

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO E LICENCIATURA EM QUÍMICA**

MARIÉLI KARLING

**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE VINHOS PRODUZIDOS NO SUDOESTE DO
PARANÁ**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO

2013

MARIÉLI KARLING

**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE VINHOS PRODUZIDOS NO SUDOESTE DO
PARANÁ**

Projeto referente ao Trabalho de Conclusão de Curso como requisito para a conclusão do Curso Bacharelado em Química – habilitação bacharelado da UTFPR – Campus Pato Branco.

Professora Orientadora: Dr^a. Tatiane Luiza Cadorin
Oldoni

Professora Coorientadora: Dr^a. Solange Teresinha
Carpes

Pato Branco, 2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado como: **DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE VINHOS PRODUZIDOS NO SUDOESTE DO PARANÁ** foi considerado aprovado de acordo com a ata da banca examinadora 1.13.

Fizeram parte da banca os professores:

Orientadora: Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

Co-orientadora: Dra. Solange Teresinha Carpes

Avaliador: Vanderlei Aparecido de Lima

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais que amo muito, Lauri e Elizabete, por todo carinho e apoio que me foi concedido durante toda minha vida. Foram vocês que me ensinaram a perseguir meus ideais com dedicação e coragem, e acima de tudo com muita humildade.

À minha querida irmã Janaína pelo seu companheirismo, amizade e carinho. És sem dúvidas a chave importante da minha vida. Fonte de amor incondicional.

À todos os meus grandes amigos Mauricio, Fabricio, Aline Sachs, Eloisa, Aline, Taís, Julia, Lucas, Paula, Alexandre e Larissa.

À minha amiga e confidente Tatiana Monaretto, por sua imensa ajuda em todos os momentos, sendo eles bons ou ruins.

À minha orientadora Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni por me mostrar o caminho da ciência, com muita dedicação, carinho e atenção, contribuindo assim para o meu crescimento profissional. Sua participação foi fundamental para a realização deste trabalho, e você sem dúvidas é um exemplo a ser seguido.

À Profa. Dra. Solange Teresinha Carpes, pelo fornecimento dos reagentes para a realização das análises.

Ao professor Dr. Vanderlei Aparecido de Lima pela sua imensa gentileza e disponibilidade para ser banca deste trabalho.

À Central de Análises que sempre esteve de portas abertas para a realização das análises.

Ao LAQUA, principalmente a Roberta e Carla, que sempre me auxiliaram de todas as formas possíveis e impossíveis.

Meu muito obrigada a todos!

EPÍGRAFE

“Porque ter a mente boa não é o bastante; o principal é aplicá-la bem. As maiores almas são capazes tanto das maiores virtudes quando dos maiores vícios, e aqueles que marcham lentamente podem avançar muito mais, se seguirem o caminho certo, do que os que correm, porém dele se afastam.

Descartes, Discurso sobre o Método, Parte I (1637).

O vinho é constituído de humor líquido e luz.

Galileu Galilei

RESUMO

Pesquisas comprovam que o vinho, quando consumido em quantidade moderada, contribui para a saúde do organismo atuando principalmente contra as doenças cardiovasculares e prevenindo vários tipos de câncer. Apesar de serem encontrados na literatura estudos desenvolvidos com vinhos produzidos no Brasil, são escassos resultados com vinhos produzidos na região sudoeste do Paraná, a qual vem se destacando na produção de vinhos coloniais. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo determinar o teor de compostos fenólicos totais pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, atividade antioxidante utilizando três métodos distintos, sequestro do radical DPPH, captura do radical ABTS e redução do ferro (FRAP), bem como a identificação dos principais compostos fenólicos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de vinhos produzidos nas cidades de Mariópolis e Salgado Filho – Paraná, no ano de 2011. Os vinhos analisados foram produzidos a partir da uva Bordô e todos os ensaios foram realizados em triplicata.. Os resultados encontrados para os compostos fenólicos nos vinhos artesanais produzidos em Mariópolis e Salgado Filho (PR), pelo método colorimétrico e atividades antioxidantes não diferiram estatisticamente entre si. Os compostos fenólicos totais apresentaram um valor médio de 1,83 g EAG L⁻¹. Os valores de atividade antioxidante para as amostras produzidas nas cidades de Mariópolis e Salgado Filho foram respectivamente de, de atividade antioxidante de: 7,5 mmol de Trolox L⁻¹ e 5,96 mmol de Trolox L⁻¹ para seqüestro do radical DDPH; 11,00 mmol de Trolox L⁻¹ e 9,02 mmol de Trolox L⁻¹ para seqüestro de ABTS; 6,3 mmol e 5,57 mmol de Fe²⁺ L⁻¹ para FRAP. . As amostras de vinho foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE, e foram identificados os mesmos compostos para ambas as amostras, sendo eles: ácido gálico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido cumárico, e ainda o *trans*-resveratrol Os resultados obtidos indicaram elevado teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante, justificando assim o estudo de caracterização química e biológica dos derivados da uva, o que pode contribuir e agregar valor ao produto local.

Palavras chave: vinho, atividade antioxidante, compostos fenólicos, CLAE.

ABSTRACT

Research has shown that wine, when consumed in moderate amounts, contributes to the health of the body acting mainly against cardiovascular disease and preventing various types of cancer. Although they are found in the literature developed with wines produced in Brazil, there are few results with wines produced in the southwestern region of Paraná, which has been excelling in the production of wines colonial. In this context, this study aimed to determine the content of phenolic compounds by the colorimetric method of Folin-Ciocalteu, antioxidant activity using three different methods, sequestration DPPH, ABTS radical capture and reduction of iron (FRAP) as well as identification of the main phenolic compounds using high performance liquid chromatography (HPLC) of wines produced in the cities of Mariópolis and Salgado Filho - Paraná, in the year 2011. Analyzed wines were produced from grapes Bordô and all assays were performed in triplicate. The results for the phenolic compounds in wines produced in artisanal Mariópolis and Salgado Filho (PR), the colorimetric method and antioxidant activities did not differ statistically. The phenolic compounds showed an average value of 1.83 g EAG L⁻¹. The antioxidant activity values for samples produced in the cities of Mariópolis and Salgado Filho were respectively, for antioxidant activity: 7.5 mmol of Trolox L⁻¹ and 5.96 mmol L⁻¹ for Trolox sequestration radical DDPH; 11.00 mmol L⁻¹ Trolox and Trolox 9.02 mmoles of L⁻¹ for sequestration ABTS, 6.3 mmol and 5.57 mmol Fe²⁺ L⁻¹ to FRAP. The wine samples were subjected to high performance liquid chromatography, HPLC, and the same compounds have been identified for both samples, namely: gallic acid, vanillic acid, caffeic acid, coumaric acid, and further trans-resveratrol. The results indicate a high content of phenolic compounds and antioxidant activity, thus justifying the study of chemical and biological characterization of the grape, which can contribute and add value to local produce.

Keywords: wine, antioxidant activity, phenolic compounds, HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do fenol	19
Figura 2 - Estrutura genérica de uma molécula de flavonoide.	20
Figura 3 - Estrutura geral dos ácidos hidroxibenzoicos	21
Figura 4 - estrutura geral dos ácidos hidroxicinâmicos	21
Figura 5 - Estrutura química do <i>trans-resveratrol</i>	22
Figura 6 - Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante.	25
Figura 7 - Formação do radical estável com persulfato de potássio e reação com antioxidante.	26
Figura 8 - Redução do complexo TPTZ com Fe ³⁺	27
Figura 9 - Cromatograma obtidos para os padrões. (a) Detector arranjo de diodos 1 – ácido gálico, 2- ácido vanílico, 3 - ácido caféico, 4 – ácido cumárico, 5 – ácido ferrulico 6 - <i>trans-resveratrol</i> e b) detector de fluorescência 6 - <i>trans-resveratrol</i>	33
Figura 10 - Cromatograma da amostra de vinho da cidade de Mariópolis: 1 - gálico, 2 - vanílico, 3 - cafeico, 4 - cumárico, 5 - <i>trans-resveratrol</i>	34
Figura 11 - Cromatograma da amostra de vinho produzido na cidade de Salgado Filho: 1 – ácido gálico, 2 – ácido vanílico, 3 – ácido cafeico, 4 – ácido cumárico, 5 - <i>trans-resveratrol</i>	34
Figura 12 - Cromatograma da amostra de vinho da cidade de Salgado Filho sobreposto com o Mix de padrões dos compostos fenólicos no detector de fluorescência : 1 - <i>trans-resveratrol</i>	35
Figura 13 - Cromatograma da amostra de vinho da cidade de Mariópolis sobreposto com o Mix de padrões dos compostos fenólicos no detector de fluorescência : 1 - <i>trans-resveratrol</i>	35
Figura 14 – Sobreposição dos cromatogramas das amostras de vinho de Salgado Filho	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1 HISTÓRIA DO VINHO	13
3.2 VINHOS E SAÚDE	14
3.3 VITIVINICULTURA	16
3.3.1 Vitivinicultura no Sudoeste do Paraná.....	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS	27
4.2 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	27
4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	28
4.3.1 Atividade Antioxidante pelo Sequestro do Radical DPPH•	28
4.3.2 Atividade antioxidante através da captura do radical livre ABTS•+	28
4.3.3 Atividade Antioxidante pelo método de redução do Ferro FRAP	29
4.4 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS UTILIZANDO CLAE	29
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
5.1 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	30
5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	31
5.4 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENOLICOS UTILIZANDO CLAE	32
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
7 REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

A partir dos anos 80, houve um aumento considerável na procura por alimentos naturais que proporcionem uma melhor qualidade de vida (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Este crescente interesse tem impulsionado pesquisas voltadas para o descobrimento de compostos bioativos, os quais se encontram presentes em alimentos naturais (MELLO, 2009; SAUTTER et al., 2005)

Nos últimos anos os compostos que apresentam atividade antioxidante tem recebido atenção especial por apresentarem capacidade de seqüestrar os radicais livres, que são responsáveis por diversos danos à saúde (OLDONI, 2007). Além disso, estudos demonstram que o consumo diário de substâncias antioxidantes pode proteger o organismo contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem, estando relacionados processos responsáveis pelo envelhecimento do corpo além de desencadear doenças (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Dentre esses compostos se destacam os compostos fenólicos, que apresentam capacidade de seqüestrar radicais livres e quelar íons metálicos que catalisam reações de oxidação (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Pesquisas comprovam que o vinho, quando consumido em quantidade moderada, contribui para a saúde do organismo aumentando a qualidade e o tempo de vida, atuando principalmente contra as doenças cardiovasculares e prevenindo vários tipos de câncer (SAUTTER et al., 2005). Devido às suas inúmeras propriedades biológicas e nutricionais, os vinhos e sucos de uva atualmente têm conquistado o mercado brasileiro (PINTO et al., 2011).

Segundo Protas, Camargo e Melo (2008) entre algumas características da vitivinicultura brasileira duas se destacam: sua diversidade e complexidade. Existem diversas vitiviniculturas no Brasil, cultivadas em climas, com tecnologias, processos e solo diferentes, o que resulta em produtos com características diferenciadas. A principal região produtora de vinhos do estado do Paraná é o Norte, contudo as outras regiões também vêm ganhando espaço nesse cenário. Apesar de serem encontrados na literatura estudos desenvolvidos com vinhos produzidos no Brasil, são escassos resultados com vinhos produzidos na região sudoeste do Paraná, a qual vem se destacando na produção de vinhos coloniais.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo determinar o teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante utilizando três métodos distintos: sequestro do

radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazina (DPPH), 2,2 – azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) (ABTS) e redução do ferro (FRAP), bem como identificar os principais compostos fenólicos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em vinhos produzidos nas cidades de Mariópolis e Salgado Filho – Paraná.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a atividade antioxidante utilizando três métodos distintos: sequestro do radical DPPH, captura do radical ABTS e redução do ferro (FRAP), o teor de compostos fenólicos totais pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu e otimizar metodologia analítica pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para identificar os principais compostos fenólicos encontrados em vinhos produzidos nas duas cidades que se destacam em produção no sudoeste do estado do Paraná, safra 2011.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar os vinhos tintos nas cidades de Salgado Filho e Mariópolis, safra de 2011;
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu;
- Avaliar as propriedades antioxidantes utilizando os seguintes métodos analíticos distintos: sequestro do radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazina (DPPH), 2,2 – azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) (ABTS); redução do ferro (FRAP);
- Otimizar a metodologia analítica para identificar os principais ácidos fenólicos – gálico, vanílico, cafeico, cumárico, ferulico – e o estilbeno *trans*- resveratrol utilizando a técnica CLAE.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 HISTÓRIA DO VINHO

De todos os alimentos e bebidas conhecidos até hoje, o vinho talvez seja a mais rica historicamente e culturalmente (PHILLIPS, 2005). Não se sabe ao certo quando foi descoberto ou a idade certa do vinho, mas pesquisadores datam essa bebida de aproximadamente sete mil anos (JONHSON, 1989; GALLICE, 2010). Sabe-se também que as sementes de uvas mais antigas foram encontradas na Turquia, Líbano e Jordânia a aproximadamente 8000 a.C. Foram encontradas também na Rússia sementes datadas de 7000 – 5000 a.C (JONHSON, 1989).

Em suma, o vinho tem grande espaço na história, fazendo parte da agricultura, indústria, do comércio, das regulamentações estatais e ainda da medicina, religião e cultura (PHILLIPS, 2005).

Do ponto de vista econômico desde muito tempo se apresenta importante. Os países com maior destaque na produção de vinhos são França, Itália, Espanha e Portugal. Países como Chile e Austrália vem ganhando destaque na exportação do produto (PHILLIPS, 2005). Contudo deve-se observar que nos dias de hoje vinhos são produzidos em lugares que antigamente eram inaceitáveis, como por exemplo, Canadá, Estados Unidos e Nova Zelândia (PHILLIPS, 2005).

Desde a antiguidade, o vinho apresenta-se ligado à medicina, desempenhando sempre um papel principal. Os primeiros praticantes da arte da cura, chamados muitas vezes de curandeiros ou até mesmo religiosos, utilizavam o vinho como remédio. Papiros do Egito antigo e tábuas dos antigos Sumérios (cerca de 2200 a.C.) já traziam receitas baseadas em vinho, tornando assim a mais antiga prescrição médica documentada (VIDA E SAÚDE, 2011; PHILLIPS, 2005).

Desde a antiguidade o vinho passou a fazer parte da dieta alimentar humana, trazendo junto com resinas de árvores importantes benefícios para a saúde, logo sendo conhecidos como importantes propriedades medicinais e terapêuticas. Já nessa época foi sugerido que as sociedades que bebiam vinho eram mais saudáveis do que aquelas que não bebiam (PHILLIPS, 2005).

Pode-se dizer que as descobertas de Louis Pasteur (1822-1895) sobre microorganismos e o processo de fermentação, foram o grande marco para o

desenvolvimento da enologia moderna. O século XX presenciou grandes avanços tecnológicos nos vinhedos e nas vinícolas. Nos anos 70, constatou-se que o Novo Mundo era capaz de competir com as regiões clássicas Europeias na alta qualidade de vinhos. Ao mesmo tempo, a produção em grande escala resultou em queda na qualidade, mas os anos 80 e 90 trouxeram novos progressos técnicos e o novo milênio anunciou qualidade e confiabilidade. Nos anos 90, percebeu-se que os bons vinhos não resultam apenas de um bom processo de fabricação, mas também de cuidados com os vinhedos. A poda para garantir safras pequenas, o equilíbrio entre a vinha e seu ambiente e a viticultura aumentam a qualidade do produto final (JONHSON, 1989; GALLICE, 2010).

3.2 VINHOS E SAÚDE

O vinho é resultado de um processo natural de fermentação e é definido pela Office International de la Vigne et du vin (OIV) como “bebida resultante da fermentação do mosto (suco) de uvas frescas”.

Segundo Jonhson (1989) a fermentação é um processo bioquímico, realizada por microorganismos que convertem moléculas de carboidratos (açúcares) em álcool, gás carbônico e energia.

Para Gallice (2010) a produção de vinhos é um sensível conjunto de procedimentos e reações que influenciam diretamente sua consistência, sabor e aroma. Os principais processos na produção de vinhos são: maturação, esmagamento e desengajo das uvas, adição de leveduras ao mosto, maceração, fermentação, clarificação, filtração, engarrafamento e envelhecimento (GALLICE, 2010; JONHSON, 1989).

Os elementos químicos do vinho são todos encontrados dentro ou na casca da uva. A polpa da uva contém água, açúcar e pectina; a casca fornece o tanino, o fermento e o pigmento aos vinhos tintos e rosé. Durante o processo, o que acontece é o açúcar sendo transformado em álcool e em dióxido de carbono. Porém a uva não fermenta espontaneamente e a intervenção do homem é necessária para esmaga - lá e controlar a temperatura. O vinho deve ficar protegido do ar e guardado em barris, tanques ou garrafas para impedir que se transforme em vinagre. O sabor e qualidade do vinho é resultado principalmente do tipo de uva utilizada, é também

influenciado pelo solo em que a videira é plantada e indiscutivelmente muitas características como aspecto, aroma e sabor são resultantes da vinificação. Contudo, 90% da qualidade do vinho está associada à uva (PHILLIPS, 2005; GALLICE, 2010).

Estudos indicam que existe uma correlação inversa entre consumo moderado de vinhos tintos e doenças cardiovasculares. O vinho desperta interesse dos cientistas por apresentar uma vasta gama de substâncias (aproximadamente 500) até agora identificadas, destacando a presença de oxidantes, redutores e catalisadores, bem como compostos fenólicos, taninos e antocianinas, podendo estes intervir no sabor, textura e cor. E ainda pode-se dizer que os vinhos são ricos em compostos com grande atividade antioxidante. Estudos clínicos e *in vitro* mostram múltiplos efeitos biológicos relacionados aos compostos fenólicos da dieta, tais como: atividades antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica, sendo que a ingestão de 25 a 50 mg de compostos fenólicos por dia pode proporcionar menor risco de doenças do coração (ABE et al., 2007; GALLICE, 2010; CABRITA; SILVA; LAUREANO, 2003; JANG et al., 1997).

Como descreve Penna e Hecktheuer (2004) os europeus utilizam o vinho como uma complementação alimentar, pois este contém carboidratos, vitaminas e minerais, provenientes da uva. Além da água (80 a 85% do volume), a bebida ainda fornece ao organismo energia na forma de açúcares, como glicose e frutose. Entre os minerais, destacam-se o potássio, o cobre, o zinco, o flúor, o magnésio, o alumínio, o iodo, o boro e o silício que, mesmo em quantidades pequenas, são indispensáveis para que o organismo execute bem todas suas funções. Além destes constituintes, o vinho também pode conter algumas vitaminas, como, por exemplo, a biotina, o ácido pantotênico, a niacina, a tiamina e o ácido ascórbico.

As uvas são consideradas uma das maiores fontes de compostos fenólicos quando comparadas a outras frutas e vegetais, porém a grande diversidade entre as cultivares resulta em uvas com diferentes características, tanto de sabor quanto de coloração, o que certamente está associado com o conteúdo e o perfil dos fenólicos. Por ser a matéria-prima para a produção de vinhos e sucos, é importante conhecer os teores de compostos fenólicos das uvas, pois estes podem influenciar a qualidade dos produtos finais (ABE et al., 2007).

Em 1989, um estudo da Organização Mundial de Saúde mostrou correlação significativa entre consumo de gorduras saturadas e mortalidade por doença

aterosclerótica coronária (DAC). A única discrepância era representada pela França, onde, apesar do elevado consumo de laticínios, a proporção de DAC era relativamente baixa. O fato foi atribuído ao consumo regular de vinho tinto nesse país, consumidos regularmente durante as refeições, que aumentam o HDL (lipoproteína de alta densidade), diminuindo com isso o LDL (lipoproteína de baixa densidade) no sangue. Esse curioso dado estatístico ficou conhecido como “Paradoxo Francês” (ABE et al., 2007; CERQUEIRA; GENNARI; OHARA, 2007).

3.3 VITIVINICULTURA

Dados históricos apontam que as primeiras videiras foram trazidas para o Brasil, mais precisamente na então Capitania de São Vicente, hoje estado de São Paulo. Logo, a vitivinicultura foi levada para outras regiões do país (MELLO, 2009).

A vitivinicultura atualmente é uma atividade importante para a sustentabilidade da pequena propriedade rural no Brasil. Nos últimos anos tem se tornado importante fonte na geração de empregos, em grandes empreendimentos para produção de uvas para consumo *in natura* e uvas para o processamento de vinhos e sucos (MELLO, 2012).

Segundo a União Brasileira de Vitivinicultura, o consumo de vinho no Brasil vem aumentando consideravelmente. Em 2009 foram produzidos no Brasil um total de 1.345.719 toneladas de uva. Em 2011 a produção de uvas destinadas ao processamento aumento cerca de 50%, isso devido ao fato de as condições climáticas nesse ano serem extremamente favoráveis, o restante da produção foi destinada ao mercado de uva *in natura* (MELLO, 2012).

Como mostra dados estatísticos do IBGE, sobre a produção de uvas no ano de 2011, houve um crescimento de aproximadamente 13% na produção de uvas, sendo que o maior aumento na produção aconteceu no estado de Pernambuco (24%). O Paraná e Santa Catarina também entraram nos estados em que foi observado um aumento na produção. Já na Bahia houve redução de 21% na produção de uvas. Nos estados de São de Paulo e Minas Gerais pode-se observar um pequeno declínio também na produção.

No Brasil, o Rio Grande do Sul representa a maior produtora de uvas e vinhos do país, concentrando mais de 90% da produção vinícola. A maior parte dessas

vinícolas está localizada na Serra Gaúcha, região de montanha ao norte no estado, onde se destacam as cidades de Bento Gonçalves, Garibaldi e Caxias do Sul, seguidas de Flores da Cunha, Farroupilha e Canela, e o restante está localizado em Erechim, no noroeste do estado (MELLO, 2009).

No fim do século XX, o mundo tinha mais de oito milhões de hectares de vinhas e produzia quase 300 milhões de hectolitros de vinho. Do Chile a África do Sul, Nova Zelândia e China, os melhores vinhos atualmente são produzidos na região global (GALLICE, 2010).

3.3.1 Vitivinicultura no Sudoeste do Paraná

A viticultura, na Região Sudoeste do Paraná, teve início junto com a colonização, quando imigrantes vindos do estado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina ocuparam as terras disponíveis, formaram famílias e desenvolveram seus costumes, entre eles, a cultura da videira e a fabricação do vinho e outros derivados de uva. No entanto, somente a partir da década de 1990 que essa prática se transformou em uma alternativa de renda e foco de investimentos produtivos (ZARTH et al., 2011).

Segundo o IBGE, a região do estado do Paraná que vem se destacando na produção de vinhos é a região sudoeste. Atualmente é composta por mais de 1300 viticultores, onde cultivam anualmente 1100 ha de uva, cerca de 300 produtores produzem 1.500.000 L/ano de vinho em pequenas e médias cantinas. Além da produção de vinho no sudoeste do estado do Paraná, tem havido o aumento na produção e consumo de suco de uva nos últimos anos, passando de 150 mL per capita em 1995 para 480 mL em 1998, situando-se em 390 mL per capita, em 2003 (SANTANA et al., 2008).

Porém o produto local ainda não é tão valorizado. Segundo Souto et al., (2001) vinhos de diversos países apresentaram valores médios de resveratrol de: Canadá, 0,77 mg.L⁻¹, EUA, 0,998 mg.L⁻¹, Grécia, 0,873 mg.L⁻¹, Japão, 0,157 mg.L⁻¹, Portugal, 1,00 mg.L⁻¹, Chile e Argentina, 1,21 mg.L⁻¹, enquanto os vinhos produzidos na serra gaúcha mostraram teores médios de 1,78 mg.L⁻¹, confirmando a presença de elevada atividade antioxidante nos vinhos produzidos no Rio Grande do Sul.

Estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar a atividade antioxidante de vinhos e sucos de uva (DÁVALOS; BARTOLOMÉ; GÓMEZ-CORDOVÉS., 2005; SANCHEZ-MORENO, 2003; DANI; OLIBONI; VANDERLINDE, 2007; MULERO, et al., 2011), no entanto, no Brasil existem poucos estudos sobre o conteúdo de resveratrol e atividade antioxidante de sucos e vinhos, principalmente daqueles produzidos nos estados do Paraná e Santa Catarina, o qual demonstra importância deste estudo para a caracterização do produto local.

3.4 COMPOSTOS FENOLICOS

Como cita Gallice (2010) “os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, na forma simples ou de polímeros, o que lhes confere uma estrutura antioxidante”. Eles estão presentes em grande escala na natureza e são responsáveis geralmente pelas propriedades organolépticas e coloração de muitas frutas e flores, podendo ainda contribuir com propriedades benéficas para o organismo humano. Pode-se dizer que a qualidade de alguns alimentos, principalmente bebidas alcoólicas e sucos, tem relação direta com a presença de algumas substâncias fenólicas em sua composição (ROSSATO et al., 2000; CERQUEIRA; GENNARI; OHARA, 2007).

Os compostos fenólicos são heterogêneos e apresentam em sua estrutura vários grupos benzênicos característicos, substituídos por grupos hidroxilas (Figura 1) (SOARES, 2008). O composto mais comum é o fenol simples que é o resultado da descarboxilação de ácidos fenólicos (SOARES, 2008). As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio. A atividade dos antioxidantes depende de sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais) (MAMEDE; PASTORE, 2004).

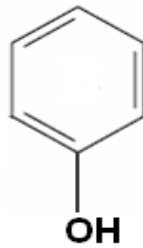


Figura 1 – Fórmula estrutural do fenol

As plantas sintetizam centenas de compostos fenólicos, que possuem variadas estruturas e funções. Os compostos fenólicos são classificados como flavonoides e não-flavonoides. Do primeiro grupo fazem parte os flavonóis (catequina, epicatequina e epigallocatequina), não-flavonoideis (caempferol, quercetina e miricetina) e antocianinas, e ao segundo grupo pertencem os ácidos fenólicos, hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos. Além destes compostos, pode-se encontrar também o resveratrol pertencente à classe dos estilbenos (ABE et al., 2007). Os compostos fenólicos podem ser encontrados nos vegetais na forma complexa ligados a açúcares (glicosilados) e proteínas, ou na forma isolada (agliconas) (GALLICE, 2010; CERQUEIRA; GENNARI; OHARA, 2007; ABE et al., 2007).

A uva é uma fruta que apresenta muitas classes de compostos fenólicos, sendo que os principais são os grupos dos flavonoides (antocianinas e flavanóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos) e uma larga variedade de taninos (MALACRIDA; MOTTA, 2004). Dentre todos os compostos fenólicos das uvas, o resveratrol tem atraído atenção especial nas últimas décadas em resultados a estudos epidemiológicos que mostram correlação inversa entre o consumo moderado de vinho e doenças cardiovasculares. Os estudos com resveratrol tiveram início a partir de investigações relacionadas à dieta francesa chamada de 'Paradoxo Francês' (ABE et al., 2007).

Segundo Soares (2008), "os compostos fenólicos agem como antioxidantes não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também por causa de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de ácidos graxos e óleos".

3.4.1 Flavonoides

A palavra flavonoide é originada do latim *flavus*, que significa amarelo, e era designada inicialmente somente para compostos que apresentassem coloração amarela. Atualmente sabe-se que os grupos pertencentes a essa classe incluem compostos de várias colorações ou até mesmo incolores. Estes compostos absorvem radiações na região do ultravioleta e do visível desempenhando assim o papel de defesa nas plantas contra as radiações solares, podendo também apresentar uma barreira química contra micro-organismos (PETERSON; DWYER, 1998; RICE-EVANS, 2004).

Os flavonoides são os compostos mais abundantes na dieta humana por serem encontrados em grande variedade e frutas, hortaliças, chá preto, vinho, suco de uva, pólen, própolis, entre outros. Calcula-se que existem cerca de 5000 flavonoides com estruturas diferentes, mas que apresentam como estrutura básica o núcleo flavânico, (Figura 2) (BEHLING, 2007; OLDONI, 2010).

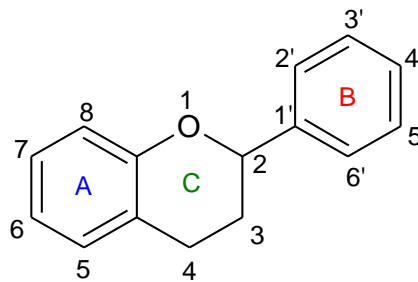


Figura 2 - Estrutura genérica de uma molécula de flavonoide.

As diferentes classes dos flavonoides estão relacionadas com as características do anel C como a presença ou ausência do anel central, hidroxilas ou duplas ligações ligadas a este (OLDONI, 2010). Os principais flavonoides encontrados na natureza são: antocianidina, flavonóis, flavonas e as flavanonas.

3.4.2 Ácidos Fenólicos

Como destaca Stalikas (2007) “o termo ácido fenólico é denominado aos fenóis que apresentam ácidos carboxílicos”. Estes são divididos em dois grupos que apresentam estruturas diferentes, são eles os hidroxibenzóicos e os hidroxicinâmicos. Apesar de apresentarem estruturas semelhantes, estas se

diferenciam pelo número e posição da hidroxila no anel aromático (STALIKAS, 2007).

3.4.2.1 Ácido hidroxibenzoico e hidroxicinâmicos

Os ácidos pertencentes ao grupo do ácido hidrobencóico e do ácido hidroxicinâmico tem origem nas estruturas gerais expostas nas figuras 3 e 4 (As letras R significam o grupo OH substituinte).

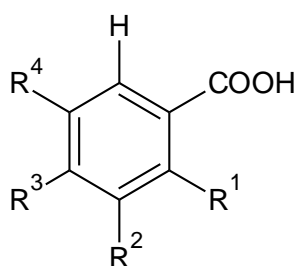


Figura 3 - Estrutura geral dos ácidos hidroxibenzoicos

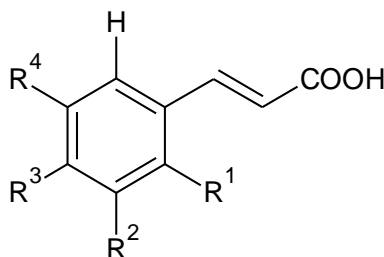


Figura 4 - estrutura geral dos ácidos hidroxicinâmicos

No grupo dos ácidos hidroxibenzoicos (Figura 3), compostos que possuem grupo carboxílico ligado ao anel aromático, destacam-se os ácidos protocatecuíco, vanílico, siríngico, salicílico, elágico e gálico. Esses dois grupos de ácidos fenólicos têm apresentado propriedades antioxidantes (HARBORNE, 1973). Embora outras características também contribuam para a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e seus ésteres, esta é, geralmente, determinada pelo número de hidroxilas presentes na molécula (RAJALAKSMI; NARASIMHAN, 1995).

Os derivados do ácido hidroxicinâmico são compostos fenólicos que possuem um anel aromático com uma cadeia carbônica, constituída por três carbonos ligada ao anel. Os ácidos p-cumárico, ferúlico, caféico e sináptico são os hidroxicinâmicos mais comuns na natureza. Estes ácidos existem nas plantas, geralmente na forma de ésteres, como por exemplo o ácido clorogênico. Também são encontrados na

forma de glicosídeos ou ligados a proteínas e a outros polímeros da parede celular e, as vezes se apresentam, como ácidos livres (BELITZ; GROSCH, 1988; DURÁN ; PADILLA, 1993; HARBORNE, 1973).

3.4.3 Grupo dos estilbenos – *trans*-resveratrol

O resveratrol é o estilbeno prioritário e que se apresenta em maiores concentrações em uvas tintas e seus derivados, como o vinho e suco (MONAGAS et al., 2005). O resveratrol ocorre em duas formas isoméricas (*trans* e *cis*), o *trans* resveratrol ou 3,5,4'-trihidroxistilbeno (Figura 5) é a forma mais abundante e está localizado principalmente na casca das uvas (WANG et al., 2002). Como descreve VACCARI et al., 2009:

A atividade antioxidante do *trans*-resveratrol está relacionada com sua estrutura química, especialmente o número e o arranjo dos grupos hidroxilas livres nos anéis aromáticos. Influem também o seu tamanho, massa e forma, assim como sua estereoquímica. Sua função “protetora” está relacionada com a doação de hidrogênios das hidroxilas para os radicais livres.

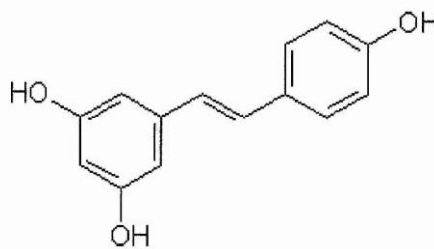


Figura 5 - Estrutura química do *trans*-resveratrol

O *trans*-resveratrol é, um componente sintetizado pela videira em resposta a uma situação de estresse, como o ataque de alguns micro-organismos patogênicos. O *trans*-resveratrol é encontrado nos vinhos tintos em concentrações muito variadas. Essa substância antioxidante concentra-se nas células da película da uva, por isso seu teor é maior nos vinhos tintos (VACCARI, 2009; SAUTTER et al., 2007).

No grão de uva, a síntese de resveratrol é principalmente iniciada na casca e é ausente ou em baixíssima concentração na polpa da fruta (JEANDET et al., 1991; KALLITHRAKA et al., 2005). A concentração de resveratrol aumenta durante a

fermentação em presença da casca, mas esta quantidade é dependente da variedade da uva e das condições enológicas de processamento (OKUDA, YOKOTSUKA, 1996; LAMUELA-RAVENTOS et al., 1995; KALLITHRAKA et al., 2005). A extração do resveratrol da casca pode ser facilitada com o etanol produzido durante o processo de fermentação (THRELFALL et al., 1999).

O *trans*-resveratrol tem mostrado importantes propriedades biológicas entre elas: antimicrobiana, antifúngica e antioxidante, além de inibir a oxidação lipídica, diminuir a mortalidade por doenças cardiovasculares em populações que apresentam um consumo moderado e regular de vinho e capacidade protetora contra o câncer, devido a sua ação antioxidante, antimutagênica e anti-inflamatória (VACCARI et al., 2007; SAUTTER et al., 2007).

3.5 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, por meio de vários mecanismos, como a inibição de radicais livres e complexação de metais (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Uma definição de antioxidante foi descrita por Halliwell (1996), como: "qualquer substância que diminui ou previne significativamente a oxidação de outra substância, sempre que presente em menor concentração quando comparada a substância oxidável de interesse".

Os antioxidantes podem ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em alimentos, devem ser seguros para a saúde. Alguns dos antioxidantes sintéticos mais importantes são hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT) e entre os naturais destacam-se ácido ascórbico, vitamina E e β -caroteno (HALLIWEL et al., 1996).

Estudos têm demonstrado que o consumo de antioxidantes na dieta diária pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo. Estas substâncias também estão ligadas com processos responsáveis pelo envelhecimento do corpo (DEGÁSPARI, 2004).

Atualmente o interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico, tem aumentado consideravelmente, com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos, os quais têm

sido restringidos devido ao seu potencial de carcinogênese, bem como pela comprovação de diversos outros males (DEGÁSPARI, 2004).

3.5.1 Métodos de análise de atividade antioxidante

Muitas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, permitindo assim uma seleção rápida de substâncias que tem uma capacidade biológica potencial. Não existe apenas um método preciso para uma determinada substância, isso ocorre pelo fato de que existe uma grande variedade de radicais livres e várias formas de ação no organismo. Portanto, quanto mais métodos forem utilizados para caracterizar e quantificar uma substância melhor, pois cada técnica apresenta uma matriz com reações e princípios diferentes, podendo assim agir de forma diferenciada para cada substância (ALVES et al., 2010; MELO, 2010).

Dentre os métodos mais utilizados três se destacam neste trabalho: sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), poder antioxidante de redução do Ferro (FRAP) e captura do radical livre ABTS^{•+}.

O método de DPPH consiste em inibir os radicais DPPH, baseando-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Pode-se verificar através da estrutura do DPPH (Figura 6) que o composto pode aceitar um elétron ou radical hidrogênio para então se transformar em uma molécula estável. O DPPH apresenta uma absorção característica no comprimento de onda de 517 nm, e em solução orgânica possui uma coloração violenta intensa. A partir da redução do radical DPPH por um antioxidante, seu elétron se torna emparelhado, diminuindo assim sua absorvidade, transformando-se de uma coloração violeta para amarela. O DPPH é uma radical que não reage com flavonoides que não apresentam grupos – OH no anel B, bem como ácidos aromáticos contendo apenas um grupo – OH (ROGINSKI ; LISSI, 2005).

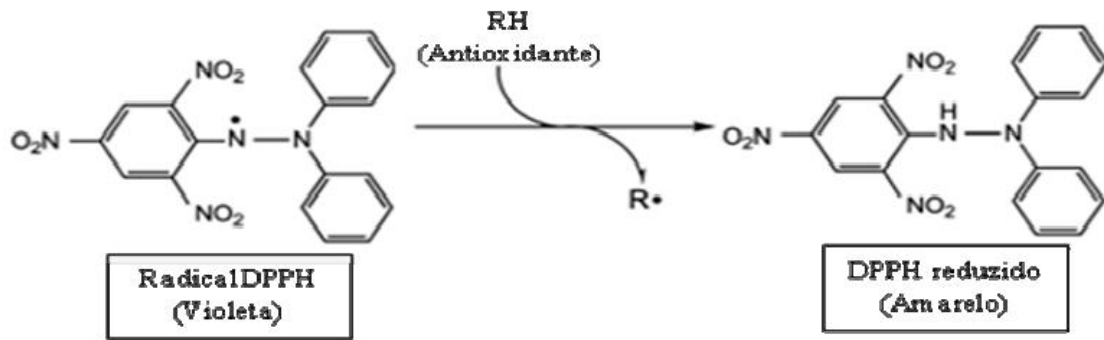


Figura 6 - Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante.
Fonte: Moon e Shibamoto (2009).

Já o método de captura do radical $ABTS^{•+}$ reage com qualquer composto aromático hidroxilado, podendo reagir com grupos $-OH$ que não contribuem com a atividade antioxidante. É um composto que reage em solução aquosa. O radical $ABTS^{•+}$ apresenta uma cor esverdeada e é formado pela redução do ABTS pelo persulfato de potássio. Ao reagir com os antioxidantes presentes na amostra, o radical vai descolorindo e esse decaimento de coloração é medido pela absorbância a 734 nm (Figura 7) (Re et al., 1999).

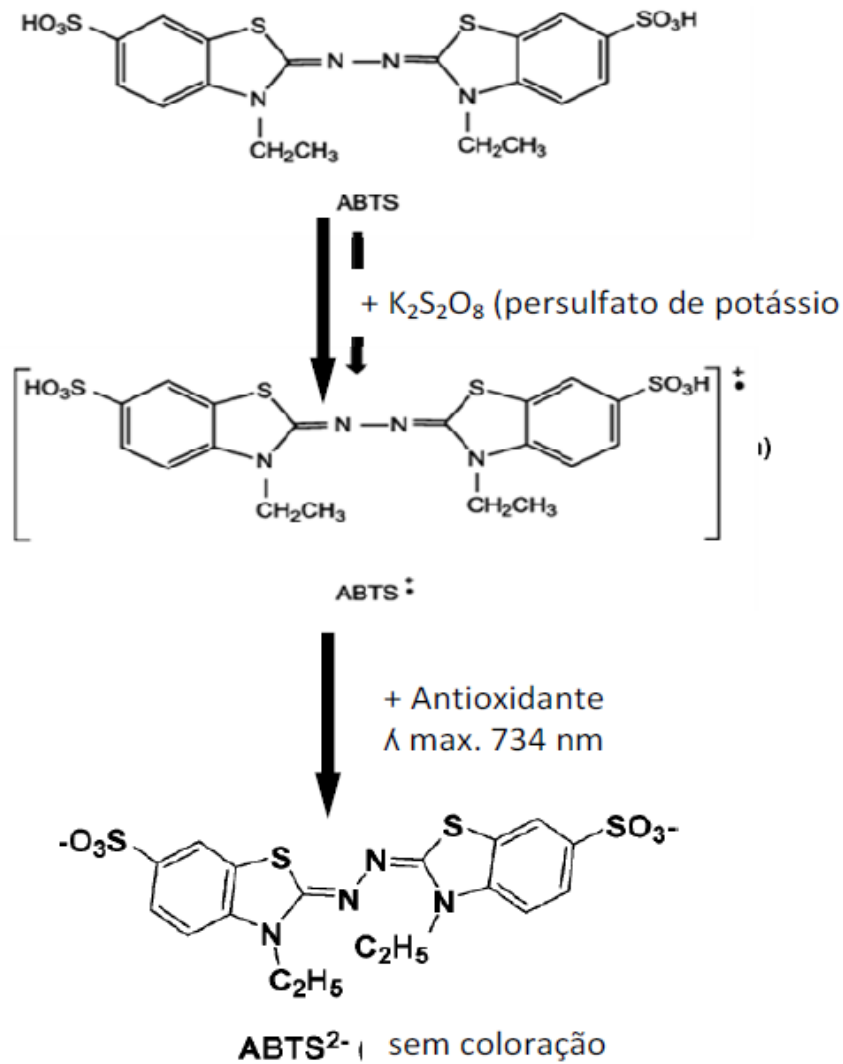


Figura 7 - Formação do radical estável com persulfato de potássio e reação com antioxidante.
Fonte: Moon e Shibamoto (2009);

O método de atividade antioxidante FRAP consiste na redução do complexo ferritripiridiltriazina (Fe^{3+} - TPTZ) a ferroso tripiridiltriazina (Fe^{2+} TPTZ), em meio ácido, pelos agentes antioxidantes naturais presentes, neste caso no vinho (Figura 7). Esta redução pode ser acompanhada pela coloração azul intensa apresentada pelo complexo de Fe^{2+} , com absorção na região de 593 nm (Figura 8).

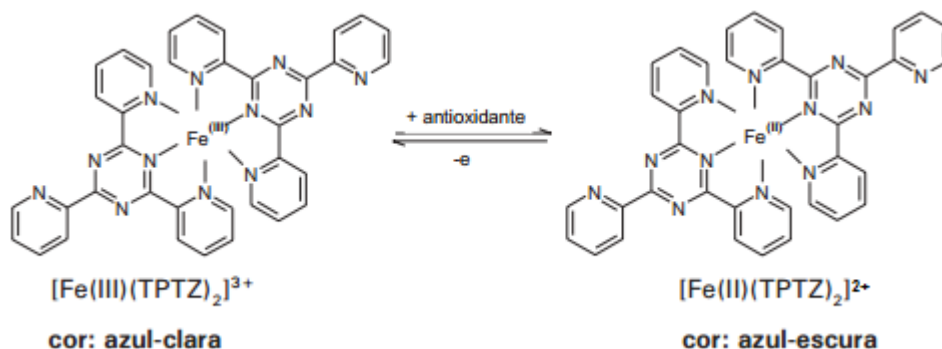


Figura 8 - Redução do complexo TPTZ com Fe³⁺.

Fonte: Rufino et al. (2006).

O fator limitante deste método é que nem todos os antioxidantes presentes em uma matriz complexa reduzem o ferro, assim como nem todo redutor do Fe³⁺ a Fe²⁺ é antioxidante. Porém, este método é muito utilizado em conjunto com outros ensaios para análises de plantas e alimentos (PINELI, 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de vinhos tintos seco, variedade *Vitis Labrusca* (cultivar Bordô), foram coletadas nas cidades de Mariópolis e Salgado Filho, ambas localizadas na região sudoeste do Paraná. Em cada vinícola, foram coletadas três amostras de um mesmo lote, estes representativos da produção do ano de 2011. As garrafas foram armazenadas no escuro e abertas imediatamente antes das análises, garantindo a integridade das amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O conteúdo de compostos fenólicos foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999). Este método envolve a oxidação de fenóis por um reagente amarelo heteropoliácido de fosfomolibdato e fosfotungstênio (reagente de Folin-Ciocalteu), e a medida colorimétrica de um complexo azul Mo-W que se forma na reação em meio alcalino (SINGLETON; ROSSI, 1965). Para a determinação de fenólicos totais, uma alíquota de 0,5 mL de amostra previamente

diluída foi misturada com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído 1:10. Após 5 minutos de repouso da mistura, foram adicionados 2,0 mL de Na_2CO_3 4%. As soluções incubadas em local escuro, à temperatura ambiente e após 2 horas absorvância foi medida a 740nm. Os resultados do teor dos compostos fenólicos totais são expressos em grama de equivalente de ácido gálico por litro de amostra (g EAG L^{-1}). A curva padrão analítica foi construída contendo na faixa de 10 a 100 mg L^{-1} de ácido gálico.

4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.3.1 Atividade Antioxidante pelo Sequestro do Radical DPPH•

A medida da atividade seqüestrante do radical DPPH• foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams et al. com algumas modificações. A mistura da reação foi constituída pela adição de 0,5 mL das amostras diluídas 100 vezes, 3 mL de etanol absoluto e 0,3 mL da solução do radical DPPH 0,5 mM em etanol absoluto, após 45 minutos de reação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foi realizada leitura em espectrofotômetro a 517 nm. Para o controle negativo foi substituído o volume da amostra por igual volume do solvente. Preparou-se o branco substituindo o volume da solução de DPPH por igual volume de etanol. Para o cálculo da capacidade antioxidante das amostras foi preparada uma curva padrão analítica utilizando o antioxidante sintético Trolox como padrão de referência nas concentrações 15 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em mmol L^{-1} .

4.3.2 Atividade antioxidante através da captura do radical livre ABTS•+

Para esta metodologia utilizou-se o método descrito por Re et al., (1999) com algumas modificações. A formação do radical ABTS^{•+} foi obtida a partir da reação de 7 mM de ABTS com 140 mM de persulfato de potássio, incubada à temperatura ambiente na ausência de luz num período de 16 horas. Após esse tempo diluiu-se a solução em etanol até obter uma absorvância de $0,700 \pm 0,200$ em 734 nm. Foram

adicionados 30 μL de amostra para 3 mL da solução contendo o radical. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro, a 734 nm após 6 minutos de reação. Para a construção da curva padrão utilizou-se o antioxidante sintético Trolox nas concentrações de 100 a 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em mmol de Trolox por litro de amostra.

4.3.3 Atividade Antioxidante pelo método de redução do Ferro FRAP

Esta metodologia seguiu o descrito por Benziel e Strain (1996) com algumas modificações. O reagente FRAP foi preparado por meio da mistura de 25 mL de uma solução de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL da solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e 2,5 mL de FeCl_3 (20 mM) em solução aquosa. Adicionou-se uma alíquota de 100 μL da amostra previamente diluída a 3 mL do reagente FRAP e incubou-se a 37°C em banho-maria por 30 minutos. A absorbância foi medida após esse tempo e o espectrofotômetro zerado com a solução FRAP. Fez-se a curva de calibração com sulfato ferroso nas concentrações 100 – 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e os resultados foram expressos em mmol de Fe^{2+} por litro da amostra.

4.4 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS UTILIZANDO CLAE

Os compostos fenólicos: ácido cafeíco, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido vanílico, ácido cumárico e o estilbeno *trans*-resveratrol foram extraídos da amostra utilizando a partição líquido-líquido e na sequencia, identificados por CLAE.

A extração líquido-líquido foi realizada de acordo com o descrito por Porgah e Büyüktuncel (2012), com algumas modificações. Acidificou-se 4 mL da amostra, a pH 2, com uma solução de ácido clorídrico 3 mol L^{-1} , na sequencia adicionou-se 4 mL do solvente acetato de etila, este conjunto foi agitado em vórtex por 1 minuto e em seguida centrifugado por 5 minutos em 5000 rpm. O sobrenadante foi retirado e o processo de extração repetido três vezes. O sobrenadante resultante do processo foi evaporado em um evaporador rotativo e o resíduo seco dissolvido em 750 μL de metanol e 250 μL de água.

Para análise por CLAE foi injetado um volume de 10 μL em um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de fluorescência com λ_{em} 374 nm e λ_{ex} 330 nm para

detecção do *trans*-resveratrol, sendo os demais compostos identificados pelo espectro de absorção na região ultravioleta, utilizando os recursos do detector de arranjo de fotodiodos. A coluna analítica utilizada foi de fase reversa C-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) Varian, mantida a 30°C. A fase móvel utilizada foi uma mistura de metanol (solvente B) e água (solvente A), ambos acidificados com ácido acético a 0,1%, com eluição em modo gradiente. O gradiente iniciou com 5% de B até 7% de B em 7 minutos, 20% de B em 15 minutos, 50% de B em 30 minutos, 90% de B em 50 minutos e 5% de B em 55 minutos, mantendo esta concentração por mais 10 minutos, numa vazão de 1 mL por minuto. Neste trabalho, foram utilizados padrões autênticos de ácido ferúlico, ácido gálico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido cumárico e *trans*-resveratrol.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente o conjunto de dados foi submetido à análise de homogeneidade de variância, pelo teste de Levene e análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. O conjunto de dados foi submetido à análise de variância (ANOVA) e para o teste de contraste entre as médias, foi utilizado o teste de Tukey, utilizando o programa Assistat 6.0. As análises estatísticas foram feitas empregando-se o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O teor de compostos fenólicos totais não foi estatisticamente diferente entre as amostras analisadas (Tabela 1), apresentando um valor médio de 1,83 g EAG L⁻¹.

Tabela 1 – Teor de compostos fenólicos em amostras de vinhos tintos.

Amostras de vinhos (Ano 2011)	Fenólicos totais (g EAG L⁻¹)*
<i>Mariópolis</i>	2,07 ± 0,27 ^a
<i>Salgado Filho</i>	1,60 ± 0,06 ^a

* grama equivalente em ácido gálico por litro de amostra.

**médias com letras iguais, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si (p ≤ 0,05).

***os números indicados depois das médias denotam o desvio padrão entre as réplicas.

Estudos realizados por Gallice et al., (2011), com amostras de vinhos tintos da região Sul do Brasil, demonstraram valores de compostos fenólicos que variaram de 0,97 a 2,91 g EAG L⁻¹, com valor médio de 1,91 g EAG.L⁻¹. Mamede e Pastore (2004) encontraram teores de fenólicos variando de 1 a 4 g de EAG L⁻¹ para vinhos tintos de diversas nacionalidades. Freitas (2006) encontrou valores que variaram de 0,49 a 1,72 g de EAG L⁻¹.

Porgali e Büyüktuncel (2011) em estudos com vinhos nativos da Turquia encontraram valores de fenólicos totais que variaram de 1,83 a 3,4 g EAG L⁻¹. Dias e Menegon (2012) encontraram valores para amostras de vinhos tintos, cabernet Sauvignon, que variaram de 1,65 a 1,90 g EAG L⁻¹.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com os descritos na literatura, contudo a quantidade de compostos fenólicos totais pode diferir de uma amostra para outra em consequência da característica dos vinhos, variedade da uva, fatores ambientais dos vinhedos, bem como técnicas de processamento, produção e maturação dos vinhos (LI et al., 2009)

5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para a determinação da atividade antioxidante, foram utilizados três métodos distintos de análise, com princípios reacionais distintos para a caracterização das amostras. Foi possível concluir que não houve variação estatisticamente significativa entre as amostras para nenhum dos métodos utilizados (Tabela 2).

Os resultados encontrados para as atividades antioxidantes corroboram com os encontrados na literatura

Tabela 2 – Atividades antioxidantes de vinhos pelos métodos de DPPH, ABTS•+ e FRAP

<i>Amostras de vinhos (2011)</i>	<i>DPPH (mmol de Trolox L⁻¹)</i>	<i>ABTS (mmol de Trolox L⁻¹)</i>	<i>FRAP (mmol de Fe²⁺ L⁻¹)</i>
Mariópolis	7,5 ± 1,0 ^a	11,00 ± 0,59 ^a	6,32 ± 0,94 ^a
Salgado Filho	5,96 ± 0,063 ^a	9,02 ± 5,3 ^a	5,57 ± 0,14 ^a

*médias com letras iguais, na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

**os números indicados depois das médias denotam o desvio padrão entre as réplicas.

Šeruga et al. (2010) em estudos com vinhos (variedade *Vitis Vinifera*) de regiões distintas da Croácia, encontraram valores de atividade antioxidante de 7,9 a 24,2 mmol de Trolox L⁻¹ para ABTS e de 9,2 a 37,8 mmol de Trolox por L⁻¹ de DPPH. Gris (2011) et al. analisaram a capacidade antioxidante de vinhos pelo método ABTS e DPPH (variedade *Vitis Vinifera*) da região de São Joaquim, no sul do Brasil, entre os anos de 2006 e 2007, encontrando valores que variam de 11,2 a 23,17 mmol de Trolox por L⁻¹.

Granato et al. (2011) estudando vinhos da variedade *Vitis vinifera* (Merlot, Malbec, Pinot Noir, Cabernet e Sauvignon e Syrah) de três países da América do Sul - Chile, Argentina e Brasil - encontraram valores de atividade antioxidante pelo método de DPPH que corroboram com os encontrados nesse trabalho.

Foi possível observar que as amostras possuem uma elevada atividade antioxidante quando comparadas com outras amostras de vinhos analisadas e descritas na literatura. Para o método de atividade antioxidante pela redução do ferro (FRAP) não foi possível encontrar estudos na literatura, justificando assim a importância da realização deste estudo.

5.4 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENOLICOS UTILIZANDO CLAE

Utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), os principais ácidos fenólicos e o estilbeno *trans*-resveratrol foram identificados por comparação dos tempos de retenção, similaridade espectral e cocromatografia entre padrões autênticos e as amostras.

Os ácidos fenólicos, gálico e vanílico, foram identificados utilizando o detector arranjo de diodos trabalhando no comprimento de onda de 280 nm, enquanto os ácidos caféico, cumárico, e ferrúlico absorvem fortemente a radiação ultravioleta em 320 nm (Figura 9 a). Para a identificação do estilbeno *trans*-resveratrol foi utilizado o detector de fluorescência (9 b) pelo fato deste ser mais sensível que os outros detectores para este composto nas amostras analisadas.

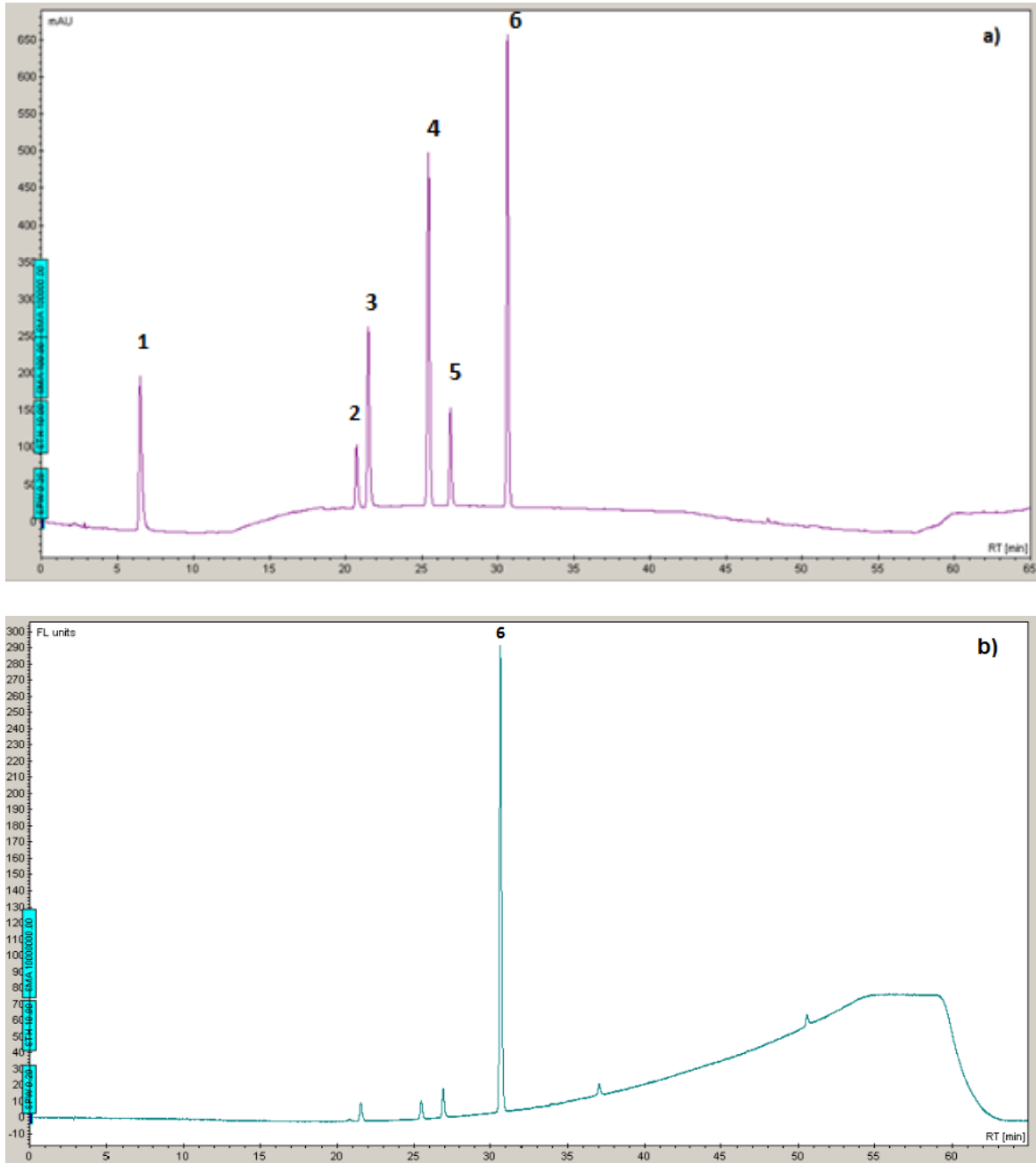


Figura 9 - Cromatograma obtidos para os padrões. (a) Detector arranjo de diodos 1 – ácido gálico, 2- ácido vanílico, 3 - ácido caféico, 4 – ácido cumárico, 5 – ácido ferrulico 6 - *trans*-resveratrol e b) detector de fluorescência 6 - *trans*-resveratrol

Para ambas as cidades foram identificados os mesmos compostos fenólicos, sendo eles: ácido gálico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido cumárico (Figuras 10 e 11), e ainda o *trans*-resveratrol.

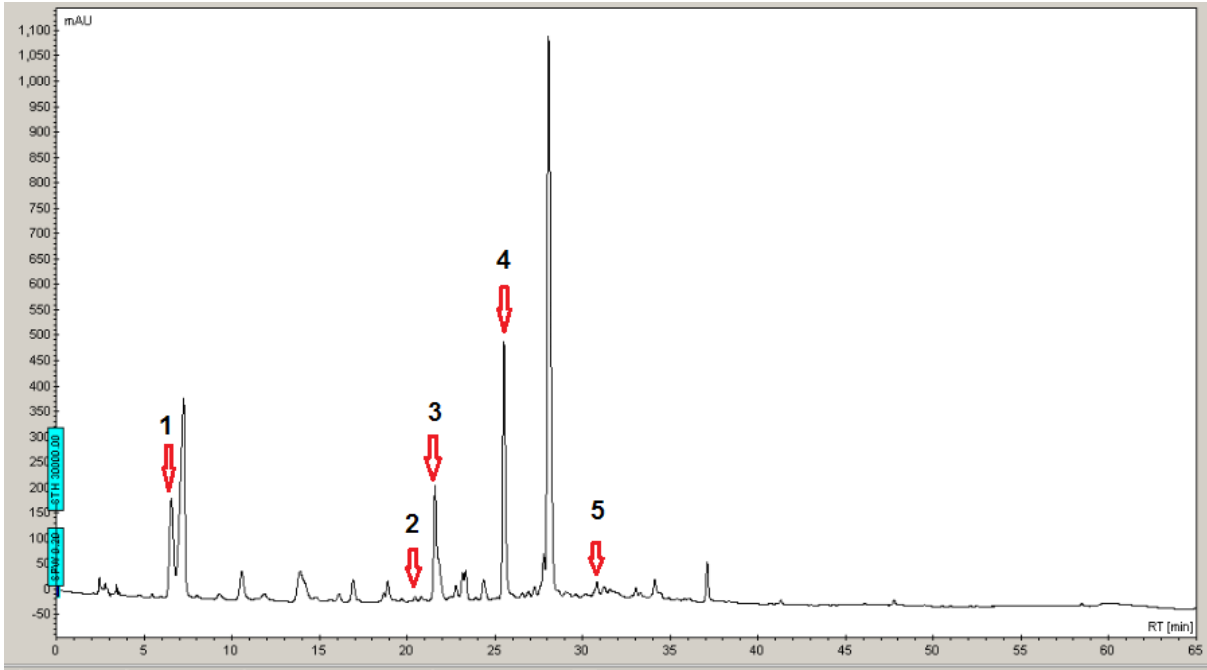


Figura 10 - Cromatograma da amostra de vinho da cidade de Mariópolis: 1 - gálico, 2 - vanílico, 3 - cafeico, 4 - cumárico, 5 - *trans*-resveratrol.

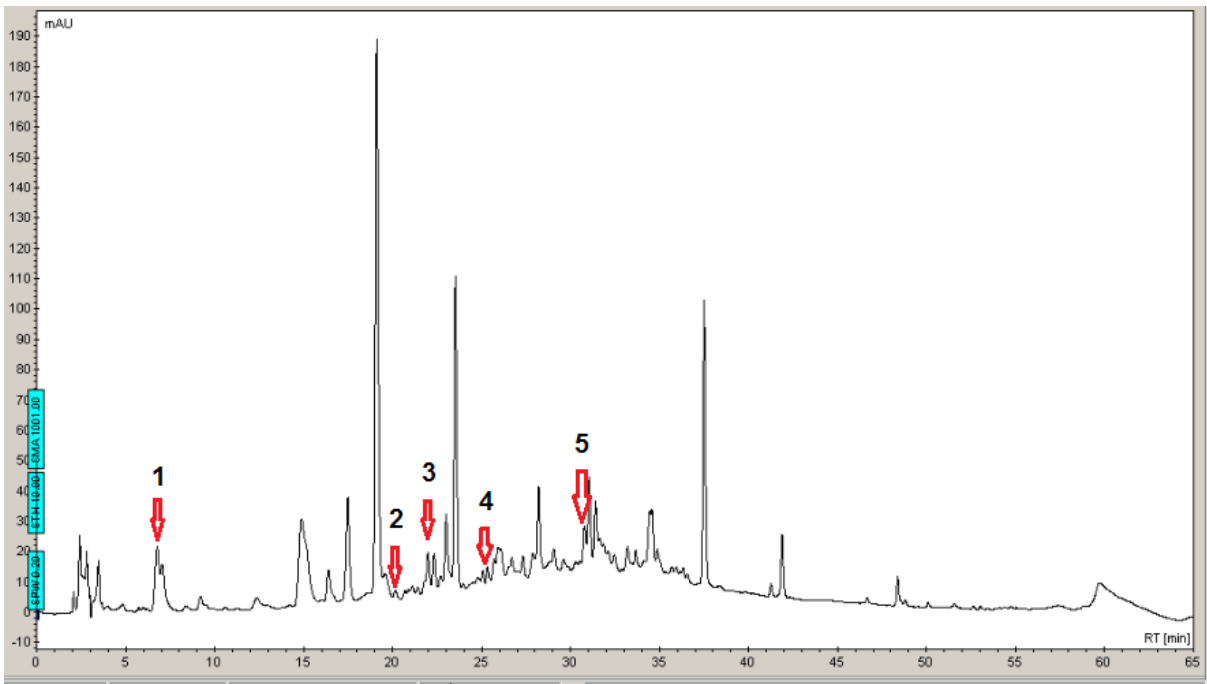


Figura 11 - Cromatograma da amostra de vinho produzido na cidade de Salgado Filho: 1 - ácido gálico, 2 - ácido vanílico, 3 - ácido cafeico, 4 - ácido cumárico, 5 - *trans*-resveratrol.

Para o *trans*-resveratrol foi realizada sobreposição com o padrão no detector de fluorescência, onde se observa um pequeno pico em ambas as cidades (Figuras 12 e 13). Foi possível concluir que apenas o ácido ferrúlico não foi encontrado nas amostras de vinhos tintos para as cidades analisadas.

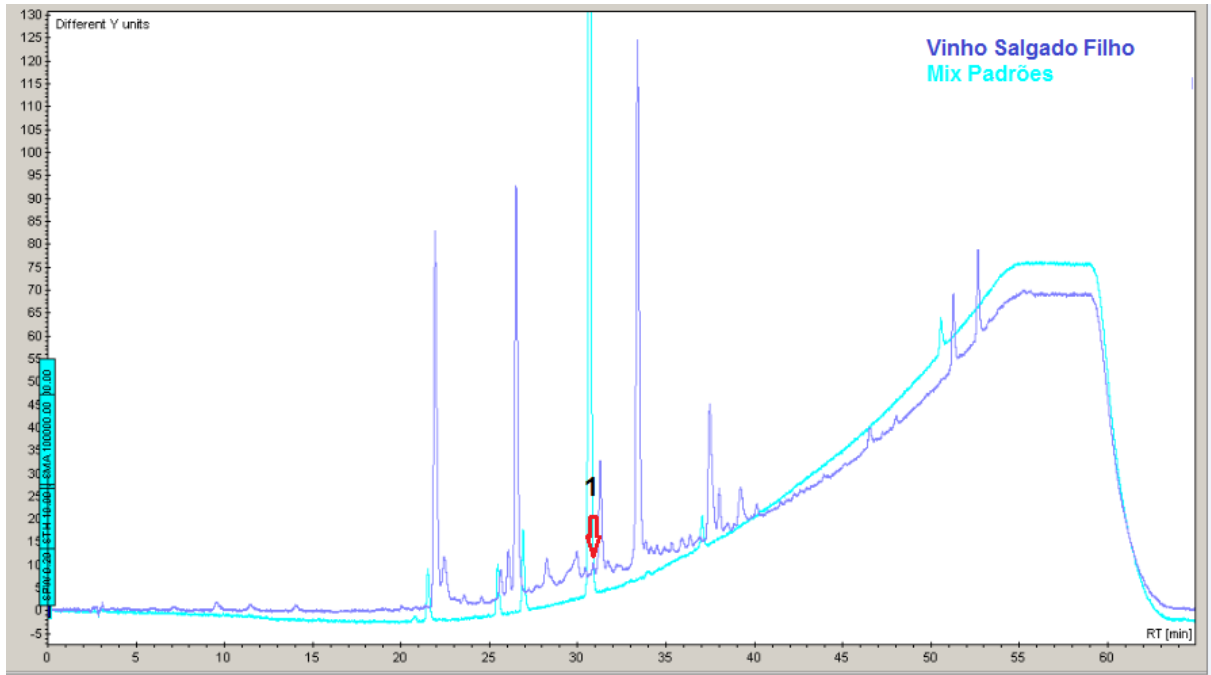


Figura 12 - Cromatograma da amostra de vinho da cidade de Salgado Filho sobreposto com o Mix de padrões dos compostos fenólicos no detector de fluorescência : 1 - *trans*-resveratrol.

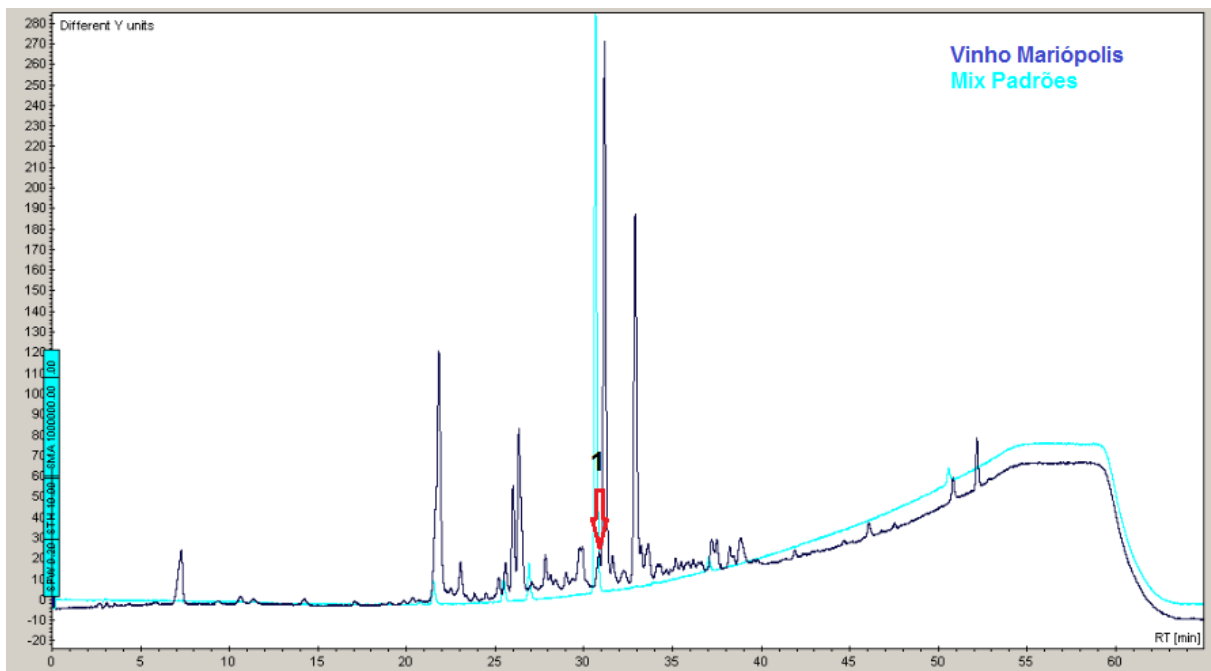


Figura 13 - Cromatograma da amostra de vinho da cidade de Mariópolis sobreposto com o Mix de padrões dos compostos fenólicos no detector de fluorescência : 1 - *trans*-resveratrol.

As amostras foram analisadas em triplicata e na sequência os cromatogramas obtidos, representativos de cada cidade, foram sobrepostos (Figuras 14 e 15). Foi possível observar um perfil químico semelhante entre as replicatas,

mas que variou entre as cidades. Esta variação no perfil químico é indicativa da diferença de composição química dos vinhos em função do local de produção.

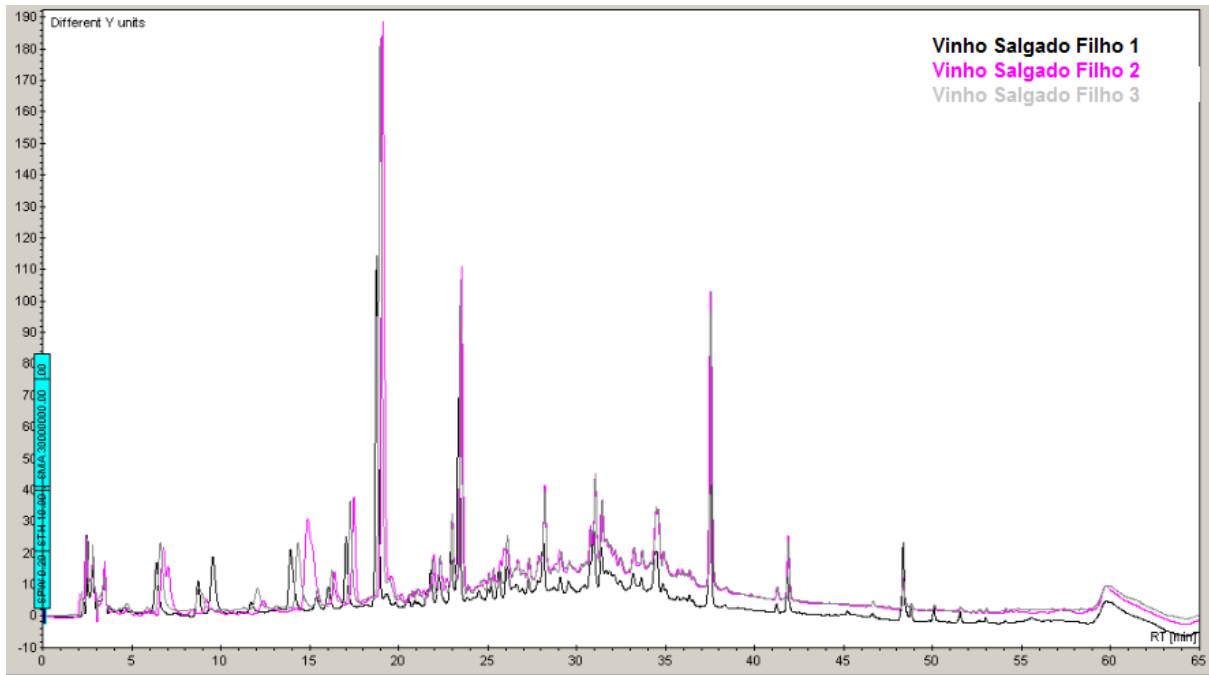


Figura 14 – Sobreposição dos cromatogramas das amostras de vinho de Salgado Filho

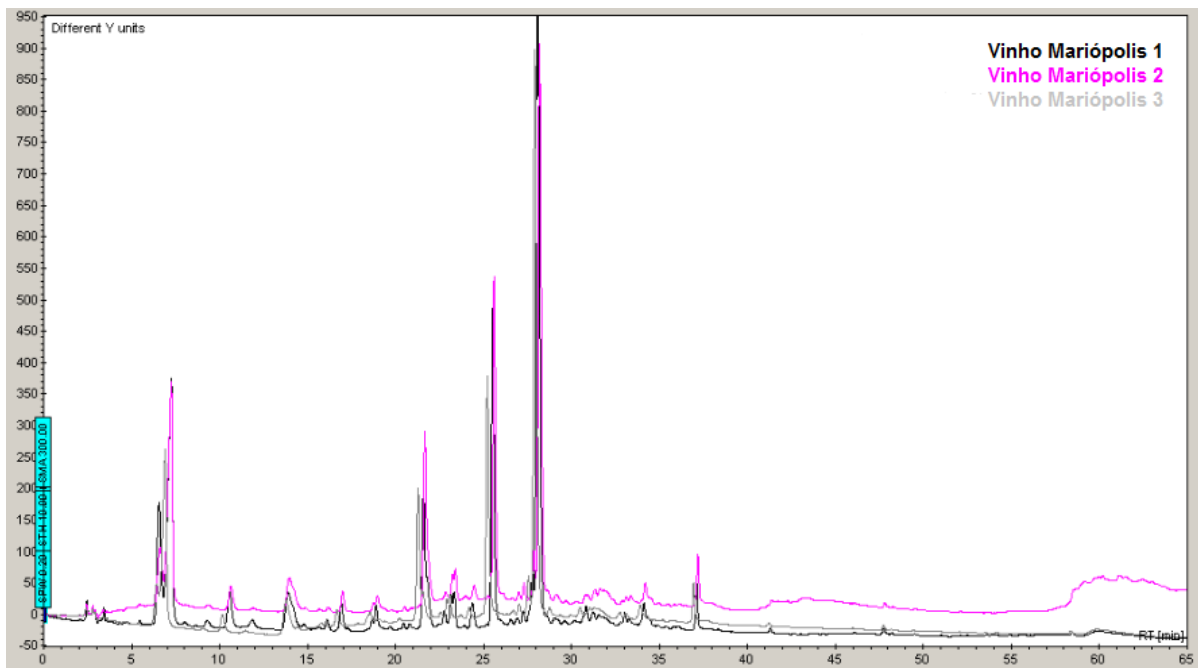


Figura 15 - Sobreposição dos cromatogramas das amostras de vinho de Mariópolis

Muitos estudos são encontrados na literatura com o intuito de identificar e quantificar compostos fenólicos utilizando CLAE. Alañón et al. (2011) e Porgali e Büyüktünel (2011) além de encontrar os mesmos compostos identificados neste trabalho, identificaram também: rutina, ácido síngico, quercetina, kaempferol, ácido

elágico e catequina. Gris et al. (2011) em estudo com compostos fenólicos utilizando CLAE, com vinhos (variedade *Vitis Vinifera*) da região de São Joaquim, no sul do Brasil, entre os anos de 2006 e 2007 encontraram também os compostos: catequina, epicatequina e galocatequina.

Os compostos encontrados por CLAE são de suma importância para as características antioxidantes dos vinhos. Muitos estudos mostram uma correlação entre o conteúdo de ácidos fenólicos dos vinhos e sua ação antioxidante (SAUTTER et al., 2005; GALLICE 2010; DEGÁSPARI: WASZCZYNSKYJ, 2004). Segundo Sautter et al. (2005) a detecção do isômero *trans*-resveratrol em vinhos ganhou muita atenção e vem sendo estudada intensamente nos últimos anos, pelo fato de ele apresentar uma altíssima atividade biológica, algumas delas de uso terapêutico, bem como diminuição de das doenças cardiovasculares a alguns tipos de câncer.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que vinhos produzidos nas duas cidades da região sudoeste do Paraná, apresentaram uma elevada atividade antioxidante, bem com elevado teor de compostos fenólicos, podendo assim ser considerados biologicamente ativos. Segundo os parâmetros analisados não foi observada diferença estatística entre as amostras das cidades, comprovando assim que há pouca variação da composição química entre elas. Nas amostras de ambas as cidades foram encontrados alguns ácidos fenólicos e o estilbeno *trans*-resveratrol, demonstrando o potencial e a alta qualidade dos vinhos produzidos nessa região. Todos os resultados obtidos foram satisfatórios, justificando assim o estudo da caracterização química e biológica para agregar valor ao produto local.

7 REFERÊNCIAS

ABE, Lucile T.; DA MOTA, Vieira; LAJOLO, Franco M.; GENOVESE, Maria, I. Compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de cultivos de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimento**, Campinas, v. 27, n.2, p. 394-400, abril – junho/2007.

ALAHÓN, M.EA; . CASTRO-VÁZQUEZ L A;. DÍAZ-MAROTO M.C; GORDON, C; PÉREZ-COELLO, A. A study of the antioxidant capacity of oak wood used in wine ageing and the

BEHLING, Estela B.; SENDÃO, Milena C.; FRANCESCATO, Heloisa D. C.; ANTUNES, Lusânia M. G.; BIANCHI, Maria de L. P. Flavonóides quercetinas: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos Nutricionais**. Araraquara, v. 5, n. 3, p. 285 – 292, 2004.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. Química de los alimentos. Zaragoza: Acribia, p. 645- 656, 1988.

BENZIE, I. F.F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 239, p. 70-76, 1996.

BRAND-WILLIAN, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – food Science and Technology**. London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CABRITA, M. J.; SILVA, R.; LAUREANO, J. O. **Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos**. In: I SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE VITIVINICULTURA. **Anais...**Ensenada, México, 2003.

CERQUEIRA, F.M; GENNARI, M.H DE M; OHARA, A. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, **Química. Nova**, Vol. 30, No. 2, 441-449, São Paulo, 2007

DANI, C.; OLIBONI, L.S.; VANDERLINDE, R. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juice manufactured with organically - or conventionally- produced grapes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2574-2580, 2007.

DÁVALOS, A.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZCORDOVÉS, C. Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. **Food Chemistry**, p.325-330, 2005.

DEGÁSPARI, C.H; WASZCZYNSKYJ, N. **Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos**. Universidade Tuiuti do Paraná e Universidade Federal do Paraná, v. 5, n. 1, p. 33-40, Curitiba, Jan.-Jun 2004. Dekker, p. 65-157, 1995.

DUARTE-ALMEIDA, J.M; SANTOS, R.J dos;GENOVESE, M.I; LAJOLO, F.M. **Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema B-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH**. Campinas, 2006.

DURÁN, R.M.; PADILLA, R.B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Grasas y Aceites*. Sevilla: v. 44, n.2, p. 101-106, 1993.
Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 4 p. (Comunicado Técnico, 125).
Food Antioxidants – technological, toxicological and health perspectives. New York: Marcel

FREITAS, D. M. Variação dos compostos fenólicos e de cor dos vinhos de uvas (*Vitis vinifera*) tintas em diferentes ambientes. Santa Maria, 2006. 42 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria.

GALLICE, W.C. **Caracterização do potencial antioxidante de vinhos e quantificação de fenóis totais e trans-resveratrol utilizando técnicas cromatográficas e espectroscópicas multivariadas**, 2010. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

GRIS, E.F.; MATTIVI, F.; FERREIRA, E.A.; VRHOVSEKC, U.; PEDROSA, R.C.; BORDIGNON-LUIZ; M.T. *Food Chemistry*, Barking, 213–220, Oct/2010.

HALLIWELL, B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for

HARBORNE, J.B. *Phytochemical Methods*. London: Chapman and Hall, p. 33-88, 1973.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical methods**. London: Champman and Hall, 1973. 295 p.

HUANG, Dejian; OU, Boxin; PRIOR, Ronald. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, 1997.

JEANDET, P.; BESSIS, R.; GAUTHERON, b. **The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages**. *American Journal Enology and Viticulture.*, v. 42, p. 41-46, 1991.

JONHSON, H. **O Vinho: atlas mundial dos vinhos e aguardentes**. Ed. Siciliano, São Paulo, 1989.

KALLITHRAKA, S. Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity. *J. Food Comp. Anal.*, v. 18, p. 375-386, 2005.

KOLOUCHOVA-HANZLIKOVA, I., MELZUCH, K., FILIP, V., And Smidrkal, J. Rapid method for resveratrol by HPLC with electrochemical and UV detections in wines, **Food Chemistry**, v. 87, p.151–158, 2004.

LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; ROMERO PÉREZ, *et al.* Direct HPLC analysis of cis- and trans-resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 2, p. 281-283, 1995.

LI, H.; WANG, X.; LI, Y.; LI, P.; WANG, H. Polyphenolic compounds and antioxidant

M.S. ALVES, Clayton Q.; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P.; BAHIA, Marcus V. AGUIAR, Rosane M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n.10, p. 2202-2210, 2010.

MALACRIDA, Cassia R.; MOTTA, Silvana da. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n. 4, p. 659-664, outubro – dezembro/2005.

MAMEDE, M.E.O; PASTORE, G.M. B. *CEPPA*, Curitiba, v.22, n.2, p 233-252, jul/Dez 2004.

MELLO, L. M. R. Vitivinicultura brasileira – Panorama 2009. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, Artigo Técnico, 2009.

MELLO, Loiva. M. R. **Vitivinicultura brasileira** – Panorama 2009. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2012. Artigo Técnico. <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/prodvit2009vf.pdf>> Acesso em: 31 de ago de 2013.

MELLO, Loiva. M. R. **Vitivinicultura brasileira** – Panorama 2009. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2009. Artigo Técnico. Disponível em:

MELO, Priscilla S. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais**. 2010. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Piracicaba, 2010.

MONAGAS, M., BARTOLOME´, B., & GO´MEZ-CORDOVE´S, C. (2005). Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, 45, 85–118.

MOON, Joon-Kwan; SHIBAMOTO, Takayuki. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 1655–1666, 2009.

MULERO, J.; ZAFRILLA, P.; CAYUELA, J.M.; MARTÍNEZ-CACHÁ, A.; PARDO, F. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Organic Red Wine Using Different Winemaking Techniques. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 3, p. C436-C440, 2011.

n. 1, p. 57-74, 1996.

OKUDA, T.; YOKOTSUKA, K. **Trans-resveratrol concentrations in berry skins and wines from grapes grown in Japan**. American Journal Enology Viticulture, v. 47, n. 1, p. 93-99, 1996.

OLDONI, Tatiane L. C. **Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais**. 2010. 163f. Tese (Doutorado em ciências) – Universidade de São Paulo – Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba, 2010.

optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radical Research*, v. 25,

PENNA, N.G; HECKTHEUER, R.H.L. **Vinho e Saúde: uma revisão**. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary, occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, New York, v. 18, n. 12, p. 1995 – 2018, 1998.

PHILLIPS, Rod. **Uma breve história do vinho**. 3 ed. Rio de Janeiro: Record, 2005.

PINELI, Livia de L. de O. **Qualidade e potencial antioxidante *in vitro* de morangos *in natura* e submetidos a processamentos**. 2009. 222f. Tese (Doutorado em Ciência da Saúde) – Universidade de Brasília. Brasília, 2009.

PINTO, Ellen P.; MOREIRA, Angelita da S.; MACHADO, Mirian R. G.; RODRIGUES, Rosane da S. A uva como um alimento funcional. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, Bento Gonsalves, v. 3, p. 66 – 73, set. 2011.

PORGAH, Esra; BÜYÜKTUNCEL, Ebru. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. **Food Research International**, Essex, v. 45, p. 145 – 154, 2012.

PROTAS, J.F.S; CAMARGO, U.A; MELO, L.M.R. A VITIVINICULTURA BRASILEIRA: REALIDADE E PERSPECTIVAS. **EMBRAPA UVA E VINHO, BENTO GONÇALVES, 2008**. DISPONÍVEL EM: < [HTTP://WWW.CNPUV.EMBRAPA.BR/PUBLICA/ARTIGOS/VITIVINICULTURA/](http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura/)> ACESSO EM 31 AGO DE 2013.

RAJALAKSMI, D.; NARASIMHAN, S. Food antioxidants: sources and methods of evaluation.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RICE-EVANS, C. Flavonoids and Isoflavones (Pytoestrogens): Absorption, Metabolism and Bioactivity. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 36, n. 7, p. 827-828, 2004.

RIZZON, L. A.; MIELE, A.; MENEGUZZO J. Avaliação da cultivar Isabel para a elaboração de vinho tinto. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, p. 115-121, 2000.

ROSATTO, S.S; FREIRE, R.S; DURAN, N; KUBOTA, L.T. **Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental**. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2000.

RUFINO, Maria S. M.; ALVES, Ricardo E.; BRITO, Edy S.; MORAIS, Selene M.; SAMPAIO, Caroline G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; SAURA-CALIXTO, Fulgencio D. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Fortaleza:

SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. *Alimentaria*, v. 329, p. 29-40, 2002.

SANTANA, M.T.A; SIQUEIRA, H.H DE; REIS, K.C DOS; LIMA, L.C DE O; SILVA, R.J.R. Caracterização de diferentes marcas de sucos de uva Comercializados em duas regiões do Brasil. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 882-886, maio/jun., 2008

SAUTTER, C.K; DENARDIN, S; ALVES, O.A; MALLMANN, C.A; PENNA, N.G; HECKTHEUER, L.H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 437-442, jul.-set. 2005.

ŠERUGA, M.; NOVAK, I.; JAKOBEK, L. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, Barking, 1208–1216, Jul/2010.

SINGLETON, Vernon. L.; ORTHOFER, Rudolf.; LAMUELA, Rosa. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, San Diego, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. Campinas, jan/abr, 2008.

SOUTO, A. A.; CARNEIRO, M. C.; SEFERIN, M.; SENNA, M. J. H.; CONZ, A.; GOBBI, K. Determination of *trans*-resveratrol concentrations in Brazilian red wines by HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 441-445, 2001.

STALIKAS, Constantine D. Extraction, separation e detection methods for phenolic acid and flavonoids. **Journal of Separation Science**. v. 30, n. 18, p. 3268 - 3295, december, 2007.

THRELFALL, R. T.; MORRIS, J. R.; **Mauromoustakos A. Effect of variety, ultraviolet light exposure, and enological methods on the *trans*-resveratrol level of wine.** *American Journal Enology Viticulture*, v. 50, n. 1, p. 57-64, 1999.

VACCARI, N.S.F.; HEIDMANN, M.C.; SOCCOL, G.M.E. Compostos fenólicos em vinhos e seus efeitos antioxidantes na prevenção de doenças. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. Lages, v.8, n.1, p. 71-83, 2009.

Vida e Saúde: confira artigo sobre os benefícios do vinho para a saúde, atualizado em segunda-feira, 08 de ago de 2011. Disponível em:
<<http://www.news.med.br/p/medicaljournal/850/vinho+e+saude+confira+artigo+sobre.htm>> Acesso em: 10 de ago de 2013.

WANG, B.J.; LIEN, Y.H.; YU, Z.R. Supercritical fluid extractive Fractionation – study of the antioxidant activities of propolis. **Food Chemistry, Barking**, p. 237-243, 2002.

ZARTH, Nelson A.; DONAZZOLO, Joel; CITADIN, Idemir; PERONDI, Miguel A.; BRAIDA, João A.; MAZARO, Sérgio M. Caracterização da vitivinicultura na região sudoeste do Paraná. In: I SEMINÁRIO SISTEMA DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA, 2007, Dois Vizinhos. **Anais do I Seminário: Sistemas de Produção** Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2011. p. 129-133.