Daniel Luís Ramalho Abegão

VINHO E SAÚDE

INÍCIO DE DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ENZIMÁTICA INOVADORA COM VISTA AO AUMENTO DA ABSORÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES PRESENTES NO VINHO TINTO

Mestrado em Química

Departamento de Química

FCTUC

Agosto de 2016

· U C ·

Universidade de Coimbra

Daniel Luís Ramalho Abegão

Vinho e Saúde

Início de desenvolvimento de metodologia enzimática inovadora com vista ao aumento da absorção de compostos antioxidantes presentes no vinho tinto

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química, Área de especialização em Química Avançada e Industrial

Orientador: Doutor Filipe Antunes

Agosto de 2016

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Coimbra foi a cidade onde me licenciei em Bioquímica e onde, por razões profissionais, me viria de novo a fixar após período no estrangeiro. O Mestrado em Química Avançada e Industrial no Departamento de Química foi enquadrado neste regresso, inicialmente planeado para poder prosseguir carreira enquanto investigador no Departamento de Química.

E este regresso tem um nome – Filipe Antunes. Grande Filipe Antunes! – que realmente por acaso tive a oportunidade de conhecer enquanto estudante de Licenciatura em Bioquímica. Perante nós, moldáveis finalistas de Licenciatura, estava um jovem docente de Química de Colóides, carismático, empreendedor, alegre e dinâmico. Falava-nos de empresas e de ideias, de ponte entre academia e indústria, concretizava a sua visão com uma linguagem gestual e um entusiasmo particulares, era disruptivo e trazia-nos uma lufada de ar fresco, jovens entediados com Ciência comum. Tendo-me mostrado as portas da academia internacional, com todos os seus encantos, foi para aqui que voltei, Coimbra, porque vi que, mesmo perante algumas expectáveis adversidades de trabalhar em Portugal, era aqui que eu poderia realmente alimentar o jovem voraz que se ia, e vem, construindo.

Filipe, sem palavras. Já te tinha prometido o prefácio da minha autobiografia a escrever um dia. És uma pessoa admirável, com uma notável componente humana e uma veia empreendedora à qual inegavelmente fui beber. Acreditaste sempre no meu potencial. És um poeta, um trovador, um guerreiro que belicamente enfrenta o desconhecido, qual Vasco da Gama em terras de Vera Cruz. Muitas colaborações virão nesse futuro que promete ser risonho. Muito obrigado por toda a orientação e mentoria, não só nesta tese enquanto orientador, mas também nos anos transatos. Sou uma pessoa melhor porque te conheci e porque aprendi contigo. Um grande abraço, tens aqui um amigo. Obrigado por tudo.

Também quero agradecer às pessoas que fizeram parte destes dois anos em Coimbra, e que contribuíram para este Mestrado.

Professor Carlos Palmeira, por ter aceite fazer parte da equipa candidata para o projeto, uma pessoa que admiro muito, pessoa com um carisma e tranquilidade específicos, enorme experiência, uma voz confiante.

César Filho, enorme obrigado pela orientação e pela ajuda no *HPLC*. A tua forma de ver a vida é apaziguadora. Professor Sérgio Melo, agradeço a permissão para utilização do equipamento – fica prometida a tal garrafa de vinho.

Ao grupo de Química Física Molecular, enorme agradecimento, em especial à Professora Paula Marques e à Ana Carvalho. Ana, a tua inacreditável disponibilidade e capacidade de trabalho impressionam-me. Muito obrigado por tudo.

À pessoa que fica nos nossos corações, e que deixa saudades onde passa – Gustavo Braga. A tua orientação, a tua curiosidade científica, os teus valores enquanto pessoa, a tua retidão e humildade, és enorme amigo! Agradeço enormemente a tua ajuda para compreender os meus sistemas e a disponibilidade para tudo. Até um dia!

Um agradecimento também a todo o Grupo COLLING. Tenho em grande apreço a vossa ajuda e disponibilidade estes dois anos. Muito obrigado.

À Maria João da Secretaria, uma confidente, sempre disponível para ajudar. Um beijinho grande.

Um agradecimento também à Quinta da Aveleda, que acreditou na nossa proposta de valor e também em mim – um agradecimento endereçado sobretudo ao Ildefonso Martins e Pedro Costa, a equipa da Aveleda responsável neste projeto. A vossa visão estratégica dará frutos muito em breve. Muito obrigado pelo acompanhamento constante e também pelas incontáveis garrafas de vinho que me enviaram para análise – ir distribuindo pelo Departamento de Química as garrafas cujo conteúdo já tinha sido analisado fez-me a pessoa mais popular do meu piso durante efémeros instantes.

À família, a todos os amigos e à minha namorada, vocês dão-me a estabilidade para continuar no caminho certo.

Fica um pensamento especial dirigido à minha Avó, Francelina Luísa Lucas, que em 2015 nos deixou. Fica na memória o amor incondicional, o carinho, o afeto, o cuidado maternal. Estás sempre comigo.

Índice

Abreviaturas……7

Resumo……8

Abstract…… 10

Capítulo 1 – Introdução

Secção 1.1 – Os alimentos funcionais e o Paradoxo Francês……13
Secção 1.2 – Equilíbrio redox e inflamação – relação com componentes antioxidantes……15
Secção 1.3 – Atividade antioxidante e fenóis……19
Secção 1.4 – O vinho e a medição da atividade antioxidante…… 25
Secção 1.5 – Deteção e separação dos compostos presentes no vinho…… ……27
Secção 1.6 – Componente antioxidante e relação com casta, localização geográfica e método de vinificação……29
Secção 1.7 – Biodisponibilidade e absorção de antioxidantes em matrizes alimentares……32
Secção 1.8 – Proposta de valor……39

Capítulo 2 - Experimental

Secção 2.1 – Materiais e métodos……40
Secção 2.2 – Reagentes e Equipamentos…… ..41
Secção 2.3 – Descrição dos métodos analíticos e testes *in vitro*……44

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

Secção 3.1 – Componente antioxidante – testes de *TPC, DPPH, FRAP e ABTS*$^{+}$…… ……49
Teste Compostos Fenólicos Totais (*TPC*) …… 50
Teste do *DPPH*……53
Teste da *FRAP*…… 56
Teste do *ABTS*$^{+}$. …… ……58
Correlação entre testes de *TPC*, *DPPH, FRAP e ABTS*$^{+}$…… ……60
Secção 3.1.2 – Escolha das amostras para continuação dos testes em *HPLC*…… ……62
Secção 3.2 – Trabalhos em *HPLC*…… …… .63
Protocolo *HPLC*……63
Caracterização dos padrões em solução aquosa …… 65
Neutralização do radical *DPPH*: soluções de Malvidina e Malvidina-3-Glucósido…… ……68
Início dos testes enzimáticos em solução mimética de vinho……69
Testes enzimáticos em matriz vínica…… ……76
Secção 3.3 – Trabalhos em células Caco-2……84

Conclusão…… …… …… ……92

Trabalho futuro…… …… ……93

Bibliografia…… …… …… ……95

Anexos…… …… …… …… ……102

Abreviaturas

ABTS$^+$ - 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico

AGPI – Ácidos gordos polinsaturados

ATP – Adenosin Triphosphate

DAD – Diode Array Detector

DCV – Doenças Cardiovasculares

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA - Deoxyribonucleic acid/ **ADN** – Ácido desoxirribonucleico

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

ERAS – Espécies Reativas de Azoto

EROS – Espécies Reativas de Oxigénio

FC – Folin-Ciocalteu (Reagent)

FRAP – Ferric Reducing Ability of Plasma

GAE – Gallic Acid Equivalents

HBSS – Hank's Balanced Salt Solution

HEPES - (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

HPLC – Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography

LAD – Lipoproteínas de alta densidade

LBD – Lipoproteínas de baixa densidade

M3G – Malvidina-3-Glucósido

MV – Malvidina

ORAC – Oxygen Radical Absorbance Capacity

PBS – Phosphate Buffered Saline

PVPP – Polivinilpolipirrolidona

SMV – Solução Mimética de Vinho

SN – Stress Nitrosativo

SO – Stress Oxidativo

TEAC – Trolox Equivalents Antioxidant Capacity

TPC – Total Phenolic Count

TPTZ- 2,4,6-tripiridil –s-triazina

UV – Ultraviolet (light)

Resumo

O vinho é uma bebida alcoólica feita a partir do sumo fermentado de uvas, sendo considerado um alimento funcional por possuir características que o tornam um alimento com propriedades benéficas para a saúde, em especial pelas suas propriedades antioxidantes, um aspeto cada vez mais valorizado pelos consumidores. Porém, devido a aspetos químico-físicos e biológicos, sobretudo a nível intestinal, as moléculas presentes no vinho que são responsáveis por este efeito positivo para a saúde apresentam biodisponibilidade limitada, o que resulta da sua baixa absorção e elevada metabolização e, consequentemente, menores benefícios para a saúde do consumidor do que poderia ser expectável.

Dada a pertinência da problemática supracitada, a proposta de valor deste trabalho passa por desenvolver uma metodologia industrial que consiga, em tese, aumentar a absorção total dos compostos antioxidantes presentes no vinho, sendo perfeitamente passível de ser integrada na realidade industrial vinícola. O objetivo final é conseguir produzir um vinho cujos benefícios *reais* para a saúde do consumidor sejam comprovadamente maiores do que qualquer vinho no mercado. O trabalho experimental dividiu-se em três partes i) identificação dos vinhos com maior capacidade antioxidante natural, ii) desenvolvimento de metodologia enzimática que permita hidrolisar os compostos-alvo e iii) simulação da absorção intestinal dos compostos do vinho por cultivo de células intestinais CACO-2.

Inicialmente, começou-se por identificar *in vitro* os vinhos com maiores propriedades antioxidantes por recurso à espetroscopia de UV-Visível (métodos do *DPPH, FRAP* e *ABTS*$^{+}$), correlacionando aspetos como a casta, o ano de cultivo, a região de cultivo ou as práticas enológicas com a resposta antioxidante dos respetivos vinhos. Os vinhos tintos provenientes da casta tintureira Portuguesa Vinhão e Touriga Nacional, dois vinhos da Bairrada, 2015, não filtrados nem clarificados, registaram as duas melhores respostas antioxidantes e foram selecionados para testes posteriores. De seguida, recorreu-se à técnica de *HPLC* para caracterizar a matriz dos vinhos tintos referidos e acompanhar os tratamentos propostos para aumento da biodisponibilidade destes compostos em solução aquosa, solução mimética de vinho (SMV) e vinho tinto – nesta

fase, considerando a molécula malvidina-3-glucósido (M3G), a principal antocianina do vinho tinto, como a molécula antioxidante padrão neste vinho, e sabendo que a literatura indica que a baixa absorção das antocianinas no vinho pode estar relacionada com a presença deste grupo glucósido, foram desenvolvidas metodologias com β-glicosidases vínicas que se propunham a remover esta unidade glicosilada, permitindo, por tratamento prévio ao engarrafamento, aumentar a concentração das moléculas agliconas das antocianinas no vinho tinto, neste caso, da malvidina (MV), o que poderá aumentar a biodisponibilidade total dos compostos antioxidantes presentes no vinho. Foram alcançadas elevadas conversões de malvidina-3-glucósido em malvidina em solução aquosa e solução mimética de vinho, com aparecimento de malvidina (por *HPLC*); porém, esta molécula é fortemente instável e degrada-se prontamente, resultando na formação de compostos de menor massa molecular e mais estáveis, também eles com propriedades benéficas para o organismo; observou-se que o potencial antioxidante do vinho tinto *in vitro* com tratamento enzimático aumenta no espaço de 72 h, o que pode estar relacionado com o monitorizado decréscimo da concentração da malvidina-3-glucósido e libertação da aglicona.

Finalmente, de modo a poder estabelecer uma comparação preliminar entre os compostos dos vinhos tratados enzimaticamente e os não-tratados, o processo de absorção a nível intestinal dos compostos foi simulado *in vitro* por uso do teste da monocamada intestinal formada por células da linha celular CACO-2, testando posteriormente pelo teste espectroscópico do *DPPH* a capacidade antioxidante dos produtos de absorção. O teste exploratório em questão permitiu estabelecer as bases para testes posteriores de simulação de absorção *in vitro* e *in vivo*.

Este trabalho abre as portas a um entusiasmante novo ciclo de testes. Próximos testes deverão incidir na maior compreensão do comportamento das agliconas no vinho após tratamento enzimático, caracterizando os seus produtos de degradação, bem como testes de estabilização ou microencapsulação destes compostos. Posteriormente, de modo a cimentar a interpretação dos resultados dos testes de absorção, deverão ser conduzidos mais testes com as células CACO-2, bem como, após sucesso nestes testes *in vitro*, considerar a possibilidade de testar esta metodologia em modelos vivos.

Abstract

Wine is an alcoholic beverage made from the fermented juice of grapes, being considered a functional food due to some characteristics that make it a food with beneficial health properties, specially due to wine's antioxidant capacities, an aspect that is being more and more valued by the consumer. However, due to physical-chemical and biological aspects, mainly at gut domain, the molecules present in wine that are responsible for this positive health aspect present limited bioavailability, which results from poor absorption and high metabolization of these compounds, which consequently yields lower health benefits to the consumer that would be expectable.

Given the pertinence of the before mentioned problematic, the value proposition of this work is to develop an industrial methodology that would allow, in thesis, to increase the total absorption of these antioxidant compounds present in wine, being that this practice would be perfectly integrated in the wine industrial quotidian. The final goal of this work is to be able to produce a wine whose *real* consumers' health benefits would be much higher than any wine in the market. The experimental work was divided in three parts: i) identification of wines with natural higher antioxidant capacity; ii) development of an enzymatic methodology that could hydrolyze target compounds; iii) wine compounds absorption simulation by gut cell cultivation, CACO-2 cells.

This work began by the *in vitro* identification of the wines with bigger antioxidant properties, making use of UV-Visible spectroscopy (*DPPH*, *FRAP* and $ABTS^+$ methods), correlating aspects such as the breed, the harvest year, the crops region or the enological practices with the antioxidant response of the respective wines. Red wines from typical Portuguese teinturier breed Vinhão and Touriga Nacional, both from Bairrada Region, year 2015, non-filtered or fined, registered the best antioxidant responses and were chosen for further testing. Next, the matrix of the referred red wines was characterized by *HPLC*, also serving to duly monitor the proposed treatments for theoretical increased bioavailability of the referred compounds, both in aqueous solution, mimetic wine solution and red wine – in this stage, considering malvidin-3-glucoside (M3G) as the main antioxidant molecule in red wine, and knowing that the literature suggests that the low anthocyanin absorption and consequent low

bioavailability could be due to the glucoside moiety present in this molecule, methodologies were developed with enological β-glycosidases that aimed to remove this glycosidic component, allowing, by employing a pre-capping treatment, to increase the concentration of the corresponding aglycone molecules of wine anthocyanins, in this case, malvidin (MV), which, in the end, could increase wine antioxidant components' total bioavailability. High conversions of malvidin-3-glucoside in malvidin were achieved, both in aqueous solution and in wine mimetic solution, with clear malvidin quantification by *HPLC*; however, malvidin is highly unstable and promptly degrades itself, yielding lower molecular weight compounds with higher stability that could also present beneficial characteristics for the organism; it was also observed that total antioxidant capacity of red wines gradually increased *in vitro* with enzymatic treatment during 72 h, which could be related to an observed decrease in malvidin-3-glucoside concentration and aglycone release.

Finally, in order to make a preliminary comparison between the absorption of compounds of enzymatically treated wines with non-treated wines, the corresponding gut absorption was simulated *in vitro* by use of the CACO-2 gut cells monolayer test, further testing the antioxidant capacity of the absorption products by the *DPPH* method. This test allowed to set the bases for further *in vitro* and *in vivo* absorption and bioavailability simulation tests.

This work undoubtedly opened the gates for an incredibly versatile battery of further testing. This further work could aim to shed light on the behavior of the aglycones in wine after enzymatic treatment, characterizing the degradation products, as well as aiming for their stabilization or microencapsulation. After this, in order to strengthen the absorption interpretation, more tests with CACO-2 cells should be conducted, as well as, after having success in this *in vitro* testing, consider the possibility of testing this technology with living models.

Capítulo 1 - Introdução

O vinho é uma bebida transversalmente difundida pela História, pela cultura de inúmeros povos e igualmente pela gastronomia, sendo uma das bebidas mais consumidas a nível Mundial [1]. O vinho é um alimento com conhecidos benefícios para a saúde do consumidor [2]–[4], enquadrando-se na tipologia de alimento funcional, produtos definidos como alimentos que 'demonstram afetar satisfatoriamente uma ou mais funções alvo no corpo, para além das componentes nutricionais adequadas, de forma que são relevantes para uma condição melhorada de saúde e bem-estar e/ou redução do risco de doença conhecido' [5]; por contrapartida, um alimento funcional é descrito pelo Centro de Alimentos Funcionais, EUA, como 'um alimento natural ou processado que contém compostos biologicamente ativos, conhecidos ou desconhecidos (…), que contribuem para a prevenção, controlo ou tratamento de doenças crónicas '[6].

É possível observar que os alimentos funcionais são um conceito mesclado entre a nutrição e a medicina [7], sendo alimentos que, incluídos na dieta, poderão melhorar ou contribuir para um estado de saúde melhorado do seu consumidor, para além da nutrição expectável conferida por um alimento. Poderão ser consumidos com vista à regulação de doenças como hipertensão, diabetes, doenças cardiovasculares (DCV) ou certos tipos de neoplasias [8]. Exemplos de alimentos funcionais são alimentos naturalmente portadores ou enriquecidos com probióticos, prebióticos, fibras, antioxidantes ou ómega-3, entre outros [9].

A popularidade destes alimentos não para de aumentar. A galopante perceção do público da influência da alimentação no equilíbrio e bem-estar do indivíduo tem promovido crescimentos realmente notórios neste setor de mercado [10]. No entanto, verifica-se que os aspetos culturais, sociais ou demográficos podem condicionar a aceitação destes produtos, na medida em que podem comunicar uma noção de alimento processado, industrializado ou artificial [11]. Existe a tendência, no entanto, de promover este tipo de alimentos de forma cientificamente pouco corroborada, dada a popularidade dos mesmos e as exigências do mercado [12]. Segundo a American Society for Nutritional Sciences, citando a Food and Drug Administration, deve existir

um comprometimento das entidades promotoras do produto em assegurar que as alegações feitas sobre a sua funcionalidade respeitam as regulações científicas e epidemiológicas necessárias para a sua legitimidade, tais como evidências laboratoriais, testes em modelos animais, testes clínicos devidamente parametrizados ou testes epidemiológicos, entre outros; no entanto, devido a efeitos de Marketing, o que tende a verificar-se são alegações dos possíveis efeitos benéficos de determinado alimento funcional quando, no limite, as informações indicadas não apresentam qualquer evidência científica [13].

1.1 - Os alimentos funcionais e o Paradoxo Francês

Os alimentos funcionais fazem parte de uma nova conceção de alimentos, lançada pelo Japão na década de 80, através de um programa de governo que tinha como objetivo desenvolver alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e apresentava uma grande expectativa de vida [13]. É extremamente interessante notar que a funcionalidade alimentar é amiúde descoberta ou promove o seu interesse através do impacto dos hábitos alimentares praticados regionalmente ou culturalmente – existiam algumas evidências [8],entretanto contrapostas [14], de que os esquimós, com os seus hábitos alimentares fortemente dependentes de peixes e produtos do mar ricos em ácidos gordos polinsaturados das famílias ómega 3 e 6, poderiam sofrer de menor prevalência de DCV. O mesmo sucede com os hábitos alimentares dos povos orientais, em especial na China, onde se verificam baixas incidências de cancro da mama nas mulheres, tendo sido estabelecida uma forte correlação entre o consumo de soja e este aspeto [15]. Ambas as situações contribuíram para a popularização do consumo de peixes gordos e soja.

No caso do vinho, também houve uma situação chave que despoletou um acrescido interesse na investigação centrada nas propriedades funcionais do mesmo, em especial do vinho tinto. As evidências apontam que uma dieta rica em gorduras saturadas e colesterol é um fator de risco para uma maior incidência de DCV [16]. Num estudo de 1993 [17], os investigadores correlacionaram, em 40 países, as mortes originárias de DCV com a ingestão diária (de 1976 a 1978) de colesterol e gorduras saturadas. Estes verificaram que a maioria dos países seguia uma tendência de proporcionalidade direta

entre os dois aspetos referidos (Figura 1). Porém, surgiam dois países que se afastavam claramente da regressão linear traçada para estabelecer correlação – França e Finlândia. A França é um país com elevadíssimo consumo de gorduras saturadas, especialmente provenientes dos laticínios. Porém, a prevalência de DCV é anomalamente baixa, em especial no Sul do País. Estranhando esta situação, mediram-se os níveis de colesterol sérico nas populações em análise de França, Estados Unidos e Reino Unido, tendo-se concluído que eram semelhantes. Neste momento, excluindo o fenómeno do *pool* genético nas populações analisadas, considerou-se a possibilidade de incluir na análise qualquer hábito cultural/gastronómico que pudesse distinguir as populações Francesas das restantes, explicando este aparente paradoxo. Aqui, foi possível correlacionar um maior *intake* de alimentos à base de plantas nas populações Francesas do que, por exemplo, nas Finlandesas, com destaque para o consumo de vinho tinto regular em França como o fator com maior capacidade de distinção e influência.

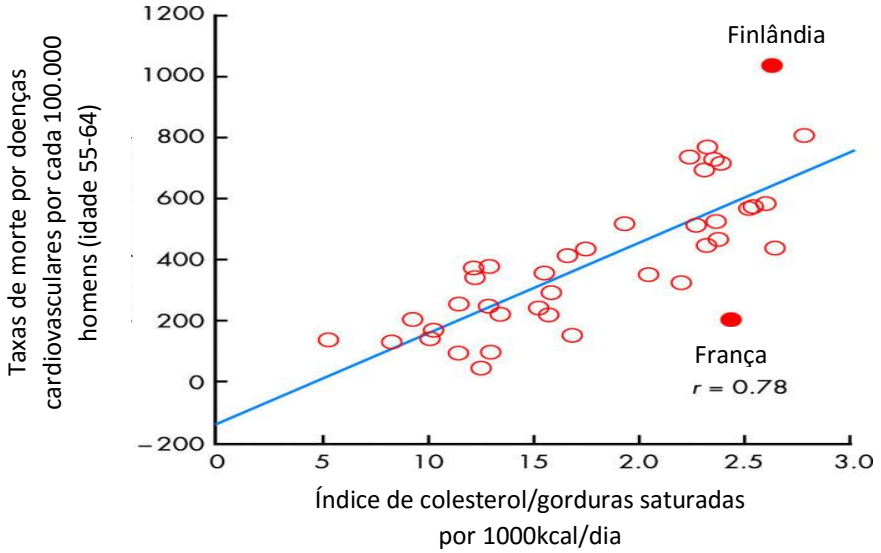


Figura 1 – Correlação entre a ingestão de gorduras saturadas e colesterol, expresso pelo índice colesterol/gorduras saturadas, e o número de mortes reportadas por cada 100.000 homens entre os 55 e os 64 anos. É possível observar uma correlação aparente e diretamente proporcional entre os dois aspetos, porém, os investigadores observaram que a França e a Finlândia saíam claramente do âmbito desta regressão; a consequente investigação levaria à popularização do Paradoxo Francês. Adaptado de [17]

Assim se iniciava a discussão do **Paradoxo Francês**, alegando a importância do estilo de vida, em especial da alimentação, na saúde dos consumidores [18]. O Paradoxo Francês foca as atenções nas propriedades benéficas do vinho tinto enquanto alimento

riquíssimo em compostos fenólicos, altamente antioxidantes e que demonstradamente podem contribuir para a diminuição de fatores de risco para a DCV como o aumento do rácio colesterol de lipoproteínas de baixa densidade/lipoproteínas de alta densidade (LBD/LAD), o aumento da hipertensão, do ritmo cardíaco, a diminuição da função endotelial, a inflamação sistémica generalizada, da hiperglicemia, do stress oxidativo e dos níveis de homocisteína [16], mas em especial pela capacidade reguladora/preventiva dos antioxidantes em contribuírem positivamente para a diminuição/prevenção da formação da placa aterosclerótica, que é demarcadamente promovida pela presença e acumulação de células espumosas nas paredes endoteliais, originadas pelo engolfamento de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas nos locais de acumulação destes depósitos por parte dos macrófagos [19]. A arteriosclerose é a condição singular mais significante para o desenvolvimento da DCV, responsável por cerca de 50% das mortes em países desenvolvidos [20].

Após a popularização do Paradoxo Francês, que poderá ter engrandecido demasiadamente o impacto do vinho nesta correlação anteriormente referida, desconsiderando outros aspetos como a variabilidade intercidades na própria França, a ingestão complementar de outros alimentos benéficos, ou até a evidência científica de que as gorduras saturadas e o colesterol poderão não ser o que mais contribui para a ocorrência de DCV [21][22], as propriedades funcionais do vinho, sobretudo do vinho tinto, começaram a merecer maior atenção por parte do corpo científico, com inúmeros trabalhos de investigação dedicados a este tema nos últimos anos [23]–[27]. Porém, também o público começou a querer saber mais sobre esta bebida alcoólica, revelando um interesse cada vez maior nas suas características funcionais, o que se registou num ressurgimento e relançamento das vendas de vinho em todo o Mundo, em especial na Europa e nos EUA [22][28]. Desde então que o vinho passou de bebida em desuso, consumida sobretudo por faixas etárias superiores, para uma bebida moderna e com fortes argumentos ao seu consumo.

1.2 - Equilíbrio redox celular e inflamação – relação com componentes antioxidantes

A palavra 'oxidação' tem normalmente uma conotação negativa, seja a nível alimentar – uma maçã cortada e que escureceu pela ação do oxigénio –, a nível cosmético – cabelo alourado/estragado pela ação oxidante do peróxido de hidrogénio - ou um prego com acumulação de ferrugem – oxidação do ferro sólido e formação de hidróxido de ferro (II). Em matéria de saúde, é bem conhecido do público em geral que a palavra 'antioxidante' tem hoje em dia uma conotação comercial muito bem estabelecida. No entanto, nem toda a oxidação é deletéria, pelo menos a nível biológico.

Foi em meados do século XX que se percecionou que poderia existir algum efeito adverso da presença interna do oxigénio molecular no corpo humano, para além da sua função óbvia, estar presente no fim da cadeia mitocondrial de modo a poder ser reduzido pelos eletrões circulantes na rede eletrónica e formar água, em conjunto com os protões dos gradientes de concentração mitocondriais, responsáveis pela formação de ATP. Porém, durante a transdução energética, uma pequena percentagem destes eletrões, cerca de 1-3% [29], não seguem a trajetória normal e terminam reagindo com o oxigénio molecular dissolvido, reduzindo-o incompletamente. Este processo pernicioso dá origem à espécie reativa de oxigénio (EROS) superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Um radical livre pode ser definido como uma molécula que contém um ou mais eletrões desemparelhados em orbitais atómicas ou moleculares [29], com elevadíssima propensão para oxidar qualquer substrato que, naturalmente, apresente um potencial redox mais baixo que o seu próprio potencial redox, geralmente muito positivo.

O anião superóxido foi a primeira EROS a ser estudada em detalhe [30]. Para além deste anião, existem outras EROS, como o radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$), um radical de elevadíssima reatividade, o radical hidroxiperoxil ($HOO^{\bullet}$), a forma protonada do anião superóxido (pKa~4.8) ou o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), produzidos em maior ou menor quantidade no corpo humano [31]. Deve-se referir também o oxigénio singleto ($^1O_2$), uma forma fortemente reativa da molécula de oxigénio que surge por fotoexcitação. Existem também as espécies reativas de azoto (ERAS), especialmente representadas pela molécula do óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), uma molécula envolvida em diversos mecanismos de regulação celular e sistémica [32]. Tanto as EROS como as ERAS apresentam a capacidade dual de serem tanto absolutamente necessárias para a ocorrência de inúmeras reações de regulação e sinalização sistémica, como o caso da defesa inicial

contra bactérias por parte de células fagocíticas, onde a produção de superóxido é um passo essencial, como também de serem fortemente oxidantes de substratos celulares e notoriamente desreguladoras da função celular normal [33]. A este processo chama-se *stress* oxidativo (SO) e *stress* nitrosativo (SN), que ocorre em sistemas biológicos quando existe uma sobreprodução destas espécies reativas e que não é devidamente colmatada pelas defesas antioxidantes presentes nesse local. Quando isto acontece, verificam-se danos a nível dos lípidos (principalmente dos fosfolípidos, extremamente sensíveis à oxidação), proteínas ou DNA. Esta homeostase redox é fundamental para a manutenção do equilíbrio redox *in vivo*, sendo que, por mais que se mantenha esta homeostase, irá sempre ocorrer *stress* oxidativo, promovendo condições como o envelhecimento.

Na medida em que o vinho foi aclamado como possuidor de moléculas antioxidantes e que o seu consumo foi notoriamente popularizado pelo impacto positivo para a saúde cardíaca, que é agravada por uma condição generalizada de inflamação [24], torna-se aqui interessante perceber no que consiste a inflamação, como ela se pode relacionar com o SO, como pode igualmente promover condições como a arteriosclerose ou lesões oncológicas e como as defesas biológicas antioxidantes podem reverter ou minimizar estes efeitos. A inflamação é uma resposta de defesa e sinalização biológica extremamente complexa que pretende eliminar algum tipo de intruso viral ou bacteriano, deletar células irregulares ou iniciar a reparação de tecido lesado, entre outros aspetos. A inflamação pode ser uma resposta aguda ou crónica, e em qualquer uma destas situações, por intermédio da intervenção de agentes imunológicos, como forma de sinalização de ataque ou desregulação metabólica/transcricional, ocorre a formação de EROS/ERAS, promovendo o SO e o SN. Nesta medida, é a própria sinalização inflamatória, que pretende ser um mecanismo de alerta e indicação de local de ataque biológico, que promove a própria formação destas espécies altamente reativas, o que, como visto anteriormente, potencia a oxidação de substratos biológicos – esta situação, em especial quando ocorre oxidação de DNA e mutagénese, potenciará a acumulação de erros genéticos e, eventualmente, a formação de um tumor. Os danos no DNA *via* ataque de EROS, em especial por via do radical hidroxilo, são seguidos pela formação do composto 8-hidrodeoxiguanosino (8-OHdG) [34] – dados recentes indicam a correlação

epidemiológica entre as condições de inflamação e irritação crónica com a incidência de cancros, com evidências que o microambiente tumoral é orquestrado por células inflamatórias e que estas promovem a sua resistência e metastização [35]. Paralelamente, sendo a formação e a continuação de acumulação da placa de ateroma um processo inflamatório, na medida em que são continuamente enviados para o local do corpo estranho – a placa de ateroma – mais células imunitárias de defesa, é promovida a formação de EROS/ERAS e a consequente oxidação dos substratos proteicos e lipídicos, o que, ciclicamente, irá promover a oxidação das LBD, a acumulação de células espumosas e o agravamento desta condição pré-enfarte [16]. O estilo de vida ocidentalizado, com os seus consumos desenfreados de açúcares simples, ausência de fibras, prebióticos e polifenóis, ingestão desmesurada de peças proteicas inundadas com gorduras saturadas, antibióticos, hormonas de crescimento ou metais pesados, dietas hipercalóricas, gorduras *trans,* total sedentarismo, *stress* constante, atmosfera envenenada com monóxido de carbono, benzeno e dióxido de carbono, entre outros gravíssimos fatores, é um constante e duríssimo teste de fogo às resistências de manutenção de qualquer tipo de homeostase biológica.

Os sistemas biológicos possuem, no entanto, mecanismos de defesa contra este desequilíbrio, em especial o oxidativo, que podem ser enzimáticos e não-enzimáticos, externos ou internos. As defesas enzimáticas antioxidantes incluem a ação da superóxido dismutase, responsável pela decomposição da EROS superóxido, ou da catalase, responsável pela conversão de peróxido de hidrogénio em água e oxigénio molecular. Em contraste, as principais defesas antioxidantes não-enzimáticas são a Vitamina C, o alfa-tocoferol (Vitamina E), a glutationa e os flavonóides, componentes que podem ser obtidos através da dieta em quantidades variáveis e contribuir para a homeostase redox do organismo. O foco deste trabalho prende-se precisamente com os mecanismos de defesa antioxidantes externos obtidos da dieta, uma vez que, o vinho, rico em flavonóides, fornece assim armas biológicas preciosas para o combate a esta condição generalizada de oxidação e inflamação [36].

Os radicais livres estão passíveis de atacar qualquer biomolécula, em especial os ácidos gordos polinsaturados da membrana celular (AGPI). Este dano oxidativo, conhecido

como peroxidação lipídica, é particularmente destrutivo, na medida em que perpetua uma reação cíclica e potencialmente interminável (Figura 2).

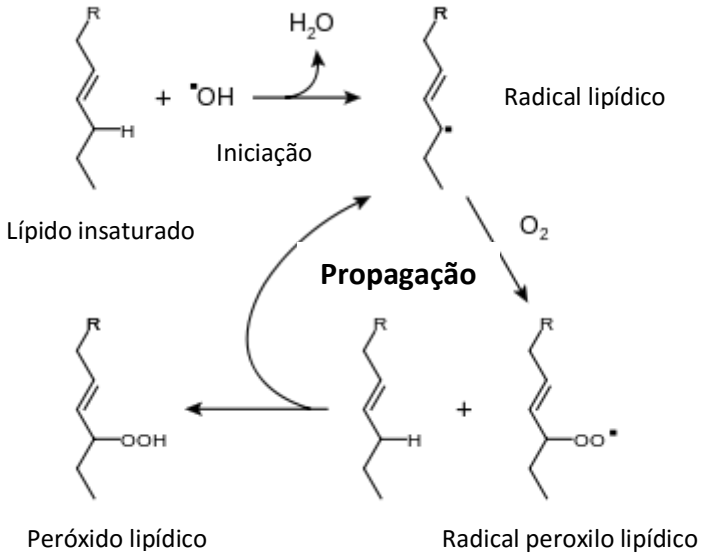


Figura 2 – Esquematização do processo de peroxidação lipídica que ocorre por ataque de um radical livre a uma dupla ligação presente na cadeia alifática de um ácido gordo, ocorrente nos fosfolípidos da bicamada fosfolipídica. A reação de propagação é levada a cabo por radicais lipídicos que se formam ciclicamente. Adaptado de Wikipédia

A vitamina E (α-tocoferol) é um antioxidante apolar que é capaz de interromper a reação de propagação representada na Figura 2, sobretudo em membranas celulares e LBD's. Esta vitamina intercepta a formação dos radicais lipídicos peroxilados, resultando na formação de um outro radical, α-tocoferoxil, insuficientemente reativo para iniciar peroxidação lipídica *per se* (Equação 1) [37]. A vitamina C, por contrapartida, é um antioxidante solúvel capaz de doar eletrões aos radicais livres em solução, ajudando no processo de regeneração da vitamina E [37].

$$LOO^{\bullet} + \alpha\text{-tocoferol-OH} \rightarrow LOOH + \alpha\text{-tocoferoxil-O}^{\bullet} \qquad \text{(Equação 1)}$$

1.3 - Atividade antioxidante e fenóis

O vinho possui naturalmente uma elevada quantidade de compostos fenólicos, os quais apresentam um potencial antioxidante que se pode revelar como extremamente

benéfico para a saúde do consumidor [38][23][39]. Os compostos fenólicos presentes no vinho dividem-se em dois grupos: flavonóides e não-flavonóides [40][41]. Os flavonóides, aos quais se atribui cerca de 90% do conteúdo fenólico do vinho, podem ser divididos em flavonóis, a quercetina e miricetina, em catequinas, (+)-catequina e (-)-epicatequina, e em antocianinas, estas últimas sendo largamente responsáveis pela cor do vinho, em especial do vinho tinto [42]; os taninos, de sua designação geral, também estão incluídos no ramo dos flavonóides [41]. Os compostos não-flavonóides incluem os ácidos hidroxibenzóicos, gálico, elágico, cafeico, caftárico e o ácido *p*-cumárico, bem como os estilbenos glucósidos *trans* e *cis* resveratrol [41][43][44].

Estes compostos polifenólicos compõem também a estrutura responsável pelo facto do vinho ser uma solução coloidal com estabilidade dependente dos processos industriais e do tempo de contacto entre moléculas em dispersão coloidal. As partículas abaixo de 1µm, como a maioria dos taninos e das proantocianidinas, contribuem para a estrutura e cor do vinho; porém, aspetos como a polimerização destes taninos ou a formação de aductos antocianina-tanino promovem o aumento da sua massa molecular, que, quando acima de 1µm, podem converter o vinho numa suspensão na qual estes compostos irão, previsivelmente, precipitar. Aspetos industriais de clarificação com agentes como a metilcelulose ou a gelatina promovem interações eletrostáticas com estes compostos em suspensão e precipitam-nos, sendo normal, após este momento, proceder à filtração dos vinhos com filtros de 1 µm ou 0.22 µm [45]–[50].

Torna-se efetivamente útil compreender a nomenclatura por detrás dos compostos fenólicos para uma boa contextualização neste trabalho (Figura 3). Os compostos fenólicos simples incluem aqueles com um único anel aromático, contendo um ou mais

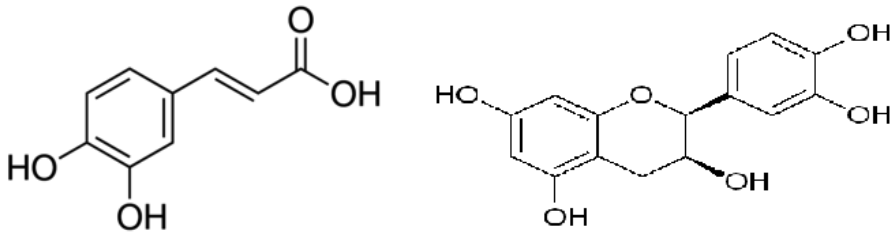


Figura 3 – Exemplo de composto fenólico (A – ácido cafeico) e composto simultaneamente polifenólico e flavonóide (B – catequina). O anel fenólico é a principal característica do composto A, ao passo que a multiplicidade de anéis fenólicos e a estrutura de três anéis altamente identificativa, em B, é o aspeto mais distintivo dos polifenóis e dos flavonóides, respetivamente. Estes compostos podem ser encontrados no vinho em quantidades variáveis. Adaptado de *Wikipedia.*

grupos hidroxilo, sendo um exemplo o ácido cafeico. Os polifenóis são os compostos com múltiplos anéis fenólicos na sua estrutura, sendo um exemplo a catequina, que também é um flavonóide, por possuir uma estrutura de três anéis fortemente característica.

Os flavonóides são todos, portanto, compostos polifenólicos. Os flavonóides são definidos por um sistema de três anéis, sendo que o anel central é um anel pirano com diferentes estados de oxidação, na medida em que se observam maior ou menor número de insaturações neste heterociclo (Figura 4). Estes estados de oxidação no anel central são aquilo que define as diferentes classes de flavonóides, ao passo que o padrão de substituição no anel aromático à direita do pirano é o que define os diferentes membros dentro da classe de flavonóides a que estes pertencem [40][51].

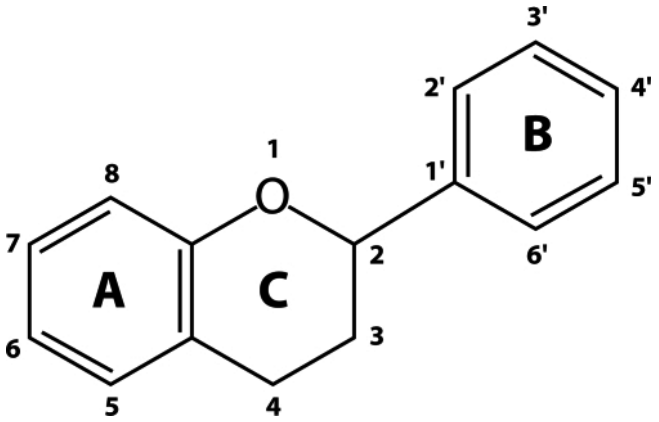


Figura 4 – Estrutura genérica de um flavonóide. Os flavonóides encontrados no vinho possuem todos um grupo hidroxilo no anel A em posição 5 e 7. Diferenças no estado de oxidação e substituição no anel C definem as diferentes classes de flavonóides – flavanóis com anel C saturado; grupo ceto na posição 4, com insaturação entre 2 e 3, define os flavonóis; anel C aromático define as antocianidinas. Retirado de [41].

Os flavanóis são a classe de flavonóides mais abundante nas uvas e no vinho, contabilizando entre 25% a 50% do conteúdo total dos vinhos. As duas formas monoméricas mais comuns no vinho são a catequina e a epicatequina, ambas com substituição de um hidroxilo nas posições 3’ e 4’. Ao contrário dos outros flavonóides, os flavanóis são normalmente encontrados no vinho sob a forma de ésteres de galato; porém, a maioria dos flavanóis encontra-se na forma polimérica, promovida por reações de condensação, dando origem às proantocianidinas oligoméricas e aos taninos

condensados. Considera-se que estes compostos, pela sua elevada massa molecular, não serão fortemente absorvidos, o que representa potenciais menores efeitos benéficos para a saúde [49].

Os flavonóis são os flavonóides com menor representação no vinho. São encontrados sobretudo na forma de glicosídeo, e as respetivas agliconas apresentam três formas principais – quercetina, miricetina e canferol. Parecem funcionar como filtros UV nas uvas, razão pela qual se concentram particularmente nas cascas. O aumento da incidência UV promove a sua formação neste fruto [50].

As antocianinas são a classe de flavonóides particularmente responsável pela cor do vinho, atribuída ao sistema de ressonância eletrónica entre os três anéis, estando este mecanismo fortemente dependente da acidez do meio (Figura 5) [52]. Ao pH do vinho, normalmente cifrado entre os 3.2 e os 3.7 [53], grande parte das antocianinas encontra-se na forma de catião flavílio, tendo esta forma a particularidade de possuir um oxigénio positivamente carregado no anel de pirano.

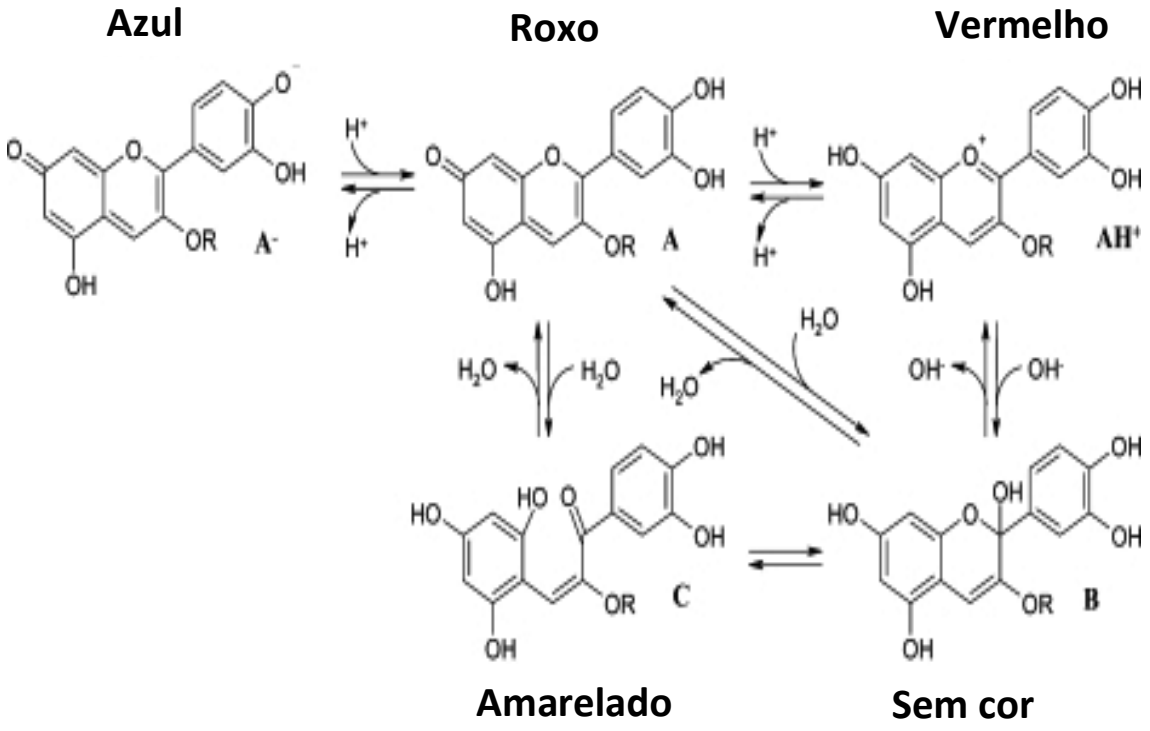


Figura 5 – Evidência do complexo equilíbrio ácido-base das antocianinas em variação com o pH da solução – as diferenças de pH em soluções com estes compostos promovem a variação de cor, podendo oscilar entre o azul (pH's mais elevados) e o vermelho/alaranjado (pH's mais baixos). Ao pH do vinho, é expectável que a maioria das antocianinas se encontram na forma de catião flavílio, contribuindo profundamente para a cor desta bebida. **A^-:** Base quinonoidal; **A**: Forma A^- protonada; **AH^+:** catião flavílio; **B:** Hemiacetal; **C:** chalcona. Adaptado de [52]

Relativamente à Figura supra, a pH abaixo de 1, todas as antocianinas no vinho estarão na forma de catião flavílio, com maior ou menor contribuição para a cor verificada, dadas as diferentes estruturas passíveis de serem encontradas nas antocianinas. À medida que o pH aumenta, um fenómeno de competição cinética e termodinâmica ocorre entre a reação de hidratação do catião flavílio (resultando no composto B hemiacetálico a um valor de pH de aproximadamente 4.5) e a dissociação dos protões dos grupos catecol (resultando no composto A^- quinonoidal a um valor de pH entre 6-7). O composto hemiacetálico pode estabelecer um equilíbrio estrutural com a forma de chalcona por abertura do heterociclo oxigenado [54].

As antocianinas encontram-se na Natureza na esmagadora forma de glicosídeo, na medida em que a presença deste grupo polar lhes assegura uma maior estabilidade em solução aquosa. Neste sentido, o termo antocianina compreende a presença de um substituinte glicosilado, sendo que, quando este grupo é removido, se obtém uma antocianidina, que é a respetiva aglicona. As principais agliconas das antocianinas presentes no vinho são a cianidina, a peonidina, a delfinidina, a petunidina e a malvidina [53], porém, por motivos de instabilidade, as antocianidinas raramente se encontram sem a presença de grupo glucósido na Natureza. No vinho, a principal antocianina é a malvidina-3-glucósido, sendo a respetiva aglicona a malvidina (Figura 6).

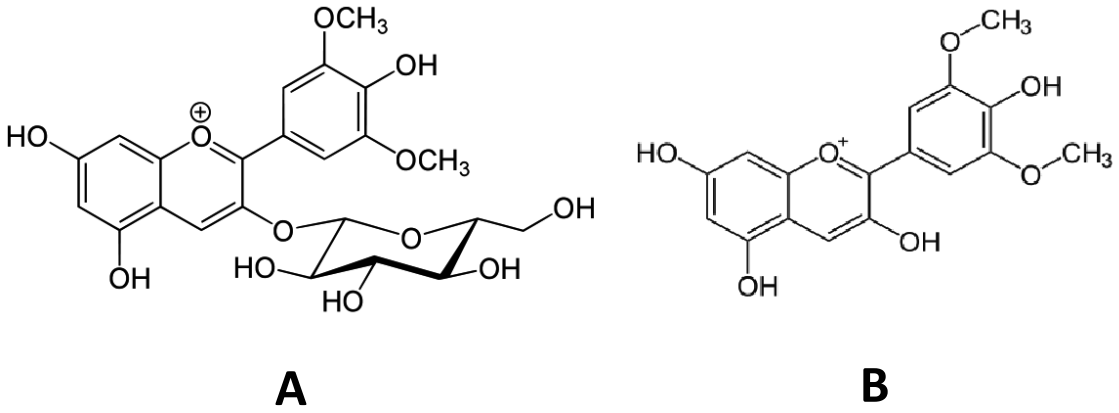


Figura 6 – Estrutura da malvidina-3-glucósido, em **A**, e da respetiva aglicona, a malvidina, em **B.** Ambas as estruturas são representadas na forma de catião flavílio. Adaptado de Wikipédia.

Em maior ou menor medida, todos estes compostos referidos demonstram capacidade antioxidante em solução [44]. Apresenta-se, de seguida, o mecanismo proposto por Nimse *et.al* para a neutralização de radicais livres por parte da cianidina, sendo o

mecanismo representativo antioxidante vigente em flavonóides (Figura 7) [37]. A ressonância entre os três anéis da antocianina, a principal característica dos flavonóides, promove a estabilização do novo radical formado após eliminação do radical livre alvo por doação de átomo de hidrogénio por parte dos grupos catecol.

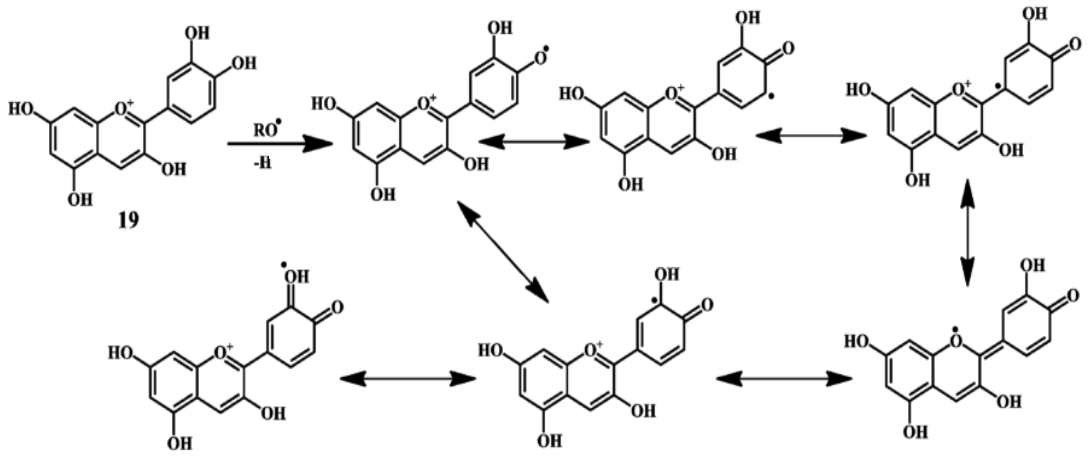


Figura 7 – Mecanismo proposto por Nimse *et. al* para o *scavenging* de radicais livres por parte da cianidina. A doação de um átomo de hidrogénio por parte do grupo catecol do anel B da cianidina permite reduzir o composto oxidante RO·. O oxigénio deste hidroxilo fica com um eletrão desemparelhado, ou seja, forma-se novo radical livre a partir da cianidina anteriormente estável, molécula que é rapidamente estabilizada pela ressonância promovida pelo conjunto de três anéis deste flavonóide. Retirado de [37]

Torna-se também interessante estabelecer uma correlação entre o pH e a atividade antioxidante. É expectável que as antocianinas, estando dependentes do pH da solução para efeitos estruturais e da ressonância entre os anéis A, B e C, que a sua atividade antioxidante seja de alguma forma influenciada pela acidez do meio. Na medida em que a atividade antioxidante das antocianinas é promovida por doação de átomo de hidrogénio a partir de um hidroxilo, é lógico assumir que esta dissociação seja afetada pelo pH. Adicionalmente, na medida em que o pH do estômago é 1, do intestino delgado é 5.3-6.3, da saliva é de 6.8, do sangue é de 7.4, no intestino grosso é de 8 e que no duodeno podem-se verificar valores de pH até 8.6, esta reflexão torna-se especialmente relevante. [55] De facto, as evidências mostram que a desprotonação das antocianinas aumenta consideravelmente o seu potencial antioxidante, o que permite afirmar que um pH mais elevado, potenciando a forma quinonoidal (ver Figura 5), contribui para esta

resposta [56]. Este aspeto acaba por ser extremamente relevante para os reais efeitos destas moléculas *in vivo*, quiçá até o mais importante.

1.4 - O vinho e a medição da atividade antioxidante

Efetivamente, o vinho, sendo conhecido como alimento rico em antioxidantes, é cada vez mais procurado pelo consumidor pelos seus atributos nutricionais benéficos [57]. Porém, o potencial antioxidante desta bebida encontra-se totalmente dependente de condições como a casta das uvas selecionadas, o método de vinificação, a localização geográfica ou as práticas enológicas feitas na adega [43], atribuindo-se aos três aspetos iniciais muitas das caraterísticas antioxidantes do vinho em questão.

Existem algumas técnicas *in vitro* para a avaliação do potencial antioxidante de um determinado composto [58], sendo que todas elas se guiam por dois mecanismos pelos quais os antioxidantes conseguem neutralizar as espécies com eletrões desemparelhados - o primeiro baseia-se na neutralização desta espécie mediante a doação de um átomo de hidrogénio por parte do antioxidante; o segundo, no potencial que tem o agente antioxidante em ceder um eletrão de modo a reduzir qualquer outro composto, nomeadamente metais, grupos carbonilo e radicais livres [43]. A forma normal de medir esta capacidade antioxidante é pela aquisição de radicais sintéticos estáveis, que, na presença de antioxidantes sofrem um dos dois tipos de redução supracitados, o que normalmente é acompanhado colorimetricamente por intermédio de espetrofotometria. Exemplos deste tipo de radicais é o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (*DPPH*) ou o 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) ($ABTS^+$, também chamado teste do *TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), que normalmente dão o nome aos respetivos testes utilizados laboratorialmente.

Outro teste comumente utilizado em laboratório é o teste capacidade de redução do plasma pelo cloreto férrico (*FRAP*), empregue em conjunto com o composto 2,4,6-tripiridil-s-triazina (*TPTZ*). O *DPPH* é reduzido por intermédio de átomo de hidrogénio (Figura 8), ao passo que o $ABTS^+$ e o composto de *Fe(III)-TPTZ* são reduzidos por intermédio de eletrão doado pelo composto redutor [59].

Não devem ser tecidas conclusões definitivas sobre a capacidade antioxidante de determinado produto, neste caso, de um vinho, com base exclusiva num único teste *in*

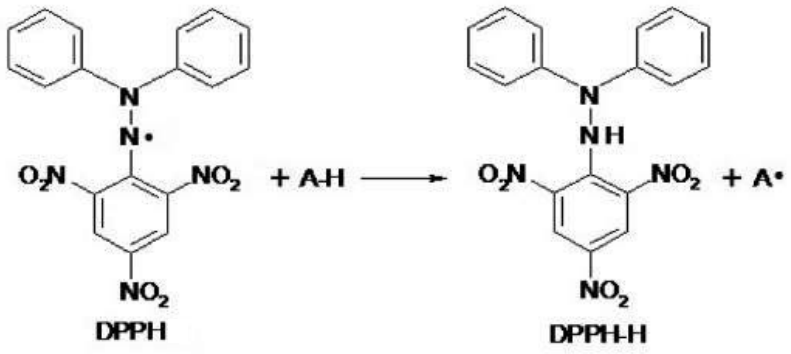


Figura 8 – Redução do radical livre *DPPH* a *DPPH*-H após doação de átomo de hidrogénio por parte de antioxidante. O *DPPH*, quando em solução, evidencia uma forte coloração roxa, sendo que o processo de redução deste radical livre é acompanhado espetrofotometricamente a 517 nm por observação da redução da intensidade de cor roxa. Adaptado de [128].

vitro de antioxidação, na medida em que a especificidade de um teste relativamente ao método pela qual a atividade antioxidante é desencadeada pelos analitos em solução poderá não apresentar correlação com outros testes que se pretendam levar a cabo para a mesma situação, corroborando assim o potencial antioxidante [60][61]. Simultaneamente, existem moléculas padrão antioxidantes pelas quais se normaliza a resposta dada pelas diferentes matrizes expectavelmente antioxidantes. Um exemplo destas moléculas amplamente difundida é o antioxidante sintético Trolox, um análogo polar da Vitamina E [62].

Torna-se importante perceber, então, quais são as moléculas com principal atividade antioxidante que decorrem do consumo de vinho, em especial do vinho tinto. Como referido, os compostos flavonóides dominam a componente fenólica do vinho; os compostos não flavonóides, apesar de poderem eventualmente apresentar interações sinérgicas quando em solução em componente antioxidante, apresentam-se em quantidades normalmente consideradas como demasiado pequenas para realmente poderem apresentar uma atividade antioxidante mensurável, sendo exemplo o resveratrol (seria necessária uma quantidade de cerca de 35L de vinho para igualar as quantidades usadas em testes clínicos deste composto) [63]. De facto, avaliando por teste de $ABTS^{+}$, vários autores indicam o flavonol quercetina [64], as antocianidinas delfinidina e cianidina [64], algumas procianidinas diméricas e triméricas e a catequina [44] como os compostos que, em fase aquosa e em *in vitro*, conseguem evidenciar um potencial antioxidante mais intenso: o primeiro flavonóide indicado existe em pequena

quantidade no vinho tinto e praticamente não existe no vinho branco [65], existindo os restantes em quantidades muito significativas no vinho tinto, mas não no branco [41][63]. Por outro lado, os testes *in vitro,* tanto aquosos como lipídicos, podem não representar o verdadeiro contexto por detrás da ação efetiva destas moléculas, seja por efeitos de absorção deficiente ao nível intestinal ou por rápida metabolização das moléculas após absorção [44]. De referir que são muitos os cientistas a evidenciar a falta de concordância entre resultados adquiridos pelo uso de diferentes métodos de medição antioxidante [43][44][64][66].

Tradicionalmente, existem alguns testes *in vitro* e *in vivo* que apresentam uma maior disseminação na sua utilização do que outros, sendo que a sua preferência normalmente está relacionada com a facilidade de execução, e/ou custo, e/ou melhor adaptação à matriz que se pretende analisar – M.N Alam *et. al* (2013) revelam que o teste do *DPPH*, como teste *in vitro*, reúne a maioria das preferências dos investigadores [60]. Concretamente em relação a vinhos, a grande maioria dos investigadores recorre a ensaios como o *DPPH*, o *FRAP*, o $ABTS^{+}$ e o teste de Folin-Ciocalteu.

Muitos destes estudos *in vitro* seguem-se da deteção, separação e quantificação de compostos presentes no vinho, usando para este fim, por excelência, a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Performance.

1.5 - Deteção e separação de compostos presentes no vinho

O vinho é uma mistura complexa de água, etanol, ácidos orgânicos, biopolímeros, açúcares residuais, compostos fenólicos, entre outros. Pode-se apresentar como uma situação desejável poder separar um ou mais compostos de entre esta solução, pelo que, para tal, se deve recorrer a técnicas analíticas de alta precisão que possam permitir alcançar este fim. No vinho, a técnica comumente mais utilizada com vista ao alcance deste objetivo é a Cromatografia Líquida de Alta Performance (doravante *HPLC – High Performance Liquid Chromatography*).

A *HPLC* é uma técnica cromatográfica que permite ao utilizador separar os compostos presentes numa amostra de acordo com a sua estrutura química, nomeadamente a sua massa molecular e a sua polaridade, bem como determinar a sua concentração [43][67]. O resultado observado será um cromatograma onde cada pico corresponderá,

desejavelmente, a um dos analitos eluídos, sendo normalmente caracterizados pelo tempo de retenção, ou seja, pelo tempo decorrido entre a injeção da amostra na coluna e a deteção do analito eluído por parte do detetor. Para tal, consideram-se várias fases móveis com diferentes polaridades e/ou pH e/ou força iónica, que passam pela coluna de *HPLC*, cujo rácio de passagem pela coluna influencia o tempo de retenção dos compostos.

Demonstra-se, em baixo, o cromatograma *HPLC* de uma amostra de vinho tinto monitorizada a 518 nm, normalmente o comprimento de onda selecionado para identificar compostos corados no vinho, em especial antocianinas. (Figura 9). Observam-se os picos característicos dos compostos presentes no vinho, que apresentam um tempo de retenção bastante identificativo da molécula em questão.

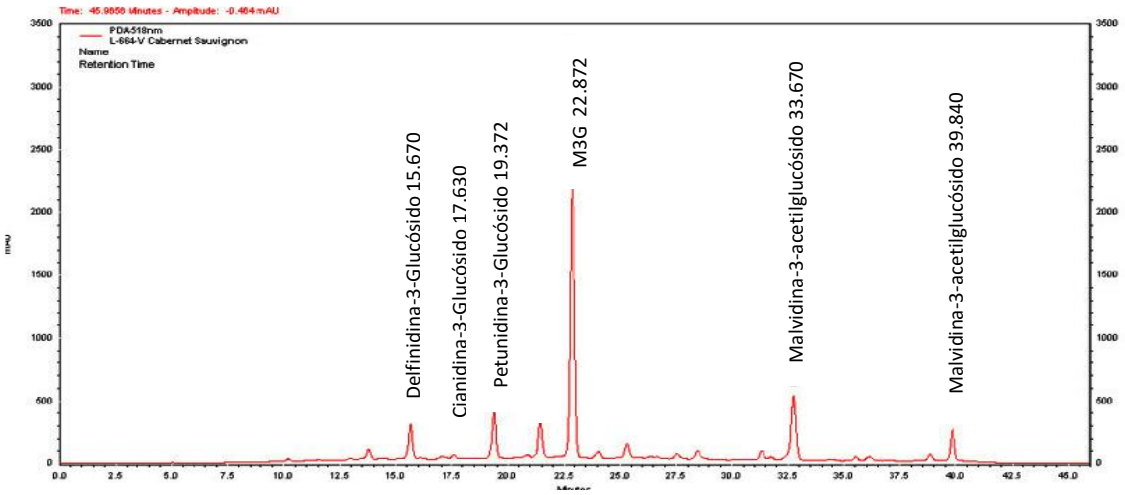


Figura 9 – Cromatograma HPLC monitorizado a 518nm, um comprimento de onda normalmente utilizado para identificar compostos corados no vinho tinto. É possível observar que cada composto apresenta um tempo de retenção definido, sendo possível identificar precisamente a grande maioria dos compostos e a sua concentração. *In* [51]

Esta técnica efetua uma correlação clara e direta com a medição da atividade antioxidante em matrizes alimentares, nomeadamente em vinhos. Na medida em que é possível atribuir muitas das características antioxidantes do vinho a moléculas individuais ou a conjuntos de moléculas, torna-se assim profícuo poder quantificar as mesmas e estabelecer correlações com os aspetos observados *in vitro* e *in vivo,* o que é normalmente alcançado por uso da técnica de *HPLC* [68]–[70].

1.6 - Componente antioxidante e a relação com a casta, a localização geográfica e o método de vinificação

É indubitável que o vinho tinto possui, efetivamente, uma componente antioxidante muito mais mensurável que o vinho branco e o Rose [43], [44], [64]–[66], [71]–[73]. Tal deve-se à presença em solução de flavonóides que conseguem assegurar a manutenção de uma atividade antioxidante muito mais pronunciada. Note-se, adicionalmente, o seguinte: os compostos fenólicos não estão equitativamente distribuídos pela uva – os ácidos fenólicos encontram-se mais concentrados na polpa, as antocianinas/antocianidinas e os estilbenos na casca e as procianidinas, catequinas e flavonóis nas sementes e na casca, para além do papel do engaço, rico em componente fenólica [53]. Esta distribuição assume uma muito maior presença destes compostos em uvas tintas do que brancas, cerca de 5 a 6 vezes maior [73], sendo que muitos destes, como as antocianinas, os taninos, os estilbenos ou as procianidinas, no geral, os compostos flavonóides, apenas se encontram no vinho tinto [53].

Tendo em conta a situação anterior, é relativamente fácil de estabelecer uma relação entre o método de vinificação e o conteúdo antioxidante: quanto maior o tempo de maceração e o contacto com as sementes, cascas e engaço, principalmente o contacto com estas componentes respetivas às uvas tintas, maior a presença fenólica, e, por conseguinte, maior a atividade antioxidante. Em termos concretos, e através de métodos de aferição como o *DPPH*, o *FRAP* ou o $ABTS^+$, observa-se um poder antioxidante maior para os vinhos tintos, depois para os vinhos Rose e depois para os brancos (*FRAP* - média de 50 mM de equivalentes de $FeSO_4$ para vinhos tintos, 20 mM de equivalentes de $FeSO_4$ para vinhos Rose e menos de 10mM de equivalentes de $FeSO_4$ para vinhos brancos monocasta e pluricasta Portugueses da região de Lisboa, Tejo e Setúbal; em medição por *DPPH*, e no mesmo trabalho, as discrepâncias entre tinto e Rose são ainda mais evidentes, notando-se uma maior aproximação entre características antioxidantes do Rose e do branco) [43]. Aspetos como as práticas vinícolas também podem afetar a resposta antioxidante – Yildrim *et. al* (2011) observou, em vinhos tintos, que os agentes clarificantes que mais impacto têm na resposta antioxidante são a clara de ovo, reduzindo em cerca de 18% a atividade antioxidante, e

o PVPP, reduzindo em cerca de 15% [74], concluindo-se, então, que existe uma influência negativa nesta resposta por introdução de agentes colantes.

Num estudo feito na Universidade Nova de Lisboa, no qual foram analisados os potenciais antioxidantes de vários vinhos Portugueses tintos e brancos, monocasta e pluricasta, de três origens diferentes – Lisboa, Tejo e Setúbal – os vinhos brancos analisados (castas Arinto e Fernão Pires), provenientes de qualquer das três origens geográficas, evidencia sempre um potencial antioxidante muito baixo e pouco distinguível entre os próprios vinhos (testes de *FRAP* e *DPPH*) [43]. Por outro lado, nos tintos, observa-se uma tendência muito demarcada para que a casta autóctone Touriga Nacional, tanto em climas como o de Lisboa, Tejo [43] ou o da Madeira [73] apresente excelentes índices de capacidade antioxidante, mesmo não sendo tintureira – esta ressalva é importante uma vez que a casta Alicante Bouschet, uma reconhecida tintureira – casta tinta cujas próprias uvas tintas possuem o interior corado, isto é, rica em compostos fenólicos, ao contrário da maioria das uvas tintas, cuja polpa é incolor - denota elevados índices de compostos fenólicos e, igualmente, de atividade antioxidante [43]. Por outro lado, a casta Syrah apresenta uma atividade antioxidante muito baixa em qualquer uma das três regiões, ao passo que a casta Castelão evidencia uma boa atividade antioxidante, em especial na Península de Setúbal.

Numa junção entre a análise da influência da casta e da localização geográfica, Jordão *et.al* (2012) constataram níveis mais elevados de capacidade antioxidante da casta Tinta Roriz relativamente à Touriga Nacional, e que ambas, mesmo *per se* já bastante elevadas, apresentavam valores mais baixos de atividade antioxidante do que o vinho proveniente da casta tinta Cabernet Sauvignon, o que se confirma por intermédio de outras referências bibliográficas [66][43]. Os mesmos autores identificam igualmente as sementes das uvas como uma importante fonte de proantocianidinas com atividade antioxidante, tendo procedido a um trabalho meticuloso de relação individual desta atividade com a presença de determinada antocianina no vinho (maior presença de delfinidina e cianidina, maior atividade antioxidante, em concordância com outros autores que procuravam estabelecer paralelismo entre a atividade antioxidante dos compostos fenólicos e a sua estrutura [41][44]). Os autores fazem ainda uma referência importante relativamente à variabilidade geográfica do plantio da casta Tinta Roriz, na

qual, comparando o seu trabalho ao de um autor que também procedera à análise da capacidade antioxidante do vinho proveniente da casta Tinta Roriz, porém, noutra localização e com práticas enológicas diferentes, se tinham observado os mesmos valores para o despiste da componente antioxidante, levando os autores a concluir que o verdadeiro fator determinante é a casta utilizada e não a localização [66], o que parece não estar em acordo preciso com outras fontes bibliográficas [53][75].

Num estudo muito interessante realizado em Portugal [75], verificou-se, relativamente à casta Alvarinho, plantada em Arcos de Valdevez e em Dois-Portos, Lisboa, uma muito maior quantidade de ácido tartárico quando no Norte do que no Centro, tendo já sido atribuídas características antioxidantes ao ácido tartárico [53]; observou-se igualmente uma substancial maior quantidade de catequina e epicatequina produzida no Norte do que no Sul nesta casta, compostos estes com conhecidas características antioxidantes [41]. Com base na influência do clima e da função fotoprotetora de alguns compostos fenólicos, é sabido que uma maior temperatura e exposição solar aumenta o seu conteúdo relativo, sendo que uma elevada exposição solar é normalmente tida como um fator importante na qualidade de alguns vinhos, nomeadamente tintos. Sabe-se que a luz UV-B provoca uma *up-regulation* dos genes respetivos à enzima fenilalanina amónia-liase (PAL), cuja atividade remete diretamente para a produção de compostos fenólicos, potenciando também a produção de resveratrol [75].

Sabe-se também que toda e qualquer prática enológica que possa favorecer o aumento de luz UV que chega às folhas e às uvas, brancas e tintas, perto do *véraison* (ponto de maturação), promove a formação de flavonóis e antocianinas, ao passo que já foi demonstrado que a temperatura aumenta o número de proantocianidinas nas sementes. No geral, a literatura aponta para que, quando em quantidades não excessivas (>35ºC de forma contínua), a temperatura e a exposição solar promovem a acumulação de compostos fenólicos na uva que efetivamente evidenciam uma componente antioxidante mensurável [76].

Conclui-se assim que existem, de facto, alguns fatores que influenciam a resposta antioxidante de determinados vinhos, observando sobretudo uma relação entre a casta, a proveniência geográfica e o método de vinificação. Tendo em conta os dados

apresentados, antecipam-se os fatores que poderão levar à produção de um vinho com maior resposta antioxidante:

1) Método de vinificação: contacto prolongado com o engaço e com a componente sólida das uvas, de modo a potenciar a extração de compostos fenólicos pelo etanol e sem colocar em cheque o caráter de boca do vinho por eventual adstringência exacerbada; vinho não colado nem filtrado.
2) Castas: tintas, sobretudo Touriga Nacional, Alicante Bouschet, Vinhão, Cabernet Sauvignon e Aragonez.
3) Localização: considerando Portugal, Alentejo preferencialmente, potenciando assim a formação de antocianinas, resveratrol, flavonóis e proantocianidinas por maior exposição solar e temperaturas.

1.7 - Biodisponibilidade e absorção de antioxidantes em matrizes alimentares

A bioacessibilidade e a biodisponibilidade de determinados componentes, neste caso, de antioxidantes, são dois conceitos diferentes [77]. Normalmente a biodisponibilidade dos antioxidantes é avaliada em alimentos de onde estes componentes são facilmente libertos. A bioacessibilidade e a biodisponibilidade de cada antioxidante difere grandemente de matriz para matriz, e os antioxidantes normalmente ingeridos em maiores quantidades em frutas (ou outros componentes) não são necessariamente aqueles que irão originar um maior efeito ativo nos tecidos-alvo [78]. A biodisponibilidade de um determinado componente é definida como a proporção que é ingerida, digerida, absorvida e que fica disponível para efetuar a sua ação nos tecidos-alvo; a bioacessibilidade é definida como a quantidade de um componente que está passível de ser absorvida no intestino após digestão. A partir desta definição, é possível perceber que a biodisponibilidade está compreendida dentro da bioacessibilidade [79]. Praticamente todo o tipo de compostos nutricionais são absorvidos no decorrer do intestino, em especial no início do intestino delgado (entre 70% a 95%) [77]. Na grande maioria da ingestão de compostos como proteínas ou hidratos de carbono, é necessário

que o tamanho molecular dos mesmos seja diminuído, de forma a potenciar a absorção via vilosidades intestinais, localizadas no intestino delgado. Este processo é chamado de digestão química, governado principalmente por mecanismos de clivagem enzimática [80]. A absorção (Figura 10) ocorre principalmente nos enterócitos, as células de maior expressão no intestino delgado, através de cinco mecanismos distintos – transporte ativo (1), difusão passiva (2), difusão facilitada (3), co-transporte (4) e endocitose (5).

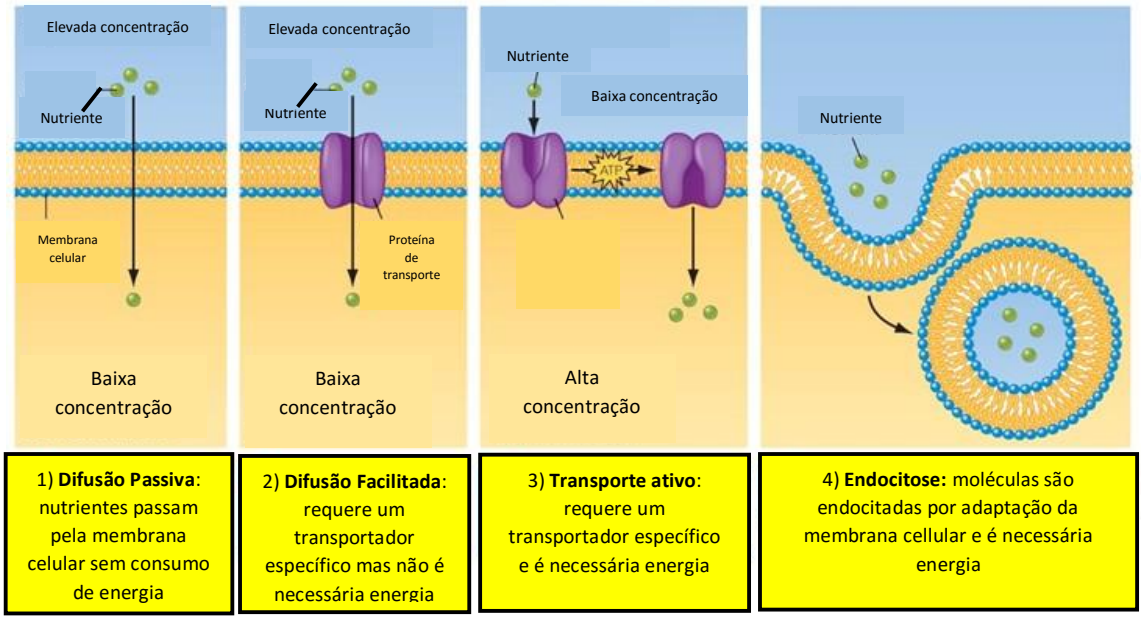


Figura 10 – Mecanismos de absorção de nutrientes vigentes no intestino delgado – 1) difusão passiva; 2) difusão facilitada; 3) transporte ativo; 4) endocitose. Os mecanismos 1) e 2) funcionam a favor do gradiente de concentração, não requerendo ATP para a sua ocorrência; os mecanismos 3) e 4) necessitam de ATP para o seu funcionamento. Na imagem não surge representado o mecanismo de co-transporte, que funciona a favor de um gradiente de concentração iónico mas contra um gradiente de concentração molecular. Adaptado de [80].

Em 1), verifica-se o movimento de uma substância pela membrana celular contra a verificação de alguma resistência celular, normalmente um gradiente de concentração, transporte mediado por proteínas membranares que requer o consumo de ATP. Em 2), ocorre o movimento de nutrientes naturalmente pela bicamada fosfolipídica a favor de um gradiente de concentração e sem consumo de ATP. Em 3), ocorre o movimento de substâncias de uma zona de maior concentração para uma de menor concentração através de transportador, mas sem consumo energético. Em 4), o transporte de iões a favor do seu gradiente de concentração gera a energia motriz necessária para que um

transportador seja ativado e para que este transporte uma molécula contra o gradiente de concentração. Em 5), ocorre o transporte de uma determinada molécula através da mudança de forma da membrana, com consequente consumo de ATP [80].

No intestino, uma monocamada de células epiteliais cobre a parede intestinal interna e forma a barreira que limita a absorção de nutrientes ou fármacos. Consequentemente, a reconstituição *in vitro* desta monocamada epitelial possibilita a previsão da absorção de nutrientes ou drogas a este nível. As células Caco-2 são células de carcinoma humano do cólon, que permitem simular a situação supracitada e que, pela sua utilidade, versatilidade e capacidade de crescimento em laboratório, se tornaram o padrão de simulação *in vitro* para a absorção destes componentes (Figura 11).

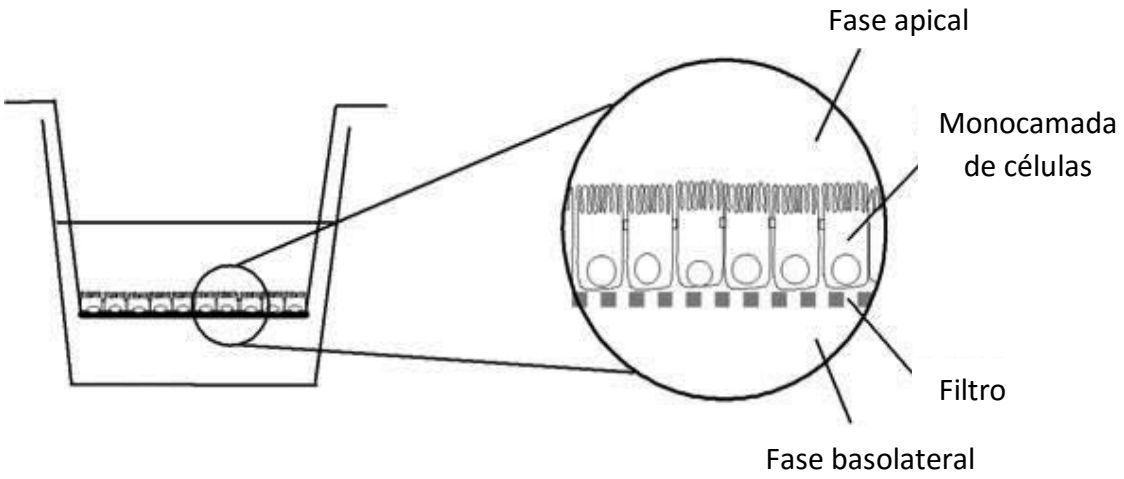


Figura 11 – Diagrama da deposição de uma monocamada de células Caco-2 num suporte de filtros permeáveis. Após correta diferenciação em monocamada epitelial, estas células estão prontas para iniciar um teste de permeabilidade. A fase apical pretende simular o lúmen intestinal e a fase basolateral o tecido intersticial ou a própria entrada na corrente sanguínea. Adaptado de [81]

Isto acontece porque, após cultura, estas células exibem praticamente todas as características das células do intestino, desde o fenótipo até à expressão de enzimas de superfície ou proteínas de transporte, que assim medeiam o *uptake* ativo de compostos ou o seu efluxo [81]. Na Figura 11 encontra-se um diagrama de uma monocamada de células Caco-2 cujo plaqueamento fora feito em membranas porosas de polietileno tereftalato. Em condições laboratoriais e ao fim de 14 a 21 dias, as células plaqueadas nas respetivas membranas deverão ter formado uma monocamada confluente. Porém,

tal pode não se verificar, e esta monocamada apresentar-se com defeitos estruturais que comprometam a viabilidade dos resultados. É recomendável empregar algum teste analítico de modo a aferir que esta monocamada reúne a integridade estrutural para execução de teste de permeabilidade. Para este fim, pode-se aplicar o amarelo de lúcifer, uma sonda fluorescente hidrossolúvel utilizada para a verificação da integridade das monocamadas da Caco-2. Em condições ideais, este composto apresenta coeficientes de permeabilidade (medidos por fluorescência) devidamente tabelados e que indicam ao utilizador se as células estão em devidas condições para iniciar os testes de permeabilidade.

Os compostos presentes na dieta, neste caso, no vinho, devem apresentar um bom balanço entre a sua hidrofilicidade, de modo a se poderem dissolver eficazmente nos fluidos gastrointestinais, a sua lipofilicidade, de forma que seja promovida a sua passagem facilitada pelas membranas celulares, e o seu tamanho, sabendo que quanto maior o composto, normalmente, menor a sua absorção [82]. No entanto, existe um fenómeno extremamente importante de se fazer menção relativamente aos polifenóis, que é o seu metabolismo. Apesar dos seus bem conhecidos efeitos antioxidantes, os polifenóis possuem uma estrutura que potencia a sua metabolização xenobiótica, o que significa que prontamente serão metabolizados de forma que se possa proceder à sua célere eliminação, normalmente pela urina ou fezes. Este metabolismo divide-se em três fases, com o objetivo final de sinalizar os compostos-alvo por intermédio de reações de adição de grupos sulfato, *O*-ácido glucorónico e *O*-ésteres de metilo, o que os torna simultaneamente mais hidrofílicos. Virtualmente todos os compostos fenólicos com potencial antioxidante se encontram assim *conjugados* em circulação no plasma, sendo que estas reações acontecem sobretudo aquando da passagem destes compostos pelo lúmen do intestino e de forma mais clara no fígado. Estas reações promovem a diminuição clara da atividade e disponibilidade dos constituintes polifenólicos [83]. Um grupo de investigadores norte-americanos demonstrou claramente que as agliconas dos flavonóides eram até cinco vezes mais absorvidas que os seus compostos glicosilados através das células Caco-2 e em intestino de rato, registando e quantificando, porém, uma elevada taxa de metabolização e consequente perca de atividade destes compostos [84]. Adicionalmente, os xenobióticos podem sofrer um processo de efluxo nos

enterócitos, que consiste na ativação de proteínas de transporte que potenciam a remoção destes compostos já absorvidos de novo para o lúmen intestinal, o que potencia a sua eliminação [85].

A absorção dos flavonóides, em especial dos compostos glicosilados, tinha-se como negligenciável no início do seu estudo de absorção, tendo em conta que se cria que seria absolutamente necessária a remoção do grupo glicosídeo para que esta absorção acontecesse [77]. É possível encontrar documentos relativamente recentes que afirmam que de facto as agliconas dos flavonóides, por não possuírem grupo glicosídeo, poderão ser melhor absorvidas a nível intestinal [86][87], sem descurar a possibilidade, para a qual existem evidências científicas, da absorção mais eficaz dos flavonóides glicosilados [78]. Existe igualmente trabalho publicado que aponta para o potencial maior impacto antioxidante *in vivo* da absorção e metabolização da cianidina relativamente ao seu glicosídeo cianidina-3-glucósido [88]. Deste modo, é possível compreender que existem algumas evidências a favor das duas teses, pelo que os mecanismos de absorção e respetivos efeitos fisiológicos parecem carecer de maior investigação.

Após a absorção dos polifenóis, que compreende a sua passagem pelo interior do enterócito e passagem para a corrente sanguínea, passando pelo espaço intersticial, o composto poderá ser metabolizado, em especial no fígado – esta metabolização poderá, ou não, originar compostos diferentemente ativos a nível antioxidante do composto original. Independentemente da adoção de qualquer uma das conceções sobre esta temática, é facto bem evidente de que a absorção destes compostos é consideravelmente baixa em condições normais de ingestão dos alimentos em questão [42]. Porém, os compostos não absorvidos no intestino poderão promover um ambiente antioxidante no intestino grosso [78].

Num trabalho publicado em 2005, Nielsen *et.al* apresentam dois mecanismos possíveis para absorção de um flavonóide glicosilado a nível intestinal (novo vislumbre da Figura 6 para melhor compreensão). A hesperitina-7-glucósido, tendo chegado ao lúmen intestinal, é inicialmente deglicosilada por uma enzima membranar, resultando na aglicona, que difunde para o interior do enterócito por difusão passiva ou facilitada. A metabolização desta aglicona pode ocorrer logo no interior do enterócito, sendo transportada para o sangue de seguida após passagem pela membrana basolateral e

pelo espaço intersticial, entrando de seguida em circulação sanguínea [86]. Alternativamente, o glicosídeo poderá ser absorvido por transporte ativo por transportadores semelhantes aos transportadores de glucose, existindo evidências muito fortes da interação deste transportador com as formas glicosiladas mas não com as agliconas (Figura 12).

Num outro trabalho [85], que está em concordância com Nielsen *et.al*, são referidos três aspetos interessantes – que a glicosidase citosólica não consegue clivar 3-glucósidos, que quanto mais tarde é potenciada a absorção dos flavonóides – glicosilados vs não-glicosilados – menor a sua biodisponibilidade (há evidências de absorção de agliconas no estômago), e que se verifica um efluxo basolateral-apical muito significativo de flavonóides glicosilados (quercetina-3-glucósido) em modelos celulares intestinais, por expressão de proteínas transmembranares. Os autores concluem que células intestinais que não possuem lactase florizina hidrolase (beta-glicosidase membranar) não potenciam a absorção de flavonóides glicosilados, que compostos que não são substratos para estas enzimas não são facilmente absorvidos e que a deglicosilação pode ser o passo limitante para a absorção destes compostos. Estes aspetos limitantes estarão relacionados com a saturação das beta-glicosidases intestinais na presença destes compostos, o que confere menor possibilidade de absorção à medida que o bolo alimentar avança no intestino delgado.

Assim sendo, parece haver evidências de que existe uma dualidade na absorção dos flavonóides – tanto os glicosilados como os não glicosilados serão absorvidos, no entanto, poder-se-á verificar uma absorção mais dificultada relativamente aos flavonóides glicosilados. Por contrapartida, as agliconas poderão verificar uma absorção incrementada, na medida em que são moléculas mais pequenas e menos polares que a sua congénere glicosilada; no entanto, por terem maior instabilidade em solução, poderão não promover uma resposta antioxidante mensurável *in vivo* por efeitos de conjugação ou degradação processual. De qualquer das formas, parecem haver evidências que a deglicosilação intestinal poderá ser um aspeto limitante da absorção destes compostos. Estas informações altamente pertinentes permitem-nos assim elaborar uma proposta de valor na qual assenta este trabalho de investigação, e que se apresenta de seguida.

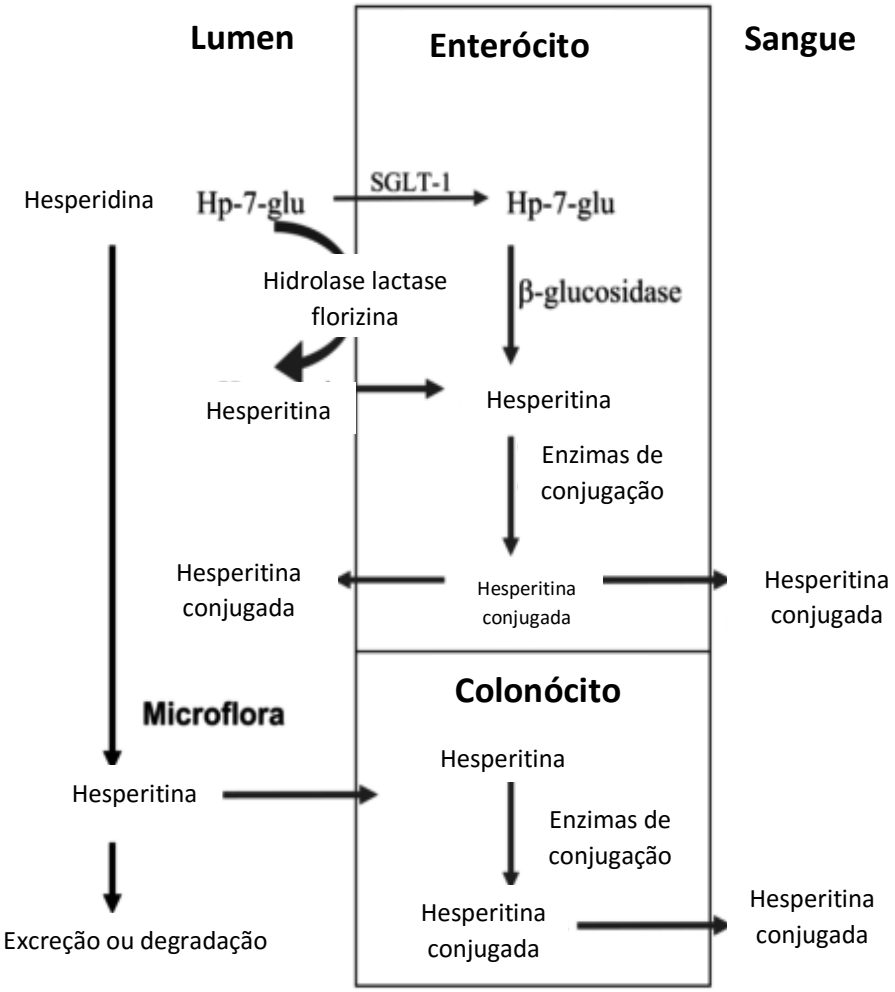


Figura 12 – Mecanismo de absorção de flavonóides glicosilados em células intestinais. A absorção pode ocorrer *via* clivagem do glicosídeo e absorção da aglicona ou por transportador transmembranar. A aglicona é a molécula que irá sofrer conjugação intracelular e absorção para o sistema sanguíneo. Adaptado de [86]

1.8 - Proposta de valor

A proposta de valor deste trabalho de investigação assenta na possibilidade de poder desenvolver uma metodologia que significativamente aumente a absorção intestinal, e, previsivelmente, a biodisponibilidade, de compostos antioxidantes presentes no vinho, em especial os flavonóides glicosilados e seus produtos de hidrólise, fazendo com que, no final, a ingestão de determinado volume de vinho por parte de um consumidor consiga providenciar maiores benefícios *reais* para a saúde do que a ingestão do mesmo vinho com ausência desta metodologia.

Para alcançar este objetivo, devem ser estudadas as características antioxidantes de vinhos comerciais, correlacionando esta resposta com aspetos como a casta, ano de cultivo ou método de vinificação. Seguidamente, escolhendo um vinho que apresente uma resposta antioxidante bastante elevada *in vitro*, deverá ser empregue um tratamento enzimático que, em condições de pré-engarrafamento, consiga remover o grupo glicósido de uma porção dos flavonóides glicosilados em solução – idealmente, este tratamento enzimático deve ser já comercialmente viável e aprovado para contacto alimentar. Na medida em que os principais flavonóides glicosilados do vinho, em especial do vinho tinto, são as antocianinas, o composto padrão utilizado para este tratamento enzimático será a malvidina-3-glucósido, a principal antocianina do vinho tinto, monitorizando o seu produto de deglicosilação, a malvidina, cuja estabilidade deve ser analisada. Finalmente, a absorção dos compostos a nível intestinal de vinhos normais e vinhos tratados enzimaticamente deve ser simulada, fazendo uso de linhas celulares representativas do intestino delgado numa primeira fase e de modelos animais numa segunda fase.

Capítulo 2 - Experimental

2.1 - Materiais e Métodos

O trabalho experimental iniciou-se pela escolha e acomodação de 29 vinhos, dentro os quais vários vinhos brancos, verdes, tintos, vinhos fortificados e derivados (ver Tabela 1, Anexos). A escolha foi feita em parceria com os responsáveis da Aveleda S.A neste projeto, de modo a simultaneamente poder fazer um escrutínio das propriedades antioxidantes dos vinhos produzidos por esta empresa e também poder estudar castas e vinhos de outras regiões, naturalmente produzidos por outras empresas.

O trabalho experimental iniciou-se pela quantificação dos compostos fenólicos totais em cada vinho, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Seguidamente, procedeu-se a um estudo monitorizado por espectrofotometria de UV-Visível das propriedades antioxidantes *in vitro* dos 29 vinhos referidos, através dos métodos do *DPPH*, $ABTS^+$ e *FRAP*. Para assegurar que o mínimo de oxidação ocorria, os vinhos foram sempre analisados e selados com celeridade, tendo sido guardados a baixas temperaturas (4ºC) e sem incidência de luz. Os vinhos foram renovados a meio das experiências (após cerca de 3 semanas de abertura) *in vitro* para minimizar os efeitos da eventual oxidação após abertura prolongada. Após esta análise, iniciaram-se os trabalhos em Cromatografia Líquida de Alta Performance com Detetor de Díodos (*HPLC-DAD*, doravante apenas *HPLC*) com dois vinhos de elevada resposta antioxidante *in vitro* anteriormente obtida, tendo sido primeiramente escolhido e adaptado um método de *HPLC*, otimizando-o posteriormente para diminuição dos tempos de retenção dos compostos-alvo. Iniciaram-se de seguida as experimentações enzimáticas de modo a poder verificar e monitorizar a remoção do grupo glicosídeo nos compostos-alvo, tanto em solução mimética de vinho, com padrão, como em vinho tinto comercial escolhido anteriormente. Finalmente, iniciou-se a cultura celular das células Caco-2 (n=1), com posterior plaqueamento em poços para respetiva diferenciação em monocamada e mimetização das condições intestinais de absorção de nutrientes – foi testada a absorção de vinhos tintos normais e enzimaticamente tratados ao fim de 21 dias de diferenciação.

2.2 – Reagentes e Equipamentos

Testes de Espetroscopia UV-Visível: *TPC, DPPH, FRAP* e *ABTS$^+$*

Os seguintes testes de *TPC, DPPH, FRAP* e *ABTS$^+$* foram conduzidos em espetrofotómetro Shimadzu UV-2450, utilizando cuvettes de plástico descartáveis de 1 cm de caminho ótico.

O reagente de Folin-Ciocalteu (VWR, Portugal) e o carbonato de sódio (VWR, Portugal) foram utilizados para a determinação do conteúdo fenólico total (TPC), usando ácido gálico (98%, Acros Organics, Bélgica) como padrão.

O reagente 2,2-difenil-1-picrilhidrazil - *DPPH* (95%, Alfa Aesar, Alemanha) e metanol (99,5%, Panreac, Espanha) foram utilizados para o teste antioxidante *in vitro* do *DPPH*, com 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico (Trolox) como padrão antioxidante (BioVision, EUA).

Para o teste antioxidante *FRAP*, foram utilizados os seguintes reagentes: ácido acético glacial (99,8%, Chem-Lab, Bélgica), acetato de sódio anidro (99%, Sigma-Aldrich, Portugal), 2,4,6 – tripiridil-s-triazina *TPTZ* (Acros Organics, 98%, Áustria), ácido clorídrico (Fisher Scientific, 37%, Reino Unido), cloreto férrico hexahidratado (97%, Sigma-Aldrich, Portugal), usando sulfato de ferro heptahidratado (99%, Sigma-Aldrich, Portugal) como padrão.

O reagente 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico – *ABTS$^+$* (99%, Panreac, Espanha) e o persulfato de potássio (99%, Sigma-Aldrich, EUA) foram utilizados para o teste antioxidante do *ABTS$^+$*, com Trolox como padrão.

A água ultrapura utilizada em todas as experiências foi adquirida com recurso a um sistema Direct-Q 3UV-R.

Foi feita uma solução de tampão de fosfato salino (PBS), a ser usada nos testes indicados, com a seguinte composição: 2g de KH_2PO_4 (15 mM), 6.1g Na_2HPO_4 (43 mM), 2g de KCl (27 mM), 87.7g NaCl (150 mM) (todos os sais foram fornecidos pela Sigma-Aldrich-Aldrich, Portugal) e 1000 mL de água ultrapura.

Trabalhos de *HPLC*

Para os trabalhos em *HPLC*, foram definidas as fases móveis A e B. A fase móvel A é constituída por 94% água ultrapura, 5% acetonitrilo (grau *HPLC* 99,99%, Fisher Scientific, Reino Unido) e 1% ácido fórmico (85%, Pancreac, Espanha). A fase móvel B é constituída por 60% acetonitrilo e 40% água ultrapura. Foi também utilizado metanol (grau *HPLC* > 99.9%, Sigma-Aldrich, Portugal) como eluente. Os padrões cloreto de malvidina-3-glucósido (M3G) (>96%, ExtraSynthese, França) e cloreto de malvidina (MV) (> 95%, Sigma-Aldrich, Portugal) foram utilizados para monitorização dos trabalhos em *HPLC*. Para efeitos de tratamento enzimático, a M3G foi dissolvida em solução mimética de vinho, com pH 3.5 e 13% Etanol (99%, Panreac, Espanha). As preparações enzimáticas rastreadas foram providenciadas pela empresa EcoFiltra (Porto) e são produzidas pela empresa Laffort (França), sendo as mesmas Lafazym Arom, Lafazym Extract e Extralyse.

O sistema de *HPLC* utilizado (Grupo de Fotoquímica do Dpt. De Química da UC) é constituído por um desgaseificador Selecta Ultrasons UB-1488, um organizador VWR-Hitachi, uma bomba binária de gradiente VWR-Hitachi L-2130, um amostrador automático VWR-Hitachi L-2200 e um detetor de díodos VWR-Hitachi L-2455. O detetor mais comum utilizado em *HPLC* é o Detetor de Díodos (*DAD*). Este detetor absorve luz no espetro UV-Visível e é, de longe, o detetor mais utilizado em *HPLC*, dado que permite, num único cromatograma, optar-se pela monitorização de um único comprimento de onda ou de múltiplos comprimentos de onda após injeção e chegada dos compostos ao detetor.

O software utilizado foi o EZChrom Elite.

Testes *in vitro* com linha celular Caco-2

As células da linha celular Caco-2 foram fornecidas pelo banco de células ECACC e foram descongeladas à passagem número 17, um aspeto necessário devido ao crescimento das células, que assim vão sendo alocadas em novos frascos, com meio fresco. Cada tripsinização e diluição/divisão de células conta como uma passagem, e este número é importante para guiar o utilizador relativamente ao número de vezes que as células já foram divididas.

Estas células foram cultivadas em câmara de fluxo laminar (BW 100) (fluxo: 1050 m^3/h - BioWizard, Frilabo, Portugal) em frascos de cultura T 75cm^2 (OrangeScientific, Frilabo,

Portugal), mantidas a um ambiente de 37ºC, 5% CO_2 e 95% humidade (incubadora MCO-19AIC (UV) - Sanyo, Frilabo, Portugal). As células foram estabelecidas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM-HG) (com 4500 mg/L glucose e L-glutamina, sem bicarbonato de sódio - Sigma-Aldrich, Portugal), a um pH de 7.4, meio suplementado com:

- 10% soro de feto bovino (aprovado na EU, produzido na América do Sul - Gibco-Life Technologies, Porto, Portugal);
- 1% de solução de penicilina/estreptomicina (Pen/Strep – 10.000 unidades de penicilina e 10 mg de estreptomicina/mL - Sigma-Aldrich, Portugal);
- 1% de solução de aminoácidos não essenciais (100x, Sigma-Aldrich, Portugal);
- 1% de piruvato de sódio 100 mM (Sigma-Aldrich, Portugal).

Quando julgado oportuno, as células foram observadas com recurso a microscópio CRX41 acoplado a câmara DP20 (Olympus, Portugal). Quando observadas confluências de 70-80%, as células foram separadas com uso de solução de tripsina-EDTA 1x a pH 7.4 (tripsina, solução 10x: 25g de tripsina suína por litro em 0.9% NaCl - Sigma-Aldrich, Portugal; EDTA - Sigma-Aldrich, Portugal). A respetiva tripsinização ocorreu sensivelmente a cada 3-4 dias. Estes trabalhos foram desenvolvidos no grupo de Química Física Molecular do Dpt. de Ciências da Vida da UC.

As células foram contadas usando azul tripano (solução de 0.4% (m/v) – Sigma-Aldrich, Portugal), e a lavagem dos frascos, de modo a prevenir a inatividade da tripsina, foi feita com PBS. As células foram posteriormente cultivadas em *inserts* PET de porosidade 0.4 µm (BD Falcon, Enzifarma, Portugal), por sua vez suportados em placas de 24 poços para *inserts* (BD Falcon, Enzifarma, Portugal). Ao fim de 21 dias de diferenciação, de modo a determinar a integridade da monocamada celular, utilizou-se o composto Amarelo de Lucifer (Reagente5, Portugal), tendo-se medido as respetivas fluorescências na fase basolateral, ao fim de 120 min de incubação, num fluorímetro Molecular Devices – Spectra Max Gemini EM (Centro de Neurociências e Biologia Celular da UC). Utilizaram-se, para os testes de permeabilidade, os seguintes reagentes:

- Tampão Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) sem vermelho fenólico, com $NaHCO_3$ e sem HEPES (Sigma-Aldrich, Portugal), pH 7.4;

- Atenolol (Reagente5, Portugal) e (S)-(-)-hidrocloreto de propranolol (Reagente5, Portugal), com reportadas permeabilidades de 50% e 90%, respetivamente [89].

As leituras respetivas ao teste do *DPPH* utilizadas neste teste foram efetuadas em leitor de microplacas µQuant MQX200 (BioTek, Portugal).

Será doravante descrito como V1 o conjunto dos vinhos brancos, verdes, aguardentes e moscatéis analisados e como V2 o conjunto dos vinhos tintos, sangrias e vinhos do Porto analisados. Exceto quando declarado o contrário, todos os testes foram efetuados em metodologia de n=3.

2.3 – Descrição dos métodos analíticos e testes *in vitro*

Os padrões escolhidos para os testes de TPC, *DPPH*, *FRAP* e $ABTS^+$ foram escolhidos por serem universalmente aceites pela comunidade académica como aqueles que reúnem a maior aceitação e concordância entre resultados.

Conteúdo fenólico total (TPC) – a metodologia foi desenvolvida com base em trabalho já publicado [61][90][91], com algumas modificações. Para a curva de calibração, foi preparada uma solução aquosa de 10 g/L de ácido gálico, tendo sido diluída de modo a se poder obter concentrações de 200 mg/L a 5 mg/L (R^2 = 0,9971). Para um volume final de 4 mL, foram misturados 200 µL de FCR, 800 µL de solução básica de carbonato de sódio 6%, 2.96 mL de água ultrapura e 40 µL de amostra diluída. Após 60 min de incubação à temperatura ambiente no escuro, as amostras foram lidas a 750 nm num espetrofotómetro, sendo que o branco utilizado foi água ultrapura. As amostras de V1 foram diluídas 500x e as de V2 1000x, para um mesmo volume final de 4 mL. Os resultados são expressos em equivalentes de ácido gálico por litro (GAE/L).

Teste do *DPPH* – a metodologia foi desenvolvida com base em trabalho já publicado [92], com algumas modificações efetuadas. Foi preparada uma solução de 48 mg/L de *DPPH* em metanol. Para a curva de calibração foi utilizado o padrão Trolox, diluído em metanol para uma concentração final de 8 mM (R^2 = 0,9959) – para um volume final de 2.5 mL, a solução de Trolox foi diluída entre 25 µM e 1 µM com metanol. A absorvância

das amostras foi lida ao fim de um período de incubação no escuro de 60 min a 517 nm. As amostras de V1 foram diluídas 250x e as de V2 foram diluídas até 5000x. O branco utilizado foi metanol. Os resultados são expressos em equivalentes de Trolox (µM).

Teste *FRAP* - a metodologia foi desenvolvida com base em trabalho já publicado [43], com algumas modificações. Iniciou-se o processo medindo 16 mL de ácido acético glacial, ao qual se adicionaram 3.1 g de acetato de sódio, perfazendo com água ultrapura até 1 L (tampão 0.3 M pH 3.6). De seguida, fez-se uma solução aquosa de reagente *TPTZ* de 10 mM em HCl 37% e uma solução aquosa de cloreto férrico de 20 mM. Para um volume final de 500 mL, misturou-se primeiro o *TPTZ* com a solução de cloreto férrico, adicionando posteriormente o tampão, numa razão de 1:1:10. Para a curva de calibração, adicionou-se a 3 mL deste reagente final um volume de solução de sulfato ferroso para obter uma concentração que variou de 8 mM a 42 mM (R^2 = 0,9964).

A mistura reacional ficou a incubar em banho a uma temperatura de 37ºC durante 50 minutos. Ao final do período de incubação, procedeu-se à leitura da absorvância a um comprimento de onda de 593 nm.

O mesmo procedimento foi efetuado para as amostras, com fator de diluição para V1 de 130x e V2 de 2000x. Os resultados são expressos em equivalentes de $FeSO_4$ (mM).

Teste *ABTS*$^+$ – o teste foi desenvolvido com base na adaptação de outros trabalhos [73][44]. Uma solução aquosa de *ABTS*$^+$ (7 mM) foi misturada com uma solução oxidante de persulfato de potássio (2.5 mM). Foi feita uma mistura numa proporção 80:20, deixando *overnight* a oxidar. No dia seguinte, o resultado desta mistura, que é uma solução com tonalidade verde escura intensa, foi diluída com PBS, até atingir uma absorvância de 0.6 a 734 nm. Para efeitos de calibração, foi feita uma solução padrão de Trolox de 1 mM em etanol, adicionando volumes variáveis de Trolox a 1 mL de solução oxidada de modo a obter concentrações de Trolox de 1 µM a 20 µM e medindo ao fim de 60 min (R^2 = 0,9999). O branco utilizado foi PBS.

O mesmo procedimento foi efetuado para as amostras, com fator de diluição para V1 de 300x e V2 de 1000x. Os resultados são expressos em equivalentes de Trolox (µM).

Quantificação de compostos por *HPLC* - para a quantificação de diferentes compostos por *HPLC*-DAD, as amostras foram previamente filtradas, utilizando filtros de 0,22 µM,

de modo a remover partículas que pudessem interagir com a coluna de cromatografia ou danificar a mesma.

O método utilizado para separação de antocianinas foi adaptado do método apresentado por Kozminski *et.al* (2006) [93], com algumas modificações. Houve oportunidade de otimizar o protocolo de eluição de modo a diminuir o tempo de retenção dos padrões escolhidos, malvidina-3-glucósido e malvidina. As análises foram efetuadas numa coluna RP-C18 (5 µm, Merck, Alemanha), deste modo baseando a capacidade de retenção de compostos em interações hidrofóbicas por parte dos enxertos alquílicos com os compostos em análise.

As fases móveis foram combinadas de acordo com o programa de eluentes descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Programa de eluentes aplicado neste trabalho, adaptado de [93]. A fase A é composta por água, acetonitrilo e ácido fórmico num rácio de 94:5:1, a pH 2.20; a fase B é composta por acetonitrilo e água num rácio de 60:40, com 2 mM de KCl, a pH 2.20.

Tempo/min	A(%)	B(%)
0	85	15
9,3	25	75
9,8	50	50
10,5	75	25
11,5	85	15
14	85	15

O fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min e o volume de injeção foi 20 µL. Existem dois regimes de eluição – de gradiente ou isocrático. O mais comum, em especial quando se querem separar compostos do vinho, é o de gradiente. [94] As fases móveis são normalmente de polaridades intermédias, sendo constituídas por misturas de quantidades variáveis de água, acetonitrilo e metanol, o que permite separar desejavelmente os compostos.

A aquisição de resultados em *DAD* foi realizada em modo de varrimento total, num intervalo de 300 a 650 nm, utilizando um canal de deteção a 520 nm, selecionado por corresponder a comprimentos de onda de absorção de flavonóides, nos quais ambos os

padrões se enquadram. Foram igualmente monitorizados outros comprimentos de onda de relevo.

Para as retas de calibração da M3G e Malvidina, os padrões foram preparados em água ultrapura com diferentes concentrações, variando entre 1 e 250 ppm para a M3G e entre 1 e 90,9 ppm para a Malvidina (ver curvas de calibração em anexo). As concentrações dos compostos foram adquiridas, assim, pela relação da área dos picos com a respetiva curva de calibração.

Testes *in vitro*

Cultura celular e testes de absorção de compostos – os testes de absorção foram realizados com base em trabalho publicado [95], com algumas adaptações. As células Caco-2 foram descongeladas à passagem 17, tendo sido mantidas em meio previamente descrito. O meio das células foi trocado de dois em dois dias, tendo sido divididas quando observadas confluências de 70-80%. Cerca de 20 dias após descongelamento (passagem número 25), aproximadamente 20.000 células foram dispensadas em 14 *inserts* pré-humedecidos com 50 µL de HBSS sem HEPES (sem vermelho de fenol e sem bicarbonato de sódio), colocando 200 µL da solução contendo as células Caco-2 na fase apical e 600 µL de HBSS na fase basolateral.

Ao fim de 12 horas, as células não aderentes foram removidas por aspiração moderada na fase apical. O meio na fase apical não foi aspirado nos primeiros nove dias, porém, o meio da fase basolateral foi mudado de dois em dois dias. Ao fim de 20 dias após plaqueamento realizaram-se os testes de absorção. Para isto, começou por se remover o meio da fase apical. Seguidamente, procederam-se a ensaios de verificação da integridade das monocamadas por utilização do método do Amarelo de Lúcifer, incubando 200 µL de HBSS nos poços contendo este composto a uma concentração de 100 µM na fase apical, aguardando 120 min e fazendo as leituras num leitor de placas a 530 nm, com curva de calibração previamente realizada de 1 µM a 50 µM (ver em anexo) [96].

Tendo surpreendentemente verificado a não integridade de nenhum das 14 monocamadas (ver Discussão e Resultados), foram apenas aproveitados as 6 monocamadas que evidenciaram menor porosidade relativa ao amarelo de lucifer. Na

medida em que se pretendia testar exatamente os vinhos com e sem tratamento enzimático, optou-se por colocar 200 µL sem diluição dos vinhos tratados com 5000 ppm de Lafazym Arom passadas cerca de 72h de incubação, controlando com vinho normal e com soluções de atenolol e propranolol em HBSS de 100 ppm [96].

Ao fim de 120 min de incubação com agitação manual, a 37ºC, o potencial antioxidante da fase apical e da fase basolateral foi testada com recurso ao método do *DPPH*. A absorção dos controlos foi monitorizada a 273 nm (atenolol) e a 290 nm (propranolol) (ver em anexo).

Tratamentos estatísticos – os tratamentos estatísticos foram feitos recorrendo à versão 6.0 do *software* GraphPad Prism (GraphPad Inc., EUA) e ao software Excel 2013 (Microsoft, EUA). As barras de erro apresentadas representam o desvio padrão entre resultados afetos a cada *n* ou a cada *conjunto de n's.* Foi utilizado o teste de Dunnett face ao controlo para verificar a significância das variações entre resultados.

Capítulo 3 - Discussão e Resultados

3.1 – Componente antioxidante: testes da TPC, DPPH, FRAP e ABTS⁺

Este trabalho iniciou-se pela escolha e compra de 29 vinhos comerciais, dentro dos quais 7 vinhos produzidos pela Quinta da Aveleda sem intuito comercial (ver Tabela 1, Anexos). A escolha dos vinhos pretendia assim, simultaneamente, poder fazer um escrutínio das propriedades antioxidantes dos vinhos produzidos por esta empresa e também poder estudar castas e vinhos de outras regiões. Desta forma, abrangeu-se todo o património vinícola relevante presente em Portugal, com análise de vinhos brancos, verdes, roses, vinhos fortificados, destilados e vinhos tintos (Figura 13).

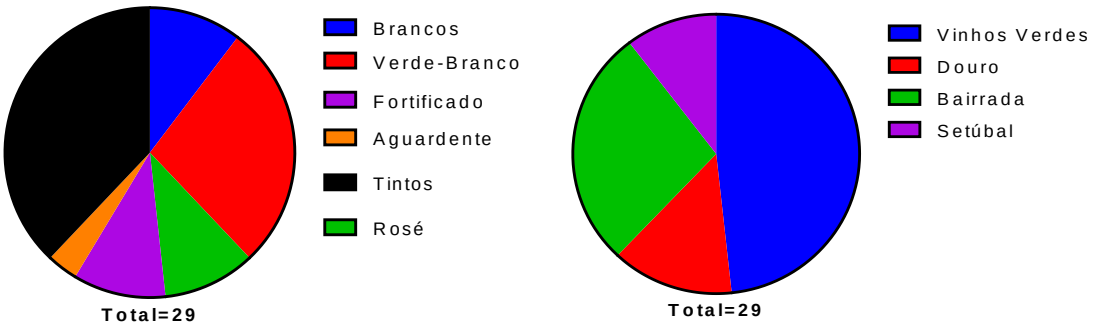


Figura 13 – Designação dos vinhos analisados, designados, em a), pela sua tipologia (branco, verde-branco, fortificado, aguardente, tinto ou rosé), e em b), pela sua região de origem (Região dos Vinhos Verdes, Região do Douro, Região da Bairrada e Região de Setúbal).

A amostragem centrou-se em vinhos jovens (2014 para anos mais recentes), sobretudo da região dos Vinhos Verdes e Bairrada, por serem os locais onde a empresa Aveleda S.A possui os seus terrenos. Nos vinhos brancos, verdes e roses, com semelhantes métodos de vinificação [73], não existe uma casta predominante que permita uma possível

correlação com uma eventual resposta antioxidante diferenciada, verificando-se elevada variabilidade. Nos vinhos tintos, verifica-se uma situação semelhante, se bem que, nestes, a escolha foi seletivamente feita de modo a se poderem analisar preferencialmente vinhos monocasta e efetuar correlações mais diretas (das 11 amostras tintas, 8 são monocasta, ver Tabela 1 Anexos).

Teste dos compostos fenólicos totais - O trabalho iniciou-se pela quantificação dos compostos fenólicos em solução, através do reagente de Folin-Ciocalteu. Esta é uma metodologia normalmente empregue em análises alimentares, bem como de despiste primário de atividade antioxidante, na medida em que esta concentração de fenólicos totais apresenta normalmente elevadas correlações com os testes de atividade antioxidante [66]. O reagente de FC consiste numa mistura de fosfomolibdato e fosfotungstato, que, em meio básico, reage com compostos fenólicos e polifenólicos. Porém, já foi demonstrado que este composto reage com a generalidade dos compostos redutores, como vitaminas ou compostos azotados [97]. No entanto, continua a ser considerada uma forma rápida, barata e acessível de determinar o conteúdo fenólico total de uma amostra e de estabelecer imediatamente uma correlação com o potencial redutor da mesma. Na Figura 14 apresenta-se o resultado desta análise para os 29 vinhos, medido em mg/L de equivalentes de ácido gálico (GAE). A azul, reportam-se os resultados para os vinhos verdes, brancos, roses, aguardente e moscatel (conjunto V1), lendo-se no eixo da esquerda; a vermelho, os resultados para os vinhos tintos e vinhos do Porto (conjunto V2), lendo-se no eixo da direita.

Os resultados obtidos demonstram claramente que as amostras do conjunto V1 apresentam um conteúdo fenólico claramente mais reduzido que o conjunto V2. O valor mais baixo reportado foi o da Aguardente Velha, com aproximadamente 150mg/L de GAE, ao passo que o valor mais alto reportado foi para o Vinhão da Bairrada, com cerca de 5 g/L de GAE.

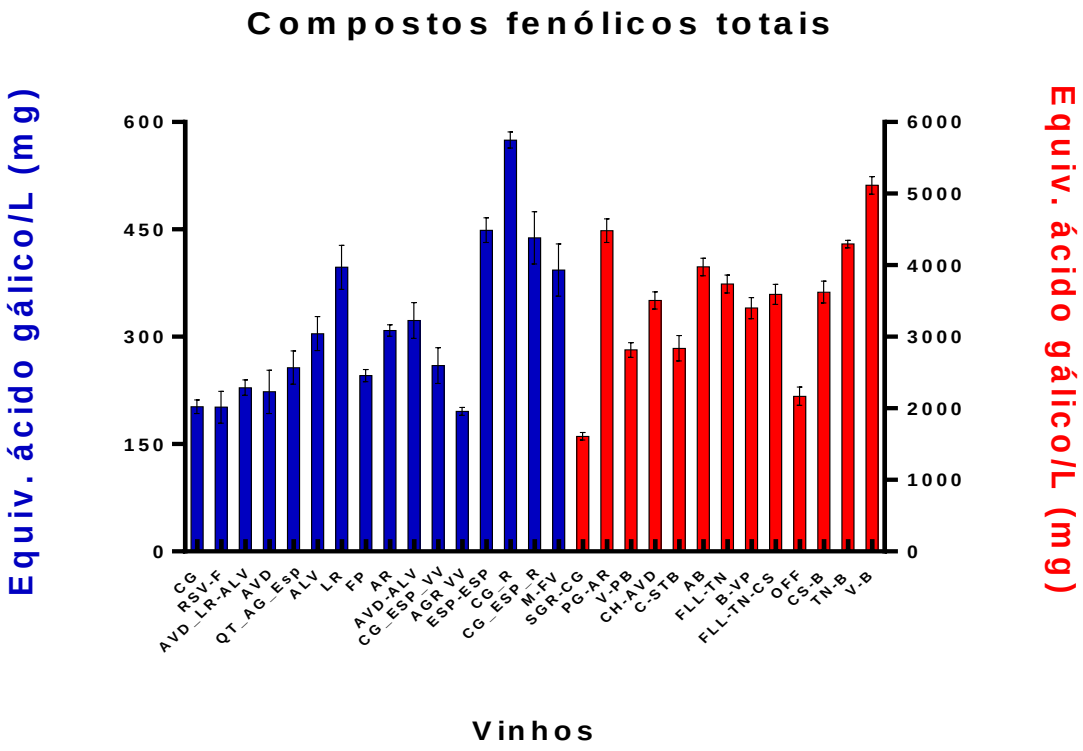


Figura 14 – Resultados da análise da quantificação dos compostos fenólicos totais nas 29 amostras selecionadas, medidos em equivalentes de ácido gálico (mg/L). A azul reportam-se os valores que remetem para o eixo das abcissas da esquerda (conjunto V1), enquanto a vermelho se reportam os valores que remetem para o eixo das abcissas da direita (conjunto V2). O conteúdo fenólico de V1 é muito menor, em média, que a de V2. Em V1, destacam-se os vinhos rosé; em V2, destacam-se as amostras PG-AR, TN-B e V-B.

Estes resultados são expectáveis e enquadram-se claramente com o referido na literatura. É sabido que o vinho tinto possui muito maior componente fenólica e polifenólica que o vinho branco [98][99], o que se pode relacionar diretamente com o método de vinificação – no vinho branco, as uvas são pressionadas e é este processo que transporta eventuais compostos fenólicos e polifenólicos para o mosto; no vinho tinto, para além de se pressionar as uvas para obtenção de sumo, ocorre contacto (maceração) mais ou menos prolongado do mosto com as películas, com as sementes e com o engaço da uva, o que potencia fortemente a extração de compostos polifenólicos. Nesta medida, sabendo que os compostos não-flavonóides se encontram principalmente na polpa, e que estes contabilizam cerca de 10% do conteúdo fenólico do vinho tinto e a maioria do conteúdo fenólico do vinho branco [100], pode-se prever um conteúdo fenólico cerca de 10 vezes maior no conjunto V2 em relação ao conjunto V1, que é o que genericamente se observa. Dentro do conjunto V1, observa-se uma clara

distinção entre os vinhos roses e os restantes vinhos brancos e verdes – os vinhos roses podem ser vinificados a partir do sumo de uvas brancas, com algum contacto com películas tintas, ou então a partir do sumo ligeiramente rosado de uvas tintas: este método de vinificação trará, naturalmente, mais compostos fenólicos ao vinho Rose comparativamente ao vinho branco, resultando numa resposta ligeiramente mais elevada pelo teste de FC. A amostra de moscatel também apresentou uma resposta bastante interessante, quase ao nível dos vinhos roses analisados. Dentro do conjunto de vinhos brancos/verdes, a casta Loureiro parece ter alguma evidência. Porém, seriam necessários mais vinhos monocasta Loureiro para se poder perceber se esta resposta seria efetivamente corroborada.

Relativamente ao conjunto V2, observa-se que a sangria apresenta o valor mais baixo por entre as 11 amostras analisadas, ao passo que o Vinhão da Bairrada (V-B) denota o valor mais elevado, quase com 5 g/L de GAE, surgindo, de seguida, o vinho Aragonez de Setúbal (PG-AR). Outros trabalhos relatam valores para o TPC com intervalos entre os 1.2 g/L e os 5.9 g/L [43]. Genericamente, registam-se respostas bastante positivas respetivamente ao conteúdo fenólico das amostras analisadas do conjunto V2. Será interessante promover uma análise entre o conteúdo fenólico do vinho V-B e PG-AR. As uvas da casta Vinhão, uma conhecida casta tintureira, reúnem no seu interior uma polpa profundamente rosada, aspeto sobejamente diferente da esmagadora maioria das polpas de uvas tintas, normalmente não-coloradas. Naturalmente, este aspeto remete para o maior conteúdo fenólico da polpa destas uvas, o que, em condições normais de vinificação de um vinho tinto, resultará num vinho com maior TPC comparativamente a uma polpa não corada. Atribui-se a este aspeto a resposta observada para V-B. Porém, tanto o vinho V-B, como os vinhos CS-B e TN-B, são vinhos não comerciais, não tendo sido filtrados nem lhes sido aplicados agentes de clarificação, como a gelatina ou a metilcelulose, uma prática perfeitamente normal em indústria. É sabido que estes aspetos afetam o TPC dos vinhos, diminuindo-o [74]. Comparativamente, a casta Aragonez não é tintureira, porém, o seu valor de TPC é muito elevado. Este vinho monocasta Aragonez, que em outros trabalhos apresenta normalmente um elevado valor para o TPC [43][101], tem a particularidade de ter sido desenvolvido num *terroir* solarengo e de excelentes condições edafoclimáticas como é o da Península de Setúbal,

para além de que foi envelhecido em pipa durante 12 meses. Ambos estes aspetos promovem a formação e a solubilização de compostos fenólicos para o resultado final na solução alcoólica [53][72], o que pode estar a promover esta elevada resposta por parte deste vinho. Desta forma, o elevado conteúdo fenólico destas duas amostras pode estar a ser influenciado por aspetos como a casta, as práticas de indústria, o *terroir* e também o envelhecimento em barril.

Uma nota de igual destaque para a casta Alicante Bouschet, que, sendo tintureira, apresenta um elevado valor de TPC. Adicionalmente, a casta Touriga Nacional, não-tintureira mas reportadamente uma casta que dá origem a sumos com elevada concentração de pigmentos [66], surge em amostra com a terceira (TN-B) e quinta (FLL-TN) resposta mais elevada neste teste.

Teste do *DPPH* – seguidamente, os vinhos foram testados relativamente à sua capacidade de neutralizarem o radical *DPPH* (Figura 15).

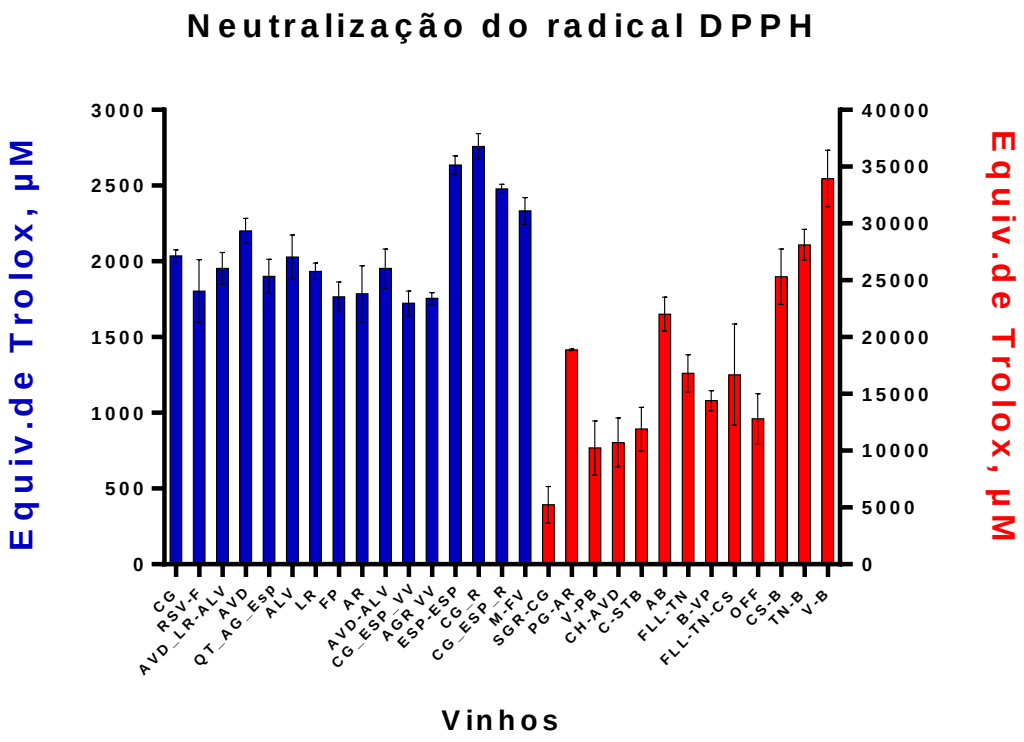


Figura 15 – Resultados da análise da neutralização do radical *DPPH* nas 29 amostras selecionadas, medidos em equivalentes de Trolox (µM). A azul reportam-se os valores que remetem para o eixo das abcissas da esquerda (conjunto V1), enquanto a vermelho se reportam os valores que remetem para o eixo das abcissas da direita (conjunto V2). A neutralização deste radical por parte de V1 é muito menor, em média, que a de V2. Em V1, destacam-se os vinhos rosé; em V2, destacam-se as amostras CS-B, TN-B e V-B.

Os resultados obtidos seguem a mesma tendência que a evidenciada na Figura 14 – as amostras do conjunto V1 apresentam uma muito mais baixa capacidade de neutralização do radical *DPPH* do que as amostras do conjunto V2. Semelhantemente, os resultados revêem-se com aqueles obtidos por outros investigadores [43], tanto para os vinhos brancos (valores entre 0,4 mM e 2,2 mM de equivalentes de Trolox), como para os vinhos tintos (entre 5 mM e 25,5 mM de equivalentes de Trolox), limite ligeiramente ultrapassado pela amostra V-B e TN-B.

O teste do *DPPH* é percecionado como um dos testes de antioxidação mas rápidos e fiáveis para testar a capacidade antioxidante *in vitro* de amostras contendo polifenóis, sendo de facto um dos mais amplamente usados [60] Por ser um teste que relega na abstração de hidrogénio a respetiva redução do radical, e sabendo que é este o método preferencial de redução/antioxidação por parte de flavonóides, este poderá ser um teste fortemente representativo da real capacidade antioxidante *in vitro* de amostras vínicas.

Dentro do conjunto V1, não se observam diferenças relevantes entre os vinhos brancos/verdes analisados, sendo evidente a resposta ligeiramente mais elevada por parte dos vinhos roses. No conjunto V2, destaque, de novo, para as amostras V-B, TN-B, CS-B, AB e PG-AR. Dentro destas cinco, como referido, a casta Alicante Bouschet e a casta Vinhão são tintureiras, ao passo que as três primeiras são vinhos não comerciais e não-filtrados. A malvidina-3-glucósido é, indubitavelmente, a molécula singular que mais contribui para a cor dos vinhos tintos, atribuindo-se cerca de 50% da cor destes vinhos às propriedades cromogénicas desta molécula. Radovanovic *et.al* obtiveram elevados valores de correlação R^2, analisando vinhos Cabernet Sauvignon da região dos Balcãs, entre o total de antocianinas 3-glucósido num vinho e a sua capacidade de *scavenging* do radical $DPPH^{\cdot}$ (0,9619), tendo também obtido correlações muito elevadas entre este *scavenging* e a soma das antocianinas com substituição 3-acetil-3-glucósido (R^2=0,9728) e a substituição *p*-coumaril-3-glucósido (R^2=0,8873) [68]. Em trabalho não publicado nesta tese, foram medidas as composições de cor de alguns vinhos selecionados, definidas como a razão entre as absorvâncias a cada comprimento de onda – 420 nm, 520 nm e 620 nm – a dividir pela soma destes três valores de absorvância [102]. O valor de 420 nm representa a tonalidade amarela dos vinhos, trazida pelos

flavonóis, predominante no vinho branco e rose, ao passo que o valor de absorção a 520 nm representa a cor vermelha dos vinhos, naturalmente com maior influência por parte das antocianinas. Foi possível observar que o vinho V-B e TN-B apresentavam ambos as maiores composições em cor vermelha de todos os vinhos analisados, enquanto vinhos brancos e rosés apresentavam predominância a 420 nm; sendo os dois primeiros os vinhos com maior resposta perante a neutralização do radical *DPPH*, este aspeto cromogénico poderá encontrar relação com o proposto por Radovanovic *et. al* [68]. A casta Cabernet Sauvignon é também, reportadamente, uma casta que dá origem a vinhos com elevada capacidade antioxidante [2].

Existe um aspeto interessante de se analisar. Pode-se admitir que a amostra V-B e V-PB possuem uma conceção semelhante – ambos monocasta Vinhão e da Região Norte do País, com diferença de um ano na colheita. Porém, a diferença entre a resposta face ao radical *DPPH* é notória, sendo que o V-PB apresenta uma resposta cerca de três vezes menor que o V-B. Este aspeto coloca perguntas direcionadas ao impacto das práticas enológicas, ou até à influência do microclima/solo. Foi provado por uma equipa de investigadores checos que, para o mesmo tipo de vinho, com semelhantes uvas maturadas na mesma sub-região, que a diferença em conteúdo de *trans*-resveratrol podia ascender até nove vezes mais em determinadas colheitas [94]. Em 2011 reportou-se que, para dois vinhos diferentes, feitos da mesma casta (Syrah), na mesma região, por dois produtores diferentes, se obteve uma diferença face à resposta ao *DPPH* de aproximadamente o triplo [43]. De novo, é totalmente legítimo afirmar que este decréscimo na resposta antioxidante poderia ser devido à filtração e à clarificação por agentes externos (V-PB é uma amostra filtrada e clarificada). Porém, admitindo uma genérica semelhança no conteúdo molecular entre as duas amostras, e já tendo presente que a estrutura dos flavonóides e os respetivos substituintes nos anéis A, B e C influenciam determinantemente a capacidade de *scavenging* de radicais livres [64], fatores enológicos pré-colheita, como a água, a exposição solar, a exposição a organismos patogénicos, os tratamentos químicos, entre outros [69], bem como fatores pós-colheita, como a oxidação do mosto [103], não só podem promover a formação de compostos com menor atividade antioxidante (exemplo – anéis aromáticos com diferentes substituições), como também oxidar os compostos presentes em solução. Tal

aspeto resultaria em duas respostas totalmente diferentes, apesar das condições originais serem semelhantes.

Teste do *FRAP* – após o teste do *DPPH*, procedeu-se ao teste do *FRAP* com as amostras selecionadas (Figura 16).

Os resultados obtidos seguem a mesma tendência que a evidenciada na Figura 14 e 15 – as amostras do conjunto V1 apresentam uma muito mais baixa capacidade de redução do complexo Fe(III)-*TPTZ* do que as amostras do conjunto V2. Semelhantemente, os resultados revêem-se naqueles obtidos por outros investigadores [43], não precisamente em vinhos brancos (valores médios de 10 mM de equivalentes de $FeSO_4$, contrastando com os obtidos de cerca de 4 mM) e com maior concordância nos tintos (médias de 58 a 70 mM de equivalentes de $FeSO_4$).

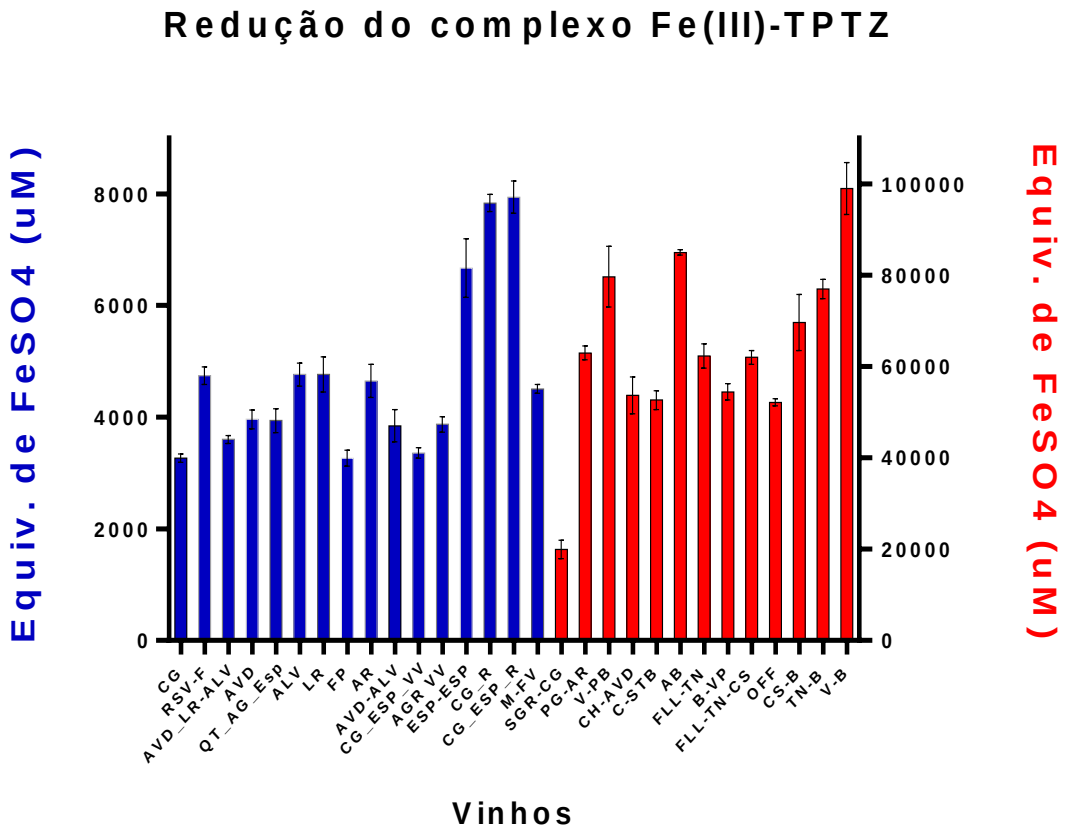


Figura 16 – Resultados da análise da redução do complexo Fe(III)-*TPTZ* nas 29 amostras selecionadas, medidos em equivalentes de $FeSO_4$ (µM). A azul reportam-se os valores que remetem para o eixo das abcissas da esquerda (conjunto V1), enquanto a vermelho se reportam os valores que remetem para o eixo das abcissas da direita (conjunto V2). A neutralização deste radical por parte de V1 é muito menor, em média, que a de V2. Em V1, destacam-se os vinhos rosé; em V2, destacam-se as amostras V-PB, AB e V-B.

Dentro do conjunto V1, reportam-se o mesmo padrão que na Figura 15 – pouca variabilidade entre amostras brancas/verdes, algum incremento na resposta em vinhos roses e moscatel. No conjunto V2, novo destaque para a amostra V-B, com resposta antioxidante seguida da amostra AB (Alicante Bouschet), V-PB (casta Vinhão) e TN-B. Desta forma, observa-se uma tendência genericamente semelhante à resposta ao *DPPH*, porém, com a novidade do aparecimento da amostra V-PB.

Aqui, torna-se interessante perceber o que poderá motivar uma resposta substancialmente diferente utilizando um método como o do *DPPH* ou do *FRAP*, dando origem a uma sequência de respostas modificada.

Os investigadores portugueses Oliveira *et.al* (2011) publicaram um artigo de revisão muito conciso e acutilante no qual abrangiam todos os processos de oxidação ao qual o vinho está sujeito [104]. No segmento da oxidação química inerente ao vinho, os autores indicam a já conhecida mediação por parte do ferro e do cobre dos processos de oxidação, cuja adição final de eletrão a um composto oxigenado é promovida pela reação em cadeia do Fe(II) e Cu(I), formando-se quinonas.

O dióxido de enxofre e o ácido ascórbico são efetivamente capazes de reduzir esta quinona de volta à forma fenólica, de forma que a sua presença pode ser de central importância para este aspeto. Na matriz do ensaio *FRAP* o pH é de aproximadamente 3.6, o que promove o aparecimento de SO_2 livre no vinho. Este SO_2 livre pode participar na redução das quinonas de volta à sua forma fenólica, pelo que estes compostos estariam de novo disponíveis para reduzir o complexo de Fe(III)-*TPTZ*.

Admitindo que este vinho se encontraria num estado de alguma oxidação anteriormente, este aspeto seria revertido considerando esta hipótese, o que pode explicar a observada resposta. Porém, a presença de iões Fe(III) no meio *FRAP* é o que poderá realmente ajudar a catalisar a resposta oxidativa dos compostos polifenólicos neste vinho, como indicado em [105], o que também pode ser particularmente visível no teste *FRAP* por eventual oxidação e nova redução (segundo esta possibilidade de regeneração) de uma molécula/conjunto de moléculas com forte propensão a evidenciar uma forte resposta antioxidante através deste teste. Os investigadores relatam que, num vinho modelo, a ausência de iões metálicos promove a não-oxidação

do anião bissulfito, pelo que a exposição a estes iões metálicos no reagente *FRAP* poderia ser o *trigger* para este processo de redução catecol → quinonas → HSO_3- → catecol → Fe(III)-*TPTZ* → Fe(II)-*TPTZ*. Na medida em que a amostra V-B e AB evidenciam elevada resposta antioxidante por este mecanismo, sendo tintureiras, à semelhança da amostra em análise, coloca-se a possibilidade das antocianinas poderem ter uma maior facilidade na doação do seu eletrão na presença de Fe(III) – esta relação entre conteúdo em antocianinas e resposta *FRAP* incrementada foi estudada e confirmada por Azima *et.al* [106].

Teste do *ABTS*$^+$ - após o teste de *FRAP*, procedeu-se ao teste do *ABTS*$^+$ com as amostras selecionadas. (Figura 17).

Os resultados obtidos seguem a mesma tendência que aquela evidenciada nas Figuras relativas ao ensaio do *DPPH* e *FRAP* – as amostras do conjunto V1 apresentam uma muito mais baixa capacidade de redução do radical *ABTS*$^+$ do que as amostras do conjunto V2. Os resultados revêem-se naqueles obtidos por outros investigadores [72] [70], tanto em vinhos brancos (valores médios de cerca de 4 mM de equivalentes de Trolox) como em vinhos tintos (valores observados sobretudo compreendidos entre os 25 mM e os 35 mM de equivalentes de Trolox).

Dentro do conjunto V1, reportam-se o mesmo padrão que aquele verificado no teste do *DPPH* e *FRAP* – pouca variabilidade entre amostras brancas/verdes, algum incremento na resposta em dois vinhos roses, com menor resposta da amostra Rose Espadeiro (ESP-ESP) e da amostra de vinho fortificado Moscatel (M-FV). No conjunto V2, observa-se de novo uma diferença fortemente mensurável entre as amostras V-B e TN-B com as restantes, com resposta antioxidante seguida da amostra Aragonez de Setúbal (PG-AR), porém, com uma resposta aproximadamente 50% menor. Sendo a tendência semelhante entre os restantes vinhos, importa ressalvar e analisar de novo as condições em que os dois vinhos com maior resposta foram produzidos.

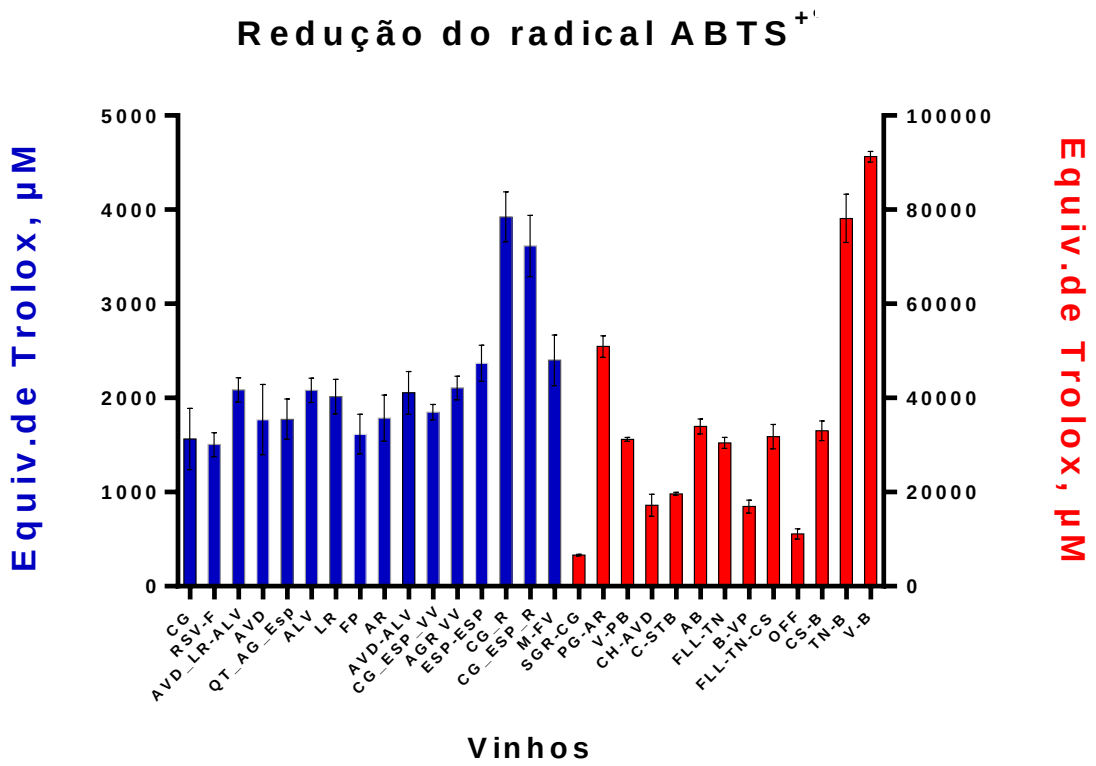


Figura 17 – Resultados da análise da redução do radical ABTS⁺ nas 29 amostras selecionadas, medidos em equivalentes de Trolox (µM). A azul reportam-se os valores que remetem para o eixo das abcissas da esquerda (conjunto V1), enquanto a vermelho se reportam os valores que remetem para o eixo das abcissas da direita (conjunto V2). A redução deste radical por parte de V1 é muito menor, em média, que a de V2. Em V1, destacam-se dois vinhos rosé; em V2, destacam-se, de forma fortemente mensurável, as amostras TN-B e V-B.

Muselík *et.al* (2007) [44] mediram isoladamente a atividade antioxidante *in vitro* de vários conjuntos de moléculas presentes no vinho, dentro das quais as proantocianidinas, as procianidinas, as antocianinas e as piranoantocianinas, reportando, interessantemente, dois aspetos: uma considerável maior diferença entre conjuntos moleculares usando o teste do *ABTS⁺* (mais de 50% de diferença entre analitos, diferenças muito menores entre amostras utilizando o teste de *FRAP*) e também que a resposta antioxidante dos analitos aumentava proporcionalmente ao grau de polimerização dos flavanóis (catequina e epicatequina). Este aspeto poderá ser determinante para a interpretação dos resultados expressos na Figura 17.

Os flavonóis e as procianidinas são responsáveis por cerca de 60% da resposta antioxidante do vinho tinto [61]. Sabendo que as amostras V-B e TN-B não foram

filtradas nem clarificadas, este aspeto poderá promover a presença de mais flavonóis e procianidinas de maior massa molecular nas referidas amostras. Tendo em mente o observado por Muselík *et. al*, a resposta observada para V-B e TN-B poderá ser simultaneamente resultado da maior capacidade antioxidante destas moléculas como também da maior sensibilidade deste teste a estes compostos. Neste sentido, a amostra CS-B, não filtrada nem clarificada, poderia igualmente apresentar uma resposta semelhante às amostras V-B e TN-B, o que poderá não se verificar por eventual menor conteúdo natural em flavonóis e procianidinas diméricas, triméricas ou até de maior massa molecular, componentes que parecem influenciar sobremaneira a resposta obtida por este teste.

Correlação entre testes de TPC, *DPPH*, *FRAP* e *ABTS*$^+$ – será interessante poder perceber se existe algum tipo de correlação entre os quatro testes realizados, sobretudo visualizar a correlação entre o TPC e os testes de antioxidação, tanto para o conjunto V1 como para o conjunto V2, o que poderia estabelecer imediatamente uma relação de causalidade entre o TPC e qualquer expectável resposta antioxidante. Para este efeito, os resultados foram correlacionados através do teste da regressão linear, evidenciando uma eventual maior ou menor correlação pelo valor de R^2 (Tabela 3).

A correlação do R^2 foi considerada em detrimento do coeficiente de Pearson por ser um teste mais expedito e que permite uma rápida visualização gráfica dos resultados. O coeficiente de Pearson é a raiz quadrada do valor de R^2. Nesta relação, apesar de haver algum debate nesta questão, considera-se que haverá algum tipo de correlação linear significativa se $R^2 > 0.9$. [107]

Neste sentido, pode-se concluir que não existe qualquer correlação linear significativa entre qualquer um dos testes efetuados, e que, em especial, o teste do TPC não pode ser considerado um verdadeiro indicador de eventual capacidade antioxidante. Estes resultados vão contra os resultados obtidos por outros investigadores [73][71][92], os quais verificam elevados valores de correlação R^2 entre os testes de TPC, *DPPH* e *FRAP*; porém, existem também trabalhos a não evidenciar correlação entre os referidos testes analíticos [61][43]. Neste trabalho, este aspeto de não-correlação, tendo em conta que a verificação de correlação é mais comum, pode ser justificado pelo facto das amostras serem bastante diferentes dentro de cada grupo: V1 com amostras de vinhos brancos,

Tabela 3 – Valores de R^2 entre os resultados da TPC, ensaio do *DPPH*, FRAP e ABTS, em ambos os conjuntos. É considerado que existirá correlação positiva quando $R^2 > 0.9$. Desta forma, os valores apresentados permitem concluir que não se verificam correlações significativas entre os testes efetuados, tanto em V1 como em V2.

Conj. V1	***TPC***	***DPPH***	***FRAP***	***ABTS***
TPC	x	0,6605	0,7181	0,7031
DPPH	-	x	0,67	0,6271
FRAP	-		x	0,7609
ABTS	-	-	-	x

Conj. V2	***TPC***	***DPPH***	***FRAP***	***ABTS***
TPC	x	0,7176	0,612	0,6972
DPPH	-	x	0,6372	0,7755
FRAP	-		x	0,5892
ABTS	-	-	-	x

verdes, aguardentes, roses e vinhos fortificados; V2 com sangria, vinhos comerciais, filtrados e clarificados, em conjunto com vinhos não comerciais, não filtrados e não clarificados, claramente num estado mais original. Apesar de se verificarem estas diferenças intra-grupais, foi considerado que seria legítimo agrupar estas amostras da forma que tal foi efetuado. Adicionalmente, as correlações foram efetuadas para cada grupo V1 e V2, dado que as matrizes vínicas são totalmente diferentes – foi simulado qual seria o valor de R^2 considerando V1 e V2 em conjunto e é sempre mais elevado do que os valores obtidos, o que, naturalmente, é promovido pelo maior número de amostras e melhor *fitting* da correlação.

3.1.2 - Escolha das amostras para continuação dos testes em HPLC

Este trabalho dividia-se em três fases principais – estudo das características antioxidantes *in vitro* das amostras analisadas, análise e monitorização por *HPLC* de tratamento enzimático a desenvolver e, finalmente, teste *in vitro* da absorção dos compostos presentes nos vinhos padrão e enzimaticamente modificados em células intestinais representativas. Nesta fase, importava decidir qual(is) das amostras deveria(m) ser escolhida(s) para testar em *HPLC*, após fazer a caracterização dos sistemas em fase aquosa e em solução mimética de vinho. Dado que o critério principal era que as amostras escolhidas apresentassem elevado potencial antioxidante *in vitro* após teste, optou-se por escolher as duas amostras que mais respostas consistentes apresentaram nesse domínio – Vinhão da Bairrada (V-B) e Touriga Nacional da Bairrada (TN-B) – iniciando os trabalhos em *HPLC* com estes dois vinhos. Porém, como explicado no decorrer deste trabalho, vir-se-ia a verificar que estas amostras interferiam com a coluna de *HPLC*, provavelmente pela sua ausência de filtração e clarificação industrial, pelo que se optou por trabalhar com um vinho industrialmente padronizado e que revelasse menores interferências com a coluna de *HPLC*.

3.2 - Trabalhos em HPLC

Os trabalhos em *HPLC* iniciaram-se pela definição da metodologia de trabalho para uso nesta técnica. Na proposta de valor (ver na página 39) é descrito que se pretende utilizar uma metodologia enzimática que permita monitorizar a possibilidade de promover a absorção e consequente biodisponibilidade de alguns dos componentes antioxidantes presentes no vinho. Para tal, são endereçadas as antocianinas e qualquer componente glicosilado que possa, teoricamente, aumentar os seus níveis de absorção caso esta componente polar seja removida, com base nas evidências apresentadas na literatura [85]–[88], [108]. Desta forma, dado que a malvidina-3-glucósido (M3G) representa a antocianina de maior concentração no vinho tinto, optou-se por adquirir este padrão comercial, bem como a sua aglicona e produto de hidrólise, malvidina [68]. O seguimento deste processo, tanto no padrão comercial como nos vinhos, foi acompanhado por *HPLC*.

Protocolo *HPLC* - Em *HPLC*, é necessário primeiramente definir um protocolo de fases móveis e respetivas metodologias de eluição, de modo que, pelos diferentes rácios de fases móveis em cada momento, seja possível separar os compostos-alvo em tempo útil. O primeiro passo passou por analisar literatura relacionada com o tema e cuja metodologia de trabalho proposta fosse exequível. Desta forma, analisaram-se os trabalhos de Gómez-Alonso *et.al* (2007) [109] e Kozminski *et.al* (2006) [93]. O primeiro trabalho apresenta uma metodologia de grande capacidade de separação de compostos presentes no vinho, porém, os tempos de retenção foram considerados bastante elevados, aliado ao facto de que as fases móveis usadas contêm forças iónicas elevadas, um aspeto a evitar por eventualidade de precipitação dos sais na coluna. O segundo trabalho, realizado na Universidade de Coimbra, apresenta uma metodologia mais simples de desenvolver, com as vantagens de que apenas usa duas fases móveis, os tempos de retenção são menos longos e apenas uma das fases móveis apresenta a adição de 2 mM de KCl. Na Tabela 4 é apresentada a metodologia de eluição usada neste trabalho.

Tabela 4 – Programa de eluentes aplicado no trabalho de Kozminski *et.al* [93]. A fase A é composta por água, acetonitrilo e ácido fórmico num rácio de 94:5:1, a pH 2.20; a fase B é composta por acetonitrilo e água num rácio de 60:40, com 2mM de KCl, a pH 2.20. Cada injeção é monitorizada no espaço de 29 minutos.

Tempo/min	A(%)	B(%)
0	100	0
3	100	0
14	85	15
27	25	85
29	20	80

Como referido neste trabalho, ambas as fases móveis apresentam o pH de 2.20 porque a este pH será possível promover uma melhor separação das antocianinas. Desta forma, com o *DAD* fixado nos 520 nm, por ser o comprimento de onda de absorção máxima das antocianinas [109], replicaram-se as condições de trabalho deste artigo e iniciaram-se as experiências com uma solução aquosa de 100ppm de M3G, tendo obtido um pico bem definido a cerca de 28 minutos após a injeção. Neste momento, questionou-se a possibilidade de arranjar uma forma de diminuir o tempo de retenção deste composto, aspeto que foi posto em prática alterando o programa de eluições.

A malvidina-3-glucósido é um composto mais polar que a malvidina, na medida em que o grupo polar glucósido é responsável por este aspeto. Porém, a malvidina-3-glucósido é um composto também com uma importante componente apolar, por presença dos dois anéis aromáticos e do anel de pirano. Assim sendo, aplicando esta técnica, será possível verificar que a malvidina-3-glucósido será primeiramente eluída, teoricamente, do que a malvidina. Como é passível de comparação entre as Tabelas 2 (Materiais e Métodos) e 4, considerou-se que uma variação no rácio de polaridades na fase inicial da eluição poderia verificar uma diminuição mensurável no tempo de retenção da malvidina-3-glucósido, que, ao fim de tentativa e erro, se conseguiu, com uma percentagem de 85% de Fase A e 15% de Fase B, eluir ao fim de 8 minutos. O protocolo da Tabela 4 poderá focar em demasia a componente polar da M3G e esquecer a sua componente mais apolar, o que potencia a sua retenção. Deste modo, tendo conseguido separar a M3G, restava detetar a malvidina, mais apolar. Para este efeito, variou-se aproximadamente um minuto depois da deteção da M3G a polaridade do meio para

uma componente mais apolar, por maior presença de Fase B, com acetonitrilo, com 75%. Neste momento, retornou-se gradativamente à condição original, por novo aumento da percentagem de Fase A. Foi possível detetar a malvidina a 12 minutos após a injeção, após injeção de solução aquosa de 100 ppm. Este protocolo permitiu encurtar grandemente o tempo de retenção da malvidina-3-glucósido relativamente ao método de eluições original, obtendo uma separação eficaz dos picos dos dois compostos-alvo.

Caracterização dos padrões em solução aquosa - Posteriormente, realizou-se a curva de calibração da M3G e da MV em água ultrapura, quantificando através da deteção a 520 nm (ver em Anexo). A malvidina, e as agliconas das antocianinas, apresentam normalmente elevada instabilidade em solução [41], o que se pôde prontamente verificar neste trabalho – a malvidina evidenciou sinais de degradação quando em solução aquosa, mesmo estando congelada a -20ºC. Esta questão da instabilidade poderá ter-se refletido na impossibilidade de ter obtido mais pontos que se enquadrassem corretamente na calibração desta antocianidina.

Apresenta-se, na Figura 18, o cromatograma total da M3G e da MV em solução aquosa a uma concentração de 90 ppm (Figura 18a) e 18b)) e os respetivos perfis em matéria de absorção de luz visível (Figura 18c) e 18d)). É possível observar que a M3G absorve a um máximo de 520 nm com um tempo de retenção de aproximadamente 7.6 minutos, ao passo que a MV absorve a um máximo de cerca de 540 nm com um tempo de retenção de cerca de 12 minutos.

Neste sentido, importa discutir os espetros de absorção destes dois compostos, dado que esta ferramenta pode ser uma mais-valia de enorme relevo na identificação de compostos após injeção em *HPLC*. As antocianinas monoméricas apresentam um típico máximo de absorção entre os 480-580 nm [110], dependendo do grau e padrão de substituição. Porém, como referido anteriormente, a estrutura adotada por estas moléculas depende de forma muito mensurável do pH, o que se vai refletir no espetro de absorção (ver Figura 19).

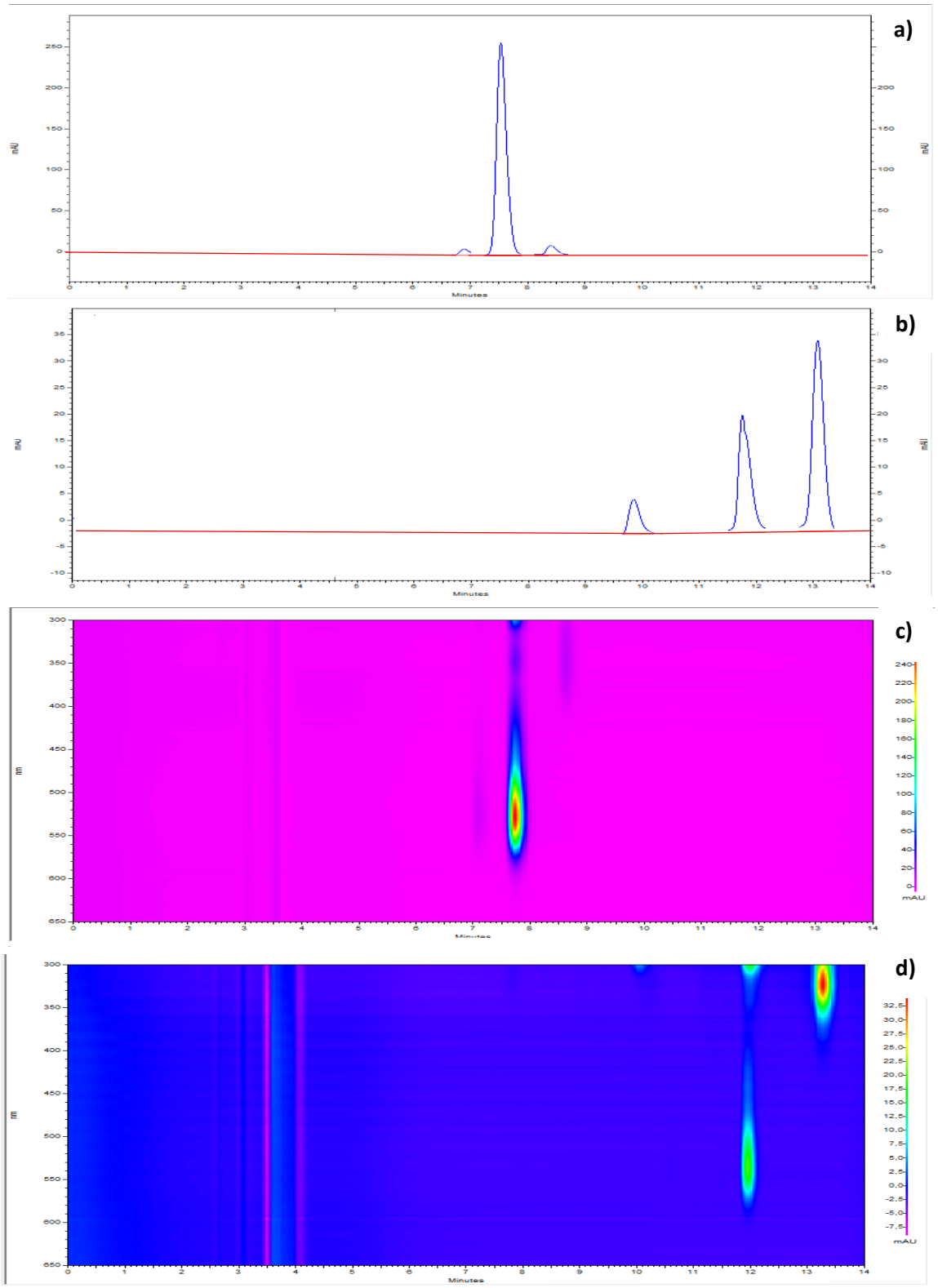


Figura 18 – Análise por HPLC de soluções em água ultrapura de 90 ppm de M3G e 90ppm de MV. Em a), é possível observar o cromatograma total da M3G, com um distinto pico a cerca de 7.6 min de tempo de retenção. Em b), constata-se a presença de 3 picos bem definidos, que remetem para a possibilidade da adoção de várias estruturas por parte da MV consoante o pH. Em c), analisa-se o espetro de absorção de a), que confirma a presença única de um pico a cerca de 520 nm e igualmente a deteção de algumas impurezas; em d), observa-se a presença de duas zonas de deteção principais – a malvidina na forma de catião flavílio apresenta assim um tempo de retenção de cerca de 12 minutos, dada a sua absorvância com um pico a cerca de 540 nm.

A pH ácido, ao pH do vinho, a forma de catião flavílio domina o equilíbrio, promovendo a absorção a comprimentos de onda na ordem dos 520 nm. Porém, não é a única forma presente no equilíbrio. A um pH apenas ligeiramente acídico, exemplo 4.5, a forma de chalcona e hemiacetálica das antocianinas irá ser promovida, o que se reflete no decréscimo quase por inteiro da absorção a 520 nm, com aparecimento de um máximo de absorção a cerca dos 320-330 nm característico destas formas [111][112]. Este novo máximo de absorção pode também verificar-se em soluções mais acídicas (pH 3.6), neste caso, algo comprovado por investigadores franceses ao estudar o perfil de absorção da malvidina-3,5-diglucósido [113]. Este aspeto é importante para a compreensão da Figura 18. A M3G, aquando da sua solubilização em água ultrapura, demonstrava imediatamente uma cor vermelha extremamente intensa, semelhante a

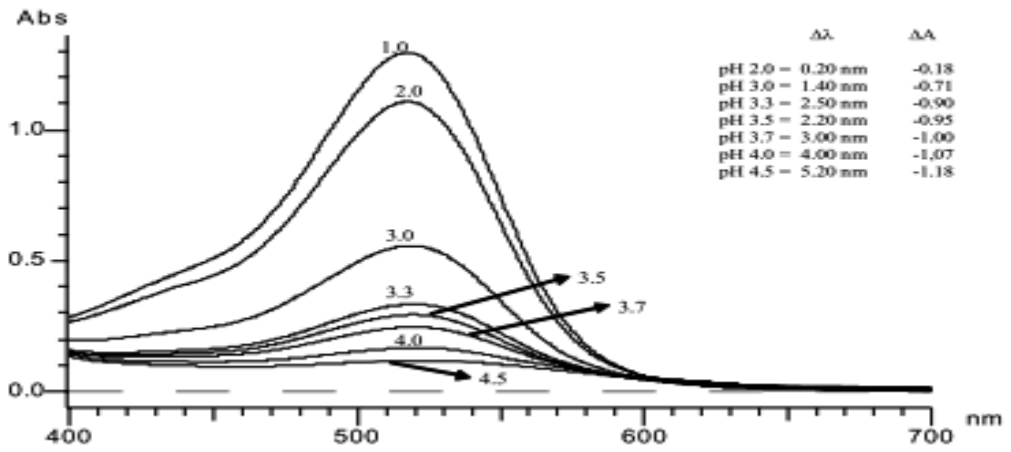


Figura 19 – Espetros representativos da absorção máxima de um extrato aquoso de uvas Cabernet Sauvignon. O pH foi propositadamente alterado de modo a poder estudar a variação no espetro do visível que tal traria. É possível observar um decréscimo na absorção a 520nm por aumento do pH. A pH 1, uma parte muito significativa das antocianinas encontrar-se-ão na forma de catião flavílio, enquanto que a pH 4.5 a grande maioria encontrar-se-á na forma hemiacetálica/chalcona. Retirado de [129]

um vinho tinto; a MV aparentava uma cor rosa diluída. Este aspeto pode ser indicativo do pH da solução e, consequentemente, da forma predominante em solução. Foram medidos os pH de cada solução, indicando a solução de 90 ppm de M3G um pH de 3.35, enquanto a medição da solução de MV indicou um pH de 4.32. Este aspeto permite prever que, na solução de M3G, predominará a forma de catião flavílio, enquanto na segunda ocorrerá preferencialmente a forma de chalcona/hemiacetal, o que é suportado por análise da Figura 18c) e d). Esta forma, não sendo catiónica, assume um

caráter mais apolar, o que promove o aumento do tempo de retenção por maior interação com a coluna. As diferenças no que respeita aos diferentes valores de absorção, apesar de semelhantes concentrações, podem ser explicadas por diferentes coeficientes de extinção molar, como devidamente explicado por Heredia *et. al* (1998) [114]. Rockenbach *et.al* consideram um valor de coeficiente de extinção molar para as antocianinas ao pH do vinho de 28.000 L/cm/mol [115].

Neutralização do radical *DPPH*: soluções de MV e M3G - Neste momento, após estudo inicial em *HPLC* das características das soluções de M3G e MV em solução aquosa, interessava saber se a glicosilação da malvidina teria algum efeito na resposta antioxidante perante o radical *DPPH*. Adicionalmente, considerou-se a possibilidade de a solubilização da M3G em solução mimética de vinho (SMV), isto é, numa solução de 13% EtOH e pH 3.5 (sem, neste caso, a força iónica providenciada pela adição de ácido tartárico [99]), influenciar a resposta antioxidante da M3G comparativamente à sua solubilização em solução aquosa. Para este efeito, realizou-se um estudo de *DPPH* comparativo e exploratório entre estas amostras (Figura 20). É possível constatar que a amostra com maior % de inibição do radical *DPPH* é a solução de MV em solução aquosa, seguida, sem diferenças constatáveis de realce, tanto pela média do n=3 da M3G em solução aquosa como pela M3G em SMV. De realçar que, por motivos de disponibilidade de reagentes, apenas se realizou n=1 com a MV e n=1 com a M3G em SMV. Os aspetos observados na Figura 20 são expectáveis, de acordo com a literatura. Rice-Evans *et.al*, em 1996 [64], demonstrou, pelo teste do $ABTS^{+}$, que a glicosilação dos flavonóides diminui consideravelmente a sua capacidade antioxidante.

Isto é explicado tendo em conta que a substituição do grupo 3-OH do anel B, como se encontra na aglicona malvidina, pelo glicosídeo, bem como a remoção das duplas ligações no anel de pirano, influenciam negativamente o fenómeno de ressonância responsável pela estabilização do radical semiquinona aquando da oxidação do flavonóide, pelo que, se o composto passível de se formar será mais instável, menos favorecimento da antioxidação se verificará. Por outro lado, não se verificou uma diferença considerável entre M3G em solução aquosa e M3G em SMV, sendo que a principal variante a considerar seria o etanol em solução, o que pode levar a conclusões

sobre o efeito não influenciador deste solvente. Porém, não devem ser retiradas conclusões firmes pelo facto de pouca credibilidade estatística (n=3 VS n=1).

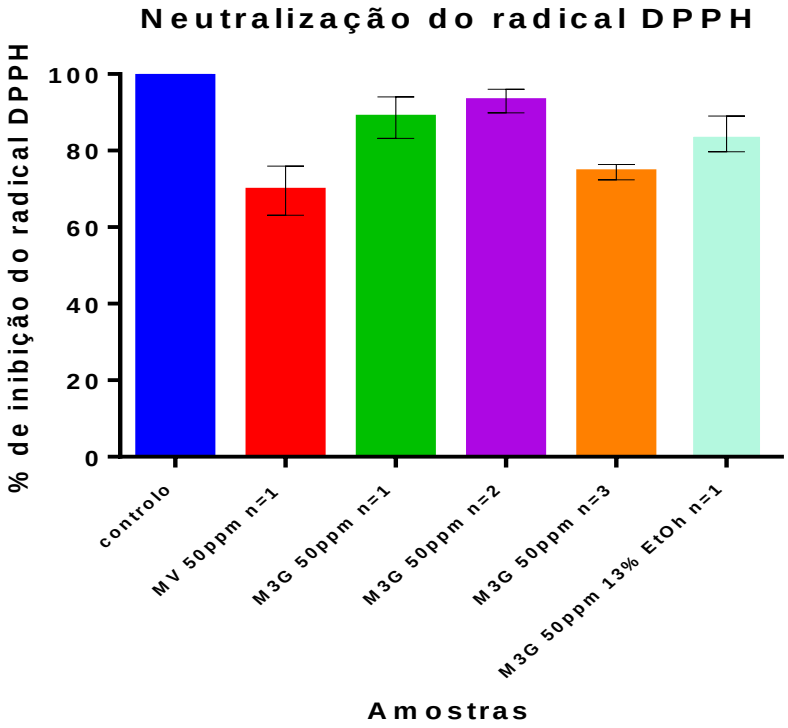


Figura 20 – Ensaio de neutralização do radical *DPPH*, medido em % de inibição. Foram comparadas as amostras de MV em solução aquosa (n=1), M3G em solução aquosa (n=3) e M3G em SMV (n=1). A amostra MV em solução aquosa demonstrou um maior potencial antioxidante face a este radical, o que se pode explicar por razões estruturais do anel B deste flavonóide. Não se verifica uma diferença significativa entre M3G em solução aquosa e SMV. As diferenças foram consideradas significativas pelo teste de Dunnett face ao controlo, exceto a amostra M3G n=2.

Início dos testes enzimáticos: M3G em SMV - Após se terem caracterizado os compostos-alvo em matéria de tempos de retenção, absorção de luz visível e capacidade de neutralização do radical *DPPH*, iniciaram-se os testes enzimáticos que permitiriam a continuação da edificação da proposta de valor. Como anteriormente referido, pretende-se remover os grupos glicosídicos dos antioxidantes glicosilados em solução vínica, de modo que, em tese, se possa promover a absorção incrementada destes compostos, agora agliconas, a nível intestinal. Adicionalmente, este processo deve ser economicamente sustentável e os compostos usados para este fim devem estar aprovados para uso vinícola.

Na medida em que se quer remover uma ligação glicosídica, procura-se naturalmente uma preparação enzimática com atividade de glicosidase. Dentro desta atividade

glicosidase, sabendo que pode distinguir-se entre α e β consoante a ligação glicosídica-alvo, optou-se por procurar uma preparação enzimática no mercado com atividade de β-glicosidase, dado que a ligação glicosídica entre as antocianidinas e o grupo glicosídico é do tipo β. Seria expectável que houvessem preparações enzimáticas enológicas com esta atividade dado que esta enzima é utilizada para a volatização de aromas em vinhos brancos e roses, precisamente pelo facto de que a ação desta enzima remove os grupos polares glicosídicos, e os aromas, agora mais apolares, apresentam maior tendência para volatizar.

Foi encontrada uma preparação enzimática com potencial de aplicação neste projeto, Lafazym Arom (Figura 21). Esta preparação enzimática, como previamente referido e como o nome poderá indicar, é utilizada para o realce aromático de vinhos brancos e roses. Porém, a aplicação desta preparação enzimática em vinhos com o objetivo de aumentar a absorção dos seus antioxidantes representa um passo fortemente inovador e disruptivo para esta indústria e, para nosso conhecimento, tal nunca tinha sido testado até então.

Figura 21 – Embalagem contendo a preparação enzimática Lafazym Arom, produzida pela Laffort e fornecida pela empresa EcoFiltra. Esta preparação enzimática apresenta uma forte atividade β-glicosidase, sendo aprovada para introdução em vinhos. Retirado de Wikipedia.

Assim sendo, iniciaram-se os testes com as três preparações enzimáticas recebidas, sendo que as outras duas preparações poderiam, ou não, apresentar atividade β-glicosidase em solução. Os testes foram conduzidos com soluções de 100 ppm de M3G em solução mimética de vinho, de modo que esta inoculação enzimática se pudesse aproximar consideravelmente das condições na amostra real, vinho tinto. O objetivo, já

tendo identificado os tempos de retenção da M3G e da MV numa fase anterior, passava por inocular uma determinada concentração de preparação enzimática em solução de modo que, após um intervalo de tempo definido, se pudesse observar um decréscimo do pico relativo à M3G e o aparecimento de um pico atribuído à MV. Os testes foram conduzidos com 50 ppm de preparação enzimática, e são apresentados os resultados ao fim de 3 h. Apenas se indicam os resultados da aplicação de Lafazym Arom, dado que as outras duas preparações enzimáticas não tiveram qualquer efeito (Figura 22) – não tendo as restantes enzimas, em princípio, atividade mensurável face ao fim pretendido, decidiu-se testar as mesmas por possibilidade de atividades enzimáticas secundárias β-glicosidase. Chama-se a atenção para a elevada variabilidade verificada no tempo de retenção da M3G nesta imagem comparativamente a anteriores, o que se atribui a variações experimentais de elaboração das fases móveis (ajuste do pH com eventual adição em demasia de HCl, com posterior correção com NaOH, o que faz variar a força iónica do meio). Porém, esta variabilidade no tempo de retenção raramente se verificou. O composto com tempo de retenção de aproximadamente 9.4 minutos é a M3G e a cerca de 12 minutos é a MV.

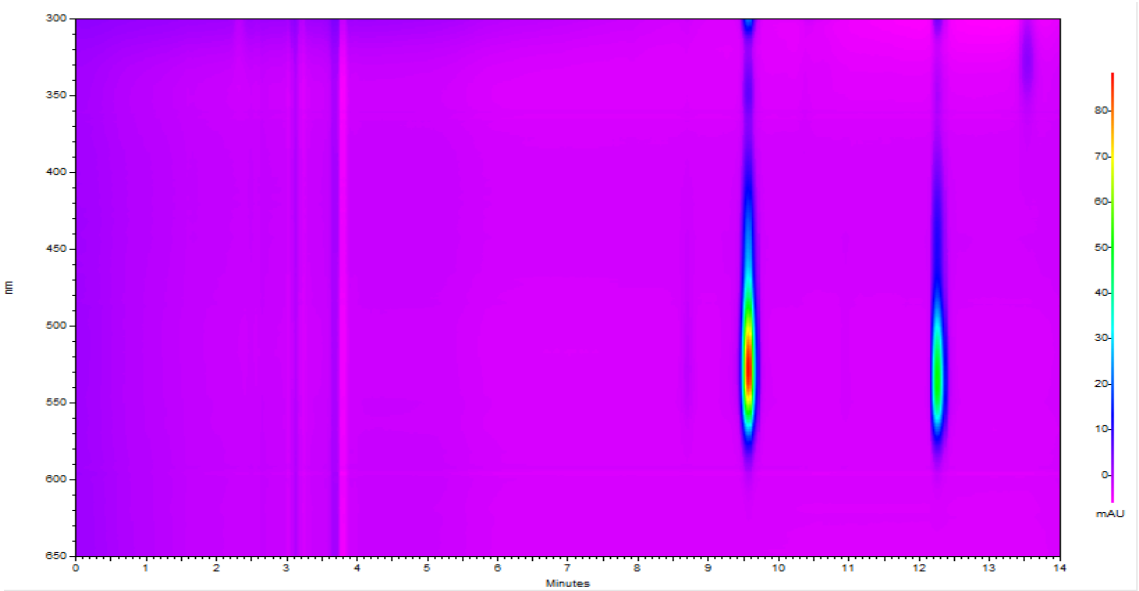


Figura 22 – Análise por HPLC de solução aquosa de 50ppm de M3G após inoculação com 50ppm de Lafazym Arom, ao fim de 3 horas. É possível observar que esta atividade enzimática promove dois focos de deteção – a cerca de 520nm, ao qual se atribui à presença de M3G, se bem que com tempo de retenção ligeiramente superior ao anterior, e a cerca de 540nm, o qual se atribui à presença de malvidina na sua forma de catião flavílio.

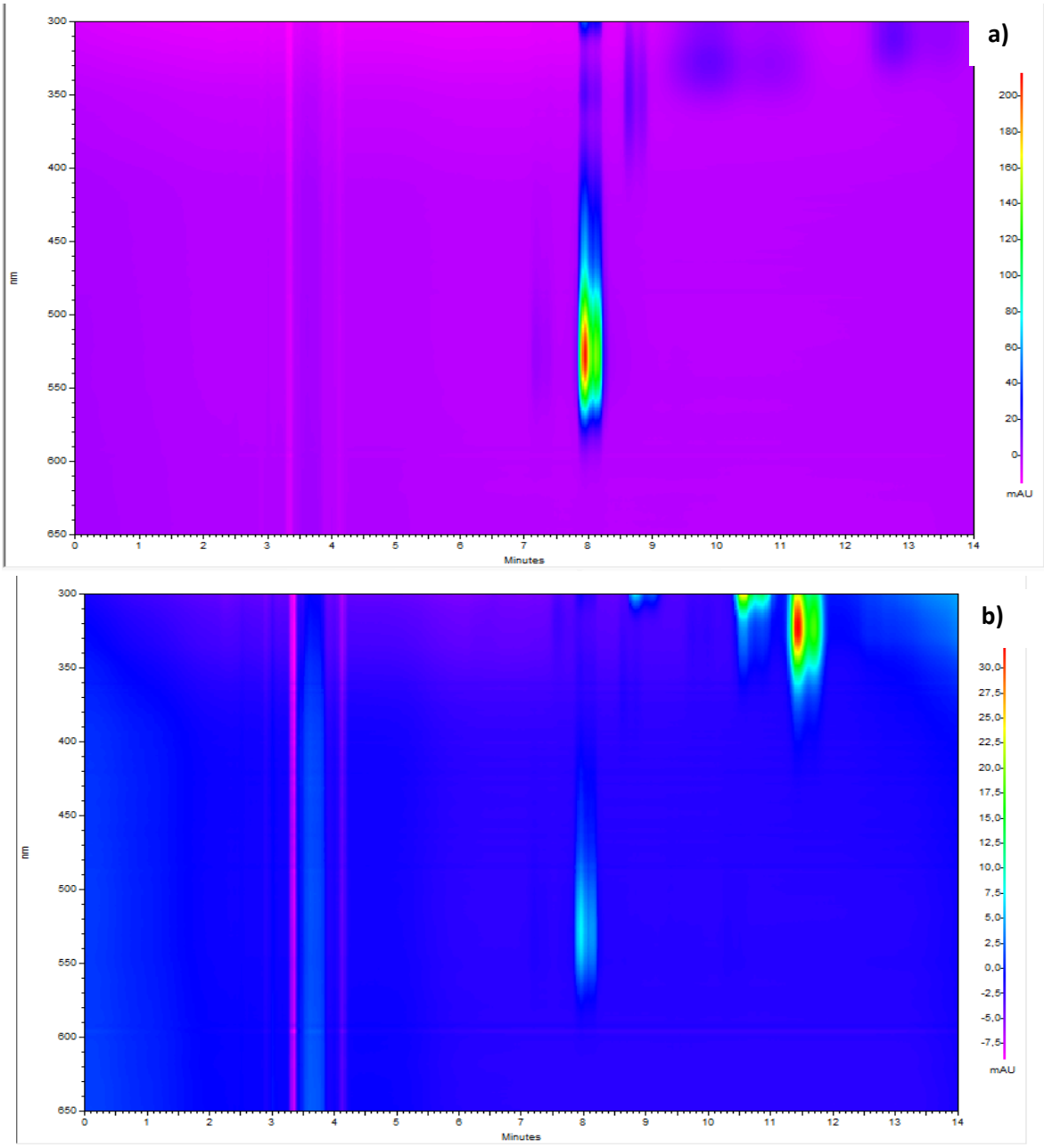
Desta forma, observa-se na figura de cima que a preparação enzimática Lafazym Arom consegue converter eficazmente M3G em MV (taxa de conversão de aproximadamente 60% nesta Figura 22) libertando MV em quantidades realmente mensuráveis. É fortemente assinalável o facto de que, a este pH (3.3), não se observar a presença da forma chalcónica/hemiacetálica, ao contrário do que aparentemente acontece de forma preferencial a pH's relativamente comparáveis. Este teste foi feito isoladamente (n=1). Desta forma, iniciou-se uma bateria de testes com base em planeamento fatorial, no qual se pretendia variar a concentração de preparado enzimático entre 50 ppm e 2000 ppm, variando simultaneamente o tempo de incubação entre 24h e 72 h, monitorizando a resposta através de *HPLC* (planeamento fatorial demonstrado na Tabela 5). O limite superior de 72 h foi considerado pois permite, em tempo útil e às concentrações utilizadas, observar significativamente o tipo de mudanças que ocorrem nas matrizes em estudo. Porém, não se exclui a possibilidade de acompanhamento a mais longo prazo não trazer uma nova perceção sobre a evolução do sistema. Esta análise exploratória foi extremamente útil para perceber alguns aspetos relativosao comportamento desta enzima em solução, sobretudo que a resposta era dependente da concentração de preparado, com eventual semelhança entre os 1100 ppm e os 2000 ppm, diferença mais aparente entre os 50 ppm e os 1100 ppm, e que se podia estar a verificar alguma formação de MV seguida de decomposição. Porém, os resultados obtidos careciam grandemente de pertinência estatística, pelo que se optou por retirar sobretudo conclusões qualitativas deste ensaio e não apresentar graficamente os resultados.

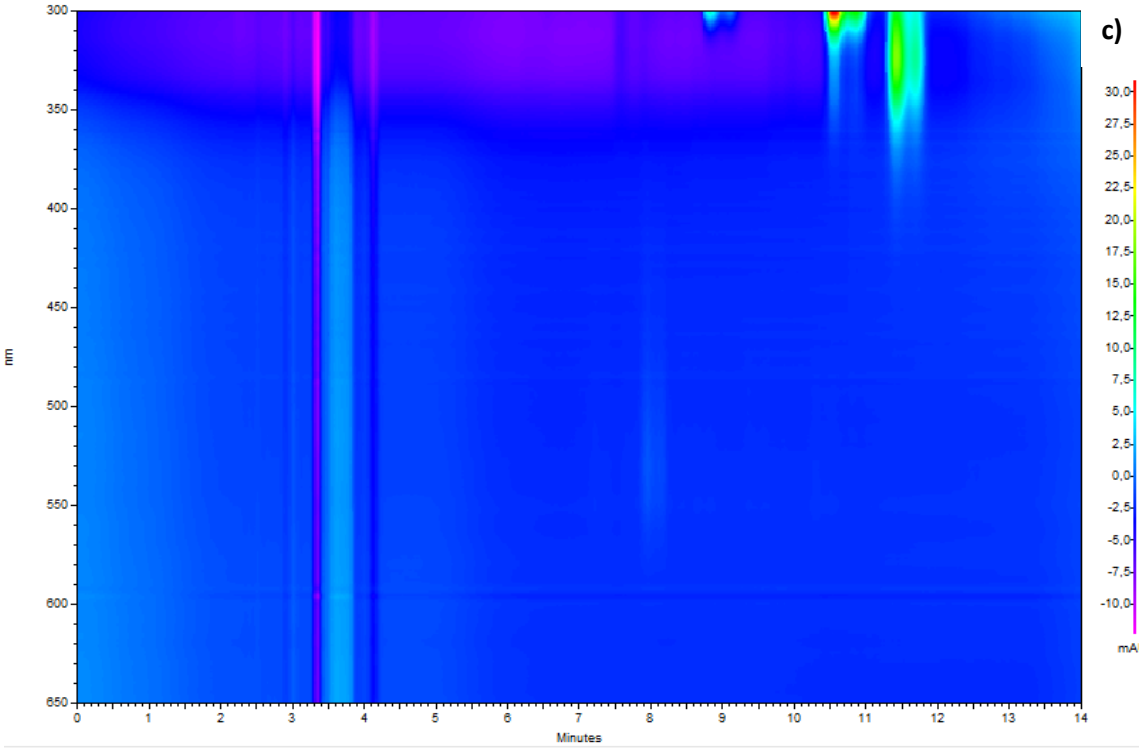
Tabela 5 – Planeamento fatorial efetuado em soluções aquosas de 50ppm de M3G, onde se pretendia verificar a influência da concentração de preparado enzimático e da variação do tempo para a degradação da M3G e surgimento da malvidina.

PPM de prep.enz. (ppm)	HORAS (h)
0	**0**
200	24
200	48
200	72
1100	24
1100	48
1100	72
2000	24
2000	48
2000	72

De seguida, iniciou-se um teste nas mesmas condições do anterior mas que pretendia acompanhar por *HPLC*, até 72 h, a evolução das amostras onde havia sido incubada uma quantidade conhecida de preparação enzimática (500 ppm foi definida como uma quantidade que permitiria um bom acompanhamento da evolução dos compostos em solução). Este teste foi conduzido em solução mimética de vinho (SMV), de pH 3.5 e 13%EtOH, porém, sem a força iónica proveniente do ácido tartárico [53].

O grande objetivo deste teste, já tendo informação de que a preparação enzimática era eficaz neste tipo de matriz, era monitorizar qual o verdadeiro comportamento dos produtos de hidrólise desta reação, neste caso, da malvidina (Figura 23).





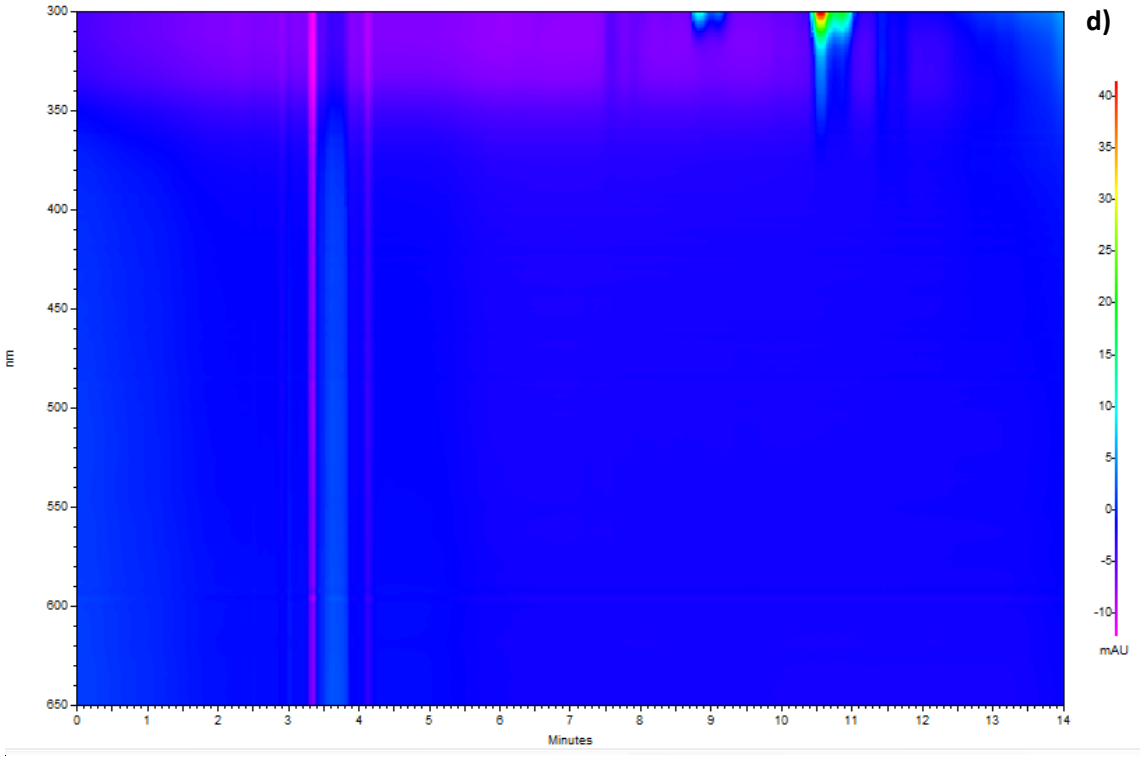


Figura 23 – Análise por HPLC de soluções de 100 ppm de M3G em solução mimética de vinho, incubadas com 500 ppm de preparação enzimática Lafazym Arom: acompanhamento temporal até 72h. a) 0h; b) 6h; c) 24h; d) 72h. Observa-se inicialmente uma predominância da M3G, a cerca de 8 minutos de tempo de retenção, mas que prontamente desvanece por ação enzimática. Não se deteta malvidina a 540 nm, porém, parece haver formação da respetiva forma chalcónica/hemiacetálica e consequente degradação em compostos com absorção máxima localizada cerca dos 300 nm.

Foi possível observar que a t=0h de incubação se visualizava uma solução notoriamente vermelha, contrastando com a observação feita a t = 72 h, onde a solução já se encontrava totalmente incolor. O pH foi descendo consecutivamente, iniciando, a t = 0 h a um pH de 3.6 e progredindo até aos 2.43. A t = 72 h a solução estava totalmente incolor. Observa-se claramente, em t = 0 h, uma predominância da M3G a 520 nm; a M3G começa a ser hidrolisada e forma malvidina, que prontamente se converte na forma chalcónica; esta forma chalcónica provavelmente degrada-se e dá origem a produtos de degradação com absorção incrementada abaixo de 300 nm.

Desta forma, conclui-se que, em solução vínica modelo, a ação da Lafazym Arom é eficaz, com capacidade de conversão de virtualmente 100% da M3G em MV. Relativamente à MV, esta degrada-se em solução modelo, fenómeno já descrito por outros investigadores em matrizes reais [111], degradação que pode resultar da maior fragilidade por abertura da cadeia na forma de chalcona e não deteção dos fragmentos por absorção de luz nos comprimentos vigiados [110], Cheynier *et.al* demonstra, por exemplo, que as antocianinas cianidina-3-glucósido e malvidina-3-glucósido se degradam por formação de aductos com produtos de degradação de ácidos fenólicos, resultando em compostos levemente corados e que, num intervalo de tempo variável, deixam de absorver no âmbito do visível [116]. Outros dois estudos demonstram, em soluções acídicas modelo, que a malvidina e as outras agliconas se deformam após abertura da cadeia e conversão na chalcona, e que esta abertura é um ponto de não retorno no que toca à nova adoção de forma de catião flavílio. A malvidina, segundo estes, decompõe-se em 2,4,6-trihidroxibenzaldeído e ácido siríngico, compostos que absorvem preferencialmente a comprimentos de onda abaixo dos 300 nm. Os mesmos advogam que a glicosilação é fundamental para a estabilidade destes compostos [117][118]. Desta forma, não se afirma ter mais malvidina em solução, mas sim os seus produtos de degradação, como a chalcona e os possíveis ácidos fenólicos e aldeídos.

A mesma situação parece estar a ocorrer neste sistema. De facto, a possibilidade de degradação faseada é fortemente cogitada, dando lugar à formação de produtos de degradação como possivelmente o ácido siríngico ou o ácido cafeico, que promovem o abaixamento do pH. Evidentemente, a deteção de malvidina não foi tão eficaz como foi

detetada anteriormente, por exemplo, no ensaio de despiste com Lafazym Arom; na verdade, não foi detetada qualquer malvidina no canal de deteção de 520 nm.

Porém, esta situação poderá não se verificar com tanta veemência na verdadeira matriz vínica às concentrações elevadas que expectavelmente serão atingidas, com base nas taxas de conversão atingidas neste teste em SMV - sabendo que as agliconas normalmente se encontram no vinho a concentrações vestigiais, poderão ser promovidos fenómenos de interação eletrostática (a malvidina monomérica, na forma flavílica, é catiónica) com taninos (aniónicos), ou, mais provavelmente, interações hidrofóbicas entre agliconas ou entre agliconas e outras moléculas anfifílicas: estas interações poderão promover a estabilidade destas moléculas, evitando a sua degradação ou eventual precipitação. Em adição, este possível aspeto de degradação até em vinhos pode não ser necessariamente um revés – o ácido siríngico é um bom antioxidante, com fortes propriedades medicinais [119]; o 2,4,6-trihidroxibenzaldeído é comprovadamente um forte agente antidiabético e antioxidante [120]. Ambas as moléculas são mais pequenas que a malvidina, o que poderá promover a absorção intestinal, e aparentemente mais estáveis.

Testes enzimáticos em matriz vínica - Após os testes do subcapítulo anterior, que permitiram evidenciar que a preparação enzimática Lafazym Arom é, efetivamente, uma solução eficaz de conversão de 3-glucósidos na sua forma aglicona em matrizes de simulação vínica, iniciaram-se os testes em vinhos previamente caracterizados em relação ao seu potencial antioxidante *in vitro* – métodos da determinação fenólica total (Figura 14) teste da neutralização do radical *DPPH* (Figura 15), teste de redução do Fe(III) *FRAP* (Figura 16) e teste da redução do radical $ABTS^{+}$ (Figura 17). Neste sentido, como previamente descrito, foram escolhidos, inicialmente, dois vinhos que apresentaram elevada resposta antioxidante nestes testes, Vinhão da Bairrada (V-B) e Touriga Nacional da Bairrada (TN-B), ambos vinhos não comerciais e feitos com o objetivo único de experimentação pela Aveleda.

A primeira bateria de testes assentou num modelo de triagem, tendo-se desenhado um protocolo fatorial como apresentado na Tabela 5, com algumas alterações (Tabela 6).

Tabela 6 – Planeamento fatorial efetuado em vinhos Vinhão - Bairrada e Touriga Nacional – Bairrada, onde se pretendia verificar a influência da concentração de preparação enzimática e da variação do tempo para a degradação da M3G e surgimento da malvidina.

PPM de prep.enz. (ppm)	HORAS (h)
0	**0**
1000	24
1000	48
1000	72
3000	24
3000	48
3000	72
5000	24
5000	48
5000	72

Neste teste, assumiu-se que, por haver maior concentração de compostos glicosilados em solução no vinho, se deveriam aumentar as concentrações de preparado de modo a poder observar uma resposta mensurável. Mantiveram-se os tempos de incubação. Após os tempos de incubação, as amostras foram analisadas por *HPLC* face a um controlo, que era o próprio vinho original, monitorizando os níveis de M3G, quantidades previamente determinadas nestes vinhos.

Os resultados obtidos por este teste foram elucidativos de forma qualitativa, à semelhança do teste fatorial conduzido quando em SMV (solução mimética de vinho) com M3G. Porém, foi encontrada uma dificuldade logo desde o início com a análise posterior em *HPLC* deste tratamento enzimático, que se relacionava com a incapacidade de deteção de malvidina a 520 nm, tal como verificado nos testes em padrão.

Na prática, observaram-se claras diminuições do conteúdo em M3G em alguns dos ensaios (os testes evidenciaram que apenas as concentrações de 5000 ppm resultavam em algum tipo de resposta, sobretudo ao fim de 72 h), mas o produto de hidrólise não se observava.

Após esta constatação, importava repetir os testes em vinho tinto para que fosse possível observar uma correlação clara entre a diminuição da quantidade de M3G, a influência do tempo nesta atividade enzimática, o respetivo produto de hidrólise, a MV,

e, simultaneamente, perceber se a atividade enzimática nestes vinhos poderia ter algum tipo de influência na resposta antioxidante *in vitro*. Este aspeto final é igualmente um indicador indireto da remoção do grupo glicosídico dos substratos-alvo, na medida em que, como demonstrado previamente (n=1), a remoção destes grupos polares promove uma resposta antioxidante mais eficaz *in vitro* face ao radical *DPPH*. Nesta medida, a atividade enzimática de β-glicosidase, com previsível libertação de agliconas em solução, assumidamente estáveis durante um intervalo de tempo variável, poderia promover uma resposta antioxidante mais veemente. Os hipotéticos produtos de degradação também foram observados.

Os testes iniciaram-se com concentrações de 5000 ppm de preparado enzimático: esta concentração, 10x maior do que a que foi usada em SMV, foi definida por se encontrar próxima da concentração que dera previamente os melhores resultados nos testes fatoriais. É naturalmente desejável manter esta concentração o mais baixa possível com os melhores resultados possível, tanto por motivos organoléticos como por aspetos económicos. Neste teste, estabeleceu-se um seguimento das amostras até 72 h, com monitorização da variação da concentração da M3G por *HPLC* às 0 h, 6 h, 24 h e 72 h; simultaneamente, as amostras foram testadas relativamente ao seu potencial antioxidante face ao radical *DPPH* às 0h (controlo), 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h e 72 h. Adicionalmente, por verificação da dificuldade e incerteza na quantificação da malvidina, optou-se por se considerar apenas o decréscimo da concentração da M3G e correlacionar este aspeto com a resposta antioxidante face ao radical do *DPPH*, bem como analisar detalhadamente os espetros de absorção.

Relativamente aos vinhos em análise, optou-se por não se realizar estas experiências com as amostras não comerciais V-B e TN-B, na medida em que o sistema de *HPLC* viria a revelar uma elevada sensibilidade perante estas amostras (elevada frequência de obtenção de picos com baixa simetria, incapacidade de separação de picos e dificuldade na verificação do sucesso da atividade enzimática). Estes aspetos poderiam estar a ser promovidos pela elevada quantidade de pigmentos nestas amostras, que podem influenciar a estabilidade da coluna, ou pela ausência de filtração industrial e clarificação destes vinhos – mesmo após filtração laboratorial usando um filtro 0,1 µm, estes aspetos viriam a ocorrer sucessivamente. Desta forma, procurou-se, dentro das amostras

previamente caracterizadas, um vinho tinto que apresentasse sobretudo um conteúdo médio de compostos fenólicos e que conhecidamente tivesse sido filtrado e clarificado industrialmente. Assim sendo, a escolha recaiu para o vinho tinto Charamba (amostra CH-AVD), um vinho do Douro produzido pela empresa Aveleda S.A, adquirindo-se três novas garrafas. Corroborando o sucesso da metodologia enzimática neste vinho, a mesma poderá ser aplicada então aos vinhos inicialmente escolhidos, de modo que se possa efetivamente promover a maior resposta antioxidante *in vivo* possível. Estes aspetos poderão ser abrangidos em trabalho futuro.

Na Figura 24 apresentam-se os espetros de absorção de 300 nm a 650 nm dos vinhos com inoculação de preparado enzimático 5000 ppm, monitorizados de t = 0 h a t = 72 h. É notável a diferença que ocorre com a variação do tempo. Primeiramente, verifica-se um perfil de absorção que corresponde à definição de um vinho tinto leve e jovem – absorção forte a 520 nm a aproximadamente 8 minutos, que representa a absorção expectável das antocianinas e, em especial, da malvidina-3-glucósido. Porém, antes constata-se a presença de uma banda com intensidade bastante demarcada. De forma a identificar este conjunto de compostos, é proveitoso analisar o que acontece após 72 h: estes compostos desaparecem totalmente. Este aspeto muito provavelmente relaciona-se com o facto de que estes compostos são glicosilados, e, assim sendo, conclui-se que estes compostos são os flavonóis glicosilados, com um máximo de absorção entre 320 a 340 nm, com possibilidade de desvios batocrómico noutras matrizes [121][122]. O ácido cafeico também absorve a este comprimento de onda. O mecanismo parece ser semelhante ao verificado em solução mimética de vinho:

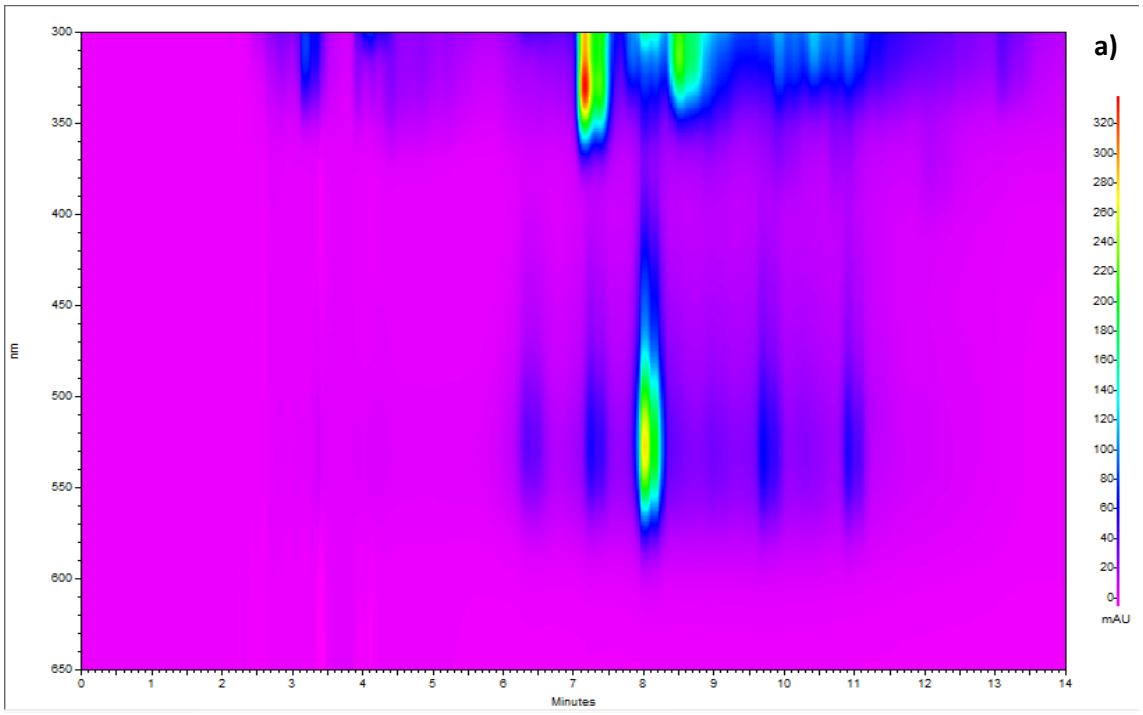
- Figura 24a) - Presença normal dos compostos anteriormente referidos, com notável quantidade de flavonóis;
- Figura 24b) - Não se observam diferenças de relevo comparativamente à primeira imagem;
- Figura 24c) - Verifica-se um claro decréscimo dos flavonóis glicosilados e das antocianinas, com aparecimento de compostos a absorver próximo dos 300 nm, com tempo de retenção de aproximadamente 10.5 minutos – muito provavelmente, dado que o tempo de retenção e perfil de absorção se conjugam com o da Figura 23, estes compostos devem resultar da degradação das

agliconas anteriormente formadas, podendo ser ácido siríngico e 2,4,6 – trihidroxibenzaldeído, entre outros compostos.

- Figura 24d) - Desaparecimento total dos flavonóis glicosilados e incremento do desaparecimento das antocianinas – reforço dos hipotéticos produtos de degradação.

Assim sendo, estes resultados (n=3) parecem indicar de forma clara que a preparado enzimático Lafazym Arom, com a sua atividade β-glicosidase, permite deglicosilar tanto as antocianinas como os flavonóis glicosilados. Consequentemente, estes produtos de hidrólise deverão ser altamente instáveis, resultando numa formação relativamente rápida dos hipotéticos produtos de degradação.

Na Figura 25 apresenta-se o resultado da medição por *HPLC* da concentração de M3G após os definidos intervalos de tempo de monitorização, que se enquadra perfeitamente com o anteriormente visualizado para o decréscimo da concentração das antocianinas com o tempo. É possível observar um decréscimo claro na concentração de M3G em função do tempo, atingindo uma taxa de 'conversão' de M3G na expectável aglicona malvidina de aproximadamente 42% ao fim de 72 h.



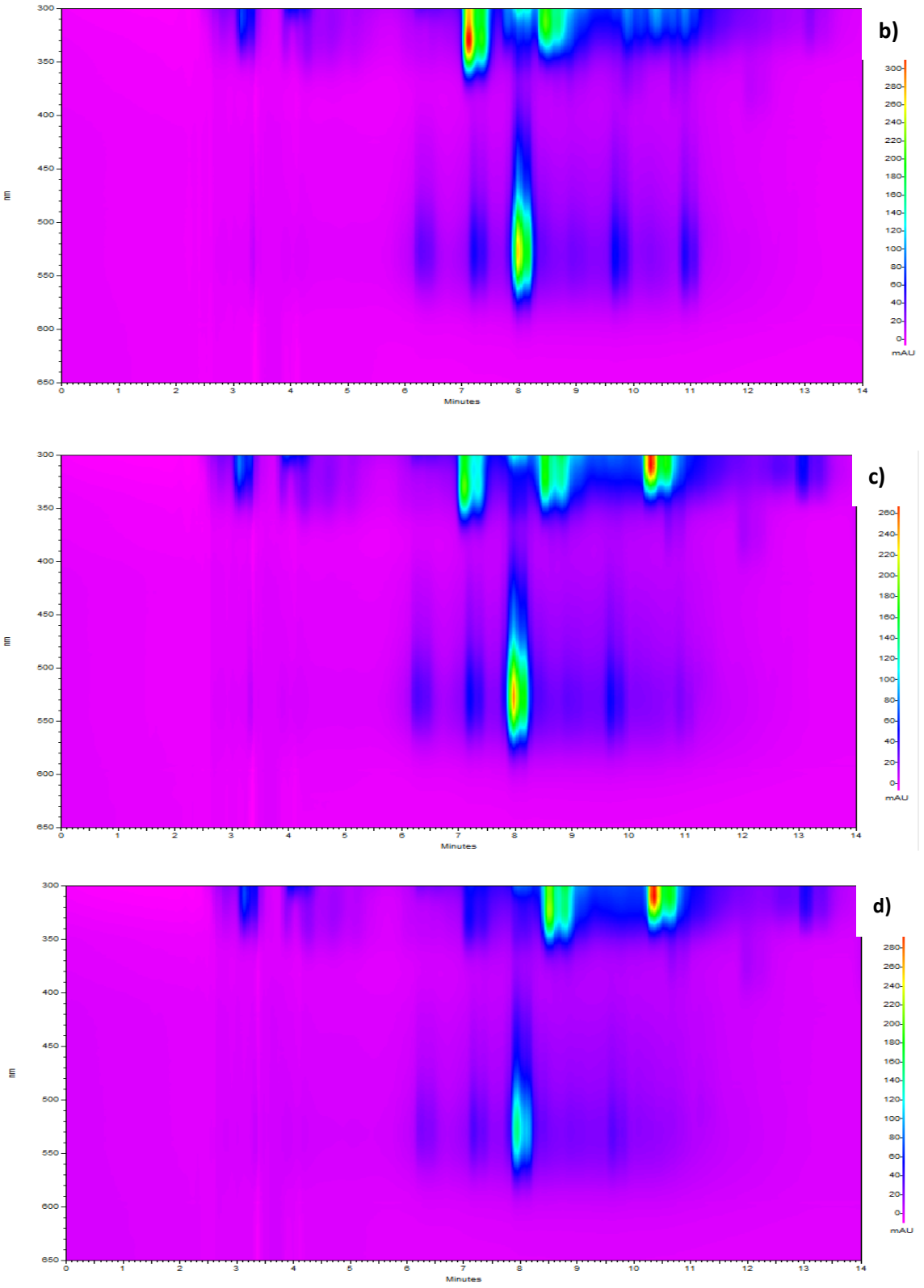


Figura 24 – Análise por HPLC de vinhos Charamba 2014, incubados com 5000ppm de preparado enzimático Lafazym Arom: acompanhamento temporal até 72h. a) 0h; b) 6h; c) 24h; d) 72h. Observa-se inicialmente uma predominância da zona atribuível às antocianinas, bem como uma zona atribuível aos flavonóis glicosilados, a cerca de 330nm e 7 minutos de tempo de retenção. Verifica-se uma forte ação enzimática de hidrólise destes compostos glicosilados, cuja concentração desce significativamente ao fim de 72h – à semelhança dos testes em padrão, o resultado final é a formação de produtos de degradação, com tempo de retenção de aproximadamente 10 minutos.

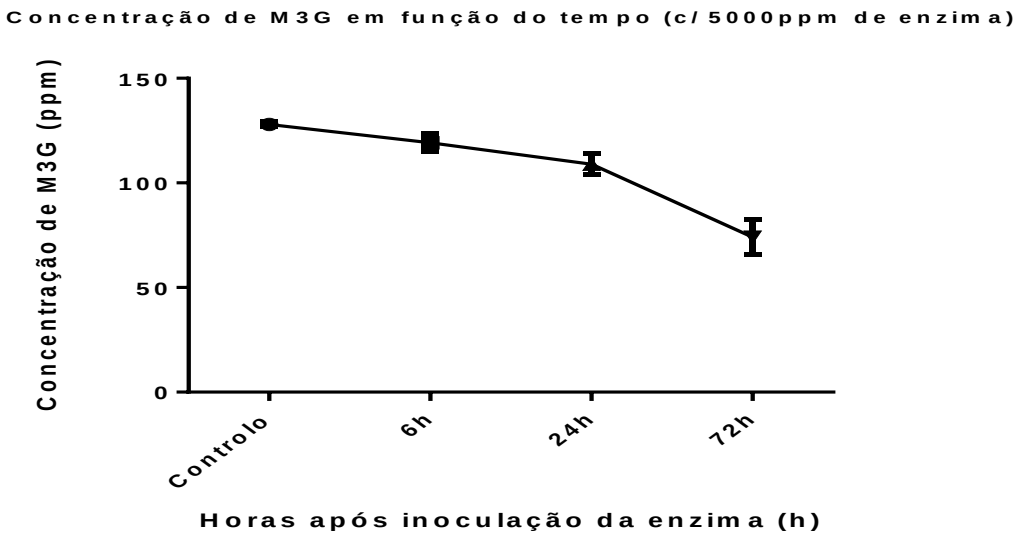


Figura 25 – Monitorização da concentração de M3G em função do tempo por HPLC em vinhos Charamba 2014 após inoculação de 5000ppm de Lafazym Arom. Observa-se um claro decréscimo da concentração deste indicador, sendo atingido um valor de 42% de hidrólise deste produto ao fim de 72h. As diferenças foram consideradas significativas pelo teste de Dunnett face ao controlo, exceto a amostra de inoculação após 6h.

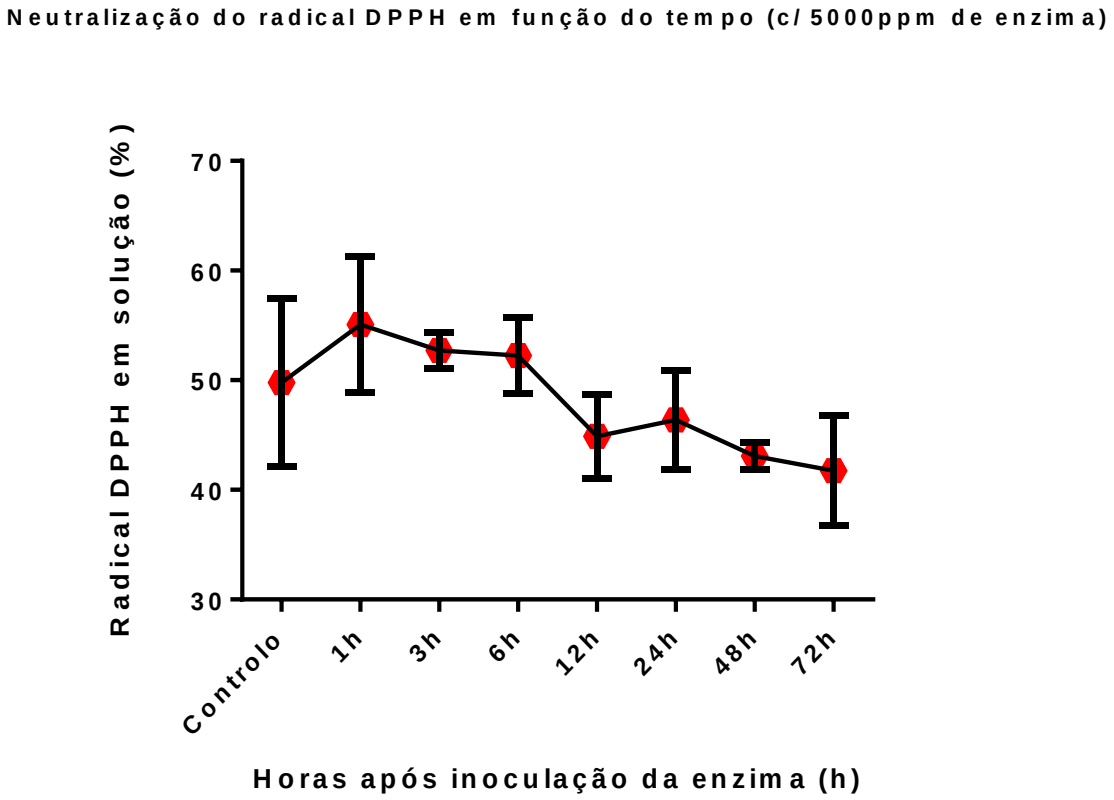


Figura 26 – Neutralização do radical *DPPH* em função do tempo em vinhos Charamba 2014 após inoculação de 5000 ppm de Lafazym Arom. Observa-se um aumento na capacidade de neutralização deste radical com o tempo. As diferenças não foram consideradas significativas pelo teste de Dunnett face ao controlo.

Na Figura 26 observa-se um periclitante aumento da capacidade de neutralização do radical *DPPH* em função do tempo (valor de 48,789% de presença deste radical no vinho sem tratamento enzimático contra um valor de 41,754% no vinho com tratamento enzimático e ao fim de 72 h). Os valores apresentados na Figura 25 são positivos e comprovam a capacidade desta preparação enzimática de hidrolisar antocianinas em vinho tinto, monitorizando esta ação por intermédio da concentração de M3G, a principal antocianina neste tipo de vinho [110]. O vinho Charamba apresenta um valor médio de M3G, em concordância com outros autores [109]. Adicionalmente, comprova-se, pelo teste do *DPPH*, que o tratamento de vinhos tintos com enzimas β-glicosidase promove a sua capacidade antioxidante *in vitro*, o que se explica pela maior disponibilidade das agliconas em reduzir estas espécies oxidantes como explicado previamente. Nesta fase, será necessário considerar os produtos de degradação como contribuindo hipoteticamente para a resposta antioxidante verificada.

Estes resultados remetem para a interpretação conjunta dos dados obtidos em ambas as Figuras supra. É possível interpretar que existe uma correlação entre ambos os aspetos, principalmente que o decréscimo da concentração de M3G enquanto indicador de antioxidante glicosilado, promove a resposta antioxidante. Porém, este aspeto não é claramente visível em todos os tempos monitorizados, nos quais se verifica inclusive algum aumento da percentagem de *DPPH* em solução face ao vinho sem tratamento enzimático. Considerando este aspeto como a variabilidade inerente ao teste, com significância reduzida - de referir que os resultados da Figura 26 foram considerados significativos com valor de P de 0.0217, porém, não significativos pelo teste da múltipla comparação de Dunnett - é expectável que, por motivos estruturais, de múltiplas interações em solução ou até de especificidade enzimática perante o seu substrato, nem todos os compostos sejam tão prontamente hidrolisados como a malvidina-3-glucósido. Permite também concluir que esta preparação enzimática, ao invés de conter apenas uma única β-glicosidase, deverá possuir várias, dada a verificação da degradação de vários substratos glicosilados. Outros compostos presentes em solução com estruturas semelhantes são os derivados glicosilados de cianidina, pelargonidina, delfinidina ou de catequina, cuja resposta antioxidante também aumenta com a remoção do grupo glicósido.

Existe algo muito interessante de se observar face a estes resultados de forma relativamente preliminar. Anteriormente, na Figura 20, observou-se que duas soluções aquosas de igual concentração de M3G e MV, quando testadas face ao radical *DPPH*, que a primeira (n=3) apresentava uma taxa de aproximadamente 16% de neutralização deste radical, ao passo que a segunda (n=1) neutralizava aproximadamente 31% de radical – isto permite afirmar que quando existe 100% de diferença entre as duas formas no que ao seu grupo glucósido concerne, que se reporta 15% mais capacidade de neutralização do radical *DPPH*. Na Figura 25 é observável que, desde t = 0 h a t = 72 h, se iniciou o teste com uma média de 128 ppm de M3G, terminando com 74 ppm, o que se reflete numa variação de 42% no conteúdo de M3G. Finalmente, na Figura 26, existe um aumento de aproximadamente 8% na capacidade de neutralização do radical *DPPH* após 72 h de incubação enzimática.

Ora, tal permite elucidar a seguinte perspetiva: quando existe 100% de conversão de M3G em MV, verifica-se um aumento de 15% de resposta antioxidante; neste caso, com uma diferença de 42%, dever-se-ia verificar uma diferença de aproximadamente 6.3%, por mera equivalência. Neste sentido, os 8% de aumento na resposta antioxidante em vinhos permitem afirmar, de forma preliminar, que a variação dos níveis de M3G neste tipo de tratamentos enzimáticos poderá ser um bom indicador da variação da capacidade de neutralização do radical *DPPH*. Num outro trabalho, analisando vinhos cujo conteúdo em M3G era mais de 50% das antocianinas totais, investigadores comprovaram que existe uma elevada correlação (R^2 = 0,95594) entre a neutralização do radical *DPPH* e o conteúdo total em antocianinas 3-glucósido [68]. Deste modo, a correlação preliminar anteriormente estabelecida poderá efetivamente encontrar algum cabimento com base nestes dados apresentados neste trabalho.

Por outro lado, existe outro aspeto que deve ser analisado. A ação desta enzima é de remover os grupos polares glicósido, neste caso analisado, dos flavonóis e das antocianinas. Este grupo químico, por sua vez, assinala a função de assegurar a solubilidade e estabilidade das respetivas agliconas em soluções hidroalcoólicas, na medida em que, sem o grupo glucósido, os dois anéis aromáticos e o anel de pirano tornam estas moléculas consideravelmente hidrofóbicas. É expectável que, num espaço de tempo variável, possam ocorrer interações hidrofóbicas entre estas agliconas, o que

poderia promover a formação de agregados e a sua precipitação. De facto, no início deste trabalho e sobretudo em amostras resultantes do planeamento fatorial em vinhos, as mesmas foram inspecionadas ao fim de um mês e, surpreendentemente, observava-se com alguma frequência a formação de um precipitado gelatinoso no fundo dos frascos de amostra. É curioso notar que o aspeto deste precipitado era semelhante ao precipitado formado pela solução *stock* de malvidina após congelamento prolongado. Este aspeto poderá ser a prova de que, num intervalo de tempo variável, as moléculas resultantes do processo de deglicosilação se associam entre si e formam agregados que precipitam sobre a forma de um componente gelatinoso. Trabalho futuro poderá endereçar esta questão da estabilidade das agliconas em solução.

3.3 - Trabalhos em células Caco-2

Nos testes anteriores foi possível concluir que a enzima Lafazym Arom era efetivamente eficaz na hidrólise de antocianinas glicosiladas em vinho tinto, concluindo que a estabilidade do produto de hidrólise monitorizado, a malvidina, era consideravelmente baixa. Adicionalmente, foi possível provar que a ação desta enzima aumentava o potencial antioxidante do vinho tinto após ação de 72 h, apesar de não serem valores significantes, segundo o teste de multi-comparação de Dunnett. Porém, a verdadeira questão passava por saber se, em adição ao facto de o vinho se tornar mais antioxidante face ao teste do *DPPH* após este tratamento, se os compostos formados, de menor massa molecular e mais apolares, seriam melhor absorvidos. Desta forma, procedeu-se ao teste da absorção intestinal *in vitro* concretizado pelo uso das células Caco-2, chamado teste de permeabilidade.

Os testes de permeabilidade utilizando as células Caco-2 para monitorização de absorção de compostos presentes no vinho e efeito destes compostos nestas células já foram, como referido anteriormente, efetuados por outros investigadores [123]–[125]. Nestes ensaios de aferição do transporte e metabolismo dos compostos por estas células, os compostos-alvo são normalmente dissolvidos a uma concentração conhecida na fase apical das células, sendo assim possível acompanhar mais facilmente se o composto foi absorvido/metabolizado por análise (*HPLC*/MS-UV) dos conteúdos das fases apical e basolateral após tempo de incubação. Neste caso, optou-se por colocar diretamente os vinhos controlo e enzimaticamente modificados em contacto com a fase apical das células. Esta possibilidade já foi levantada por outros investigadores, que, querendo testar bebidas com propriedades funcionais, iniciaram o debate se seria correto diluir estas amostras em tampão, podendo assim correr o risco de não diluir proporcionalmente os mais de 500 compostos presentes no vinho [82]. Esta questão é pertinente porque é sabido que alguns processos de diluição do vinho não apresentam proporcionalidade direta com a resposta medida, sendo exemplo a cor [102]. Neste caso, mesmo sabendo que a quantidade de etanol ou o baixo pH (3.44) do vinho poderiam danificar as membranas celulares ou inibir certos tipos de transportes

membranares, avançou-se com a metodologia de incubar as células Caco-2 com os vinhos sem serem diluídos.

Os testes de permeabilidade iniciaram-se com a necessária verificação da integridade da monocamada, tendo-se realizado curva de calibração de 0.1 a 50 µM de amarelo de lucifer em HBSS sem HEPES (R^2 = 0,9995 – ver curva de calibração em anexo) [96]. O HEPES - (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) – é um tampão zwitteriónico muito usado em cultura celular. Porém, já foi demonstrado que a sua fotoexposição promove a formação de EROS, pelo que, neste trabalho em específico, este aspeto poderia influenciar diretamente os resultados e, assim, a capacidade de tampão ficou atribuída ao HBSS contendo bicarbonato de sódio [126]. No entanto, o meio contendo apenas HBSS rapidamente acidifica por dissolução de CO_2 – este aspeto é fortemente relevante nestes testes quando se quer assegurar um meio balanceado em componente de pH entre a fase apical e basolateral, dado que assegura comparação direta entre os compostos presentes em ambos os locais da membrana sem necessidade de considerar mecanismos de transporte dependentes do pH [81]. No caso dos testes em questão, este aspeto é menos relevante, dado que se escolheu avançar com a introdução de vinho (pH 3.44) diretamente em contacto com a fase apical. Adicionalmente, utilizou-se HBSS em vez de PBS pela sua capacidade adicional, para além da de tamponização, de fornecer glucose e iões inorgânicos como Mg(II) e Ca(II).

O amarelo de lúcifer é uma sonda fluorescente utilizada para a verificação da integridade das monocamadas da Caco-2. Em condições ideais, este composto apresenta coeficientes de permeabilidade (medidos por fluorescência) devidamente tabelados e que indicam ao utilizador se as células estão em devidas condições para iniciar os testes de permeabilidade. O coeficiente de permeabilidade deve ser menor do que 1×10^{-6} cm/s [89].

Plaquearam-se 14 *inserts,* de modo que o planeamento passava por fazer 3 experiências de absorção dos compostos presentes no vinho normal, 3 experiências no vinho tratado, 3 experiências do controlo 1 e 3 experiências do controlo 2. O controlo 1 é o atenolol e o controlo 2 o propranolol: o primeiro representa o transporte paracelular que ocorre *in vivo* (entre as células) e apresenta uma permeabilidade de 50%, enquanto o segundo mimetiza o transporte transcelular passivo e apresenta uma permeabilidade de 90%

[89]. A concentração dos controlos foi monitorizada, respetivamente, a 273 nm e a 290 nm, após ter verificado os seus máximos de absorção em espetro UV-Visível em HBSS. Fizeram-se 14 *inserts* que já contabilizavam a possível perca de 2 destes *inserts.*

A fórmula que permite medir o coeficiente de permeabilidade encontra-se em baixo:

$$P_c = (V/(A*C_i))*(C_f/T) \quad \text{(Eq.2)}$$

,onde V é o volume da câmara basal (mL), A é a área da membrana do *insert* (cm^2), C_i é a concentração inicial de composto na fase apical (µM), C_f é a concentração final de composto na fase basolateral (µM) e T é o tempo do ensaio (s) [96]. Os valores do teste em questão foram, respetivamente, 0.8 mL; 0.3 cm^2; 100 µM; variável; 7200 s (2 horas).

A fase basolateral continha 0.6 mL de HBSS sem HEPES [95].

A concentração medida na fase basolateral ao fim de 2 horas variou entre 36 µM e 19.4 µM, o que corresponde a valores de P_c entre $1x10^{-4}$ cm/s e 5.4 x 10^{-5} cm/s. Desta forma, concluiu-se que nenhum dos 14 poços estava devidamente validado para testes de permeabilidade. Este aspeto fortemente imprevisto e detrator colocou imediatamente a questão de avançar, ou não, com os testes. Decidiu avançar-se com os testes sobretudo para aprendizagem pessoal, porém, foi necessário efetuar algumas alterações e reformulações. Das 14 monocamadas com excesso de permeabilidade ao amarelo de lucifer, escolheram-se os seis que apresentaram P_c menor que 6.6 x 10^{-5} cm/s. Optou-se por fazer uma experiência para cada controlo e duas experiências para os respetivos vinhos, tratados e não-tratados.

O objetivo passava por comparar os resultados ao fim de duas horas de incubação face ao teste do *DPPH*, sendo que, se se obtivesse um maior poder antioxidante da fase basolateral nos vinhos tratados face aos vinhos sem tratamento, essa situação poderia dar as primeiras indicações de sucesso desta metodologia inovadora, com a noção de que o teste está comprometido.

Fez-se uma revisão de literatura e junção de argumentos que pudessem, de alguma forma, ajudar a explicar a não integridade das monocamadas, mesmo tendo respeitado, aparentemente, todos os aspetos dos protocolos deste teste [96][81]. Os três argumentos mais fortes a favor deste insucesso são os seguintes:

1. As células Caco-2 devem ser utilizadas para os testes de permeabilidade a partir da passagem número 40, e utilizadas dentro de um intervalo de dez passagens. Estas células diferenciarão o seu fenótipo dependentemente do número de passagens e poderão não obter confluências em monocamada tão desejáveis quanto acontece em passagens mais avançadas.
2. Mau manuseamento – a monocamada é extremamente sensível a furos provocados pelo contacto da(s) pipeta(s) com as células, aspeto que pode aumentar drasticamente a sua permeabilidade.
3. Dias de diferenciação em monocamada insuficientes.

Em 1, de facto, as células que estavam disponíveis no laboratório contabilizavam a passagem número 17, tendo sido plaqueadas à passagem número 25. Este aspeto, claramente, poderá ter inviabilizado a sua diferenciação e maturação em monocamada de forma íntegra, resultando em confluências celulares menores. Contrastantemente, as células foram utilizadas dentro do espaço de dez passagens desde o descongelamento até ao plaqueamento.

Em 2, é possível que tal tenha afetado os resultados de forma significativa. A remoção e renovação dos meios foi normalmente efetuada por uso de micropipetas, se bem que de forma cuidada. No entanto, admite-se que este aspeto tenha influenciado a integridade da monocamada. Alguns autores recomendam que não sejam usados materiais contundentes como pipetas, por elevada sensibilidade das células, e que os meios sejam renovados por viragem cuidada das placas para descarte.

Em 3, admite-se que este aspeto poderá não ter influenciado preponderantemente os resultados, na medida em que a maioria dos autores indica que 21 dias após plaqueamento é o tempo ótimo de realização dos testes de permeabilidade.

Na Figura 27 apresentam-se os resultados relativos à análise por *DPPH* dos poços analisados. Analisou-se o conteúdo antioxidante da fase apical e da fase basolateral em duas situações distintas – na mesma diluição efetuada que no teste na fase apical e com diluição três vezes inferior, dado que o volume da fase apical era de 200 µL e da fase basolateral era de 600 µL. Foram igualmente analisadas as taxas de recuperação dos controlos 1 e 2 na fase apical após as duas horas, registando valores, para o atenolol

(A_{273}) de 93.5% (permeabilidade de 7.5%) e para o propranolol (A_{290}) de 18.1% (permeabilidade de 88.9%). Desta forma, apenas o controlo propranolol, que pretende ser um indicador do transporte passivo transcelular, se aproximou dos valores fixados para a sua permeabilidade (90%; atenolol 50%). (ver em anexo).

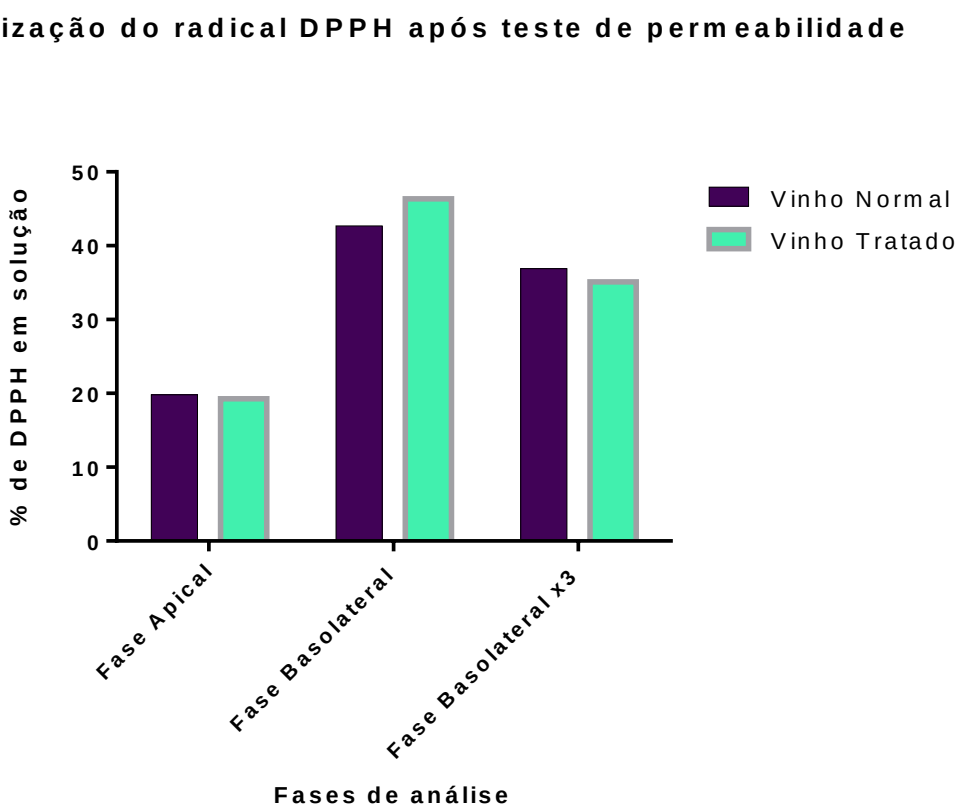


Figura 27 – Neutralização do radical DPPH após testes de permeabilidade, comparando os vinhos Charamba 2014 com e sem tratamento enzimático. Em 'Fase Apical' analisou-se diretamente o vinho após contacto com as células; em 'Fase Basolateral' analisou-se, respetivamente, o poder antioxidante dos compostos absorvidos para a fase basolateral, diluindo três vezes menos na análise em 'Fase Basolateral x3'. Não se registam diferenças assinaláveis entre o vinho normal e tratado. A fase basolateral apresenta um potencial antioxidante cerca de 50% menor que a fase apical.

Os valores observados na Figura 27 permitem concluir que, naturalmente, a fase apical, no qual o vinho se encontrava em contacto direto sem diluição, apresenta um potencial antioxidante de cerca do dobro do da fase basolateral. Dentro da fase basolateral, o aumento de três vezes da concentração de amostra não aumenta três vezes a resposta, o que parece indicar uma ausência de proporcionalidade direta neste aumento de concentração. Outra nota de realce é o facto dos vinhos controlo, na fase apical, apresentarem uma neutralização de cerca de 80% do *DPPH*, ao passo que, em condições

semelhantes (Figura 26, ao fim de 72 h) terem apresentado neutralizações de cerca de 60%. Poderia ser questionada a diferença nestes dois valores, se aparentemente os vinhos e o teste era semelhante. Neste caso, optou-se por colocar um pouco mais de amostra em contacto com o *DPPH*, de modo que se pudesse colocar o mesmo volume de amostra nos testes relativos às fases basolaterais e assim obter uma resposta mais expressiva e proporcional à usada na fase apical, sem nunca perder a proporcionalidade afeta aos testes.

Deve ser relembrado que os testes de permeabilidade não são fidedignos, porém, os resultados permitem iniciar algumas considerações. Primeiramente, deve ser questionado se, em condições normais, se verificaria uma diferença tão 'baixa' entre a capacidade de neutralização do radical na fase apical, com vinho sem diluição, e os compostos na fase basolateral. Existem vários aspetos detratores a considerar, como a distância mensurável entre as células, a ausência de cálcio no meio apical que, reforçando as *tight-junctions*, pode diminuir até 10x a absorção de compostos [127], a influência do etanol e do baixo pH no contacto direto com as células, o que pode promover a sua disrupção, ou, também, o pH muito mais elevado da fase basolateral (7.4), que potencia a capacidade antioxidante das antocianinas, como referido anteriormente. Todos estes aspetos poderão influenciar os resultados observados, sobretudo porque promovem a não integridade da monocamada e, assim, poderá haver uma muito maior facilidade destes compostos em se deslocarem para a fase basolateral.

Desta forma, mesmo partindo de uma posição em que os testes estavam, *a priori,* condicionados, foi possível entender como funciona a preparação e a logística dos testes de permeabilidade, tendo sido possível reunir informações de relevo de como proceder nos próximos testes.

Conclusão

O presente trabalho partiu da vontade de uma empresa Portuguesa chamada Aveleda S.A poder produzir o vinho mais antioxidante do Mundo. Este trabalho ainda não lhe permitirá alcançar esse objetivo por agora, mas é um excelente início.

O trabalho iniciou-se com a análise *in vitro* das propriedades antioxidantes de uma série de vinhos e derivados Portugueses, tendo sido possível concluir que três vinhos tintos monocasta - Touriga Nacional, Vinhão e Aragonez – se destacavam das restantes amostras. Atribui-se a todas estas um elevado conteúdo fenólico, promovido por serem castas com elevada pigmentação natural, e consequentemente, maior resposta antioxidante. Seguidamente, caracterizaram-se, por *HPLC*, sistemas aquosos contendo malvidina-3-glucósido e malvidina – a primeira molécula é a principal antocianina presente no vinho tinto, e a segunda é a respetiva aglicona. Desenvolveu-se uma metodologia enzimática de aplicação de preparação enzimática contendo β-glicosidase enológica para, desejavelmente, aumentar o conteúdo desta aglicona no vinho tinto, o que foi alcançado com elevada eficiência em matriz real; porém, verificou-se prontamente que a aglicona é uma molécula altamente instável, surpreendentemente derivatizar, mesmo a pH ácido, a sua forma chalcónica/hemiacetálica, que parece marcar um ponto de não-retorno de volta à sua forma de catião flavílio. Este aspeto marca o início da degradação desta molécula e aparecimento de, provavelmente, produtos de degradação como o ácido siríngico e o 2,4,6 – trihidroxibenzaldeído.

Foi concomitantemente provado que a aglicona malvidina apresenta uma maior capacidade antioxidante do que a forma glicosilada, o que se prende com uma maior eficácia da sua estrutura de ressonância após oxidação. Este aspeto serviu de mote à experiência que comprovou que a deglicosilação das antocianinas e dos flavonóis glicosilados acompanha uma maior resposta antioxidante face ao radical do *DPPH* em vinhos tintos. Parece haver, simultaneamente, uma correlação entre a diminuição da concentração de malvidina-3-glucósido, e conversão noutras estruturas, e o aumento da resposta antioxidante.

Finalmente, foi possível testar preliminarmente esta metodologia em ensaios de permeabilidade utilizando células de adenocarcinoma humano Caco-2 (n=1). Comprometidos desde o início por razões afetas ao desenvolvimento desta técnica, estes ensaios pretendiam comparar indiretamente a absorção de compostos de vinhos tintos enzimaticamente tratados à de vinhos normais por resposta ao ensaio antioxidante do *DPPH*. Não foi possível estabelecer conclusões significativas.

Conclusivamente, o trabalho desenvolvido nesta tese de Mestrado permite aumentar grandemente o estado-da-arte no que à capacidade antioxidante de vinhos de várias categorias concerne. Adicionalmente, comprova os mecanismos de hidrólise, estabilidade e degradação de antocianinas e antocianidinas padrão, procedendo à apresentação das bases científicas e tecnológicas para uma potencial metodologia de incremento de absorção e possível biodisponibilidade de compostos antioxidantes presentes em bebidas.

Trabalho futuro

Esta Tese de Mestrado permitiu estabelecer as bases de trabalho para o possível desenvolvimento de uma metodologia disruptiva de incremento da absorção e possível biodisponibilidade de compostos com demonstrado forte potencial antioxidante, em específico, no vinho. Porém, foram observadas algumas contrariedades, sendo a mais assinalável o facto de que a malvidina, enquanto padrão representativo das antocianidinas, compostos nos quais se relegou o potencial para alterar o cenário de absorção a nível intestinal, aparentemente se degradarem.

Começa a parecer evidente, pela literatura, que as agliconas, por terem menor massa molecular e serem mais apolares, são melhor absorvidas pelo organismo do que os correspondentes glucósidos. Porém, a sua estabilidade é preocupante. Trabalho futuro deverá passar, forçosamente, pela promoção de técnicas que simultaneamente possam estabilizar os compostos antioxidantes de maior preponderância no vinho e incitar à sua absorção. Existem soluções que poderão simultaneamente estabilizar e promover a absorção, tais como a microencapsulação de libertação controlada ou a micelização destes compostos – ambas as técnicas poderiam, adicionalmente, evitar os fenómenos de metabolização polifenólica abundantemente presente no corpo humano.

Porém, não deve ser esquecido o que foi atingido neste trabalho, e algumas surpresas agradáveis poderão advir deste processo de investigação. A mais relevante será porventura a constatação da degradação das antocianidinas em compostos de massa molecular mais pequeno, assumidamente mais estáveis em solução e também eles próprios com propriedades funcionais. Tendo identificado vinhos de grande preponderância antioxidante, em especial com riquíssimo conteúdo em antocianinas, o processo *natural* de conversão antocianinas → antocianidinas → produtos de degradação benéficos poderá ser surpreendente, na medida em que poderá redesenhar todo o processo de sinergias funcionais presentes no vinho.

Em concreto, a conversão parcial, nestes vinhos, das antocianinas noutros compostos deixará ainda uma enorme *pool* de compostos com mecanismos de absorção já definidos, introduzindo possivelmente novas capacidades funcionais a esta bebida. Desta forma, novos ensaios de permeabilidade em células Caco-2 poderão confirmar a eficácia desta metodologia, se bem que por outra via que inicialmente não ponderada.

Bibliografia

[1] C. Williams, "HubPages - August 2016," *Most Consumed Beverages in The World - Excluding Water*, 2015. .

[2] M. N. Xanthopoulou, E. Fragopoulou, K. Kalathara, T. Nomikos, H. C. Karantonis, and S. Antonopoulou, "Antioxidant and anti-inflammatory activity of red and white wine extracts," *Food Chem.*, vol. 120, no. 3, pp. 665–672, 2010.

[3] S. C. Renaud, R. Gueguen, P. Conard, D. Lanzmann-Petithory, J. M. Orgogozo, and O. Henry, "Moderate wine drinkers have lower hypertension related mortality: a prospective cohort study in French men," *Am. J. Clin. Nutition*, vol. 80, no. 3, pp. 621–625, 2004.

[4] C. López-Alarcón and A. Denicola, "Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays," *Anal. Chim. Acta*, vol. 763, pp. 1–10, 2013.

[5] M. Diplock, P; Aggett, A.; Aswell, M; Bornet, F; Fren, E; Roberfroid, "Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document," *Br. Food J.*, vol. 81, no. 1–27, 1999.

[6] D. . Martirosyan, *Functional Foods and Chronic Diseases: Science and Practice*. Food Science Publisher, 2011.

[7] D. Kwak, No-Seong; Jukes, "Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept," *Food Control*, vol. 12, no. 2, pp. 99–107, 2001.

[8] F. P. Moraes and L. M. Colla, "Alimentos Funcionais E Nutracêuticos: Definições, Legislação E Benefícios À Saúde.," *Rev. Eletrônica Farmácia*, vol. 3, no. 2, p. 14, 2006.

[9] S. Salminen, C. Bouley, M. C. Boutron-Ruault, J. H. Cummings, a. Franck, G. R. Gibson, E. Isolauri, M. C. Moreau, M. Roberfroid, and I. Rowland, "Functional food science and gastrointestinal physiology and function," *Br. J. Nutr.*, vol. 80 Suppl 1, no. August 2016, pp. S147–S171, 1998.

[10] W. Verbeke, "Consumer acceptance of functional foods: Socio-demographic, cognitive and attitudinal determinants," *Food Qual. Prefer.*, vol. 16, no. 1, pp. 45–57, 2005.

[11] T. . Bech-Larsen and K. G. Grunert, "The perceived healthiness of functional foods: A conjoint study of Danish, Finnish and American consumers' perception of functional foods," *Appetite*, vol. 40, no. 1, pp. 9–14, 2003.

[12] K. Menrad, "Market and marketing of functional food in Europe," *J. Food Eng.*, vol. 56, no. 2–3, pp. 181–188, 2003.

[13] C. M. Hasler, "Functional foods: benefits, concerns and challenges-a position paper from the american council on science and health.," *J. Nutr.*, vol. 132, no. 12, pp. 3772–3781, 2002.

[14] H. R. Bjerregaard P, Young TK, "Low incidence of cardiovascular disease among the Inuit–what is the evidence?," *Atherosclerosis*, vol. 166, p. 351.375, 2003.

[15] S. XiaoOu, J. Fan, D. Qi, W. WanQing, J. D. Potter, L. H. Kushi, R. ZhiXian, G. YuTang, and Z. Wei, "Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women.," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 10, no. 5, pp. 483–488, 2001.

[16] W. C. Willett, "Dietary fats and coronary heart disease," *J. Intern. Med.*, vol. 272, no. 1, pp. 13–24, 2012.

[17] S. M. Artaud-Wild, S. L. Connor, G. Sexton, and W. E. Connor, "Differences in coronary mortality can be explained by differences in cholesterol and saturated fat intakes in 40 countries but not in France and Finland. A paradox.," *Circulation*, vol. 88, no. 6, pp. 2771–9, 1993.

[18] J. Ferrières, "The French Paradox: lessons for other countries," *Heart*, vol. 91, no. 1, pp. 107–111, 2004.

[19] D. Li and J. L. Mehta, "Oxidized LDL, a critical factor in atherogenesis," *Cardiovasc. Res.*, vol. 68, no. 3, pp. 353–354, 2005.

[20] B. E. S. Alfredo C. Cordova, La Scienya M. Jackson, David W. Berke-Schlessela, "The cardiovascular protective effect of red wine," *J. Am. Coll. Surg.*, vol. 200, no. 3, pp. 428–439, 2005.

[21] P. Correia, "7 Mentiras sobre Nutrição que estão a tornar as pessoas mais gordas e doentes," 2012.

[22] S. Vendrame, "The French Paradox - Was it Really the Wine?," *American Society for Nutrition - August 2016*, 2013. .

[23] A. Artero, A. Artero, J. J. Tarín, and A. Cano, "The impact of moderate wine consumption on health," *Maturitas*, vol. 80, no. 1, pp. 3–13, 2015.

[24] A. de Lorimier, "Alcohol, wine and health," *Am. J. Surg.*, vol. 180, no. 5, pp. 357–361, 2000.

[25] F. Mazué, D. Delmas, G. Murillo, D. Saleiro, E. Limagne, and N. Latruffe, "Differential protective effects of red wine polyphenol extracts (RWEs) on colon carcinogenesis," *Food Funct.*, vol. 5, pp. 663–670, 2014.

[26] A. L. Klatsky, G. D. Friedman, M. A. Armstrong, and H. Kipp, "Wine, liquor, beer, and mortality," *Am. J. Epidemiol.*, vol. 158, no. 6, pp. 585–595, 2003.

[27] V. B. S.-K. Jean-Claude Stoclet, , Thierry Chataigneau, Mamadou Ndiaye, Min-Ho Oak, Jasser El Bedoui, Marta Chataigneau, "Vascular protection by dietary polyphenols," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 500, no. 1–3, pp. 299–313, 2004.

[28] T. Parker, "French Paradox," *diet.com*, 2016. .

[29] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease," *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, vol. 39, no. 1357–2725 (Print), pp. 44–84, 2007.

[30] A. Rahal, A. Kumar, V. Singh, B. Yadav, R. Tiwari, S. Chakraborty, and K. Dhama, "Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, 2014.

[31] P. a Kern, M. Saghizadeh, J. M. Ong, R. J. Bosch, R. Deem, and R. B. Simsolo, "The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase.," *J. Clin. Invest.*, vol. 95, no. 5, pp. 2111–2119, 1995.

[32] U. Asmat, K. Abad, and K. Ismail, "Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review," *Saudi Pharm. J.*, 2015.

[33] M. Mittal, M. R. Siddiqui, K. Tran, S. P. Reddy, and A. B. Malik, "Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 20, no. 7, pp. 1126–67, 2014.

[34] and B. B. A. Simone Reuter, Subash C. Gupta, Madan M. Chaturvedi, "Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 49, no. 11, pp. 1603–1616, 2010.

[35] L. M. C. & Z. Werb, "Inflammation and cancer," *Nature*, vol. 430, pp. 860–867, 2002.

[36] L. M. Higgins and E. Llanos, "A healthy indulgence? Wine consumers and the health benefits of wine," *Wine Econ. Policy*, vol. 4, no. 1, pp. 1–9, 2015.

[37] S. B. Nimse and D. Pal, "Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms," *R. Soc. Chem.*, vol. 5, no. 35, pp. 27986–28006, 2015.

[38] a. Jos, I. Moreno, a. G. González, G. Repetto, and a. M. Cameán, "Differentiation of sparkling wines (cava and champagne) according to their mineral content," *Talanta*, vol. 63, no. 2, pp. 377–382, 2004.

[39] M. Iriti and E. M. Varoni, "Cardioprotective effects of moderate red wine consumption: Polyphenols vs. ethanol," *J. Appl. Biomed.*, vol. 12, no. 4, pp. 193–202, 2014.

[40] N. Cook, "Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 2863, no. Ldl, pp. 66–76, 1996.

[41] A. L. Waterhouse, "Wine phenolics.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 957, pp. 21–36, 2002.

[42] M. Garcia-Alonso, A. M. Minihane, G. Rimbach, J. C. Rivas-Gonzalo, and S. de Pascual-Teresa,

"Red wine anthocyanins are rapidly absorbed in humans and affect monocyte chemoattractant protein 1 levels and antioxidant capacity of plasma," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 20, no. 7, pp. 521–529, 2009.

[43] J. A. Rodrigues, "Determinação da actividade antioxidante e composição fenólica de vinhos portugueses e correlação com parâmetros de cor," 2011.

[44] J. Muselík, M. García-Alonso, M. P. Martín-López, M. Žemlička, and J. C. Rivas-Gonzalo, "Measurement of antioxidant activity of wine catechins, procyanidins, anthocyanins and pyranoanthocyanins," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 8, no. 8, pp. 797–809, 2007.

[45] D. Zanchi, A. Vernhet, C. Poncet-Legrand, D. Cartalade, C. Tribet, R. Schweins, and B. Cabane, "Colloidal dispersions of tannins in water-ethanol solutions.," *Langmuir*, vol. 23, no. 20, pp. 9949–59, Sep. 2007.

[46] a. Versari, W. du Toit, and G. P. Parpinello, "Oenological tannins: a review," *Aust. J. Grape Wine Res.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–10, Feb. 2013.

[47] G. Schmauch, C. Saucier, A. Taticchi, M. Castroviejo, P. Teissedre, S. Sa, F. Sanson, and B. Cedex, "Grape seed tannins – Model proteins precipitation," vol. 1, no. 1.

[48] C. Pascal, C. Poncet-Legrand, B. Cabane, and A. Vernhet, "Aggregation of a proline-rich protein induced by epigallocatechin gallate and condensed tannins: effect of protein glycosylation.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 15, pp. 6724–32, Aug. 2008.

[49] V. Cheynier, E. Salas, J. Souquet, P. Sarni-manchado, and H. Fulcrand, "Structure and Properties of Wine Pigments and Tannins," vol. 3, no. Figure 1, pp. 298–305, 2006.

[50] D. Zanchi, C. Poulain, P. Konarev, C. Tribet, D. I. Svergun, L. Materiaux, and U. P. Diderot, "Colloidal stability of tannins : astringency , wine tasting and beyond," no. 1.

[51] E. I. Geana, a. M. Iordache, and R. E. Ionete, "Assessing the Wine Anthocyanin Profile for Red Grape Varieties Identification," *Prog. Cryog. Isot. Sep.*, vol. 14, no. 1, pp. 127–133, 2011.

[52] P. Barham, L. H. Skibsted, W. L. P. Bredie, M. Bom Frøst, P. Møller, J. Risbo, P. Snitkjær, and L. M. Mortensen, "Molecular gastronomy: A new emerging scientific discipline," *Chem. Rev.*, vol. 110, no. 4, pp. 2313–2365, 2010.

[53] C. Conde, P. Silva, N. Fontes, A. C. P. Dias, R. M. Tavares, M. J. Sousa, A. Agasse, S. Delrot, and H. Gerós, "Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality," *Glob. Sci. Books*, 2007.

[54] C. R. Welcha, Q. Wub, and J. E. Simonb, "Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization," *Curr Anal Chem*, vol. 4, no. 2, pp. 75–101, 2009.

[55] and U. R. Satyabrata Ghosh, Runu Chakraborty, "Determination of pH-dependent antioxidant activity of palm (Borassus flabellifer) polyphenol compounds by photoluminol and DPPH methods: a comparison of redox reaction sensitivity," *3 Biotech*, vol. 5, no. 5, pp. 633–640, 2014.

[56] T. B. Borkowski T1, Szymusiak H, Gliszczyńska-Rwigło A, Rietjens IM, "Radical scavenging capacity of wine anthocyanins is strongly pH-dependent.," *J Agric Food Chem*, vol. 13, no. 53, pp. 5526–5534, 2005.

[57] N. Urala and L. Lähteenmäki, "Attitudes behind consumers' willingness to use functional foods," *Food Qual. Prefer.*, vol. 15, no. 7–8 SPEC.ISS., pp. 793–803, 2004.

[58] G. K. Jayaprakasha, R. P. Singh, and K. K. Sakariah, "Antioxidant activity of grape seed (Vitis vinifera) extracts on peroxidation models in vitro," *Food Chem.*, vol. 73, no. 3, pp. 285–290, 2001.

[59] C. Jhin and K. T. Hwang, "Prediction of radical scavenging activities of anthocyanins applying adaptive Neuro-Fuzzy inference system (ANFIS) with quantum chemical descriptors," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 8, pp. 14715–14727, 2014.

[60] M. N. Alam, N. J. Bristi, and M. Rafiquzzaman, "Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity," *Saudi Pharm. J.*, vol. 21, no. 2, pp. 143–152, 2013.

[61] R. P. Feliciano, M. N. Bravo, M. M. Pires, A. T. Serra, C. M. Duarte, L. V. Boas, and M. R. Bronze,

"Phenolic content and antioxidant activity of moscatel dessert wines from the setúbal region in portugal," *Food Anal. Methods*, vol. 2, no. 2, pp. 149–161, 2009.

[62] R. Apak, S. Gorinstein, V. Böhm, K. M. Schaich, M. Özyürek, and K. Güçlü, "Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report)," *Pure Appl. Chem. Int. Union Pure Appl. Chem. J.*, vol. 85, no. 5, pp. 957–998, 2013.

[63] J. Harbertson, "Grape and Wine Phenolics: A primer," *Washington State University*, 2015. .

[64] C. a. Rice-Evans, N. J. Miller, and G. Paganga, "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 20, no. 7, pp. 933–956, 1996.

[65] H. Vluorinen, M. K, and R. Törrönen, "Content of the flavonols myricetin, quercetin, and kaempferol in finnish berry wines," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, no. 7, pp. 2675–80, 2000.

[66] a M. Jordao and a C. Correia, "Relationship Between Antioxidant Capacity , Proanthocyanidin and Anthocyanin Content During Grape Maturation of Touriga Nacional and Tinta Roriz Grape Varieties," vol. 33, no. 2, pp. 214–224, 2012.

[67] M. Kordis-Krapez, V. Abram, M. Kac, and S. Ferjancic, "Determination of Organic Acids in White Wines by RP-HPLC," *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 39, no. 2, pp. 93–99, 2001.

[68] B. Radovanovi?? and A. Radovanovi??, "Free radical scavenging activity and anthocyanin profile of Cabernet Sauvignon wines from the Balkan region," *Molecules*, vol. 15, no. 6, pp. 4213–4226, 2010.

[69] M. Downey O., N. Dokoozlian K., and M. Krstic P., "Cultural Practice and Environmental Impacts on the Flavonoid Composition of Grapes and Wine: A Review of Recent Research," *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 57, no. 3, pp. 257–268, 2006.

[70] O. a. A. R. E. V. N. Cavuldak, "Phenolic composition and antioxidant capacity of some red wines from Turkey," *Int. J. Food Sci. Nutr. Eng. 2013*, vol. 3, no. 3, pp. 40–47, 2013.

[71] M. N. Mitić, M. V. Obradović, Z. B. Grahovac, and A. N. Pavlović, "Antioxidant capacities and phenolic levels of different varieties of Serbian white wines," *Molecules*, vol. 15, pp. 2016–2027, 2010.

[72] P. Stratil, V. Kubáň, and J. Fojtová, "Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods," *Czech J. Food Sci.*, vol. 26, no. 4, pp. 242–253, 2008.

[73] N. Paixão, R. Perestrelo, J. C. Marques, and J. S. Câmara, "Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines," *Food Chem.*, vol. 105, no. 1, pp. 204–214, 2007.

[74] H. K. Yildirim, "Effects of Fining Agents on Antioxidant Capacity of Red Wines," *J. Inst. Brew.*, vol. 117, no. 1, pp. 55–60, 2011.

[75] A. Teixeira, "Effect of grapevine genotype and environment on grape berry composition - metabolism and metabolome studies in Alvarinho, Arinto and Padeiro de Basto varieties from North and South of Portugal," 2014.

[76] A. Teixeira, J. Eiras-Dias, S. D. Castellarin, and H. Gerós, "Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 9, pp. 18711–18739, 2013.

[77] H. Palafox-Carlos, J. F. Ayala-Zavala, and G. a. González-Aguilar, "The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants," *J. Food Sci.*, vol. 76, no. 1, pp. 6–15, 2011.

[78] G. Williamson and C. Manach, "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans.II.Review of 93 intervention studies," *Am J Clin Nutr*, vol. 81, p. 243S–255S, 2005.

[79] E. Hedrén, V. Diaz, and U. Svanberg, "Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method.," *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 56, no. 5, pp. 425–430, 2002.

[80] OpenStax, "CNX - Agosto 2016," *Chemical Digestion and Absorption: A Closer Look*, 2016. .

[81] I. Hubatsch, E. Ragnarsson, and P. Artursson, "Determination of drug permeability and

prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers," *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 9, pp. 2111–2119, 2007.

[82] S. Zibadi, "Interaction of polyphenols with the intestinal and placental absorption of some nutrients and compounds," in *Polyphenols in Human Health and Disease*, 2014, pp. 510–530.

[83] A. Scalbert, C. Morand, C. Manach, and C. Rémésy, "Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 56, no. 6, pp. 276–282, 2002.

[84] Y. Liu and M. Hu, "Absorption and metabolism of flavonoids in the Caco-2 cell culture model and a perfused rat intestinal model," *Drug Metab. Dispos.*, vol. 30, no. 4, pp. 370–377, 2002.

[85] K. Németh, G. W. Plumb, J. G. Berrin, N. Juge, R. Jacob, H. Y. Naim, G. Williamson, D. M. Swallow, and P. a. Kroon, "Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans," *Eur. J. Nutr.*, vol. 42, no. 1, pp. 29–42, 2003.

[86] I. L. F. Nielsen, W. S. S. Chee, L. Poulsen, E. Offord-cavin, S. E. Rasmussen, H. Frederiksen, M. Enslen, D. Barron, M. Horcajada, and G. Williamson, "Nutrient Physiology , Metabolism , and Nutrient-Nutrient Interactions Bioavailability Is Improved by Enzymatic Modification of the Citrus," *J Nutr*, vol. 136, no. October 2005, pp. 404–408, 2006.

[87] M. E. M. B. De Araújo, Y. E. Moreira Franco, T. G. Alberto, M. A. Sobreiro, M. A. Conrado, D. G. Priolli, A. C. H. Frankland Sawaya, A. L. T. G. Ruiz, J. E. De Carvalho, and P. De Oliveira Carvalho, "Enzymatic de-glycosylation of rutin improves its antioxidant and antiproliferative activities," *Food Chem.*, vol. 141, no. 1, pp. 266–273, 2013.

[88] T. Tsuda, F. Horio, and T. Osawa, "Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-beta-D-glucoside in rats.," *FEBS Lett.*, vol. 449, pp. 179–182, 1999.

[89] Cyprotex, "Cyprotex Official Web Page," *Caco-2 Permeability Assay*, 2016. .

[90] E. A. A. & K. M. Gillespie, "Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent," *Nat. Protoc.*, vol. 2, pp. 875–877, 2007.

[91] S. S. Sakat, A. R. Juvekar, and M. N. Gambhire, "In-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of Oxalis corniculata linn," *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 2, no. 1, pp. 146–155, 2010.

[92] V. Katalinic, M. Milos, T. Kulisic, and M. Jukic, "Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols," *Food Chem.*, vol. 94, no. 4, pp. 550–557, 2006.

[93] P. Kozminski and A. Brett, "Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Eletrochemical detection of anthocyanins," *Anal. Lett.*, vol. 39, pp. 2687–2697, 2006.

[94] M. Kumšta, P. Pavloušek, and J. Kupsa, "Influence of terroir on the concentration of selected stilbenes in wines of the cv. Riesling in the Czech Republic," *Hortic. Sci.*, vol. 39, no. 1, pp. 38–46, 2012.

[95] M. Serrano-wu, "Caco-2 Permeability Assay," vol. 35. pp. 1–4, 2014.

[96] Corning Life Sciences, "Lucifer Yellow Permeability Assay using Falcon ® HTS 96 Multiwell Insert Systems." pp. 50–51, 2012.

[97] B. Grossi, Marco; Di Lecce, Giuseppe; Arru, Marco; Gallina Toschi, Tullia; Riccò, "An opto-electronic system for in-situ determination of peroxide value and total phenol content in olive oil," *J. Food Eng.*, vol. 146, pp. 1–7, 2015.

[98] S. V. Nigdikar, N. R. Williams, B. a. Griffin, and A. N. Howard, "Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low- density lipoproteins to oxidation in vivo," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 68, no. 2, pp. 258–265, 1998.

[99] B. Lorrain, I. Ky, L. Pechamat, and P. L. Teissedre, "Evolution of analysis of polyhenols from grapes, wines, and extracts," *Molecules*, vol. 18, no. 1, pp. 1076–1100, 2013.

[100] D. C.-Q. He F, Liang NN, Mu L, Pan Q-H, Wang J, Reeves MJ, "Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and Their Color Expression.," *Molecules*, vol. 17, pp. 1571–1560, 2012.

[101] M. Niculcea, L. Martinez-Lapuente, Z. Guadalupe, M. S??nchez-D??az, B. Ayestar??n, and M. C. Antol??n, "Characterization of phenolic composition of Vitis vinifera L. 'Tempranillo' and 'Graciano' subjected to deficit irrigation during berry development," *Vitis - J. Grapevine Res.*, vol. 54, no. 1, pp. 9–16, 2015.

[102] & D. Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., "The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments," in *Handbook of Enology*, 2006, pp. 141–205.

[103] J. M. McRae, S. Kassara, J. a. Kennedy, E. J. Waters, and P. a. Smith, "Effect of wine pH and bottle closure on tannins," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 47, pp. 11618–11627, 2013.

[104] C. M. Oliveira, A. C. S. Ferreira, V. De Freitas, and A. M. S. Silva, "Oxidation mechanisms occurring in wines," *Food Res. Int.*, vol. 44, no. 5, pp. 1115–1126, 2011.

[105] M. Ozgen, R. N. Reese, A. Z. Tulio, J. C. Scheerens, and a. R. Miller, "Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no. 4, pp. 1151–1157, 2006.

[106] a. M. Siti Azima, a. Noriham, and N. Manshoor, "Anthocyanin content in relation to the antioxidant activity and colour properties of Garcinia mangostana peel, Syzigium cumini and Clitoria ternatea extracts," *Int. Food Res. J.*, vol. 21, no. 6, pp. 2369–2375, 2014.

[107] Condor, "Linear Correlation - Agosto 2016," *Linear Correlation - www.condor.depaul.edu*. .

[108] M. O. and G. W. Thomas Raab, Denis Barron, Francia Arce Vera, Vanessa Crespy, "Catechin glucosides - occurrence, synthesis and stability," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, no. 4, pp. 2138–2149, 2010.

[109] S. Gómez-Alonso, E. García-Romero, and I. Hermosín-Gutiérrez, "HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 20, no. 7, pp. 618–626, 2007.

[110] F. He, N. N. Liang, L. Mu, Q. H. Pan, J. Wang, M. J. Reeves, and C. Q. Duan, "Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression," *Molecules*, vol. 17, no. 2, pp. 1571–1601, 2012.

[111] K. C. Tseng, H. M. Chang, and J. S. B. Wu, "Degradation kinetics of anthocyanin in ethanolic solutions," *J. Food Process. Preserv.*, vol. 30, no. 5, pp. 503–514, 2006.

[112] R. Giusti, M. y Wrolstad, "Characterization and measurement of anthocyanins by UV- Visible spectroscopy," *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.*, no. August 2016, pp. 19–31, 2005.

[113] U. L. Pasteur, U. Louis, and P. Strasbourg, "The hemiacetal-cis-chalcone equilibrium of malvin, a natural anthocyanin," no. 2, 1990.

[114] F. J. Heredia, E. M. Francia-Aricha, J. C. Rivas-Gonzalo, I. M. Vicario, and C. Santos-Buelga, "Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes - I. pH effect," *Food Chem.*, vol. 63, no. 4, pp. 491–498, 1998.

[115] I. I. Rockenbach, E. Rodrigues, L. V. Gonzaga, V. Caliari, M. I. Genovese, A. E. D. S. S. Gonalves, and R. Fett, "Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (Vitis vinifera L. and Vitis labrusca L.) widely produced in Brazil," *Food Chem.*, vol. 127, no. 1, pp. 174–179, 2011.

[116] J.-M. S. and V. C. Pascale Sarni, HklZne Fulcrand, Veronique Souillol, Jean-Marc Souquet and Vkronique Cheynier* Pascale Sarni, HklZne Fulcrand, Veronique Souillol, "Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must-like solutions," *Sci. Food Agric.*, vol. 69, pp. 385–391, 1995.

[117] P. Furtado, P. Figueiredo, D. Neves, and F. Pina, "Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 75, no. 2, pp. 113–118, 1993.

[118] L. Cabrita, V. Petrovb, and F. Pina, "On the thermal degradation of anthocyanidins: cyanidin," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 36, pp. 18939–18944, 2014.

[119] O. Cikman, O. Soylemez, O. F. Ozkan, H. a Kiraz, I. Sayar, S. Ademoglu, S. Taysi, and M. Karaayvaz,

"Antioxidant Activity of Syringic Acid Prevents Oxidative Stress in l-arginine-Induced Acute Pancreatitis: An Experimental Study on Rats," *Int. Surg.*, vol. 100, no. 5, pp. 891–896, 2015.

[120] S.-Y. S. Shruti Sancheti, Sandesh Sancheti, Mayur Bafna, "2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde as a potent antidiabetic agent alleviates postprandial hyperglycemia in normal and diabetic rats," *Med. Chem. Res.*, vol. 20, no. 8, pp. 1181–1187, 2011.

[121] R. Sanna, C. Piras, F. C. Marincola, V. Lecca, S. Maurichi, and P. Scano, "Multivariate Statistical Analysis of the UV-Vis Profiles of Wine Polyphenolic Extracts during Vinification," *J. Agric. Sci.*, vol. 6, no. 12, pp. 152–162, 2014.

[122] M. Bancirova, "Changes of the Quercetin Absorption Spectra in Dependence on Solvent," *Am. Inst. Sci. Chem. J.*, vol. 1, no. 2, pp. 31–34, 2015.

[123] M. Larrosa, F. a Tomás-Barberán, and J. C. Espín, "The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway.," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 17, no. August 2016, pp. 611–625, 2006.

[124] M. I. Kaldas, U. K. Walle, and T. Walle, "Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells.," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 55, no. 3, pp. 307–312, 2003.

[125] Y. Schneider, F. Vincent, B. Duranton, L. Badolo, F. Gossé, C. Bergmann, N. Seiler, and F. Raul, "Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells," *Cancer Lett.*, vol. 158, no. 1, pp. 85–91, 2000.

[126] G. I. Lepe-Zuniga JL, Zigler JS, "Toxicity of light-exposed HEPES media," *J. Immunol. Methods*, vol. 103, no. 1, p. 145, 1987.

[127] S. Deprez, I. Mila, J.-F. Huneau, D. Tome, and A. Scalbert, "Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells," *Antioxid Redox Sign*, vol. 3, no. 6, pp. 957–67, 2001.

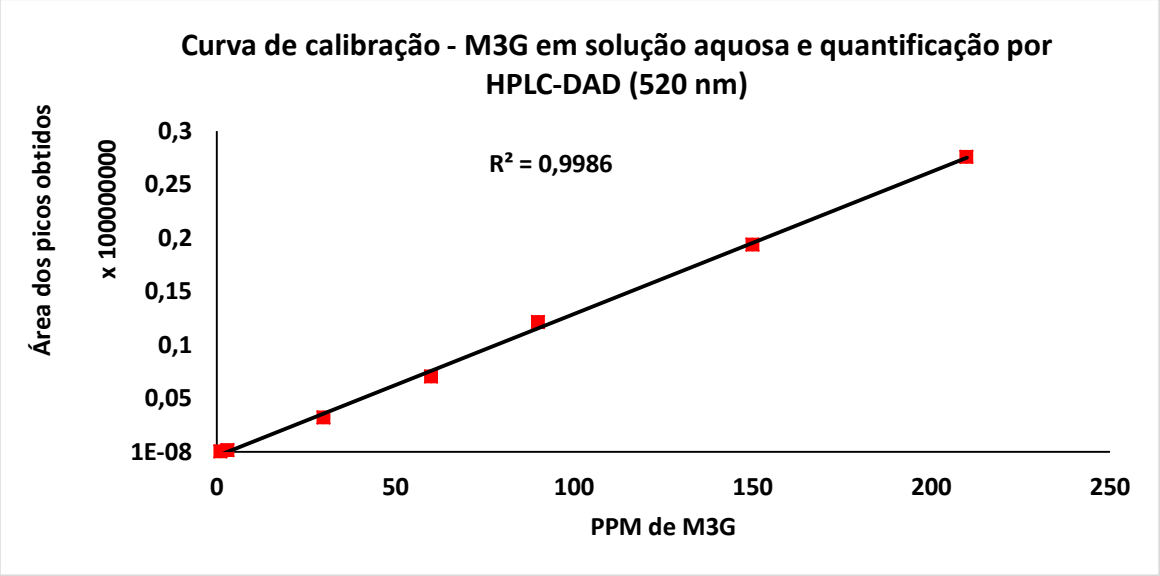
[128] G. L. S. Oliveira, "Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: Estudo de revisão," *Rev. Bras. Plantas Med.*, vol. 17, no. 1, pp. 36–44, 2015.

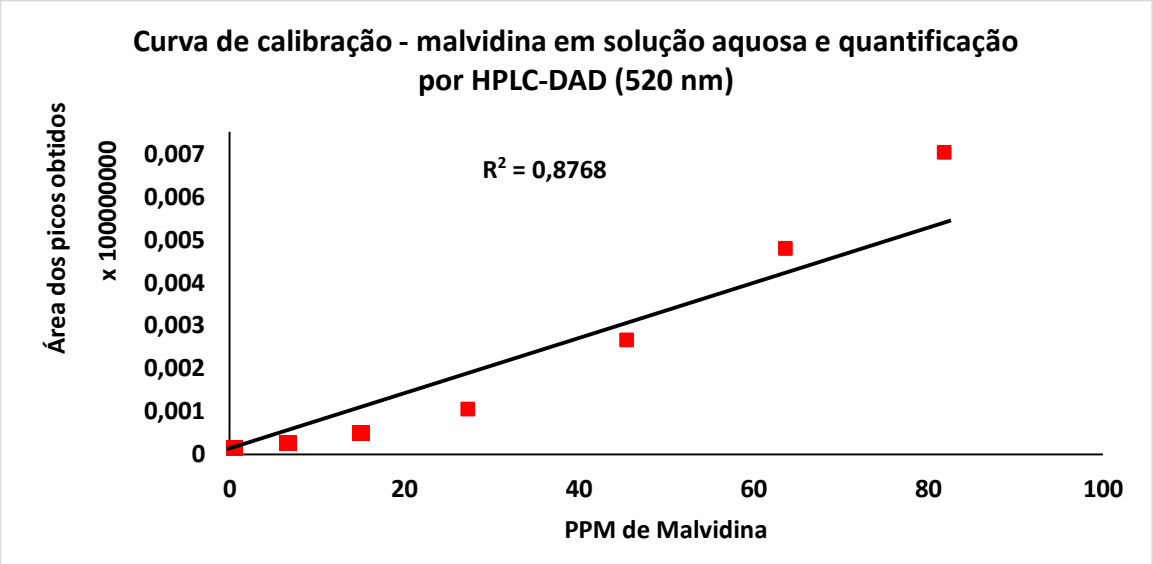
[129] C. Gauche, E. D. Malagoli, and M. T. B. Luiz, "Effect of pH on the copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts with organic acids," *Sci. Agric.*, vol. 67, no. 1, pp. 41–46, 2010.

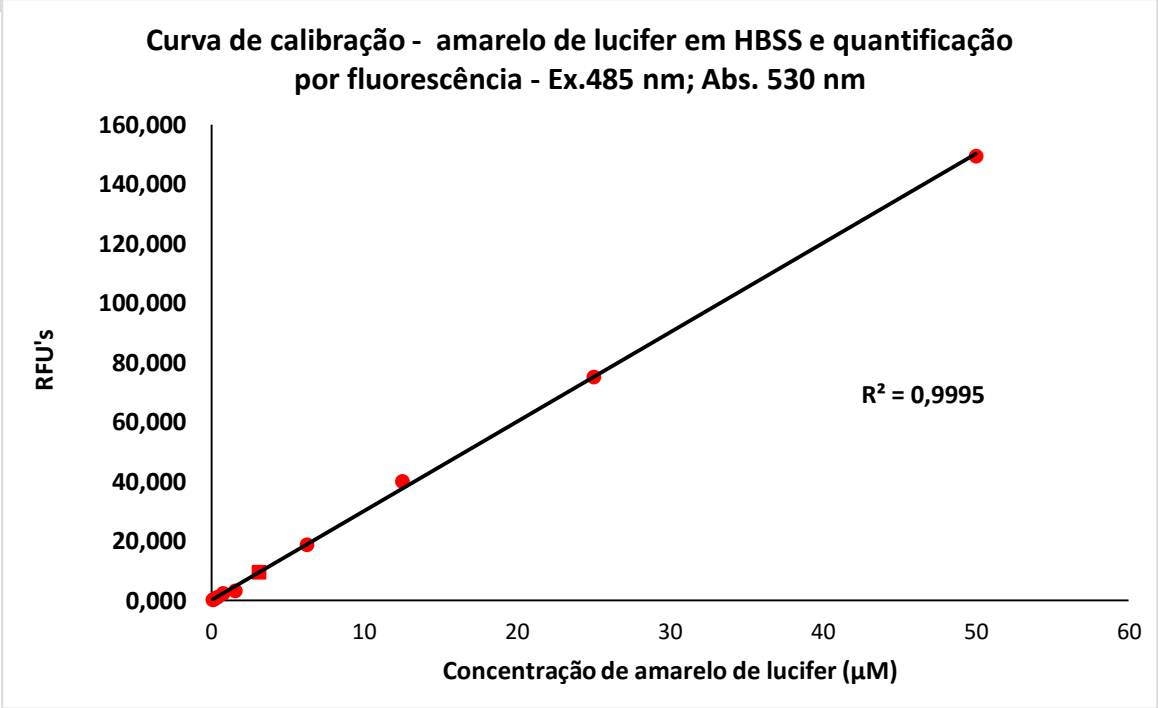
Anexos

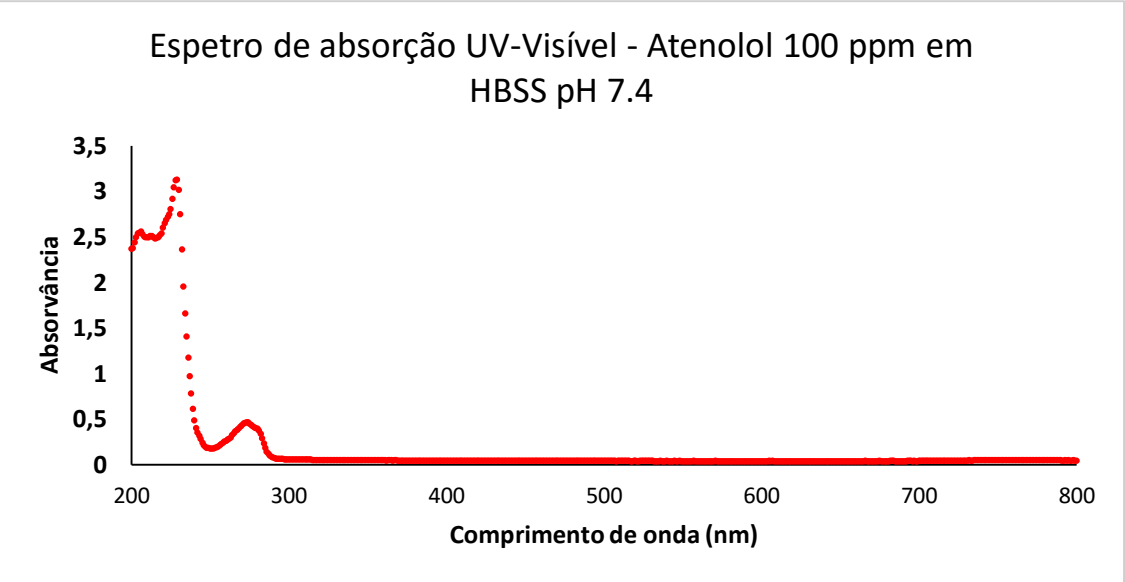
Tabela 1 – Vinhos analisados neste trabalho. Legenda – **Vinhos**: V – Verde; B – Branco; D – Derivado; R – Rosé; T – Tinto; **Casta -** A- Arinto L – Loureiro; TR-Trajadura AZ-Azal MG-Maria Gomes RO - Rabo de Ovelha CH – Chardonnay; BVV - Bica de Vinhas Velhas; ALV - Alvarinho G - Gouveio MV -Malvasia M- Moscatel ESP - Espadeiro V-Vinhão B-Borraçal TN - Touriga Nacional TF - Touriga Francesa, TB - Tinta Barroca TR - Tinta Roriz C - Castelão, TA- Tinta Amarela, TFR - Touriga Franca TC - Tinto Cão, AR - Aragonez AB - Alicante Bouschet; **Região –** VV – Vinhos Verdes; B **–** Bairrada; D – Douro; S – Setúbal;

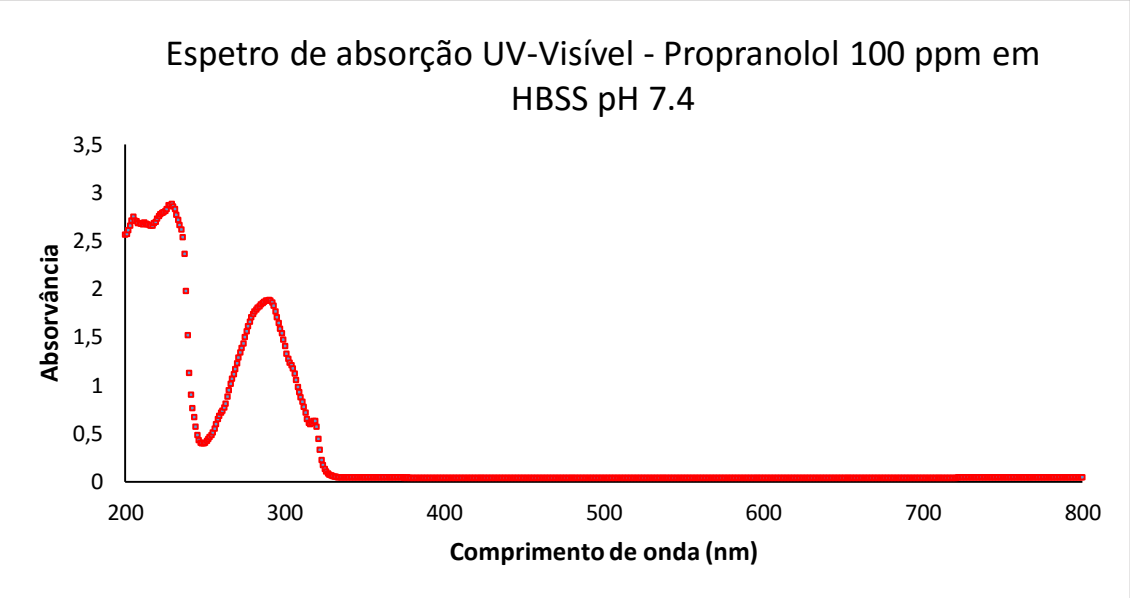
	Vinho	***Casta***	***Ano***	***Região***	***Código amostra***
Casal Garcia	V	A, L, TR, AZ	2014	VV	CG
Aveleda Reserva da Família	B	MG, RO, CH, BVV	2014	B	AVD_RSV-Fam
Aveleda Loureiro e Alvarinho	V	LR, ALV	2014	VV	AVD_LR-Alv
Aveleda	B	G, MV, M	2014	D	AVD
Quinta da Aguieira Espumante	B	CH, MG	2014	B	QT_AG_Esp
Alvarinho (Não-Comercial)	v	ALV	2014	VV	ALV
Loureiro (Não-Comercial)	v	LR, ALV	2014	VV	LR
Fernão Pires (Não-Comercial)	v	FP	2014	VV	FP
Arinto (Não-Comercial)	v	A	2014	VV	AR
Aveleda - Alvarinho	V	ALV	2014	VV	AVD-ALV
Casal Garcia Espumante	V	LR, A	2014	VV	CG_ESP VV
Aguardente Vinho Verde	D	V, AZ, B e ESP	2004	VV	AGR VV
Espadeiro Quinta da Lixa	R	ESP	2015	VV	ESP-ESP
Casal Garcia Rosé	R	V, AZ e B	2014	VV	CG_R
Casal Garcia Espumante Rosé	R	V, AZ e B	2014	VV	CG_ESP_Rose
Moscatel Favaios	D	M	2013	D	M-FV
Sangria Casal Garcia	T	ND	2015	VV	SGR-CG
Aragonez - Adega de Pegões	T	AR	2013	S	PG-AR
Vinhão - Adega Ponte da Barca	T	V	2013	VV	V-PB
Charamba Aveleda	T	TN, TF, TB e TR	2013	B	CH-AVD
Castelão Vale de Barris	T	C	2013	S	C-STB
Alicante Bouschet - Casa Ermelinda Freitas	T	AB	2012	S	AB
Follies Touriga Nacional	T	TN	2011	B	FLL-TN
Real Companhia Velha Porto	D	-	2011	D	B-VP
Follies Touriga Nacional e Cabernet Sauvignon	T	TN, CS	2011	B	FLL-TN-CS
Offley Porto	D	TA, TR, TFR, TC	2012	D	OFF
Cabernet Sauvignon (Não-Comercial)	T	CS	2015	B	CS-B
Touriga Nacional (Não-Comercial)	T	TN	2015	B	TN-B
Vinhão (Não-Comercial)	T	V	2015	B	V-B


Curva de calibração - M3G em solução aquosa e quantificação por HPLC-DAD (520 nm)
Área dos picos obtidos
x 100000000
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
1E-08
R² = 0,9986
0
50
100
150
200
250
PPM de M3G


Curva de calibração - malvidina em solução aquosa e quantificação por HPLC-DAD (520 nm)
Área dos picos obtidos
x 100000000
0,007
0,006
0,005
0,004
0,003
0,002
0,001
0
R² = 0,8768
0
20
40
60
80
100
PPM de Malvidina


Curva de calibração - amarelo de lucifer em HBSS e quantificação por fluorescência - Ex.485 nm; Abs. 530 nm
RFU's
160,000
140,000
120,000
100,000
80,000
60,000
40,000
20,000
0,000
R² = 0,9995
0
10
20
30
40
50
60
Concentração de amarelo de lucifer (µM)


Espetro de absorção UV-Visível - Atenolol 100 ppm em HBSS pH 7.4
Absorvância
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
200
300
400
500
600
700
800
Comprimento de onda (nm)


Espetro de absorção UV-Visível - Propranolol 100 ppm em HBSS pH 7.4
Absorvância
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
200
300
400
500
600
700
800
Comprimento de onda (nm)