*Botrytis cinerea*» has to do with wine?**, [Consult. 22 nov. 2017]. Disponível em <https://bawinetour.wordpress.com/2014/03/12/what-does-botrytis-cinerea-has-to-do-with-wine/>.

53. **Qué es el Oídio y cómo afecta a mis plantas?**, [Consult. 21 nov. 2017]. Disponível em <http://www.lasjarasonline.com/blog/entry/que-es-el-oidio-la-enfermedad-de-las-plantas.html>.

54. RAUF, Abdur *et al.* - **Resveratrol as an anti-cancer agent: A review.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 0:0 (2017) 1–20. ISSN 15497852. doi: 10.1080/10408398.2016.1263597.

55. GOLLUCKE, Andrea P. B. *et al.* - **Use of Grape Polyphenols Against Carcinogenesis: Putative Molecular Mechanisms of Action Using *In Vitro* and *In Vivo* Test Systems.** Journal of Medicinal Food. 16:3 (2013) 199–205. ISSN 1096-620X. doi: 10.1089/jmf.2012.0170.

56. CAMPANHOLO, Vanessa Maria De Lima Pazine *et al.* - **Oral concentrated grape juice suppresses expression of NF-kappa B, TNF- α and iNOS in experimentally induced colorectal carcinogenesis in wistar rats.** Asian Pacific Journal of Cancer

Prevention. 16:3 (2015) 947–952. ISSN 15137368.doi: 10.7314/APJCP.2015.16.3.947.

57. OSHIMA, Celina Tizuko Fujiyama *et al.* - **Grape juice concentrate (G8000™) modulates apoptosis but not oxidative stress following rat colon carcinogenesis induced by azoxymethane.** Toxicology Mechanisms and Methods. 25:2 (2015) 91–97. ISSN 1537-6516.doi: 10.3109/15376516.2014.989556.

58. PASINETTI, Giulio Maria *et al.* - **Roles of resveratrol and other grape-derived polyphenols in Alzheimer’s disease prevention and treatment.** Biochimica et biophysica acta. 1852:6 (2015) 1202–1208. ISSN 00063002.doi: 10.1016/j.bbadis.2014.10.006.

59. JOUANNE, Marie; RAULT, Sylvain; VOISIN-CHIRET, Anne-Sophie - **Tau protein aggregation in Alzheimer’s disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents.** European Journal of Medicinal Chemistry. 139:(2017) 153–167. ISSN 02235234. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.07.070.

60. CUNHA-SANTOS, Janete *et al.* - **Caloric restriction blocks neuropathology and motor deficits in Machado-Joseph disease mouse models through SIRT1 pathway.** Nature Communications. 7:May (2016) 1–14. ISSN 20411723.doi: 10.1038/ncomms11445.

61. OVERMAN, A. *et al.* - **Polyphenol-rich grape powder extract (GPE) attenuates inflammation in human macrophages and in human adipocytes exposed to macrophage-conditioned media.** International Journal of Obesity. 34:5 (2010) 800–808. ISSN 03070565.doi: 10.1038/ijo.2009.296.

62. TORABI, Sheida; DIMARCO, Nancy M. - **Original Research: Polyphenols extracted from grape powder induce lipogenesis and glucose uptake during differentiation of murine preadipocytes.** Experimental Biology and Medicine. 241:16 (2016) 1776–1785. ISSN 1535-3702.doi: 10.1177/1535370216645213.

63. KRIKORIAN, Robert *et al.* - **Concord grape juice supplementation and neurocognitive function in human aging.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 60:23 (2012) 5736–5742. ISSN 00218561.doi: 10.1021/jf300277g.

64. HASKELL-RAMSAY, C. F. *et al.* - **Cognitive and mood improvements following acute supplementation with purple grape juice in healthy young adults.** European Journal of Nutrition. 2017) 1–11. ISSN 14366215.doi: 10.1007/s00394-017-1454-7.

65. INFOVINI - **O portal do vinho português | Regiões Vitivinícolas** - [Consult. 5

dez. 2017]. Disponível em <http://www.infovini.com/classic/pagina.php?codPagina=10®iao=4>>

66. BLOG DE ADEGAS E VINHOS - **pinot-noir.png (200×200)** - [Consult. 12 jun. 2018]. Disponível em <http://blog.artdescaves.com.br/hubfs/blog/pinot-noir.png?t=1528369889787>>

67. SOMERS, T.Chris; EVANS, Michael E. - **Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, «chemical age»**. Journal of the Science of Food and Agriculture. 28:3 (1977) 279–287. ISSN 1097-0010. doi: 10.1002/jsfa.2740280311.

68. INFOVINI - **O portal do vinho português | Castas** - [Consult. 5 dez. 2017]. Disponível em <http://www.infovini.com/pagina.php?codNode=18017#tab0>>

69. COMISSÃO VITIVINÍCOLA DA BAIRRADA - **Castas - Fernão Pires** - [Consult. 5 dez. 2017]. Disponível em <http://www.cvbairrada.pt/pt/castas/castas/scripts/core.htm?p=castas&f=castas&lang=pt&idsec=131&idcont=270>>

70. INFOGRAPHICS & AMP - **Guide to Pinot Noir Wine Grape Variety - Social Vignerons** - [Consult. 30 jan. 2018]. Disponível em <http://socialvignerons.com/2015/12/22/infographics-guide-to-pinot-noir-wine-grape-variety/>>

71. BURIN, Vívian Maria *et al.* - **Bioactive compounds and antioxidant activity of Vitis vinifera and Vitis labrusca grapes: Evaluation of different extraction methods**. Microchemical Journal. 114:(2014) 155–163. ISSN 0026265X. doi: 10.1016/j.microc.2013.12.014.

72. JULKUNEN-TITTO, R. - **Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics**. Journal of Agricultural and Food Chemistry (1985) 33, 213–217.

73. WANG, Chin-kun; LEE, Wen-Hsiu; PENG, Chin-Hui - **Contents of phenolics and alkaloids in Areca catechu Linn. During maturation**. Journal of Agricultural and Food Chemistry (1997) 45, 1185–1188.

74. HANH-DEINSTROP, Elke. - **Applied thin-layer chromatography, best practice and avoidance of mistakes**. 2^aed., Alemanha, 2007, ISBN 978-3-527-31553-6

75. TLC - **Cromatografia de camada fina Cromatografia de camada fina Fases estacionárias** - [Consult. 4 abr. 2018]. Disponível em <http://www3.uma.pt/jcmarques/>

docs/qaii/QAI03TLC2007JCM.pdf>

76. MAREČEK, Vít *et al.* - **ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt.** *Journal of Cereal Science.* 73:(2017) 40–45. ISSN 10959963. doi: 10.1016/j.jcs.2016.11.004.
77. RE, R.; PELLEGRINI, N.; AL., Et. - **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.** *Free Radical Biology & Medicine.* (1999). doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3
78. FIGUEIRINHA, A.; PARANHOS, A.; PÉREZ-ALONSO, JJ.; SANTOS-BUELGA, C.; BATISTA, M.T. - **Cymbopogon citratus leaves: Characterisation of flavonoids by HPLC-PDA-ESI/MS/MS and na approach to their potencial as a source of bioactive polyphenols.** *Food Chemistry.* 110:(2008). doi:10.1016/j.foodchem.2008.02.045
79. BRAND-WILLIAMS; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. - **Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity.** *Food Science and Technology.* 28:(1995) 25–30. ISSN 00236438.doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
80. BLOIS, MARSDEN S. - **Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical.** *Nature.* 181:(1958) 1199.
81. JOSHI, Devi Datt - **Herbal Drugs and Fingerprints: Evidence Based Herbal Drugs - Devi Datt Joshi - Google Livros** - [Consult. 22 abr. 2018] Disponível em https://books.google.pt/books?id=RtC2TbBn2cIC&printsec=copyright&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false>.
82. BENZIE, FFI; STRAIN, JJ - **Analytical Biochemistry - The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: the FRAP assay.** *Analytical biochemistry* 239:(1996). doi: 10.1006/abio.1996.0292
83. SILVA, A. C. O.; LIMA, R. A. - **Identificação das classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas de Eugenia uniflora L.** *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental.* 20:1 (2016) 381–388.
84. H. WAGNER; S. BLADT; E.M. ZGAINSKI - **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatograpy Atlas.** Springer ed.1996 Berlim, ISBN 3540586768
85. KENNETH R.MARKHAM; OYVIND M. ANDERSEN, - **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications - Google Livros** - [Consult. 14 mai. 2018]. Disponível em:<https://books.google.pt/books?hl=ptPT&lr=&id=w3vLBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=fl>

avonoids+chemistry+biochemistry+and+applications+2006&ots=OEtRtIYVWw&sig=lym9s04rKUte0YqPvnnCiFApdN0&redir_esc=y#v=onepage&q=flavonoids chemistry biochemistry and applic>

86. MARKHAM, K. R. - **Flavones, flavonols and their glycosides**. Methods in Plant Biochemistry. (1989) doi:10.1016/B978-0-12-461011-8.50012-3
87. ARAPITSAS, Panagiotis - **Hydrolyzable tannin analysis in food**. Food Chemistry. 135:3 (2012) 1708–1717. ISSN 03088146. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.05.096.
88. GRAÇA, Maria; MARKHAM, Kenneth - **Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: Flavones, Flavonols and Phenolic Acids**. Coimbra, 2007. ISBN 9789898074058
89. PATI, Sandra *et al.* - **HPLC-DAD-MS/MS characterization of phenolic compounds in white wine stored without added sulfite**. Food Research International. 66:2014) 207–215. ISSN 09639969.doi: 10.1016/j.foodres.2014.09.017.
90. SEERAM, Navindra P. *et al.* - **Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy**. Food Chemistry. 97:1 (2006) 1–11. ISSN 03088146.doi: 10.1016/j.foodchem.2005.02.047.
91. BOĞA, Mehmet *et al.* - **UHPLC-ESI-MS/MS and GC-MS analyses on phenolic, fatty acid and essential oil of verbascum pinetorum with antioxidant, anticholinesterase, antimicrobial and DNA damage protection effects**. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 15:3 (2016) 393–405. ISSN 17266890.
92. SANZ, Miriam *et al.* - **LC-DAD/ESI-MS/MS study of phenolic compounds in ash (*Fraxinus excelsior* L. and *F. americana* L.) heartwood. Effect of toasting intensity at cooperage**. Journal of Mass Spectrometry. 47:7 (2012) 905–918. ISSN 10765174.doi: 10.1002/jms.3040.
93. OLIVEIRA, Luciana Mouta De *et al.* - **Isolamento das antocianinas do epicarpo de uvas- pretas (*Vitis spp.*) por CLAE / DAD e sua identificação através do sistema CLUE-QTOF-ESI / EM / EM**. Perspectivas da Ciência e Tecnologia. 6:1-2. (2014).
94. REGAL, Patricia *et al.* - **LC-MS as a Tool to Overcome the Limitations of Self-Reported Dietary Assessments in the Determination of Wine Intake**. Separations. 4:2 (2017) 17. ISSN 2297-8739.doi: 10.3390/separations4020017.

95. DUEÑAS, Montserrat *et al.* - **Preparation of quercetin glucuronides and characterization by HPLC-DAD-ESI/MS.** European Food Research and Technology. 227:4 (2008) 1069–1076. ISSN 14382377. doi: 10.1007/s00217-008-0821-2.
96. KYRALEOU, Maria *et al.* - **Changes in tannin composition of syrah grape skins and seeds during fruit ripening under contrasting water conditions.** Molecules. 22:9 (2017) 1–18. ISSN 14203049. doi: 10.3390/molecules22091453.
97. STALIKAS, Constantine D. - **Free Radicals and Antioxidant Protocols.** 610:2 (2010). ISSN 1940-6029. doi: 10.1007/978-1-60327-029-8.
98. VERZA, Simone Gasparin *et al.* - **Avaliação das variáveis analíticas do método de folin-ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de Psidium guajava L.** Quimica Nova. 30:4 (2007) 815–820. ISSN 01004042. doi: 10.1590/S0100-40422007000400011.
99. BARROS, Ana *et al.* - **Evaluation of grape (*Vitis vinifera* L.) stems from Portuguese varieties as a resource of (poly)phenolic compounds: A comparative study.** Food Research International. 65:PC (2014) 375–384. ISSN 09639969. doi: 10.1016/j.foodres.2014.07.021.
100. DÍAZ-GARCÍA, M. C. *et al.* - **Quantification by UHPLC of total individual polyphenols in fruit juices.** Food Chemistry. 138:2–3 (2013) 938–949. ISSN 03088146. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.061.
101. ARAPITSAS, Panagiotis *et al.* - **Hydrolyzable tannins with the hexahydroxydiphenoyl unit and the m-depsidic link: HPLC-DAD-MS identification and model synthesis.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55:1 (2007) 48–55. ISSN 00218561. doi: 10.1021/jf0622329.
102. SOBRAL-SOUZA, Celestina E. *et al.* - **Avaliação da atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos de Eugenia uniflora lineau e Psidium sobleianum Proença & Landrum contra metais pesados.** Revista Ciencias de la Salud. 12:3 (2014) 401–409. ISSN 16927273.
103. NILE, Shivraj Hariram; PARK, Se Won - **Determination of polyphenols and antioxidant activity of Vitis labrusca cv. baile berries.** Indian journal of experimental biology. 53:10 (2015) 671–675. ISSN 0019-5189.

104. ABE, Tiemi; MOTA, Vieira D. A.; MARIA, Franco - **Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca L.* e *Vitis vinifera L.*** Ciências Tecnológicas dos Alimentos. 27:2 (2007). ISSN 1678-457X
105. ANTONIOLLI, Andrea *et al.* - **Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec.** Food Chemistry. 178:(2015) 172–178. ISSN 18737072. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.01.082.
106. GARRIDO, Jorge; BORGES, Fernanda - **Wine and grape polyphenols — A chemical perspective.** FRIN. 54:2 (2013) 1844–1858. ISSN 0963-9969. doi: 10.1016/j.foodres.2013.08.002.