

Composição química e actividade antioxidante de folhas de diferentes castas de videira

Ana Patrícia Martins Pires

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar*

Orientado por

Prof. Doutor José Alberto Cardoso Pereira

Prof. Doutora Elsa Cristina Dantas Ramalhosa

Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri

**Bragança
2010**

A Escola Superior Agrária não se responsabiliza pelas opiniões emitidas neste trabalho.

Aos meus pais, irmã e aqueles amigos...

Trabalho realizado na Escola Superior Agrária de Bragança e na
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Orientadores:

Prof. Doutor José Alberto Cardoso Pereira

Prof. Doutora Elsa Cristina Dantas Ramalhosa



"Boa é a vida, mas melhor é o vinho"

PESSOA, FERNANDO (1888-1935)

AGRADECIMENTOS

Ao entregar este trabalho, é com a maior satisfação, que agradeço a todos os que de alguma forma contribuíram para a sua realização.

Aos meus orientadores, Professor Doutor José Alberto Cardoso Pereira e Professora Doutora Elsa Cristina Ramalhosa, da Escola Superior Agrária de Bragança pela orientação deste trabalho, pela sua capacidade científica e de resolução de problemas, pelo seu profissionalismo, pelo incentivo e motivação que sempre me transmitiram, pelos seus ensinamentos e, ainda, pela sua compreensão.

À Professora Doutora Paula Andrade e à Professora Doutora Patrícia Valentão, do Serviço de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia do Porto pelas facilidades concedidas, pelos seus conhecimentos que partilharam comigo, pelo constante e assíduo acompanhamento que me prestaram.

Aos Responsáveis dos laboratórios de AgroBiotecnologia e Agro-Indústrias, da Escola Superior Agrária de Bragança e ainda à Responsável do Serviço de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia do Porto, pelo acolhimento e disponibilidade, e pelas condições materiais indispensáveis à realização da parte experimental deste trabalho.

Ao Professor João Verdial Andrade pela colaboração e facilidade na obtenção das amostras.

A todos os Docentes do Instituto Politécnico de Bragança que de uma forma ou de outra, pelos seus ensinamentos, contribuíram para o meu progresso académico.

Aos colegas do laboratório de AgroBiotecnologia, Ricardo, Ivo, Valentim, Anabela e Susana, pelos seus ensinamentos, pelo acompanhamento que sempre me prestaram, pelo incentivo e motivação que sempre me transmitiram, pela boa vontade sempre demonstrada e, sobretudo, pela sua amizade.

Aos elementos do Serviço de Farmacognosia, em especial ao Rui e à Fátima, pela integração, apoio e ajuda que me proporcionaram.

Aos meus colegas de curso, que partilharam comigo todos os bons e maus momentos que foi necessário ultrapassar ao longo dos anos de curso, pelo seu companheirismo e amizade.

Aos meus colegas de trabalho na AgroAguiar, em especial, à Anabela, à Conceição, ao Luís e Renato, pela paciência nas horas mais difíceis, pela compreensão e apoio sempre demonstrado, mas sobretudo pela amizade.

Aos meus amigos, pela amizade e carinho que sempre me demonstraram, pelas palavras de encorajamento ao longo de toda a minha vida e confiança que desde sempre me transmitiram.

Ao Joel, pelo seu incentivo e motivação, pela boa vontade sempre demonstrada e, sobretudo, pelo seu carinho e amizade.

Aos meus familiares, pelo seu carinho, pelas palavras de incentivo e encorajamento e, sobretudo, pela confiança que sempre me depositaram.

Aos meus pais, irmã e avós pelo seu esforço, pelo seu carinho, incentivo e apoio incondicional, ao longo de toda a vida, mas especialmente, durante todo o curso, pela ternura e confiança sempre transmitida, o meu eterno agradecimento.

A todos que directa e indirectamente me ajudaram na realização deste projecto.

ÍNDICE

Índice Geral

Índice de figuras	xiii
Índice de quadros	xv
Lista de abreviaturas	xvii
Resumo	xix
Abstract	xx
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Introdução	2
1.2. Objectivos	4
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	
2.1. <i>Vitis vinifera</i> L.	6
2.1.1. Características botânicas	7
2.1.2. Características morfológicas	
2.1.2.1. <i>Raíz</i>	7
2.1.2.2. <i>Caule</i>	8
2.1.2.3. <i>Folhas</i>	8
2.1.2.4. <i>Flor</i>	9
2.1.2.5. <i>Frutos</i>	9
2.1.3. O benefício do consumo das folhas de videira <i>Vitis vinifera</i> L....	10
2.2. Compostos fenólicos	11
2.2.1. Ác. fenólicos	12
2.2.2. Flavonóides	13

2.2.3. Propriedades fisiológicas	15
2.3. Actividade antioxidante	16
2.3.1. Métodos utilizados para avaliar a actividade antioxidante.....	17
2.3.1.1. <i>Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH</i>	18
2.3.1.2. <i>Efeito do poder redutor</i>	19
2.3.1.3. <i>Avaliação da actividade sequestrante das infusões para o radical hidroxilo</i>	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Amostras	26
3.2. Preparação de extractos	27
3.3. Determinação dos fenóis individuais por HPLC-DAD	28
3.4. Determinação da actividade antioxidante	29
3.4.1. Avaliação da capacidade redutora total pelo método Folin Ciocalteu	29
3.4.2. Efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH	29
3.4.3. Determinação do poder redutor	30
3.4.4. Avaliação do radical hidroxilo	30
3.5. Apresentação dos resultados	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1. Rendimento de extracção	34
4.2. Composição em compostos fenólicos.....	35
4.2.1. Identificação dos compostos	35
4.2.2. Perfil qualitativo das amostras	38
4.2.3. Quantificação dos compostos fenólicos	41

4.3. Actividade antioxidante dos extractos de folhas de videira.....	46
4.3.1. Capacidade redutora total	46
4.3.2. Efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH	48
4.3.3. Determinação do poder redutor	51
4.3.4. Avaliação do radical hidroxilo	54
5. CONCLUSÃO	56
6. BIBLIOGRAFIA	59

Índice Figuras

Figura 1. Representação da videira, <i>Vitis vinifera</i> L.....	6
Figura 2. Estrutura química dos ácidos fenólicos mais frequentes.....	13
Figura 3. Estrutura geral dos flavonóides mais comuns.....	14
Figura 4. Estrutura das principais classes de flavonóides.....	14
Figura 5. Estrutura química do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	18
Figura 6. Explicação química para a alteração de cor.....	19
Figura 7. Determinação do DPPH - visualização após 1 hora de repouso no escuro.....	19
Figura 8. Localização geográfica do campo experimental onde foram recolhidas as amostras de folhas de castas de videira, <i>Vitis vinifera</i> L.....	26
Figura 9. Sistema HPLC-DAD utilizado no presente trabalho.....	28
Figura 10. Espectro de absorvância do ácido cafeoiltartárico e respectiva estrutura química.....	35
Figura 11. Espectro de absorvância do ácido cumaroiltartárico e respectiva estrutura química	36
Figura 12. Espectro de absorvância de miricetina-3-O-glucósido e respectiva estrutura química	36
Figura 13. Espectro de absorvância de quercetina-3-O-glucósido + quercetina-3-O-galactósido e respectivas estruturas químicas	37
Figura 14. Espectro de absorvância de campferol-3-O-glucósido e respectiva estrutura química	37
Figura 15. Compostos fenólicos identificados numa folha de videira de casta branca, designadamente, Samarrinho: 1 ácido trans-cafeoiltartárico; 2 ácido trans-	

cumaroiltartárico; **3** *miricetina-3-O-glucósido*; **4+5** *quercetina-3-O-glucósido* + *quercetina-3-O-galactósido*; **6** *campferol-3-O-glucósido*.....39

Figura 16. Compostos fenólicos identificados numa folha de videira de casta tinta, designadamente, Alicante Bouchet: **1** *ácido trans-cafeoiltartárico*; **2** *ácido trans-cumaroiltartárico*; **3** *miricetina-3-O-glucósido*; **4+5** *quercetina-3-O-glucósido* + *quercetina-3-O-galactósido*; **6** *campferol-3-O-glucósido*.....40

Figura 17. Valores do efeito bloqueador de radicais de DPPH obtidos para extractos de diferentes folhas de casta branca.....48

Figura 18. Valores do efeito bloqueador de radicais de DPPH obtidos para extractos de diferentes folhas de casta tinta.....49

Figura 19. Valores de EC₅₀ (mg/mL) do efeito bloqueador de radicais de DPPH obtidos para extractos de diferentes folhas de castas brancas e tintas50

Figura 20. Valores obtidos na determinação do poder redutor para extractos de diferentes folhas de casta branca.....51

Figura 21. Valores obtidos na determinação do poder redutor para extractos de diferentes folhas de casta tinta.....52

Figura 22. Valores de EC₅₀ (mg/mL) relativos ao poder redutor obtidos para extractos de diferentes folhas de castas brancas e tintas.....53

Índice Quadros

Quadro 1. Folhas de distintas castas analisadas neste trabalho.....	9
Quadro 2. Designações das castas amostradas, quer brancas quer tintas, e respectivos sinónimos conhecidos.....	27
Quadro 3. Rendimentos de extracção (média \pm desvio padrão).....	34
Quadro 4. Compostos fenólicos (mg/kg de matéria seca) nas folhas <i>Vitis vinifera</i> L de diferentes castas. Os resultados expressos como médias \pm desvio padrão de três extracções analisadas em duplicado (n=6).....	43
Quadro 5. Compostos fenólicos (%) nas folhas <i>Vitis vinifera</i> L. de diferentes castas analisadas no presente.....	44
Quadro 6. Capacidade redutora expressa em média \pm desvio padrão de mEq de ác. gálgico/ g extracto.....	47
Quadro 7. Avaliação da capacidade sequestradora do radical hidroxilo, nas castas brancas da folha de videira, os resultados são expressos com média \pm desvio padrão de três determinações em duplicado.....	54
Quadro 8. Avaliação da capacidade sequestradora do radical hidroxilo, nas castas tintas da folha de videira, os resultados são expressos com média \pm desvio padrão de três determinações em duplicado.....	56

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Lista de abreviaturas

Aa – Ácido ascórbico

Abs - Absorvância

Ác. – Ácido

Act. - Actividade

AHC – Ácidos hidroxicinâmicos

DAD – Detector de Díodos

DHC – Derivados hidroxicinâmicos

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dp – Desvio padrão

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

EC₅₀ - concentração de extracto a que corresponde 50% de inibição

Eq. - Equivalentes

HPLC –Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade

mEq - miligramas Equivalente

OMS- Organização Mundial de Saúde

ROS's – Espécies reactivas de oxigénio

UV – Ultravioleta

var. - variedade

Vis – Visível

RESUMO/ABSTRACT

Resumo

Neste trabalho pretendeu-se caracterizar os compostos fenólicos e avaliar a actividade antioxidante de extractos aquosos obtidos de folhas de *Vitis vinifera* L., de diferentes castas (brancas e tintas) colhidas em Sendim, concelho Miranda do Douro, distrito de Bragança.

Para tal, determinaram-se os fenóis individuais por HPLC-DAD, tendo sido a actividade antioxidante avaliada pelos métodos do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, do poder redutor e da actividade sequestrante para o radical hidroxilo.

Da análise dos compostos fenólicos foi possível identificar seis compostos fenólicos, designadamente, o ácido *trans-cafeoiltartárico*, o ácido *trans-cumaroiltartárico*, a *miricetina-3-O-glucósido*, a *quercetina-3-O-glucósido*, *quercetina-3-O-galactósido* e, ainda, o *campferol-3-O-glucósido*, tendo sido a *quercetina-3-O-glucósido* + *quercetina-3-O-galactósido* a mais abundante.

Os extractos aquosos de folhas de videira mostraram possuir actividade antioxidante bloqueadora de radicais de DPPH e poder redutor, com valores de EC₅₀ inferiores a 1 mg/mL.

Em relação à actividade sequestrante para o radical hidroxilo, constatou-se que os extractos apresentaram efeito pró-oxidante e que são capazes de quelatar o ferro.

Assim, os resultados obtidos sugerem que as folhas de *V. vinifera* L. poderão constituir uma interessante fonte de compostos antioxidantes, sobretudo fenóis, com utilidade a nível das indústrias alimentar e farmacêutica.

Palavras-chave: *Vitis vinifera* L., folhas, compostos fenólicos, actividade antioxidante.

Abstract

In this work was intended to characterize the phenolic compounds and to evaluate the antioxidant activity of aqueous extracts obtained from leaves of *Vitis vinifera* L., from different varieties (white and colored) harvested in Sendim, municipality of Miranda do Douro, Bragança district.

Owing to this, we determined the individual phenols by HPLC-DAD, being the antioxidant activity evaluated through the methods of blocking effect on the free radicals of DPPH, reducing power and scavenging activity for hydroxyl radical.

From the analysis of the phenolic compounds were identified six phenolic compounds, namely, *trans acid-caffeoyltartaric*, *trans-cumaroiltartaric acid*, *myricetin-3-O-glucoside*, *quercetin-3-O-glucoside*, *quercetin-3-O-galactoside* and also the *kaempferol-3-O-glucoside*, being *quercetin-3-O-glucoside* + *quercetin-3-O-galactoside* the most abundant.

The aqueous extracts from grape leaves possessed antioxidant activity on the DPPH radical-blocking and reducing power, with EC₅₀ values below 1 mg / mL.

In relation to the activity for the hydroxyl radical scavenger, it was found that extracts have pro-oxidant effect and are able to chelate iron.

So, the results suggest that the leaves of *V. vinifera* L. could constitute an interesting source of antioxidant compounds, particularly phenols, with utility at the food industries and pharmaceutical sectors.

Keywords: *Vitis vinifera* L., leaves, phenolic compounds, antioxidant activity.

1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

1.1. Introdução

Vitis vinifera L. é a espécie de videira (*Vitis* sp.) mais cultivada para a produção do vinho na Europa. Esta trepadeira da família das vitáceas, cujo fruto é a uva, foi cultivada por várias civilizações europeias desde há milhares de anos, o que originou dezenas de variedades, as denominadas *castas*, através de selecção artificial. Originária da Ásia, a *V. vinifera* L. é cultivada em todas as regiões de clima temperado, fazendo da produção de vinho uma das actividades mais antigas da civilização, desde o período neolítico [3].

A uva ou bago, de forma redonda, ovóide ou elipsóide, de peso e tamanho variável, de cor verde, amarela, dourada, rosada, rubra, azulada ou preta, geralmente doce e mais ou menos ácida e comestível, surge em forma de cacho e é o fruto da videira. É amplamente consumida, *in natura* ou na forma de sumos e geleias. Os principais compostos fenólicos da uva são os ácidos benzóicos e cinâmicos, flavonóis, antocianinas e taninos [4]. Estudos realizados referenciam que um copo de vinho tinto por dia pode prevenir doenças cardíacas. Contudo, não é o vinho em si que faz bem, mas sim os compostos fenólicos nele encontrados, tais como o *ácido trans-cafeoiltartárico*, *ácido trans-cumaroiltartárico*, *ácido ferúlico*, *miricetina-3-O-glucósido*, *quercetina-3-O-glucósido*, *quercetina-3-O-galactósido*, *campferol-3-rutinósido*, *campferol-3-glucósido* e *isorhamnetin-3-glucósido*, oriundos da uva. Num país como Portugal, com uma forte tradição vitivinícola, o consumo de vinho e seus derivados ocupou durante muito tempo um lugar de destaque na dieta, com efeitos benéficos para a saúde humana, na prevenção de doenças cardiovasculares, neuro-degenerativas e do cancro [5]. Em relação às plantas, e em particular às folhas, o uso medicinal das mesmas tem assumido um papel importante na sociedade, uma vez que muitas delas possuem propriedades que permitem um tratamento mais saudável e mais barato para algumas doenças face aos obtidos por medicamentos não naturais, produzidos por síntese [6]. Para além disso, muitas doenças resultam da ocorrência do stress oxidativo assumindo os antioxidantes um papel de fundamental importância.

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo estes ser enzimáticos ou não enzimáticos, tais como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos (flavonóides). O consumo de antioxidantes naturais, como os

compostos fenólicos presentes na maioria das plantas que inibem a formação de radicais livres, também chamados de substâncias reactivas, tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o stress oxidativo [8, 9]. O stress oxidativo ocorre como um desequilíbrio entre o balanço pró-oxidante/antioxidante, em favor da situação pró-oxidante, promovendo um dano potencial [7].

Em geral, existem dois tipos básicos de antioxidantes: naturais e sintéticos. Recentemente, tem aumentado um interesse considerável em encontrar antioxidantes que ocorrem naturalmente, para uso em alimentos ou materiais medicinais, de modo a substituir os antioxidantes sintéticos, cujo uso está a ser sujeito a restrições, devido à sua carcinogenicidade. Apesar de algumas plantas serem conhecidas por constituírem fontes de compostos fenólicos, os seus dados de composição são muitas vezes insuficientes. Além disso, diversas plantas, juntamente com os hortícolas e frutas, contêm numerosos fitoquímicos para além de compostos fenólicos, tais como compostos de nitrogénio, carotenóides e ácido ascórbico [1, 10].

Nesse âmbito, os produtos vitivinícolas têm suscitado um interesse crescente, relacionado com a presença de compostos fenólicos. Exemplo disso, refira-se a pele de uvas e folhas de videira, compostas por antocianinas e flavonóides, dentro destas, com destaque para a miricetina, quercetina e campferol. De realçar que extractos de *V. vinifera* L., obtidos a partir de pele de uva, bagaço de uva e de folhas, têm sido usados como suplementos dietéticos antioxidantes [11].

Adicionalmente em alguns países, tal como a Grécia, as folhas de videira são utilizadas na confecção de pratos culinários. Visto que os consumidores são cada vez mais exigentes acerca da qualidade dos produtos alimentares e na busca crescente de novos produtos, resultado da globalização dos mercados, a utilização das folhas de videira na alimentação surge como uma possibilidade cada vez mais promissora.

O interesse contínuo na pesquisa e identificação dos diferentes compostos químicos presentes nas variadíssimas espécies vegetais usadas na alimentação, das actividades biológicas que lhe estão associadas e do conhecimento dos benefícios que daí possam advir, justificam os estudos da composição química e do potencial antioxidante nessas matrizes.

1.2. Objectivos

Este trabalho teve como principais objectivos o estudo da composição química e da actividade antioxidante de folhas de videira de diferentes castas (brancas e tintas), colhidas na zona de Sendim, concelho de Miranda do Douro, distrito de Bragança (Norte de Portugal).

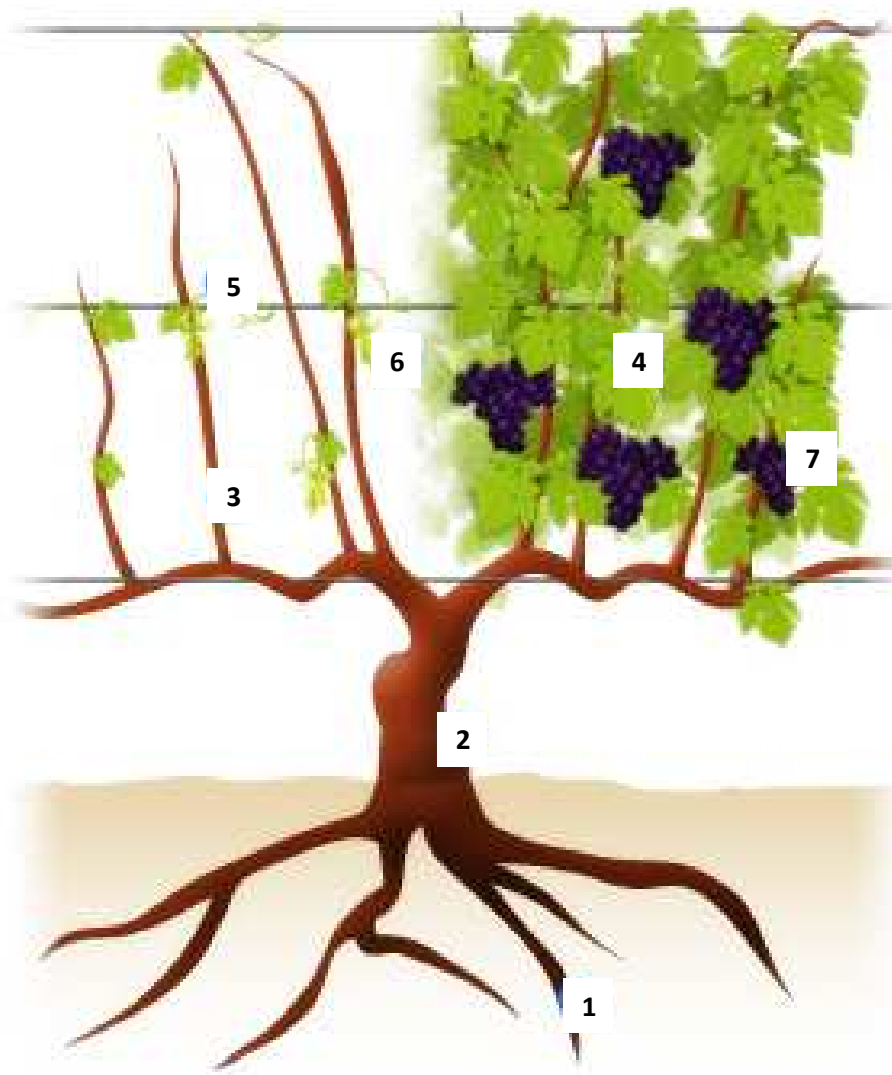
Para tal, pretendeu-se determinar nas folhas das diversas castas o teor em compostos fenólicos individuais presentes por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de díodos (HPLC-DAD).

Pretendeu-se também proceder à avaliação da actividade antioxidante por vários métodos químicos, tais como: avaliação da capacidade redutora total segundo o método Folin-Ciocalteu, o efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, o poder redutor e a actividade sequestrante para o radical hidroxilo.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. *Vitis vinifera* L.

A videira é uma planta da família das Vitáceas. Existem várias espécies de vitáceas, contudo a mais utilizada nas plantações mundiais de vinho de qualidade é a espécie *Vitis vinifera* L. (Figura 1).



Legenda: 1- Raíz; 2- Caule; 3- Vara; 4- Folhas; 5- Gavinha; 6- Flores; 7-Fruto

Figura 1. Representação da videira, *Vitis vinifera* L. (Adaptado de [13]).

2.1.1. Características botânicas

A videira pertence ao tipo de plantas denominadas Fanerogâmicas (com órgãos bem diferenciados e produtores de flor), ao sub-tipo das Angiospérmicas (plantas em que o gineceu possui estigma e os óvulos estão encerrados em ovários), à classe das Dicotiledóneas (com dois cotilédones), ao grupo das Dialipetalas (com coroa com pétalas livres), sub-grupo das Superovarianas (ovários superos) e à família das Vitáceas (coroa caduca e em que o fruto é uma baga, trepadeiras e com gavinhas) [14].

Dentro da família das Vitáceas, a videira pertence ao género *Vitis* que se distingue dos outros géneros por terem as inflorescências opostas às folhas, tendo estas cinco nervuras e uma liana sempre lenhosa; ao sub-género *Euvitis* com diagrama de nós, gavinhas bifurcadas e os bagos mais açucarados que os das outras *Vitis*.

As origens podem ser várias, sendo as cultivadas em Portugal provenientes da América e Ásia e englobam seis espécies, entre elas, a *Vitis riparia*, a *Vitis rupestris*, a *Vitis berlandieri*, a *Vitis labrusca*, a *Vitis amurensis* e a *Vitis vinifera* [14].

Dentro destas espécies temos várias variedades, que vulgarmente se denominam de castas, englobando-se nestas, castas brancas ou tintas.

2.1.2. Características morfológicas

2.1.2.1. Raíz

A raiz é o órgão que segura a planta ao solo através da qual se faz a sua alimentação, sendo também um órgão de acumulação de reservas. Na videira encontram-se três tipos de raízes. As raízes principais, que se dizem fasciculadas, partindo do colo e que correspondem às mais grossas e lenhosas. As raízes secundárias, finas e tenras, que partem das primárias e que se dividem ainda noutras mais finas denominadas radiculares. Estas últimas são responsáveis pela absorção da água e dos sais minerais, tendo uma duração limitada de um ano. Ao conjunto destas raízes dá-se o nome de cabelame [14].

2.1.2.2. *Caule*

O caule da videira divide-se em duas partes principais: tronco ou cepa e ramos.

O tronco corresponde à zona mais volumosa, raramente é direito, tem uma casca espessa tanto maior quanto mais velha é a videira. Como a videira é uma planta trepadeira, tem necessidade de se agarrar a um tutor para ficar na posição vertical.

Os ramos podem ser de dois tipos, ramo de ano ou ramo de dois ou mais anos. Os ramos do ano normalmente são compridos e designam-se por pâmparos ou sarmentos, ladrões, netas ou antecipadas, conforme a sua localização de rebentação. Os ramos de dois ou mais anos, são ramos nascidos no ano anterior e que foram deixados, com maior ou menor comprimento na altura da poda. Estes ramos tomam o nome de vara, se tiverem mais de dois gomos, e talão, polgar, torno, entre outros, quando se deixa apenas um gomo [14].

2.1.2.3. *Folhas*







É das partes mais importantes da videira. Elas são responsáveis por muitas funções vitais na planta, como a transpiração, a respiração e a função nutritiva (fotossíntese).

A sua forma varia segundo a espécie e variedade, sendo a identificação feita pela forma, tamanho, tipo de recortes, presença ou não de pêlos, cor mais ou menos acentuada, aspecto da superfície da folha e ainda a forma do seio peciolar.

As folhas podem classificar-se em folhas adultas e folhas jovens. As primeiras correspondem às folhas nascidas até ao 11º nó, as seguintes encontram-se localizadas na extremidade do ramo. As folhas adultas têm como função principal trabalhar para a maturação do cacho, enquanto que as folhas jovens apenas trabalham para o seu desenvolvimento [14].

Como este trabalho incidiu na composição de folhas de diferentes castas de videira, apresentam-se na tabela que se segue algumas amostras de folhas *V. vinifera* L.

Quadro 1. Folhas de distintas castas analisadas neste trabalho.

Casta	Nome	Folha	Casta	Nome	Folha
Branca	Gouveio		Tinta	Rufete	
	Malvasia Fina			Touriga Nacional	
	Viosinho			Trincadeira	

2.1.2.4. Flor

Observando uma flor de videira, podemos distinguir-lhe várias partes: o cálice, pouco desenvolvido e com cinco sépalas; a coroa, com cinco pétalas unidas na parte superior, que toma o nome de caliptra ou caruma; o androceu, que corresponde à parte masculina da flor e que possui cinco estames formados pelo filete e pela antera; o gineceu, que corresponde à parte feminina e é constituído por um pistilo que possui um ovário com dois carpelos soldados e um estilite curto que termina num só estigma [14].

2.1.2.5. Fruto

Os frutos das videiras, não são os cachos como vulgarmente se diz, mas sim os bagos. Como todos os frutos, o bago é resultado do desenvolvimento e transformação da flor.

Os cachos e os bagos podem ter várias formas. Os cachos podem ser cilíndricos, cónicos alados e ramosos. Relativamente aos bagos, estes podem ser globulares, alongados, achatados, elipsoidais, ovóides, entre outros. Além da forma, a cor final do bago, a consistência da polpa, a espessura e o sabor, são características que diferem de casta para casta [14].

2.1.3. O benefício do consumo das folhas de videira *Vitis vinifera* L.

O consumo de alimentos saudáveis, como vegetais, são recomendados não só pela sua riqueza em antioxidantes, vitaminas, minerais e fibras, mas também pelo seu baixo teor em gorduras e baixo valor energético [15].

Vários efeitos benéficos à saúde, têm sido atribuídos aos compostos fenólicos presentes nas frutas, vegetais, chás e vinhos. Estudos epidemiológicos, clínicos e *in vitro* mostram múltiplos efeitos biológicos relacionados com os compostos fenólicos da dieta, tais como, actividades antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana e anticarcinogénica [16].

O consumo de frutas e vegetais tem sido associado a uma baixa incidência de mortalidade de cancro e doenças cardíacas. Comer frutas e vegetais também diminui a pressão arterial, estimula o sistema imunológico, desintoxica contaminantes e poluentes, e reduz a inflamação. Os fitoquímicos presentes nos tecidos da planta responsáveis pela capacidade antioxidante podem ser largamente atribuídos aos compostos fenólicos, antocianinas, flavonóides e outros compostos [17]. No entanto, há pouca informação disponível sobre as capacidades antioxidantes em folhas da videira.

Além disso, extractos de frutas, ervas, legumes, cereais e outros materiais vegetais ricos em compostos fenólicos, assumem um papel cada vez mais interessante na indústria alimentar porque retardam a degradação oxidativa dos lípidos e assim melhoram a qualidade e o valor nutritivo dos alimentos. A actividade antioxidante dos compostos fenólicos é principalmente devida às suas propriedades redox, que lhes permite agir como agentes redutores, doadores de hidrogénio [18].

Acredita-se que as propriedades relacionadas com a saúde humana exercidas pelos compostos fenólicos (destacando-se os flavonóides) são baseadas principalmente na sua actividade antioxidante, actuando como sequestradores de radicais livres e quelantes de metais capazes de catalisar a peroxidação de lípidos.

2.2. Compostos fenólicos

Os compostos presentes nos organismos vivos dividem-se em dois grandes grupos: metabolitos primários e metabolitos secundários. Os primeiros são produzidos nos processos metabólicos primários, como a respiração e a fotossíntese. Estes, idênticos na maioria dos organismos, incluem pequenas moléculas, tais como açúcares, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, entre outros. Os metabolitos secundários são os compostos produzidos pelos derivados do metabolismo primário, estão presentes principalmente nas plantas superiores e têm uma distribuição restrita, ou seja, são específicos de certas espécies e as suas funções no metabolismo ainda estão pouco esclarecidas [20, 21].

Os compostos fenólicos são classificados como metabolitos secundários de grande importância, e estão amplamente distribuídos no reino vegetal, estando presentes essencialmente nas plantas vasculares, nas quais o tipo e a quantidade destes compostos varia nas diferentes partes da planta, como folhas, flores, frutos, caules e sementes [20]. De facto, as plantas produzem inúmeros compostos, assumindo de entre estes, os compostos fenólicos de extrema importância.

Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxilos. Os principais compostos fenólicos presentes são os flavonóides e os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos) [18]. Pela sua ubiquidade e simultaneamente pela sua presença característica dentro de grupos botânicos, alguns deles podem ser considerados marcadores químicos em sistemas taxonómicos, sendo muitas vezes utilizados no controlo de qualidade e na avaliação da autenticidade de produtos naturais [22].

Em relação aos flavonóides e em particular às antocianinas, estas encontram-se largamente distribuídas na natureza e são responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e todas as tonalidades de vermelho que aparecem em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas. Nas videiras, elas acumulam-se nas folhas durante a senescência e são responsáveis pela coloração das cascas das uvas tintas, sendo encontradas também na polpa de algumas variedades de uvas [14].

Os ácidos fenólicos são metabolitos de plantas amplamente espalhados por todo o reino vegetal. O interesse recente nos ácidos fenólicos deriva da sua função protectora

em potencial, através da ingestão de frutas e legumes, contra as doenças provocadas por danos oxidativos, tais como doenças cardíacas, AVC e cancro.

Os compostos fenólicos são essenciais para o crescimento e reprodução das plantas. A importância da actividade antioxidante dos compostos fenólicos e a sua utilização possível em alimentos processados como um antioxidante natural levou ao desenvolvimento de vários estudos nos últimos anos [18].

Entre as frutas, a uva é uma das maiores fontes de compostos fenólicos. Os principais fenólicos presentes na uva são os flavonóides (antocianinas, flavanóis e flavonóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos) e uma larga variedade de taninos.

De seguida aborda-se em maior pormenor os ácidos fenólicos e os flavonóides.

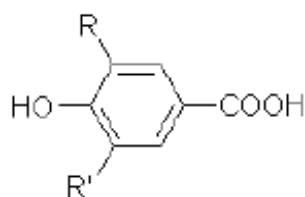
2.2.1. Ácidos fenólicos

A denominação geral de ácidos fenólicos engloba os ácidos benzóicos com sete átomos de carbono (C_6-C_1) e os ácidos cinâmicos com nove átomos de carbono (C_6-C_3) [26].

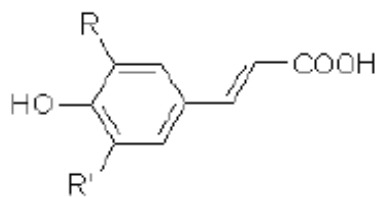
Os fenilpropanóides, termo usado para referir a maioria dos compostos em C_6-C_3 , e a maioria dos compostos em C_6-C_1 , são os metabolitos secundários mais comuns nas plantas, bactérias e fungos [20].

O ácido gálico na forma combinada é, de entre os ácidos benzóicos, o mais frequente na natureza, e, quando combinado com a glucose, forma o grupo dos taninos hidrolisáveis [27].

A estrutura química dos principais ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos (assim denominados os ácidos benzóicos e cinâmicos, uma vez que estes compostos são geralmente hidroxilados) encontram-se na Figura 2.

Derivados do ácido benzóico

- R = R' = H; **ácido *p*-hidroxibenzóico**
- R = OH, R' = H; **ácido protocatéquico**
- R = OCH₃, R' = H; **ácido vanílico**
- R = R' = OH; **ácido gálico**
- R = R' = OCH₃; **ácido siringico**

Derivados do ácido cinâmico

- R = R' = H; **ácido *p*-cumárico**
- R = OH, R' = H; **ácido cafeico**
- R = OCH₃, R' = H; **ácido ferúlico**
- R = R' = OCH₃; **ácido sinápico**

Figura 2. Estrutura química dos ácidos fenólicos mais frequentes [22].

Os ácidos fenólicos ocorrem quase sempre esterificados com outros compostos, podendo ocorrer, por exemplo, sob a forma de ésteres do ácido tartárico.

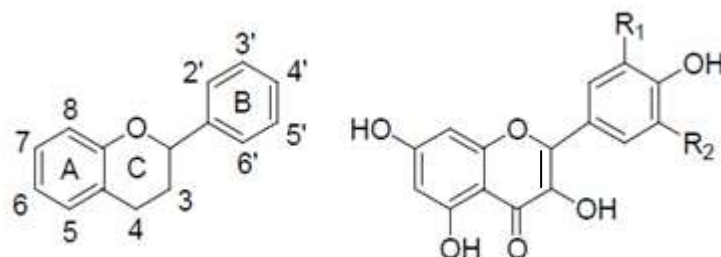
2.2.2. Flavonóides

Os flavonóides são uma classe de compostos fenólicos presentes, vulgarmente em frutas, legumes, vinhos e chás. Até ao momento, foram descritos 4000 flavonóides naturais, a maioria dos quais em plantas superiores. Os flavonóides são caracterizados pela presença de dois anéis aromáticos benzénicos ligados por uma cadeia com três átomos de carbono (que pode ou não formar um terceiro anel) com a estrutura geral C₆-C₃-C₆ [28]. Por conveniência, designam-se os anéis por A, B e C e o sistema de numeração para a maioria dos flavonóides é o representado na Figura 3.

Conforme a natureza da cadeia de ligação de três átomos de carbono e o nível de oxidação, surgem as diferentes classes de flavonóides, como por exemplo as dihidroflavonas (flavanonas), flavonas, flavonóis, antocianinas e flavanóis (catequinas), como se pode verificar na Figura 4 [26].

Estas substâncias são pigmentos amarelos presentes nas películas e folhas de castas brancas e tintas. Os flavonóides com um grupo hidroxilo 4', como a miricetina, quercetina e campferol, são os mais comuns (Figura 3).

A quercetina tem uma actividade antioxidante muito elevada, que quando comparada com a α -tocoferol (vitamina E), representa 90% deste [12].



Legenda: *miricetina* R_1 OH e R_2 OH

quercetina R_1 OH e R_2 H

campferol R_1 H e R_2 H

Figura 3. Estrutura geral dos flavonóides mais comuns [29].

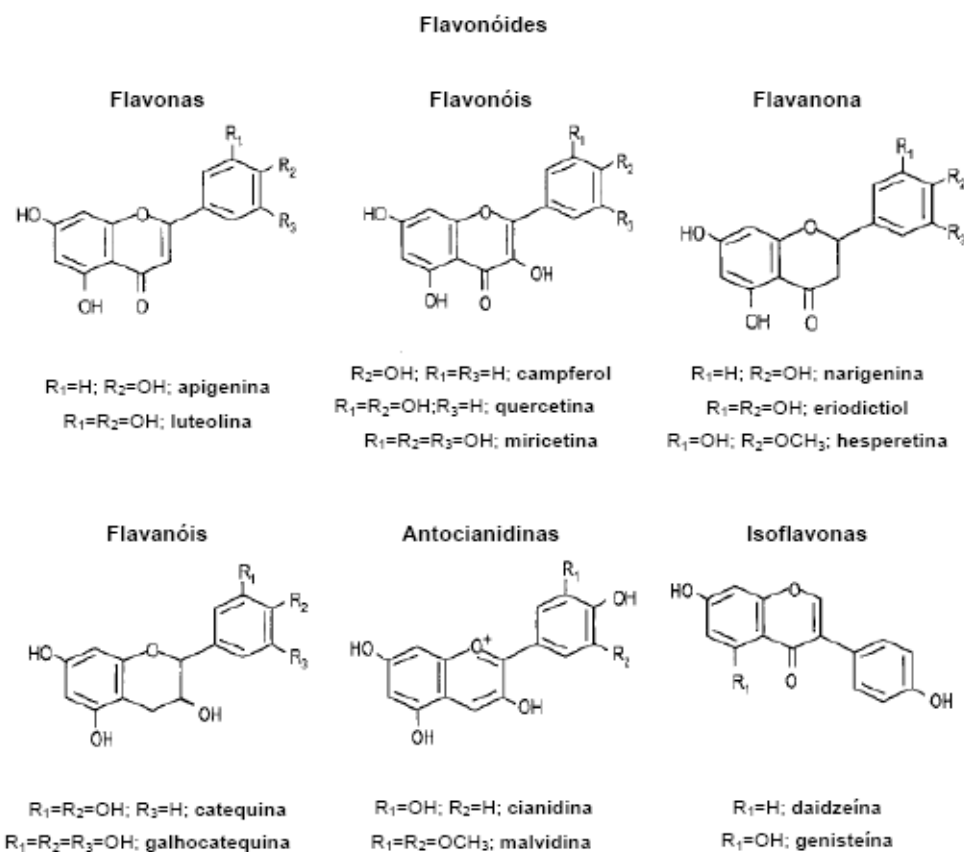


Figura 4. Estruturas das principais classes de flavonóides [22].

Os flavonóides protegem o corpo humano contra problemas produzidos por agentes oxidantes, tais como, raios ultravioleta, poluição ambiental, produtos químicos nos alimentos, etc. O homem não consegue produzir estes produtos químicos de protecção, pelo que devem ser obtidos através da dieta ou de suplementos.

2.2.3. Propriedades fisiológicas

De entre as muitas funções atribuídas aos fenóis nos vegetais, destacam-se a sua acção nos mecanismos de defesa, na coloração e ainda os seus efeitos antioxidantes. Os compostos fenólicos conferem resistência à planta, reduzindo os efeitos das condições de stress provocadas por meios biológicos ou mecânicos [31]. Além disso, com o clima mediterrânico, as plantas estão sujeitas a temperaturas elevadas e a demasiada exposição solar. Nestas condições, os compostos fenólicos são essenciais, pois oferecem resistência à foto-oxidação pelas radiações solares, uma vez que estes compostos têm grande capacidade de absorverem no U.V., evitando assim o envelhecimento prematuro da planta [32].

Em relação à actividade antioxidante de alguns compostos fenólicos, esta é de fundamental importância, pois estes compostos são capazes de neutralizar os radicais livres formados no organismo durante o normal funcionamento do metabolismo e pelas exposições ao meio ambiente [33].

Paralelamente, para prevenir ou retardar a alteração oxidativa nos produtos alimentares, cada vez mais é usual recorrer-se a aditivos, nomeadamente, a antioxidantes, que podem ser de origem natural ou sintética, sendo os primeiros os mais desejáveis.

Entre os compostos fenólicos, tem sido demonstrado que os flavonóides exercem efeitos moderados contra culturas de células malignas, apresentam actividade antiagregante de células sanguíneas, poder antibiótico, anti-inflamatório e antiviral. Além disso, têm mostrado actividade contra as alergias, hipertensão, artrite e mutações [34, 35].

2.3. Actividade antioxidante

Em organismos aeróbios, os radicais livres são constantemente produzidos durante o funcionamento normal da célula, na maior parte das vezes sob a forma de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Estas são compostos químicos resultantes da activação ou redução do oxigénio molecular (O_2) ou derivados dos produtos da redução. As principais espécies reactivas de oxigénio são: o anião radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o dióxigénio singuleto (1O_2) e o radical hidroxilo (HO^{\bullet}) [36].

O radical hidroxilo (HO^{\bullet}) é uma espécie radicalar e a mais reactiva das ROS. Por essa razão, o local mais afectado pelo radical hidroxilo é a zona onde esta espécie é formada. Sendo a produção de ROS uma consequência natural do metabolismo aeróbio, as células possuem enzimas que desintoxicam estas espécies. A superóxido dismutase, por exemplo, elimina o superóxido por dismutação. Já o peróxido de hidrogénio é eliminado por peroxidases como a catalase e a glutathione peroxidase. Não se conhece nenhuma enzima que elimine o radical hidroxilo, pelo que este é evitado pela eliminação dos seus precursores. Outras proteínas que participam na captura e transporte de iões metálicos e na redução química de estruturas celulares oxidadas são também importantes no combate ao stress oxidativo [20].

A formação do radical hidroxilo *in vivo* por via química deve-se maioritariamente à redução do peróxido de hidrogénio por um metal de transição, através da conhecida reacção de Fenton, em que o peróxido de hidrogénio reage com a forma reduzida do metal dando origem ao radical hidroxilo, a um ião hidróxido e à forma oxidada do metal [44].

No entanto, a principal via de formação do radical hidroxilo resulta do efeito indirecto da radiação ionizante sobre os tecidos vivos, ou seja, a radiólise da água por absorção da energia da radiação, que conduz à excitação e ionização da molécula com formação das espécies radicalares electrão solvatado, átomo de hidrogénio, radical anião superóxido e radical hidroxilo [45]. Desta forma, o radical hidroxilo pode ser considerado formalmente como um “fragmento” da molécula de água. De facto, sendo esta uma espécie particularmente estável, a cisão homolítica de uma das suas ligações O-H requer uma quantidade de energia importante, que pode ser conseguida por fotólise, sonólise ou radiólise. Contudo, como referido anteriormente, o radical

hidroxilo pode ser gerado em meio biológico por uma cascata de reacções, nas quais estão também envolvidas outras “espécies activas de oxigénio” [44].

Uma vez produzidos, a maior parte dos radicais livres são removidos pelas defesas antioxidantes da célula que incluem enzimas e moléculas não enzimáticas. A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes são uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo. Em concentrações baixas ou moderadas, as ROS podem ser benéficas para a célula, estando envolvidas em vários processos fisiológicos de sinalização e de regulação [38]. Entretanto, há situações em que o equilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes pode ser destruído devido a uma produção excessiva de ROS. A este desequilíbrio denomina-se stress oxidativo, o qual pode acarretar danos a nível dos lípidos, proteínas e DNA, levando à sua alteração e em muitas situações à sua inutilização [38].

Em relação à produção de ROS e de espécies reactivas de nitrogénio (RNS), na cadeia respiratória são produzidos aniões superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que podem ser transformados em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radicais hidroxilo (HO^{\bullet}). Estes radicais podem reagir com lípidos membranares (LH), promovendo o processo de peroxidação lipídica, originando radicais lipídicos (L^{\bullet}), radicais peroxilo (LOO^{\bullet}) e lípidos hidroperóxidos (LOOH). Além disso, a sintase do óxido nítrico mitocondrial (NOS) produz óxido nítrico (NO^{\bullet}), o qual se combina com o anião superóxido para produzir peroxinitrilo ($ONOO^-$). Quando em excesso, todas estas espécies podem causar danos mitocondriais e celulares [38].

Está hoje em dia claramente demonstrado que muitas condições patofisiológicas estão relacionadas com o envolvimento de radicais livres no metabolismo das células vivas. Podem referir-se como exemplos, o envelhecimento celular, a aterosclerose, os diabetes, e várias doenças neurológicas degenerativas, a sida e o cancro.

Nesta perspectiva os antioxidantes presentes na nossa dieta assumem uma grande importância como possíveis agentes protectores do corpo humano na redução desses danos oxidativos.

2.3.1. Métodos utilizados para avaliar a actividade antioxidante

Existem vários métodos que permitem avaliar a actividade antioxidante, passando pela capacidade de bloquear radicais livres, de reduzir iões metálicos, entre outros. Passa-se de seguida, a apresentar os métodos utilizados no presente trabalho.

2.3.1.1. Efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (Figura 5) é um radical livre estável, capaz de aceitar um electrão ou um átomo de hidrogénio, tornando-se num não radical dificilmente oxidável.

Devido ao electrão desemparelhado, o DPPH apresenta uma forte absorvância a 517 nm. Se o electrão emparelhar, essa absorvância diminui (Figura 6).

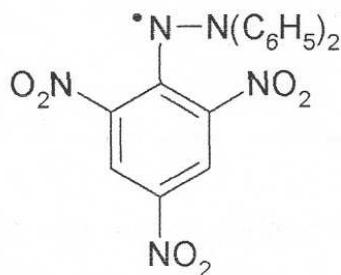


Figura 5. Estrutura química do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).

O uso do ensaio do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH é um método usado regularmente para avaliar a capacidade dos antioxidantes para sequestrar radicais livres. A absorvância a 517 nm diminui à medida que a reacção entre as moléculas antioxidantes e os radicais de DPPH ocorre. Assim, quanto mais rapidamente decresce a absorvância, maior será a actividade antioxidante do extracto sob estudo [41]. Na Figura 7, encontram-se representados diferentes extractos sujeitos ao método DPPH.

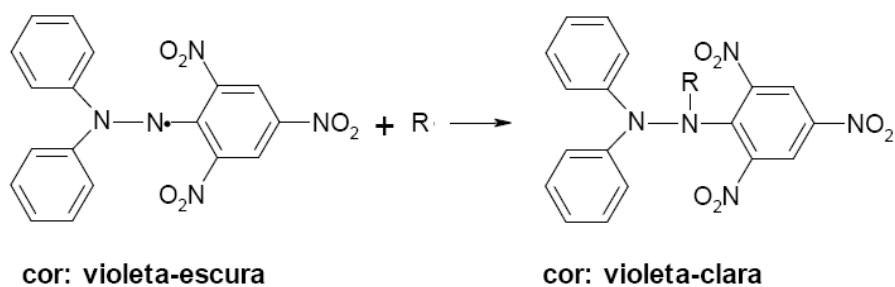


Figura 6. Explicação química para a alteração na cor [42].



Figura 7. Determinação do DPPH e sua visualização após 1h de repouso no escuro.

2.3.1.2. Efeito do poder redutor

No ensaio do poder redutor, a presença de agentes redutores (isto é, antioxidantes) provoca a redução do complexo Fe^{3+} /ferricianeto a uma forma ferrosa (Fe^{2+}). Dessa forma, a formação de azul “Perl’s Prussian”, medida a 700 nm, pode ser usada para monitorizar a concentração de Fe^{2+} [49].

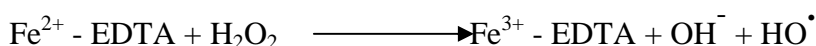
Ao contrário do método anterior, neste ensaio, verifica-se o aumento de absorvância que indica um maior poder redutor. A cor amarela da solução testada muda para vários tons de verde e azul, dependendo do poder redutor de cada extracto.

2.3.1.3. *Actividade sequestrante para o radical hidroxilo*

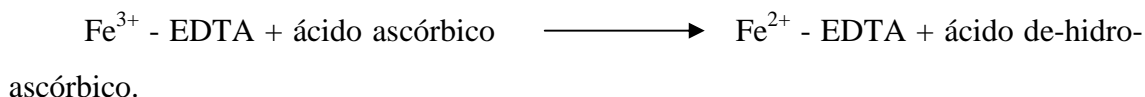
O radical hidroxilo (HO•) é o mais reactivo e o mais deletério para o organismo, possui um tempo de semi-vida curto (10 segundos) e não se difunde para longe do local onde é produzido. Esta ROS pode atacar o DNA, hidroxilar as suas bases, provocar modificações nos açúcares, quebrar cadeias, dar origem a ligações cruzadas, conduzindo à morte celular ou a fenómenos de mutagénese. Pode também causar danos nas proteínas e está envolvido na peroxidação lipídica, provocando a ruptura e perda de funcionalidade das membranas celulares.

A formação do HO• *in vivo* deve-se maioritariamente à redução do peróxido de hidrogénio por um metal de transição, através da reacção de Fenton, em que o H₂O₂ reage com a forma reduzida do metal dando origem ao radical hidroxilo, a um ião hidróxido e à forma oxidada do metal.

Em mais pormenor, os radicais hidroxilo podem ser gerados em misturas constituídas por H₂O₂, Fe³⁺ - EDTA e ácido ascórbico (sistema de Fenton), segundo



Esta reacção é acelerada pela presença de agentes redutores como o ácido ascórbico, que reduzem o Fe³⁺ a Fe²⁺:

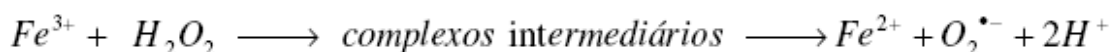


Após a formação de radicais hidroxilo e na presença da desoxirribose, formar-se-á malonildialdeído:



Este na presença do ácido tiobarbitúrico forma um cromofóro de cor rosa, com um máximo de absorção a 532 nm.

Actuando paralelamente à reacção de Fenton, vestígios de Fe(III) podem reagir com o peróxido de hidrogénio especialmente se estiverem ligados a certos quelantes. No entanto, esta é uma reacção mais lenta que aquela com Fe(II), conforme a equação:



De facto, estudos reportam que $\text{HO}\bullet$ pode ser formado a partir de sistemas contendo certos quelatos de Fe(III) (por exemplo, EDTA férrico) e H_2O_2 , aparentemente envolvendo $\text{O}_2^{\bullet-}$, uma vez que esta reacção é inibida pela presença da enzima superóxido dismutase – SOD [46].

3. MATERIAL E MÉTODOS

laboratório as amostras foram congeladas e mantidas à temperatura de -20°C até liofilização.

Quadro 2. Designação das castas amostradas, quer brancas quer tintas, e respectivos sinónimos conhecidos [47].

Casta Branca		Casta Tinta	
Nome principal	Sinónimos conhecidos	Nome principal	Sinónimos conhecidos
Carrega Branco	Barraquesa	Alicante Bouchet	Tinta Fina
Chardonnay	-	Bastardo	Bastardinho
Côdega	-	Cornifesto	Cornifesto Tinto
Gouveio	Verdelho	Merlot	-
Malvasia Fina	Broal	Mourisco	-
Malvasia Rei	Grés	Rufete	Tinta Pinheiro
Rabigato	-	Trincadeira	Tinta Amarela
Samarrinho	-	Gorda	Tinta Gorda
Viosinho	-	Touriga Cão	Padeiro
		Touriga Franca	Touriga Francesa
		Touriga Nacional	Preto Mortágua

Posteriormente as amostras foram liofilizadas (Snijders Scientific (Tilburg, Holland)) e trituradas (≤ 20 mesh). As amostras trituradas, devidamente fechadas em tubos de Falcon, foram etiquetadas e armazenadas num local escuro e seco (exsiccador) para evitar possíveis degradações dos compostos presentes até à preparação dos extractos.

3.2. Preparação dos extractos

De cada amostra foram preparados extractos, pesando cerca de 2,0 g de pó numa balança electrónica modelo Acculab Sartorius Group. Procedeu-se à sua dissolução em 125 mL de água destilada e levou-se à ebulição numa placa de aquecimento durante 45 minutos. De seguida, filtrou-se com papel de filtro Whatman nº 4. Após terem arrefecido, os extractos aquosos foram congelados, liofilizados e na altura da análise novamente re-dissolvidos em água destilada, para várias concentrações.

A água utilizada em todos os ensaios foi tratada no sistema de purificação da água Milli-Q (TGI Pure Water Systems).

3.3. Determinação dos fenóis individuais por HPLC-DAD

Os fenóis individuais foram determinados por HPLC/DAD de fase reversa. Inicialmente, foi necessário realizar alguns ensaios com diferentes solventes, fluxos e gradientes, de forma a obter a melhor separação e identificação do maior número de compostos fenólicos.

A determinação dos compostos fenólicos foi realizada usando uma unidade analítica de HPLC (Gilson), acoplada a um detector Diode Array (Gilson) (Figura 9). Os compostos foram separados usando uma coluna Spherisorb ODS2 (25,0 x 0,46 cm, com tamanho de partícula de 5 μm) e uma fase móvel composta de 2% (v/v) de ácido acético em água (A) e metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) (B). A eluição foi realizada a um caudal de 1 mL min⁻¹ e com o seguinte gradiente: 5% de B aos 0 min, 15% de B aos 3 min, 25% de B aos 13 min, 30% de B aos 25 min, 40% de B aos 30 min, 42% de B aos 35min, 43% de B aos 40 min, 47% de B aos 50 min e 100% de B aos 54 min.



Figura 9. Sistema de HPLC-DAD utilizado no presente trabalho.

Os dados espectrais de todos os picos foram obtidos na gama 200-600 nm, sendo os cromatogramas adquiridos e analisados a 280, 320, 350 e 500 nm.

Os diferentes compostos fenólicos foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção com os dos respectivos padrões.

Os dados foram processados pelo sistema de software Unipoint (Gilson Medical Electronics) e a pureza dos picos verificada.

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada através da absorvância registada nos cromatogramas das amostras e sua comparação com as dos padrões externos (calibração externa).

3.4. Determinação da actividade antioxidante

A actividade antioxidante dos extractos aquosos das diferentes castas de videira foi avaliada por diferentes métodos, nomeadamente pelo método de Folin-Ciocalteu para avaliação da capacidade redutora total; pelo método do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo); pelo método do poder redutor e ainda pela actividade sequestrante do radical hidroxilo.

3.4.1. Avaliação da capacidade redutora total pelo método Folin-Ciocalteu

A avaliação da capacidade redutora total, método usado por muitos autores para avaliar o teor em fenóis totais, dos extractos das amostras testadas foi levada a cabo de acordo com o procedimento descrito em Oliveira [49], com algumas modificações. Assim, misturou-se 1 mL de amostra com 1 mL de reagente de Folin e Ciocalteu e adicionaram-se 7 mL de água destilada. A reacção foi mantida no escuro durante 90 minutos, após os quais se leu a absorvância a 725 nm (Espectrofotómetro Genesy 10 UV, Thermo Electron Corporation). Usou-se o ácido gálgico para calcular a recta padrão, tendo os resultados sido expressos em miligramas equivalentes de ácido gálgico por grama de extracto.

3.4.2. Efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH

A capacidade para bloquear os radicais livres de DPPH foi estudada de acordo com o descrito por Hatano *et al* [50]. Para tal misturaram-se 0,3 mL das várias concentrações de extracto de cada amostra com 2,7 mL de uma solução metanólica contendo radicais de DPPH (6×10^{-5} mol/L) (Alfa Aesar). Após agitação, a mistura foi colocada a repousar no escuro até se obterem valores estáveis de absorvância. A

redução do radical de DPPH foi medida pela monitorização contínua do decréscimo da absorvância a 517 nm. O efeito bloqueador do DPPH foi calculado como uma percentagem da descoloração do DPPH, usando a seguinte equação:

$$\% \text{ Efeito bloqueador} = [(A_{\text{DPPH}} - A_A) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

em que A_A corresponde à absorvância da solução com extracto da amostra e A_{DPPH} à absorvância da solução de DPPH. A concentração de extracto a que corresponde 50% de inibição (EC_{50}) foi calculada a partir da representação gráfica da percentagem do efeito bloqueador em função da concentração de extracto.

3.4.3. Determinação do poder redutor

O poder redutor foi avaliado de acordo com o procedimento descrito por Oyaizu [51], com algumas modificações. Assim, 1 mL das diferentes concentrações de extracto de cada amostra foram misturados com 2,5 mL de solução de fosfato de sódio com pH 6,6 (Sigma Chemical Co.) e com 2,5 mL de ferricianeto de potássio (0,2 M) a 1% (Sigma Chemical Co.). A mistura foi agitada vigorosamente e posteriormente incubada a 50°C durante 20 minutos. Após esse período, foram adicionados 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% (m/v) (Sigma Chemical Co.) e centrifugou-se. Retiraram-se 2,5 mL de sobrenadante que foram misturados com 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico a 0,1% (Sigma Chemical Co.), sendo as absorvâncias lidas a 700 nm.

A concentração de extracto correspondente a 0,5 de absorvância e designada por EC_{50} foi calculada a partir da representação gráfica da absorvância registada a 700 nm em função da concentração de extracto correspondente.

3.4.4. Avaliação do radical hidroxilo

A avaliação do radical hidroxilo foi realizada de acordo com o procedimento descrito em Valentão [44], com algumas modificações. Assim, a 100 µL de amostra adicionaram-se 690 µL de tampão fosfato 18 mM pH 7,4, 10 µL de ácido áscorbico a 5 mM, 50 µL de cloreto férrico a 0,4 mM e 50 µL de peróxido de hidrogénio a 28,4 mM (Panreac, Barcelona, Espanha). Após agitação, adicionou-se 100 µL de desoxirribose 28

mM, deixando em banho-maria a 37°C, durante 60 minutos. Seguidamente foram adicionados 1 mL de ácido tiobarbitúrico 1% (Sigma- Aldrich, St. Louis, USA) e 1 mL de ácido Tricloroacético 2,8%, colocando-se a 100°C, cerca de 15 minutos. A absorvância foi lida a 532 nm. Nesta determinação do radical hidroxilo fez-se um controlo, onde se substituiu a desoxirribose por tampão fosfato. Procedeu-se, ainda, em testes independentes à substituição do ácido ascórbico por tampão fosfato, e à substituição do EDTA utilizado com o cloreto férrico a 0,04 mM por tampão fosfato.

3.5. Apresentação de resultados

Todas as amostras foram extraídas em triplicado, e os ensaios, desde a quantificação dos compostos fenólicos até à avaliação da actividade dos extractos, foi também realizada em duplicado. Os resultados apresentam-se em termos de média e desvio padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Rendimentos de extracção

Os rendimentos de extracção das amostras de folhas de videira variaram entre 8,41%, na casta Tinta Gorda, e 17,89%, na casta Trincadeira (Quadro 3), ambas castas tintas.

Quadro 3. Rendimentos de extracção (média \pm desvio padrão)

Castas	Rendimento de extracção (%)
Casta branca	
Carrega Branco	14,51 \pm 1,77
Chardonnay	15,83 \pm 1,12
Côdega	9,01 \pm 1,59
Gouveio	9,18 \pm 0,88
Malvasia Fina	13,21 \pm 1,28
Malvasia Rei	8,53 \pm 0,19
Rabigato	13,33 \pm 2,24
Samarrinho	15,68 \pm 0,88
Viosinho	10,44 \pm 0,20
Média	12,2 \pm 2,9
Casta tinta	
Alicante Bouchet	16,23 \pm 1,18
Bastardo	17,02 \pm 2,28
Cornifesto	8,98 \pm 0,93
Merlot	16,28 \pm 4,02
Mourisco	13,67 \pm 2,57
Rufete	16,42 \pm 3,48
Tinta Gorda	8,41 \pm 0,99
Tinto Cão	15,30 \pm 2,33
Touriga Francesa	15,44 \pm 1,85
Touriga Nacional	16,87 \pm 2,79
Trincadeira	17,89 \pm 1,57
Média	14,8 \pm 3,2

Apesar da média de rendimento de extracção ter sido superior nas castas tintas (14,8% *versus* 12,2%), não houve um padrão constante uma vez que o menor rendimento de extracção foi também obtido numa amostra de folhas de uma casta tinta. Nas castas brancas, o valor superior registou-se para as folhas da casta Chardonnay (com 15,83%), enquanto que o menor valor de rendimento foi observado para a Malvasia Rei (com 8,53%).

4.2. Composição em compostos fenólicos

4.2.1. Identificação dos compostos

A análise por HPLC-DAD dos extractos aquosos de folhas das diferentes castas de videira, revelou a presença de diferentes derivados hidroxicinâmicos e flavonóides. Assim, foi possível identificar cinco compostos, nomeadamente: o *ácido trans-cafeoiltartárico*, o *ácido trans-cumaroiltartárico*, a *miricetina-3-O-glucósido*, a *quercetina-3-O-glucósido*, a *quercetina-3-O-galactósido* e ainda o *campferol-3-O-glucósido*. As formas de estrutura dos compostos identificados encontram-se nas Figuras 10 a 14, bem como os espectros de absorção.

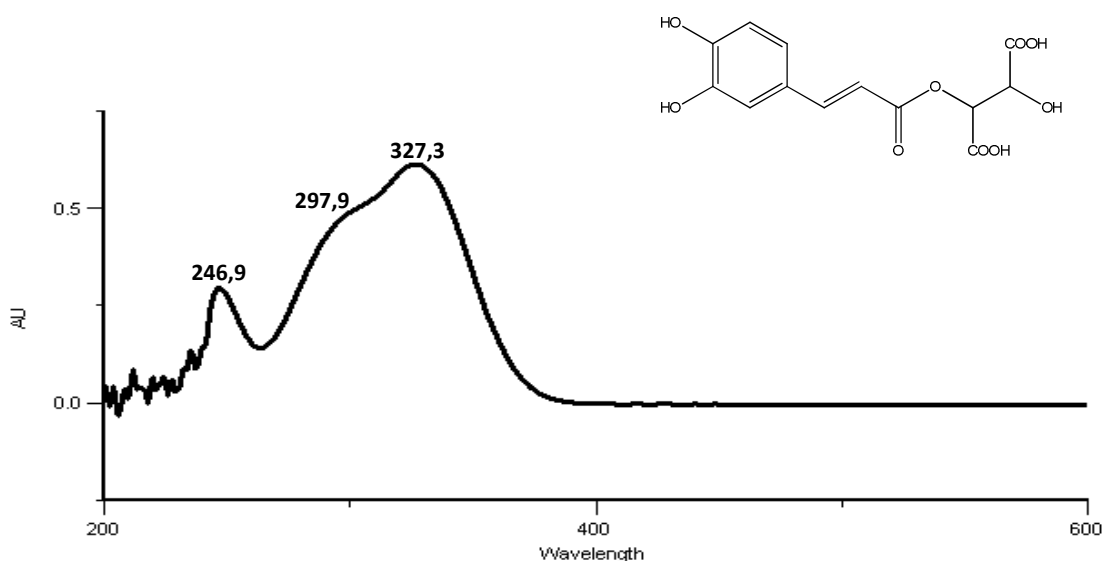


Figura 10. Espectro de absorção do *ácido cafeoiltartárico* e respectiva fórmula da estrutura.

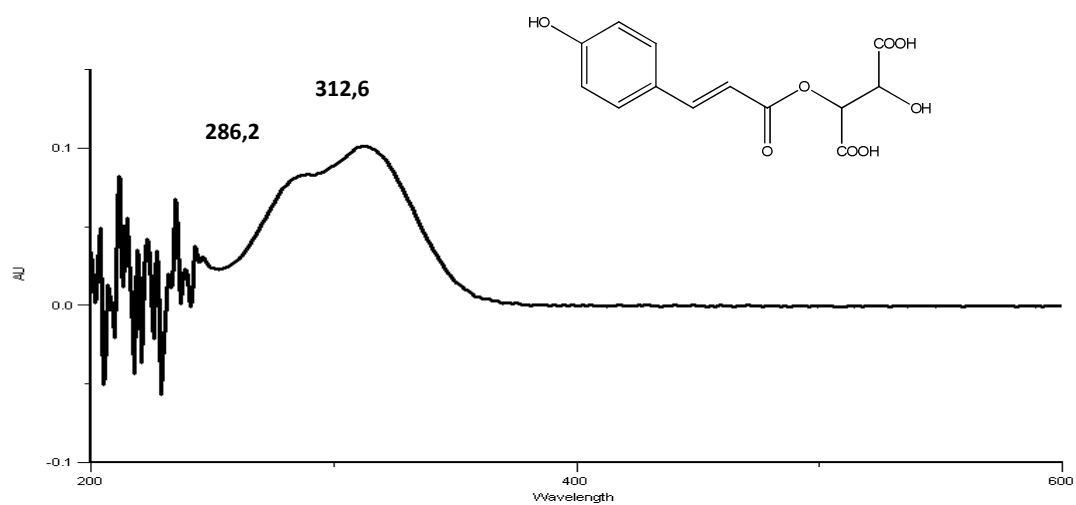


Figura 11. Espectro de absorvância do *ácido cumaroiltartárico* e respectiva fórmula da estrutura.

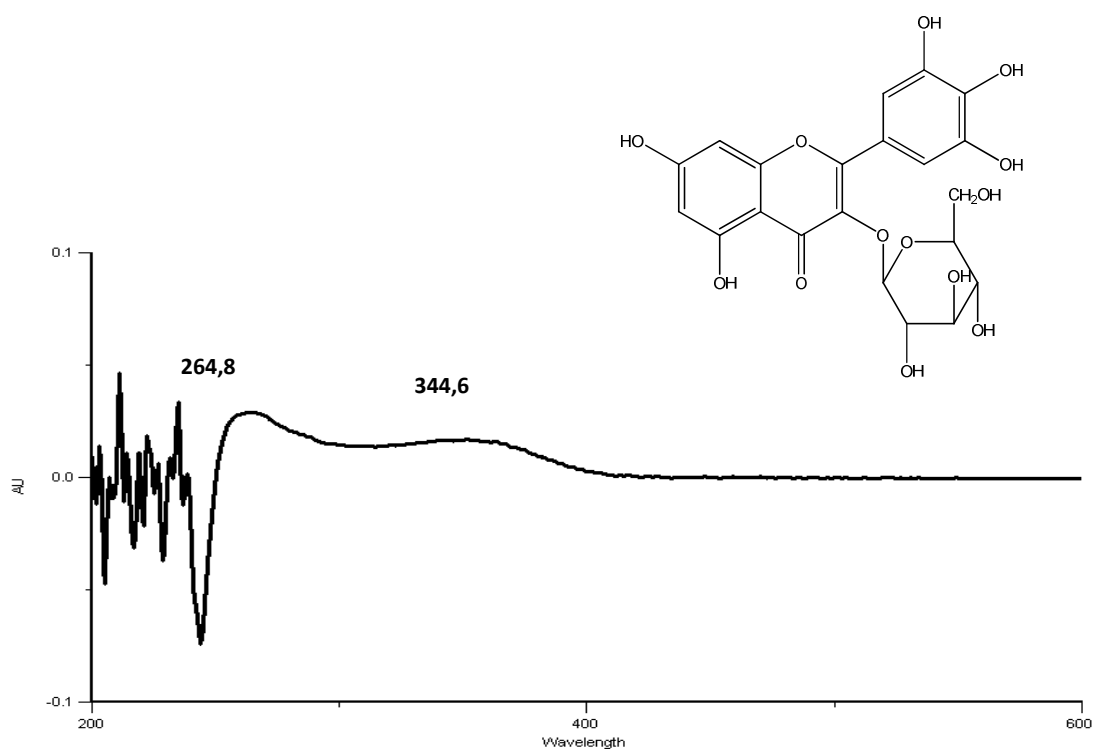


Figura 12. Espectro de absorvância de *miricetina-3-O-glucósido* e respectiva fórmula da estrutura.

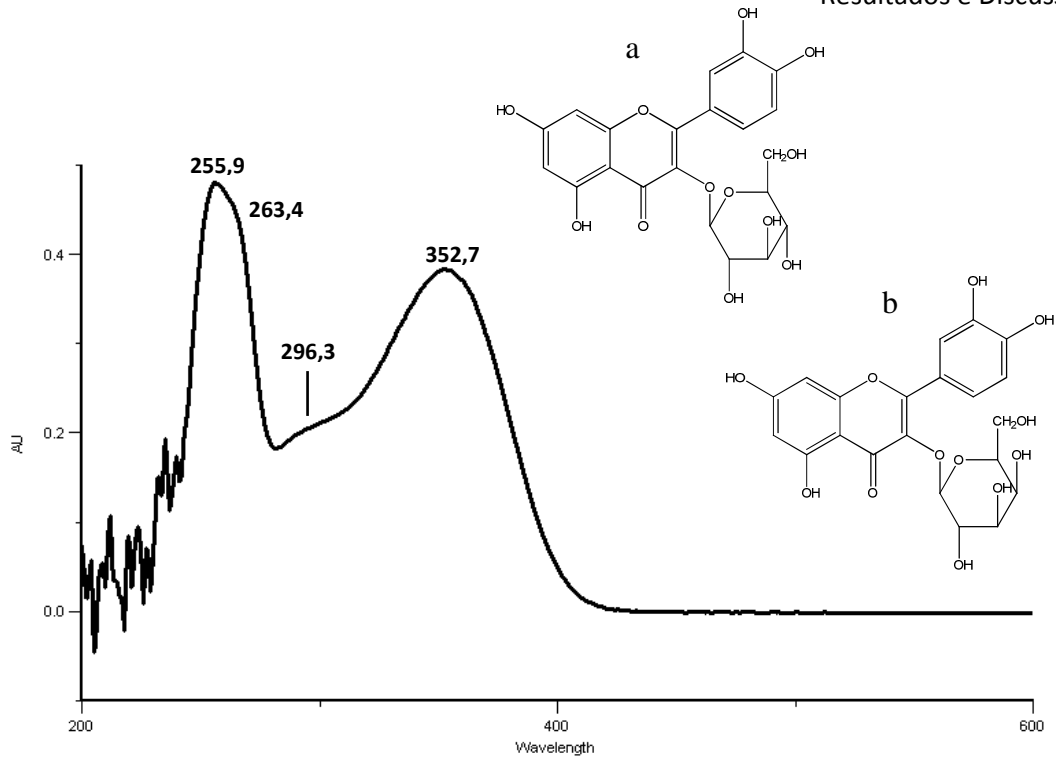


Figura 13. Espectro de absorvância de *quercetina-3-O-glucósido* (a) e respectiva fórmula da estrutura. (Nota: O espectro de absorvância *quercetina-3-O-galactósido* (b) é semelhante).

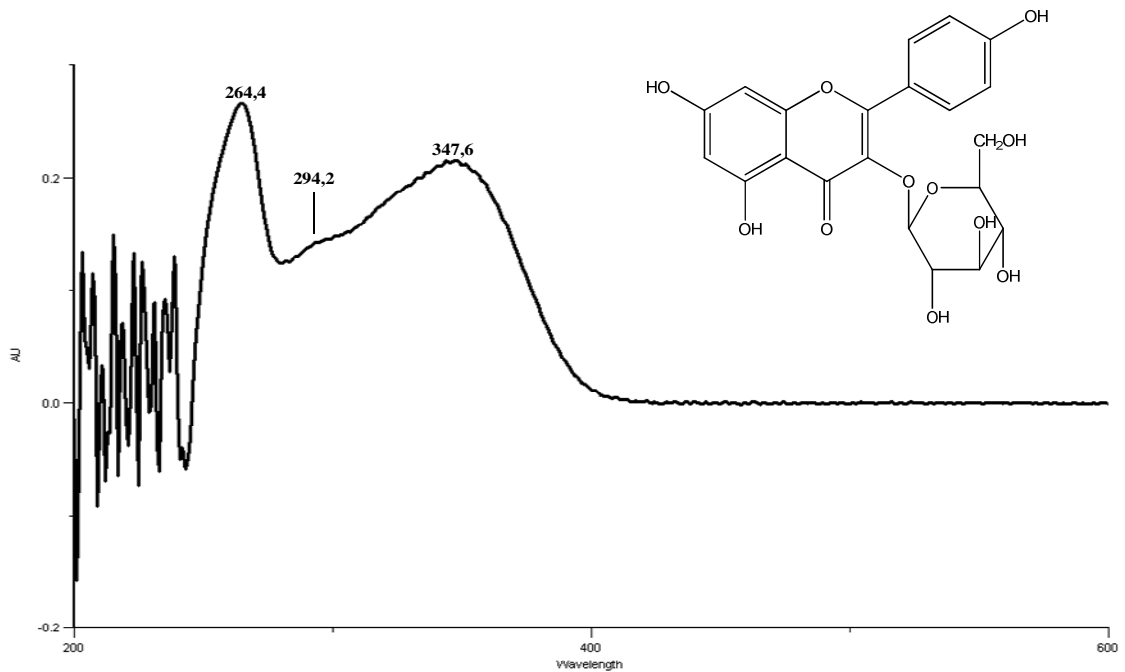


Figura 14. Espectro de absorvância de *camferol-3-O-glucósido* e respectiva fórmula da estrutura.

Os compostos identificados coincidem em parte com os observados por outros autores. No que diz respeito à quercetina, miricetina e campferol, no presente trabalho estes compostos apresentam-se na sua forma glicosilada. Pastrana-Bonilla *et al.* [54] ao procederem à identificação de compostos fenólicos em folhas de videiras *Vitis rotundifolia* das castas brancas Carlos, Early Fry, Fry, Summit e Late Fry, e castas tintas, Paulk, Cowart, Supreme, Ison e Noble identificaram a miricetina, o ácido elágico, o campferol, a quercetina e o ácido gálgico.

4.2.2. Perfil qualitativo das amostras

O registo cromatográfico das diferentes amostras de folhas provenientes de castas brancas e tintas de videira foi feito a 280, 320 e 350 nm na tentativa de melhor identificação e quantificação dos compostos fenólicos existentes.

Não foram observadas diferenças qualitativas entre as folhas provenientes de castas brancas e de castas tintas, sendo que os cromatogramas obtidos nas amostras eram muito semelhantes. A título de exemplo, na Figura 15 apresentam-se os cromatogramas obtidos para os extractos de folhas provenientes de uma casta branca, a Samarrinho, enquanto na Figura 16, apresentam-se os cromatogramas obtidos pela análise dos extractos provenientes de folhas de uma casta tinta, a Alicante Bouchet.

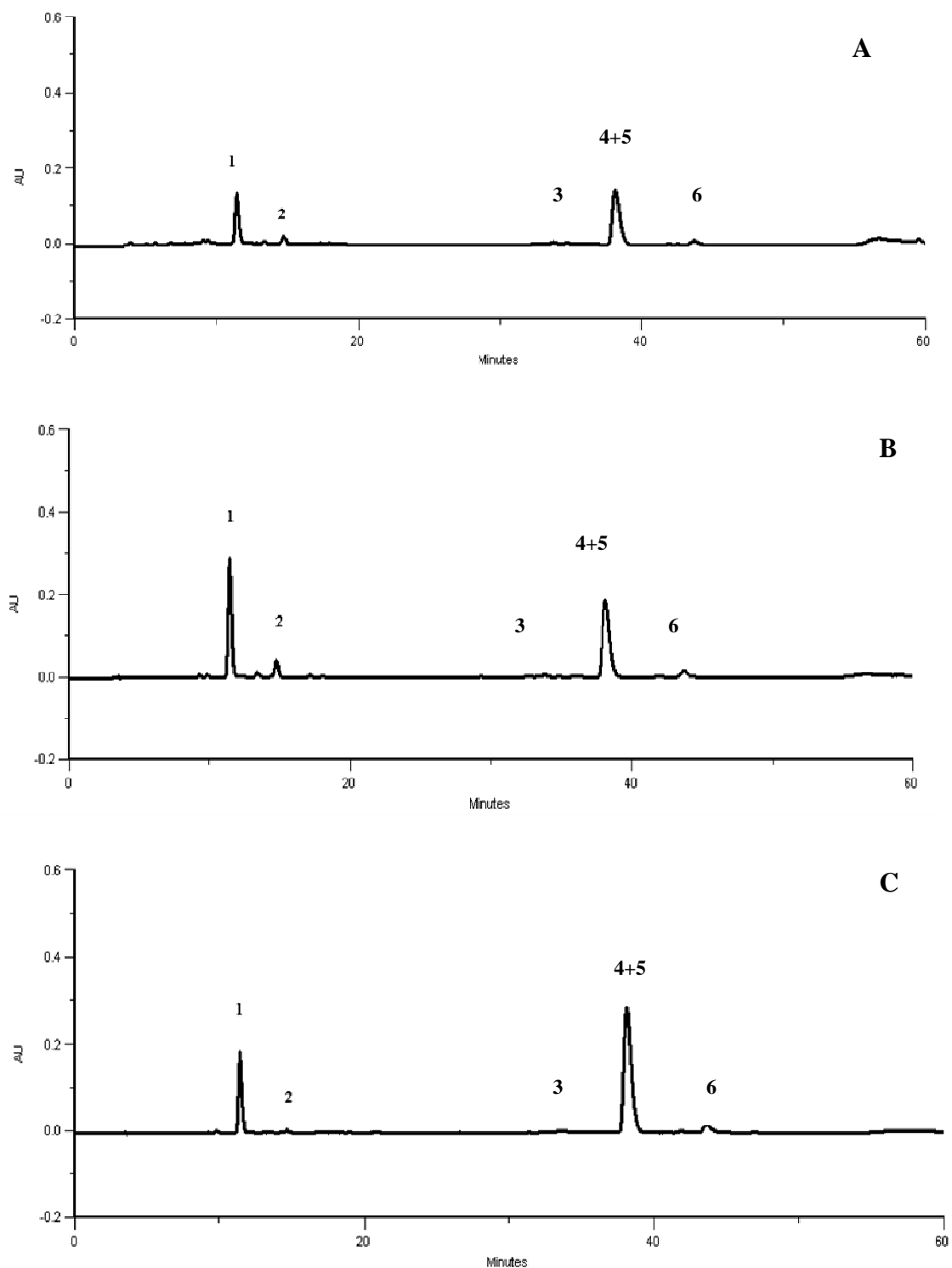


Figura 15. Compostos fenólicos identificados numa folha de videira da casta branca, Samarrinho. **1.** ácido *trans*-cafeoiltartárico, **2.** ácido *trans*-cumaroiltartárico, **3.** miricetina-3-*O*-glucósido, **4+5.** quercetina-3-*O*-glucósido + quercetina-3-*O*-galactósido, e **6** campferol-3-*O*-glucósido.

A- Detecção a 280 nm

B- Detecção a 320 nm

C- Detecção a 350 nm

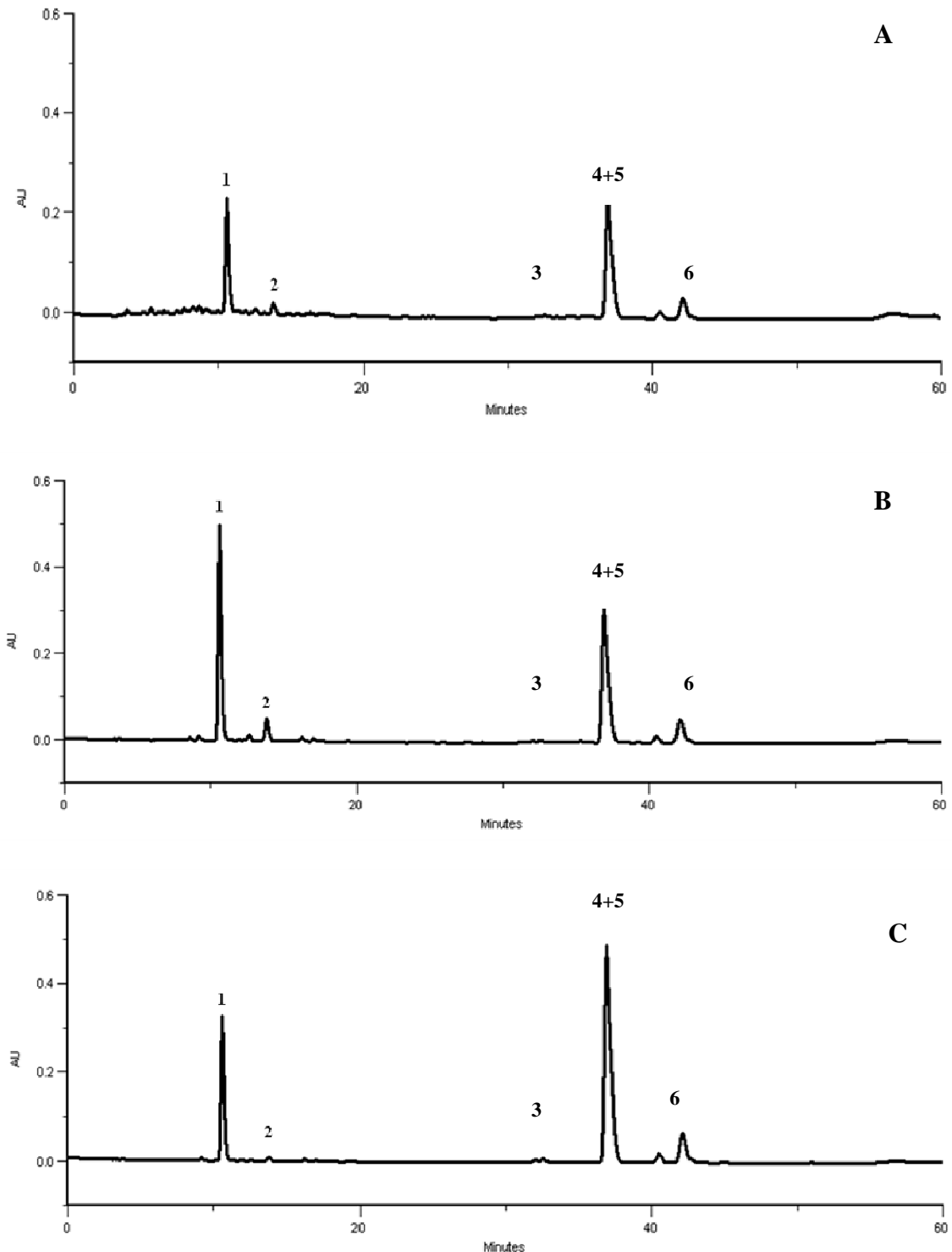


Figura 16 Compostos fenólicos identificados numa folha de videira da casta tinta Alicante Bouchet. **1.** ácido *trans*-cafeoiltartárico, **2.** ácido *trans*-cumaroiltartárico, **3.** miricetina-3-*O*-glucósido, **4+5.** quercetina-3-*O*-glucósido + quercetina-3-*O*-galactósido e **6** campferol-3-*O*-glucósido.

A- Detecção a 280 nm

B- Detecção a 320 nm

C- Detecção a 350 nm

4.2.3. Quantificação dos compostos fenólicos

Os compostos anteriormente referidos, encontram-se quantificados no Quadro 4. A percentagem de cada um deles face ao total, encontra-se indicada no Quadro 5.

Nenhuma diferença qualitativa importante foi observada nas diversas amostras de matéria vegetal, tendo em todas elas sido detectado os seis compostos.

A quantificação dos compostos fenólicos nos extractos aquosos de folhas de castas de videira brancas e tintas revelou um elevado teor destes compostos na generalidade das amostras (Quadro 4). Assim, nas castas brancas, o teor total variou entre um mínimo de 14909,9 mg/kg de matéria seca registado na casta Gouveio, e o máximo de 43199,3mg/kg de matéria seca observado nos extractos da casta Côdega. Com a excepção da amostra da casta Gouveio, todas as restantes apresentaram valores superiores a cerca de 24000 mg/kg. O teor médio nas castas brancas foi de 36858,5 mg/kg de matéria seca (Quadro 4).

Quanto às castas tintas, os teores observados em compostos fenólicos foram superiores. Nestas castas, o menor valor foi observado na casta Mourisco, com 19227,1 mg/kg, enquanto o valor mais elevado foi registado na casta Tinto Cão, com 67600,4 mg/kg. O teor médio destes compostos nas castas tintas foi de 42094,6 mg/kg de matéria seca (Quadro 4).

No que respeita aos diferentes compostos identificados, o *ácido trans-cafeoiltartárico*, nas castas brancas variou entre 1880,6 mg/kg, na casta Gouveio, e 8335,4 mg/kg na casta Rabigato, com um teor médio de 6151,8 mg/kg (Quadro 4). De uma forma geral, o *ácido trans-cafeoiltartárico* representou entre 12,6% (casta Gouveio) e 22,5 % (casta Viosinho) do teor total dos compostos identificados (Quadro 5). Nas castas tintas, o teor mais elevado em *ácido trans-cafeoiltartárico* registou-se na casta Tinto Cão, com 14052,6 mg/kg, enquanto o mais baixo foi registado na casta Mourisco, com 3279,2 mg/kg de matéria seca. O teor médio destes compostos nas castas tintas, com 8245,1 mg/kg de matéria seca, foi superior ao registado nas brancas (Quadro 4). Nas castas tintas, o *ácido trans-cafeoiltartárico* representou entre 17,1% (castas Merlot e Mourisco) e 22,9% (casta Touriga Nacional), com média de 19,5% (Quadro 5).

Por sua vez, o *ácido trans-cumaroiltartárico*, surgiu em menor quantidade, quer nas castas brancas quer nas castas tintas (Quadro 4). Nas primeiras, o seu teor foi em

média de 673,8 mg/kg, variando entre o mínimo de 211,8 mg/kg, na casta Gouveio, e o máximo de 1070,8 mg/kg, na casta Rabigato, e representou em média 2,0% do teor total de compostos identificados nas castas brancas (Quadro 5).

Nas castas tintas, o teor em *ácido trans-cumaroiltartárico* foi em média de 895,5 mg/kg, oscilando entre os 485,6 mg/kg de matéria seca, na casta Mourisco, e os 1491,0 mg/kg, na casta Tinto Cão (Quadro 4). Este composto, nas castas tintas, representou em média 2,2% do total de compostos fenólicos, representando importância relativa superior na casta Cornifesto, com 3,6% (Quadro 5).

A *miricetina-3-O-glucósido* é o composto em menor quantidade em ambas as castas. Nas castas brancas observou-se uma discrepância significativa onde a de menor quantidade, a casta Gouveio apresenta valores de 111,4 mg/kg, e a casta Rabigato, expressa em maior quantidade, representa 850,1 mg/kg de matéria seca. Globalmente, o valor médio foi de 314,7 mg/kg (Quadro 4), representando 0,9% do teor total de compostos identificados em castas deste tipo (Quadro 5).

Nas castas tintas, este composto apresenta uma média, de 330,2 mg/kg, mas representa apenas 0,7% do teor total de compostos identificados. A casta Mourisco apresenta o menor valor determinado (61,4 mg/kg), não existindo nenhuma outra casta com valores inferiores a 152,5 mg/kg. A casta de maior valor registado foi a Merlot, com 614,1 mg/kg (Quadro 4 e 5).

Quando foram considerados os compostos *quercetina-3-O-glucósido* e *quercetina-3-O-galactósido*, avaliamos os compostos maioritários nas folhas de videira, representando em média 68,8 % nas castas brancas e 68,1% nas castas tintas (Quadro 5).

De entre as castas brancas, a casta Gouveio, com 10129,9 mg/kg foi aquela onde estes compostos se apresentaram em menor quantidade, enquanto a casta Rabigato apresentou valores acima da média (22706,9 mg/kg), contendo 28831,1 mg/kg de matéria seca. Nas castas tintas, o valor médio para este composto foi ligeiramente superior, com 28705,2 mg/kg, encontrando-se num intervalo com valores mínimos respeitantes a casta Mourisco com 13374,4 mg/kg e valores máximos para a casta Tinto Cão com 46528,5 mg/kg (Quadro 4).

Quadro 4. Compostos fenólicos (mg/kg de matéria seca) nas folhas *Vitis vinifera* L de diferentes castas. Os resultados expressos como médias \pm desvio padrão de três extracções analisadas em duplicado (n=6).

Castas	Compostos fenólicos expresso em mg/kg de matéria seca					
	1	2	3	4+5	6	Total
Castas brancas						
Carrega Branco	6562,8 \pm 171,5	566,8 \pm 12,2	364,5 \pm 13,2	25567,3 \pm 891,8	3797,1 \pm 132,9	36858,5
Chardonnay	6963,3 \pm 62,2	664,1 \pm 7,8	335,7 \pm 0,8	24822,0 \pm 275,6	2698,1 \pm 14,2	35483,2
Códega	7781,0 \pm 743,7	799,4 \pm 101,6	308,3 \pm 17,2	28106,7 \pm 2441,2	6203,8 \pm 553,3	43199,3
Gouveio	1880,6 \pm 58,4	211,8 \pm 9,4	111,4 \pm 1,1	10129,9 \pm 137,1	2576,1 \pm 241,0	14909,9
Malvasia Fina	6860,6 \pm 37,7	909,4 \pm 8,2	213,1 \pm 3,6	25007,0 \pm 81,5	3327,2 \pm 7,5	36317,4
Malvasia Rei	6592,2 \pm 121,1	691,0 \pm 3,9	336,2 \pm 4,3	23869,7 \pm 65,9	2973,2 \pm 4,6	34462,3
Rabigato	8335,8 \pm 444,7	1070,8 \pm 60,2	850,1 \pm 255,1	28831,1 \pm 1279,4	3479,1 \pm 264,1	42566,9
Samarrinho	5011,3 \pm 215,8	643,6 \pm 39,8	159,6 \pm 13,1	21792,6 \pm 673,1	2143,9 \pm 30,4	29751,0
Viosinho	5378,4 \pm 33,7	507,3 \pm 15,2	153,5 \pm 1,0	16235,7 \pm 214,3	1642,6 \pm 23,5	23917,5
Média	6151,8 \pm 1906,9	673,8 \pm 245,7	314,7 \pm 221,3	22706,9 \pm 5988,1	3204,6 \pm 1308,9	36858,5
Castas tintas						
Alicante Bouchet	7090,4 \pm 582,5	692,1 \pm 69,1	447,0 \pm 32,5	27187,7 \pm 2562,2	5063,2 \pm 430,8	40480,4
Bastardo	8394,8 \pm 71,7	591,2 \pm 3,9	295,6 \pm 12,2	26405,2 \pm 408,1	2714,3 \pm 74,1	38401,1
Cornifesto	8386,3 \pm 136,6	1457,6 \pm 47,5	156,5 \pm 3,4	26088,6 \pm 500,9	4732,0 \pm 65,5	40821,0
Merlot	9962,0 \pm 426,7	892,1 \pm 66,3	614,1 \pm 25,7	41423,3 \pm 1496,6	5508,5 \pm 243,6	58400,0
Mourisco	3279,2 \pm 25,1	485,6 \pm 8,9	61,4 \pm 1,3	13374,4 \pm 15,2	2026,4 \pm 5,5	19227,1
Rufete	7693,3 \pm 719,6	1042,0 \pm 87,3	240,6 \pm 1,9	31169,8 \pm 2440,3	3777,6 \pm 265,6	43923,3
Tinta Gorda	8515,6 \pm 754,5	951,1 \pm 64,5	275,8 \pm 3,1	28809,5 \pm 15,5	4773,5 \pm 93,4	43325,4
Tinto Cão	14052,6 \pm 255,7	1491,0 \pm 28,2	328,9 \pm 2,2	46528,5 \pm 415,9	5199,3 \pm 27,9	67600,4
Touriga Francesa	6232,0 \pm 94,8	673,2 \pm 12,2	333,0 \pm 36,8	19872,7 \pm 289,9	2595,5 \pm 31,4	29706,5
Touriga Nacional	9691,9 \pm 495,3	878,6 \pm 55,0	526,7 \pm 57,5	28373,6 \pm 2507,1	2769,1 \pm 264,7	42239,9
Trincadeira	7397,5 \pm 120,0	896,5 \pm 13,3	152,5 \pm 0,1	26524,3 \pm 128,2	3945,1 \pm 73	38916,0
Média	8245,1 \pm 2644,9	895,5 \pm 329,9	330,2 \pm 208,0	28705,2 \pm 9043,5	3918,6 \pm 1224,5	42094,6

Legenda: **1-** Ácido *trans*-cafeoiltartárico; **2-** Ácido *trans*-cumaroiltartárico; **3-** miricetina-3-0-glucósido; **4+5-** quercetina-3-0-glucósido+quercetina-3-0-galactósido; **6-** campferol-3-0-glucósido.

Quadro 5. Compostos fenólicos (%) nas folhas *Vitis vinifera* L. de diferentes castas analisadas no presente.

Castas	Compostos fenólicos expressos em percentagem				
	1	2	3	4+5	6
Castas brancas					
Carrega Branco	17,8	1,5	1,0	69,4	10,3
Chardonnay	19,6	1,9	0,9	70,0	7,6
Côdega	18,0	1,9	0,7	65,1	14,4
Gouveio	12,6	1,4	0,7	67,9	17,3
Malvasia Fina	18,9	2,5	0,6	68,9	9,2
Malvasia Rei	19,1	2,0	1,0	69,3	8,6
Rabigato	19,6	2,5	2,0	67,7	8,2
Samarrinho	16,8	2,2	0,5	73,2	7,2
Viosinho	22,5	2,1	0,6	67,9	6,9
Média	18,3	2,0	0,9	68,8	10,0
Castas tintas					
Alicante Bouchet	17,5	1,7	1,1	67,2	12,5
Bastardo	21,9	1,5	0,8	68,8	7,1
Cornifesto	20,5	3,6	0,4	63,9	7,1
Merlot	17,1	1,5	1,1	70,9	9,4
Mourisco	17,1	2,5	0,3	69,6	10,5
Rufete	17,5	2,4	0,5	71	8,6
Tinta Gorda	19,7	2,2	0,6	66,5	11
Tinto Cão	20,8	2,2	0,5	68,8	7,7
Touriga Francesa	21,0	2,3	1,1	66,9	8,7
Touriga Nacional	22,9	2,1	1,2	67,2	6,6
Trincadeira	19,0	2,3	0,4	68,2	10,1
Média	19,5	2,2	0,7	68,1	9,0

Legenda: **1-** Ácido *trans*-cafeoiltartárico; **2-** Ácido *trans*-cumaroiltartárico; **3-** miricetina-3-0-glucósido; **4+5-** quercetina-3-0-glucósido+quercetina-3-0-galactósido; **6-** campferol-3-0-glucósido.

Finalmente, o composto *campferol-3-0-glucósido*, para as castas brancas variou entre 1642,6 mg/kg para a casta Viosinho e 6203,8 mg/kg para a casta Côdega, obtendo-se um valor médio de 3204,6 mg/kg de matéria seca (Quadro 4), representando 10% do teor total de compostos identificados (Quadro 5).

Nas castas tintas, o valor mais elevado é referente à casta Merlot com 5508,5 mg/kg, sendo o valor mais baixo, 2026,4 mg/kg, respeitante à casta Mourisco. Obtendo-se por sua vez, um valor médio de 3918,6 mg/kg, representando assim 9% do teor total de compostos identificados nestas castas (Quadro 4 e 5).

No presente trabalho foram detectados compostos como o *ácido trans-cumaroiltartárico* (1,4 a 3,6%) e *miricetina-3-O-glucósido* (0,3 a 2 %) não referenciados por outros autores, em folhas de videira.

Em caules de videira, Souquet *et al.* [10] detectaram alguns dos compostos fenólicos encontrados neste trabalho, como sejam a *miricetina-3-glucósido*, embora em teores residuais, ainda *ácido cafeoiltartárico* e *ácido cumaroiltártarico*, em quantidades superiores às das folhas.

Dos compostos identificados no presente trabalho, três deles foram encontrados na película da uva por Monagas *et al.* [37], nomeadamente a *quercetina-3-0-glucósido*, *quercetina-3-0-galactósido* e *campferol-3-0-glucósido*, embora em quantidades menores.

Em uvas tintas, Andrade *et al.* [21] detectaram três dos compostos identificados neste trabalho. As quantidades, quando comparadas às folhas, são no entanto muito inferiores. São por exemplo, para a Touriga Nacional, nas folhas foram quantificados 526,7 mg/kg de *miricetina-3-0-glucósido*, 28373,6 mg/kg de *quercetina-3-0-glucósido* + *quercetina-3-0-galactósido* e 2769,1 mg/kg de *campferol-3-0-glucósido*; enquanto no fruto registaram-se 58,1 mg/kg de *miricetina-3-0-glucósido*, 159 mg/kg de *quercetina-3-0-glucósido* e 77,3 mg/kg de *campferol-3-0-glucósido*.

Por sua vez, no vinho, encontraram-se identificados todos os compostos observados no presente trabalho com teores muito diferentes aos por nós registados.

Comparativamente, e através de outros estudos feitos, podemos verificar que as folhas de videira possuem grande quantidade de compostos fenólicos, essencialmente, flavonóides.

4.3. Actividade antioxidante dos extractos de folhas de videira

Neste trabalho as propriedades antioxidantes de extractos de folhas de diferentes castas de videira, quer brancas quer tintas, foram avaliadas por diferentes ensaios, nomeadamente a capacidade redutora total dos extractos pelo método de Folin-Ciocalteu, o método do efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, o poder redutor e da actividade sequestrante para o radical hidroxilo.

4.3.1. Capacidade redutora total

A capacidade redutora total dos extractos foi avaliada pelo método de Folin-Ciocalteu. Este método tem sido vulgarmente utilizado com sucesso para avaliar o teor em fenóis totais em diferentes amostras de origem vegetal, encontrando-se perfeitamente estabelecido e generalizado. No entanto, de maneira geral os resultados obtidos por este método, em termos de teor em fenóis totais, são superiores aos obtidos por outros métodos mais específicos e sensíveis. Tal facto, deve-se sobretudo à sua falta de especificidade, uma vez que, outros compostos, como açúcares e metais, com capacidade redutora podem reagir com o reagente de Folin sobrevalorizando assim os resultados.

Nos últimos anos alguns autores têm proposto que os resultados obtidos por este método sejam interpretados como forma de medir a capacidade redutora total dos extractos avaliados [52, 53]. Assim, a capacidade redutora total dos extractos aquosos de folhas de videira de castas brancas e castas tintas foi em média de 367,8 mEq. de ácido gálgico/g de extracto nas primeiras e de 316,9 mEq. de ácido gálgico/g de extracto nas segundas (Quadro 6).

Quadro 6. Capacidade redutora total, expressa em média \pm desvio padrão de mEq. de ácido gálico/ g de extracto

Castas	mEq. de ácido gálico/ g de extracto
Casta branca	
Carrega Branco	323 \pm 38
Chardonnay	203 \pm 18
Côdega	441 \pm 92
Gouveio	*
Malvasia Fina	413 \pm 75
Malvasia Rei	327 \pm 38
Rabigato	434 \pm 79
Samarrinho	199 \pm 29
Viosinho	550 \pm 62
Média	367,8 \pm 115,7
Casta tinta	
Alicante Bouchet	400 \pm 44
Bastardo	360 \pm 47
Cornifesto	208 \pm 47
Merlot	347 \pm 32
Mourisco	174 \pm 17
Rufete	294 \pm 47
Tinta Gorda	332 \pm 57
Tinto Cão	573 \pm 62
Touriga Francesa	222 \pm 42
Touriga Nacional	282 \pm 32
Trincadeira	294 \pm 47
Média	316,9 \pm 109,1

Nas castas brancas os valores variaram entre os 199 mEq. de ácido gálico/g de extracto, na Samarrinho, e 550 mEq. de ácido gálico/g de extracto, na casta Viosinho. Por sua vez, nas tintas o valor superior foi determinado na casta Tinto Cão (573 mEq. de ácido gálico/g de extracto) enquanto o mais baixo foi registado na Mourisco (174 mEq. de ácido gálico/g de extracto) (Quadro 6).

4.3.2. Efeito bloqueador de radicais livres de DPPH

A análise da actividade antioxidante das amostras através do ensaio espectrofotométrico recorrendo ao radical DPPH é considerada uma análise válida para avaliar a actividade sequestrante de radicais livres por parte dos antioxidantes, sendo um método bastante utilizado. Além disso, o composto radicalar é bastante estável e não tem que ser gerado como nos outros ensaios de sequestro de radicais.

Quando o DPPH reage com um dador de hidrogénio é reduzido a um composto incolor (i.e. 2,2-difenil-1-hidrazina ou a um substituto análogo da hidrazina), originando uma diminuição na absorvância a 517 nm.

Os extractos analisados no presente trabalho indicaram possuir uma actividade sequestrante dependente da concentração (Figuras 17 e 18).

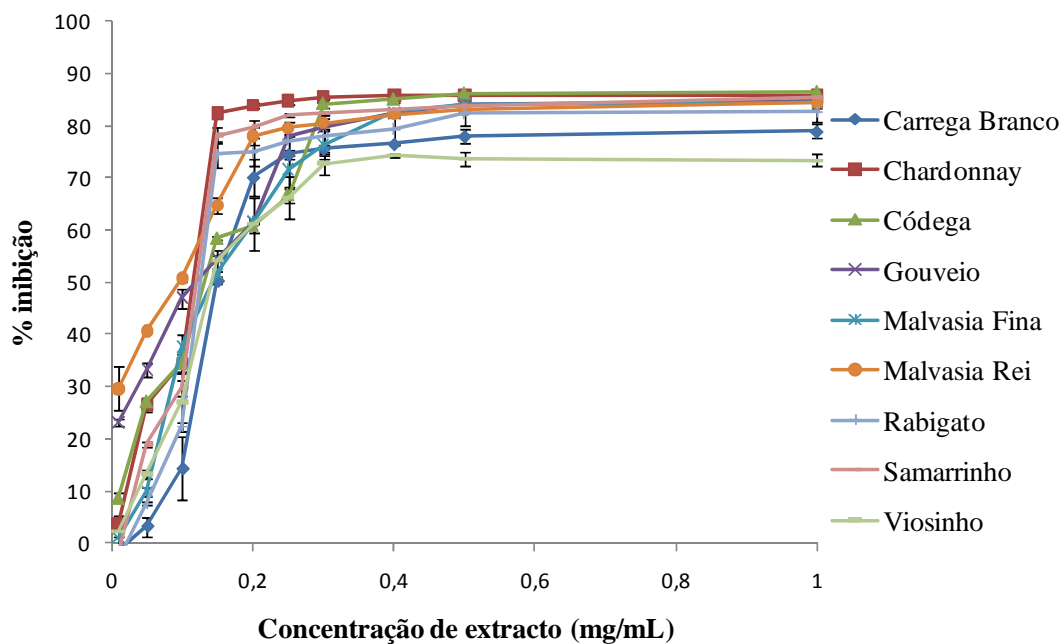


Figura 17. Valores do efeito bloqueador de radicais de DPPH obtidos para extractos de diferentes variedades de folhas de casta branca. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três ensaios realizados em duplicado.

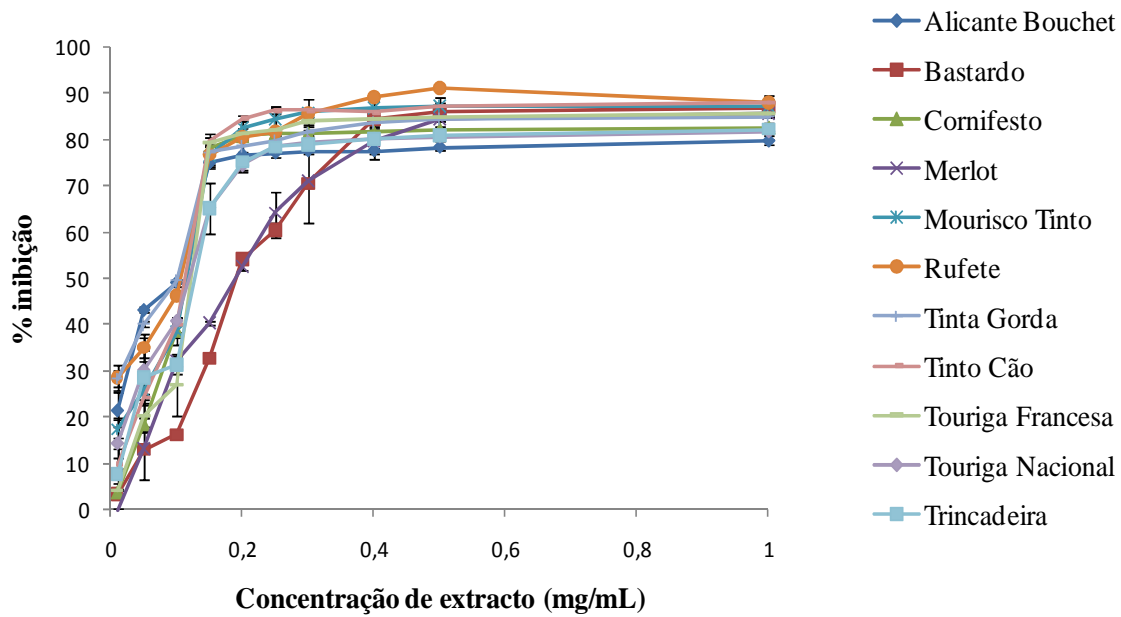


Figura 18. Valores do efeito bloqueador de radicais de DPPH obtidos para extractos de diferentes variedades de folhas de casta tinteira. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três ensaios realizados em duplicado.

O efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH dos extractos de folhas de videira aumentou proporcionalmente à medida que a concentração de extracto aumentava. Todas as castas apresentaram um comportamento idêntico para concentrações superiores a 0,5 mg/mL, a partir da qual a percentagem de inibição permaneceu praticamente constante em torno dos 80 %. Os extractos apresentaram um elevado efeito bloqueador, facto este corroborado pelos baixos valores de EC_{50} obtidos e indicados na Figuras 19.

A que apresentou maior efeito bloqueador foi a casta branca Malvasia Rei, registando o valor EC_{50} mais baixo (0,096 mg/mL). Por sua vez, a casta tinteira Bastardo apresentou o menor valor de efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, traduzido no valor EC_{50} mais elevado (0,191 mg/mL), seguida pela casta tinteira Merlot. Quanto aos valores médios de EC_{50} determinados para ambas as castas, estes foram iguais a 0,127 mg/mL.

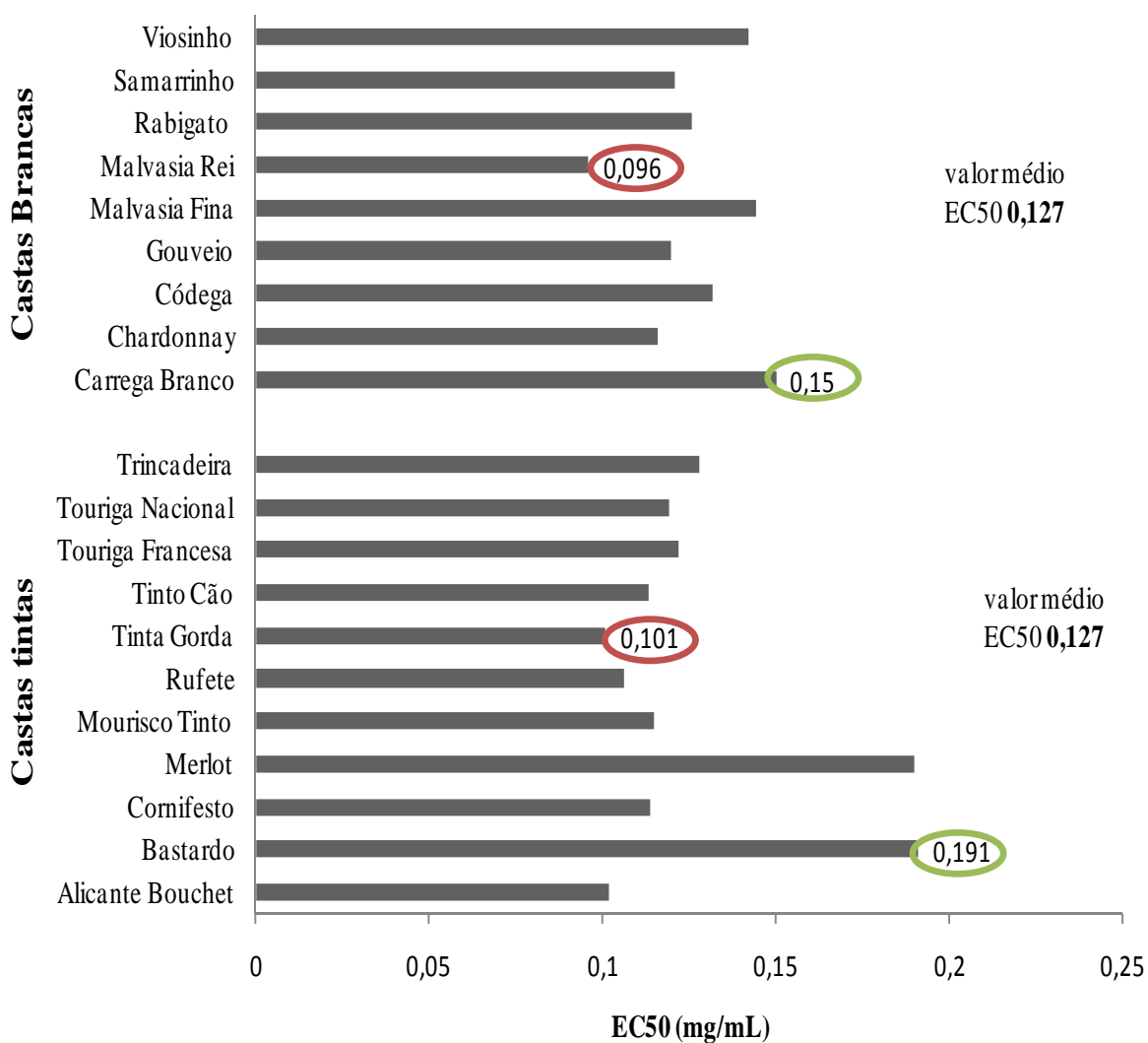


Figura 19. Valores de EC₅₀ (mg/mL) do efeito bloqueador de radicais de DPPH obtidos para extractos de diferentes variedades de folhas de castas brancas e tintas.

Comparando estes valores de EC₅₀ com os referidos noutros estudos [55, 56], 0,10 a 0,15 mg/mL, verificou-se que os mesmos são semelhantes.

4.3.3. Poder redutor

Nas Figuras 20 e 21 estão representados os resultados obtidos para os extractos de diferentes variedades de folhas de videira, sujeitos ao método de poder redutor. Verificou-se que este aumenta com a concentração de extracto para ambas as castas. Além disso, dentro destas, há variedades que se diferenciam, tais como a Samarrinho e a Viosinho nas castas brancas, e a Tinto Cão nas tintas.

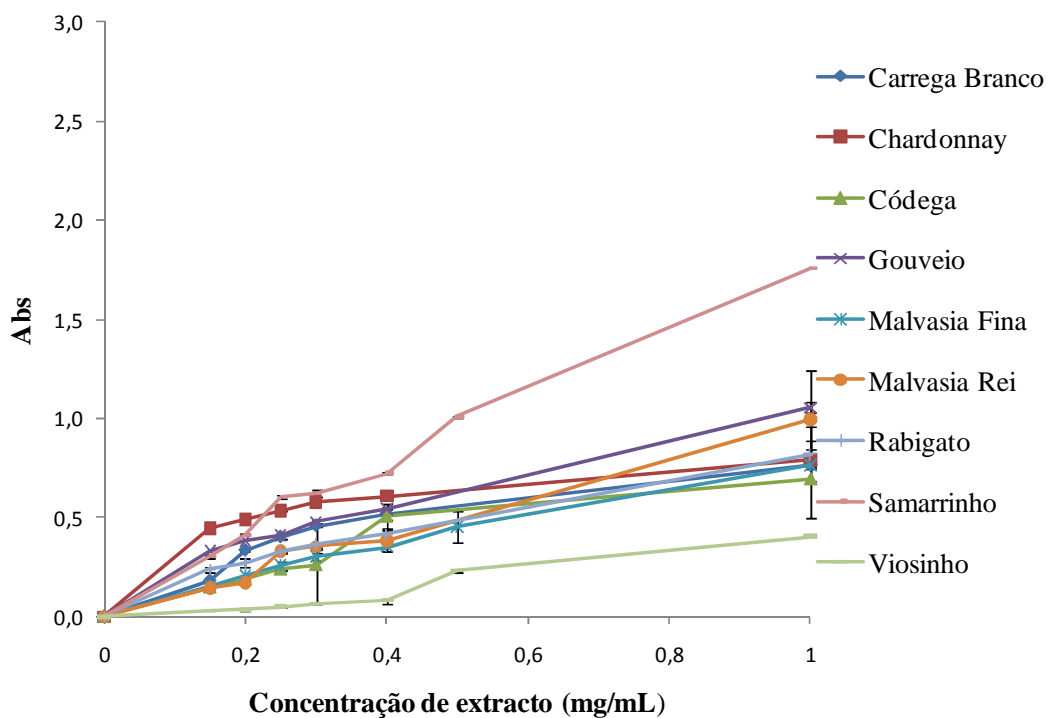


Figura 20. Valores obtidos na determinação do poder redutor para extractos de diferentes variedades de folhas de casta branca. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três ensaios realizados em duplicado.

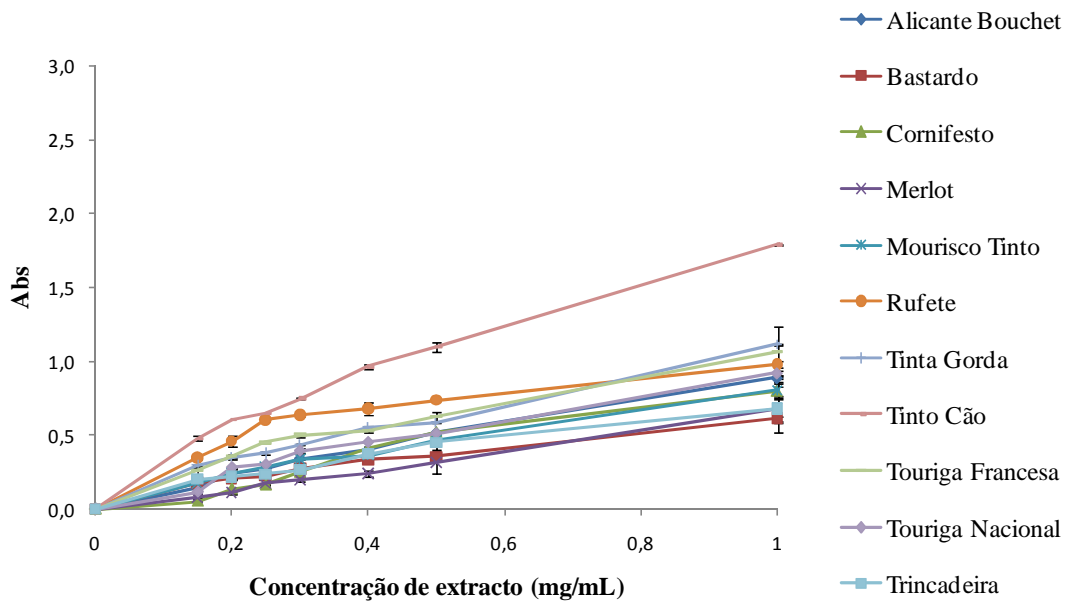


Figura 21. Valores obtidos na determinação do poder redutor para extractos de diferentes variedades de folhas de casta tinteira. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três ensaios realizados em duplicado.

A casta que apresentou valores mais elevados de poder redutor, apresentando por isso o valor de EC_{50} mais baixo, foi a casta branca Còdega, com um valor de 0,148 mg/mL. Pelo contrário, a casta Viosinho que também pertence às castas brancas, originou o valor mais baixo de poder redutor, traduzido no valor de EC_{50} mais elevado (1,173 mg/mL). Em relação às castas tintas, a Bastardo foi a que apresentou o valor mais baixo de poder redutor, traduzido num valor EC_{50} mais elevado (0,780 mg/mL), como se pode comprovar na Figura 22.

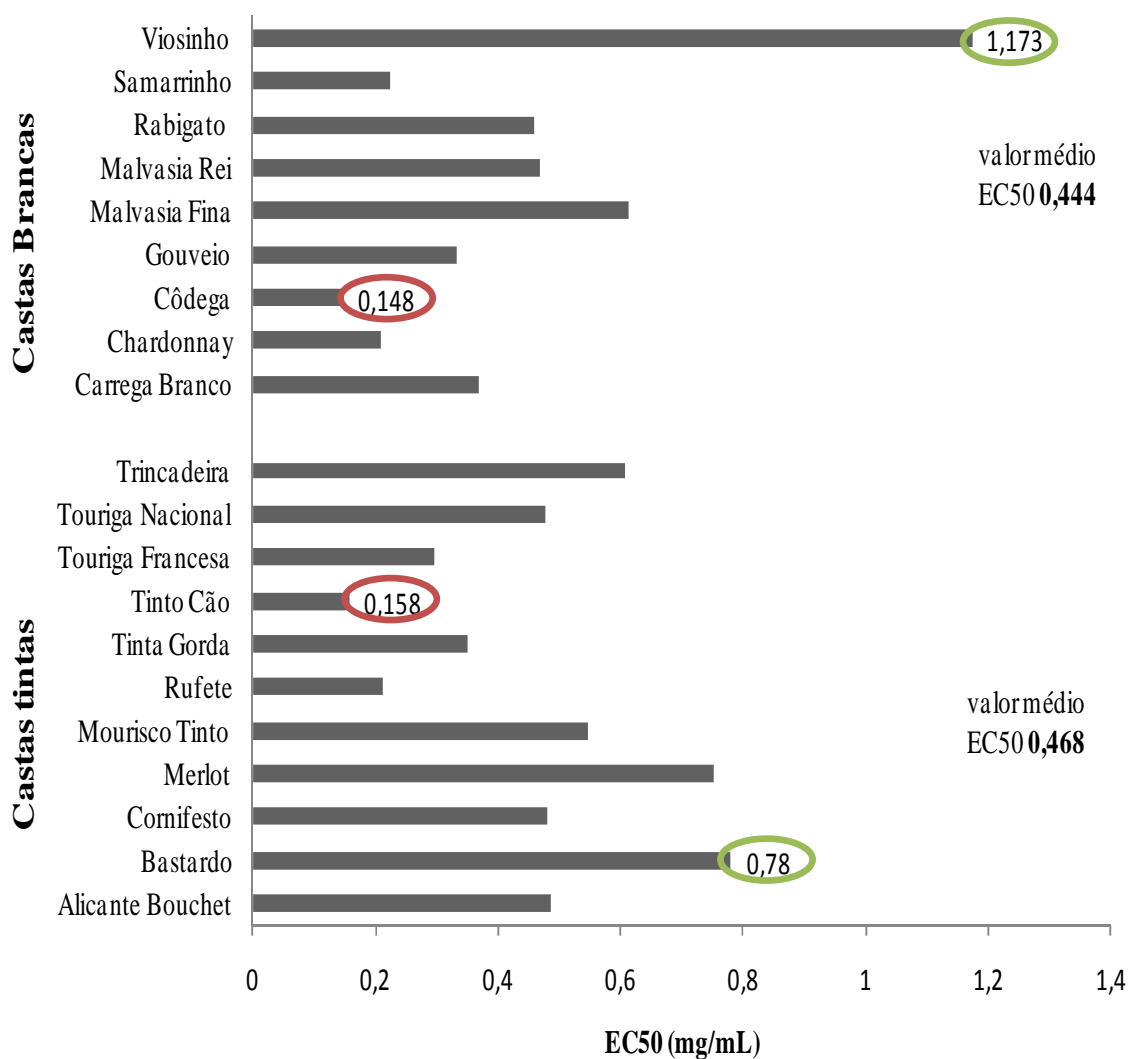


Figura 22. Valores de EC₅₀ (mg/ml) do efeito da determinação do poder redutor obtidos para extractos de diferentes variedades de folhas de castas brancas e tintas.

4.3.4. Actividade sequestrante para o radical hidroxilo

Nos Quadros 7 e 8 apresentam-se os resultados referentes à capacidade sequestrante dos extractos obtidos a partir de folhas de videira das variedades sob estudo para o radical hidroxilo.

Quadro 7. Avaliação da capacidade sequestrante para o radical hidroxilo das castas brancas da folha de videira. Os resultados expressos em média \pm desvio padrão de três determinações realizadas em duplicado.

Castas	Concentração de extracto (mg/mL)						
	0,05	0,1	0,2	0,4	1	2	4
Branças							
Carrega Branco							
Abs	0,045	0,046	0,047	0,049	0,052	0,056	0,059
Act.	19,373 \pm	18,243 \pm	13,875 \pm	19,322 \pm	41,418 \pm	39,568 \pm	36,280 \pm
Sequestrante %	10,868	6,356	12,828	9,260	0,671	0,839	1,245
Abs (s/ AA)	0,251 \pm	0,275 \pm	0,350 \pm	0,394 \pm	0,410 \pm	0,417 \pm	0,434 \pm
	0,019	0,003	0,040	0,042	0,050	0,047	0,034
Abs (s/ EDTA)	0,108 \pm	0,104 \pm	0,099 \pm	0,098 \pm	0,097 \pm	0,098 \pm	0,099 \pm
	0,002	0,002	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001
Chardonnay							
Abs	0,040	0,040	0,042	0,041	0,045	0,046	0,053
Act.	25,972 \pm	18,378 \pm	6,622 \pm	9,994 \pm	17,436 \pm	23,572 \pm	21,719 \pm
Sequestrante %	3,774	2,149	0,599	1,945	0,856	1,031	0,363
Abs (s/ AA)	0,250 \pm	0,300 \pm	0,319 \pm	0,449 \pm	0,563 \pm	0,594 \pm	0,569 \pm
	0,028	0,007	0,004	0,016	0,005	0,003	0,025
Abs (s/ EDTA)	0,194 \pm	0,199 \pm	0,184 \pm	0,157 \pm	0,146 \pm	0,121 \pm	0,121 \pm
	0,002	0,010	0,002	0,002	0,002	0,007	0,005
Códega							
Abs	0,069	0,067	0,067	0,068	0,070	0,072	0,074
Act.	11,518 \pm	9,873 \pm	2,468 \pm	9,461 \pm	14,435 \pm	16,978 \pm	15,482 \pm
Sequestrante %	1,834	1,994	1,310	0,747	1,000	0,323	0,273
Abs (s/ AA)	0,141 \pm	0,180 \pm	0,207 \pm	0,229 \pm	0,253 \pm	0,277 \pm	0,288 \pm
	0,003	0,007	0,007	0,010	0,012	0,023	0,019
Abs (s/ EDTA)	0,129 \pm	0,127 \pm	0,122 \pm	0,118 \pm	0,110 \pm	0,108 \pm	0,107 \pm
	0,003	0,002	0,003	0,001	0,005	0,004	0,005
Gouveio							
Abs	0,049	0,048	0,049	0,050	0,051	0,057	0,059
Act.	3,957 \pm	5,298 \pm	6,070 \pm	7,579 \pm	7,948 \pm	8,149 \pm	9,725 \pm
Sequestrante %	0,290	0,329	0,613	0,490	1,670	1,705	2,037
Abs (s/ AA)	0,209 \pm	0,224 \pm	0,255 \pm	0,313 \pm	0,403 \pm	0,416 \pm	0,475 \pm
	0,008	0,012	0,011	0,002	0,014	0,005	0,026
Abs (s/ EDTA)	0,169 \pm	0,162 \pm	0,143 \pm	0,132 \pm	0,130 \pm	0,126 \pm	0,120 \pm
	0,008	0,005	0,006	0,006	0,005	0,006	0,003

Malvasia Fina							
Abs	0,039	0,043	0,046	0,046	0,049	0,052	0,054
Act.	7,783±	3,695±	5,572±	6,996±	12,538±	15,082±	18,810±
Sequestrante %	0,527	1,004	0,629	0,688	1,890	3,372	2,419
Abs (s/ AA)	0,158±	0,209±	0,256±	0,285±	0,313±	0,346±	0,350±
	0,006	0,004	0,013	0,004	0,009	0,011	0,016
Abs (s/ EDTA)	0,152±	0,143±	0,136±	0,114±	0,107±	0,105±	0,109±
	0,006	0,014	0,012	0,003	0,001	0,002	0,001
Malvasia Rei							
Abs	0,073	0,077	0,076	0,074	0,075	0,077	0,081
Act.	11,118±	14,268±	13,249±	14,453±	15,874±	14,330±	15,195±
Sequestrante %	0,626	4,276	0,617	0,816	3,289	2,093	2,933
Abs (s/ AA)	0,214±	0,238±	0,264±	0,253±	0,252±	0,253±	0,274±
	0,047	0,066	0,066	0,034	0,048	0,064	0,077
Abs (s/ EDTA)	0,107±	0,104±	0,098±	0,096±	0,091±	0,092±	0,094±
	0,003	0,003	0,004	0,005	0,008	0,004	0,001
Rabigato							
Abs	0,070	0,072	0,069	0,071	0,069	0,069	0,071
Act.	7,945±	11,479±	6,082±	7,918±	10,055±	11,151±	9,945±
Sequestrante %	2,539	3,457	1,389	1,060	0,751	0,822	0,532
Abs (s/ AA)	0,184±	0,196±	0,286±	0,315±	0,350±	0,367±	0,362±
	0,003	0,008	0,008	0,033	0,007	0,003	0,005
Abs (s/ EDTA)	0,141±	0,131±	0,121±	0,102±	0,100±	0,093±	0,090±
	0,016	0,010	0,008	0,002	0,004	0,002	0,004
Viozinho							
Abs	0,070	0,067	0,070	0,074	0,073	0,075	0,073
Act.	11,686±	6,021±	9,144±	13,024±	15,745±	20,740±	18,332±
Sequestrante %	1,245	1,962	1,929	3,744	2,026	1,213	2,128
Abs (s/ AA)	0,146±	0,138±	0,145±	0,145±	0,152±	0,169±	0,192±
	0,005	0,001	0,002	0,005	0,002	0,009	0,004
Abs (s/ EDTA)	0,147±	0,143±	0,141±	0,141±	0,139±	0,140±	0,142±
	0,003	0,005	0,003	0,004	0,003	0,002	0,005
Samarrinho							
Abs	0,049	0,048	0,048	0,050	0,051	0,056	0,059
Act.	6,419±	13,199±	8,558±	17,084±	14,384±	9,842±	11,718±
Sequestrante %	0,970	2,110	1,511	5,747	0,573	1,674	2,388
Abs (s/ AA)	0,209±	0,213±	0,230±	0,323±	0,428±	0,464±	0,525±
	0,008	0,020	0,043	0,010	0,059	0,060	0,084
Abs (s/ EDTA)	0,169±	0,162±	0,143±	0,132±	0,130±	0,126±	0,120
	0,008	0,005	0,006	0,006	0,005	0,006	0,003

$$\text{Nota: Actividade sequestrante (\%)} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

Quadro 8. Avaliação da capacidade sequestrante para o radical hidroxilo das castas tintas da folha de videira. Resultados expressos em média \pm desvio padrão de três determinações realizadas em duplicado.

Castas Tintas	Concentração de extracto (mg/mL)						
	0,05	0,1	0,2	0,4	1	2	4
Alicante Bouchet							
Abs	0,042	0,043	0,047	0,050	0,053	0,061	0,064
Act.	7,065 \pm	4,558 \pm	3,920 \pm	6,837 \pm	8,660 \pm	15,269	14,676 \pm
Sequestrante %	0,544	0,766	0,666	1,237	1,084	0,602	1,331
Abs (s/ AA)	0,230 \pm	0,239 \pm	0,283 \pm	0,390 \pm	0,404 \pm	0,416 \pm	0,412 \pm
	0,008	0,009	0,009	0,006	0,012	0,009	0,016
Abs (s/ EDTA)	0,105 \pm	0,103 \pm	0,102 \pm	0,100 \pm	0,096 \pm	0,094 \pm	0,095 \pm
	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,002	0,003
Bastardo							
Abs	0,060	0,059	0,061	0,062	0,063	0,064	0,067
Act.	22,879 \pm	10,758 \pm	3,333 \pm	20,530 \pm	25,076 \pm	29,242 \pm	27,197 \pm
Sequestrante %	0,721	0,875	1,262	3,614	6,930	6,483	4,832
Abs (s/ AA)	0,104 \pm	0,109 \pm	0,116 \pm	0,123 \pm	0,128 \pm	0,135 \pm	0,138 \pm
	0,003	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,002
Abs (s/ EDTA)	0,114 \pm	0,109 \pm	0,100 \pm	0,094 \pm	0,087 \pm	0,089 \pm	0,095 \pm
	0,006	0,005	0,006	0,003	0,004	0,002	0,002
Cornifesto							
Abs	0,084	0,080	0,079	0,080	0,081	0,081	0,082
Act.	1,664 \pm	7,133 \pm	4,586 \pm	1,664 \pm	6,012 \pm	11,651 \pm	11,990 \pm
Sequestrante %	4,533	2,930	2,866	3,295	4,601	4,120	3,890
Abs (s/ AA)	0,167 \pm	0,163 \pm	0,224 \pm	0,244 \pm	0,251 \pm	0,270 \pm	0,270 \pm
	0,012	0,006	0,003	0,008	0,006	0,002	0,001
Abs (s/ EDTA)	0,202 \pm	0,197 \pm	0,188 \pm	0,188 \pm	0,187 \pm	0,192 \pm	0,195 \pm
	0,003	0,003	0,004	0,004	0,002	0,005	0,009
Merlot							
Abs	0,106	0,108	0,106	0,109	0,109	0,118	0,112
Act.	9,146 \pm	4,876 \pm	4,302 \pm	7,521 \pm	13,544 \pm	17,208 \pm	15,456 \pm
Sequestrante %	0,335	1,202	2,323	0,321	3,882	2,286	1,780
Abs (s/ AA)	0,231 \pm	0,226 \pm	0,224 \pm	0,241 \pm	0,273 \pm	0,306 \pm	0,336 \pm
	0,010	0,005	0,002	0,008	0,048	0,017	0,002
Abs (s/ EDTA)	0,187 \pm	0,174 \pm	0,182 \pm	0,173 \pm	0,175 \pm	0,135 \pm	0,130 \pm
	0,001	0,004	0,002	0,006	0,003	0,007	0,009
Mourisco Tinto							
Abs	0,080	0,079	0,078	0,080	0,081	0,081	0,082
Act.	12,855 \pm	10,360 \pm	4,747 \pm	8,177 \pm	10,845 \pm	12,335 \pm	11,331 \pm
Sequestrante %	0,414	0,922	1,167	0,895	0,511	0,473	1,008
Abs (s/ AA)	0,230 \pm	0,231 \pm	0,232 \pm	0,235 \pm	0,236 \pm	0,239 \pm	0,258 \pm
	0,002	0,004	0,002	0,004	0,005	0,002	0,005
Abs (s/ EDTA)	0,195 \pm	0,196 \pm	0,195 \pm	0,194 \pm	0,192 \pm	0,190 \pm	0,180 \pm
	0,008	0,009	0,008	0,008	0,006	0,008	0,003

Rufete							
Abs	0,074	0,073	0,073	0,074	0,075	0,076	0,078
Act.	8,811±	3,689±	5,122±	6,662±	9,921±	13,539±	11,175±
Sequestrante %	2,818	1,791	2,037	2,648	4,371	2,577	2,423
Abs (s/ AA)	0,159±	0,165±	0,181±	0,194±	0,204±	0,207±	0,230±
Abs (s/ EDTA)	0,015	0,018	0,003	0,011	0,003	0,008	0,008
	0,133±	0,127±	0,125±	0,126±	0,128±	0,123±	0,115±
	0,002	0,002	0,003	0,004	0,003	0,001	0,001
Tinta Gorda							
Abs	0,044	0,047	0,049	0,051	0,053	0,054	0,055
Act.	21,313±	19,809±	17,865±	20,103±	21,864±	25,752±	25,459±
Sequestrante %	4,235	4,416	6,271	5,291	4,796	6,585	5,810
Abs (s/ AA)	0,147±	0,246±	0,433±	0,526±	0,565±	0,633±	0,604±
	0,022	0,019	0,026	0,062	0,022	0,015	0,011
Abs (s/ EDTA)	0,221±	0,208±	0,186±	0,166±	0,140±	0,123±	0,112±
	0,015	0,004	0,010	0,010	0,006	0,009	0,006
Tinto Cão							
Abs	0,068	0,065	0,068	0,071	0,071	0,074	0,082
Act.	13,549±	18,197±	14,456±	6,009±	6,973±	21,542±	20,522±
Sequestrante %	1,799	1,247	2,170	0,600	3,485	1,031	0,838
Abs (s/ AA)	0,263±	0,245±	2,237±	0,251±	0,306±	0,442±	0,503±
	0,013	0,008	0,011	0,029	0,009	0,058	0,092
Abs (s/ EDTA)	0,141±	0,136±	0,121±	0,116±	0,108±	0,105±	0,107±
	0,008	0,009	0,003	0,001	0,003	0,001	0,002
Touriga Francesa							
Abs	0,044	0,044	0,044	0,044	0,045	0,050	0,052
Act.	10,545±	9,757±	4,632±	9,593±	11,038±	16,261±	11,695±
Sequestrante %	0,271	2,090	3,097	5,394	5,695	2,715	5,313
Abs (s/ AA)	0,140±	0,203±	0,423±	0,455±	0,544±	0,619±	0,500±
	0,005	0,019	0,034	0,049	0,024	0,005	0,016
Abs (s/ EDTA)	0,203±	0,199±	0,184±	0,162±	0,156±	0,148±	0,147±
	0,002	0,003	0,004	0,009	0,004	0,005	0,007
Touriga Nacional							
Abs	0,043	0,048	0,052	0,055	0,056	0,057	0,058
Act.	10,482±	7,224±	0,614±	4,674±	15,770±	23,654±	20,822±
Sequestrante %	0,899	1,016	0,624	0,472	0,488	2,133	1,178
Abs (s/ AA)	0,265±	0,273±	0,302±	0,379±	0,400±	0,429±	0,410±
	0,004	0,008	0,039	0,027	0,031	0,052	0,038
Abs (s/ EDTA)	0,100±	0,097±	0,097±	0,096±	0,095±	0,095±	0,095±
	0,003	0,002	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Trincadeira							
Abs	0,071	0,068	0,072	0,072	0,073	0,076	0,078
Act.	14,709±	7,069±	9,044±	12,162±	14,735±	16,892±	15,576±
Sequestrante %	0,520	1,148	1,397	0,225	0,343	0,621	0,410
Abs (s/ AA)	0,194±	0,203±	0,259±	0,290±	0,314±	0,0336±	0,363±
	0,022	0,026	0,022	0,016	0,004	0,007	0,024
Abs (s/ EDTA)	0,117±	0,112±	0,095±	0,093±	0,088±	0,084±	0,086±
	0,001	0,005	0,003	0,006	0,005	0,003	0,002

Os extractos analisados demonstraram alguma actividade sequestrante para o radical hidroxilo, traduzida pelas percentagens de actividade sequestrante obtidas. De entre as castas brancas e tintas, observaram-se algumas diferenças entre castas.

Nas castas brancas, a casta Gouveio foi aquela que apresentou as menores actividades sequestrantes, variando entre 3,96 e 9,72% para a gama de concentrações estudada, 0,05 a 4 mg/mL. Pelo contrário, a casta Carrega Branco apresentou actividades sequestrantes entre 13,88 e 41,42%, tendo sido aquela onde valores mais altos foram obtidos. Nas castas tintas nunca se obtiveram actividades sequestrantes superiores a 30%. Além disso, as castas Alicante Bouchet, Cornifesto, Mourisco Tinto e Rufete, nunca atingiram actividades sequestrantes superiores a 15%.

Adicionalmente, verificou-se que em todas as castas a absorvância lida a 532 nm aumentou à medida que se aumentou a concentração de extracto utilizada. Este facto é indicativo dessas soluções apresentarem efeito pró-oxidante. Este ponto foi corroborado pelos ensaios realizados na ausência do ácido ascórbico, onde se avalia a capacidade dos extractos para reduzir o ião férrico a ião ferroso, o que conduz a um aumento da produção do radical hidroxilo. Na maioria dos ensaios constatou-se que ao aumentar a concentração utilizada, a absorvância aumentou o que corrobora o potencial pró-oxidante das soluções.

Devido ao facto da degradação da desoxirribose ocorrer igualmente mesmo que no sistema Fenton se retirar o EDTA, compostos com capacidade para complexar o ferro retiram o metal e tornam-no inactivo ou com pouca actividade na reacção de Fenton, impedindo, assim, a degradação da desoxirribose. Dessa forma para avaliar a capacidade das amostras para complexar os iões ferro, diminuindo, assim, a quantidade de malonildialdeído formado a partir da degradação da desoxirribose [44], o ensaio foi realizado na ausência de EDTA. Analisando esse ensaio, podemos verificar que para a maioria das castas, à medida que a concentração aumentou, a absorvância diminuiu, indicando que as infusões têm capacidade de quelatar o ferro.

5. CONCLUSÕES

No presente trabalho identificaram-se seis compostos fenólicos nos extractos aquosos analisados, nomeadamente, o ácido *trans-cafeoiltartárico*, o ácido *trans-cumaroiltartárico*, a *miricetina-3-O-glucósido*, *quercetina-3-O-glucósido* + *quercetina-3-O-galactósido* e ainda o *campferol-3-O-glucósido*, sendo os dois últimos, os compostos maioritários.

Em termos de actividade antioxidante, todas as variedades apresentaram actividade bloqueadora de radicais de DPPH e poder redutor. Em relação à actividade sequestrante para o radical hidroxilo, constatou-se que os extractos apresentaram efeito pró-oxidante e que são capazes de quelatar o ferro.

Constatou-se também que as folhas das castas brancas - Carrega Branco, Chardonnay, Côdega, Gouveio, Malvasia Fina, Malvasia Rei, Rabigato, Samarrinho e Viosinho - e das castas tintas - Alicante Bouchet, Bastardo, Cornifesto, Merlot, Mourisco, Rufete, Tinta Gorda, Tinto Cão, Touriga Francesa, Touriga Nacional e Trincadeira -, apresentaram uma composição fenólica e uma actividade antioxidante semelhantes.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Zheng, W.; Wang, S.Y., 2001. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5165-5170.
2. WHO. Global strategy on diet, physical activity and health. Geneva: World Health Organization; 2004.
3. http://pt.wikipedia.org/wiki/Vitis_vinifera, acessado a 14 de Agosto de 2010.
4. Afonso, J., 2009. http://www.revistadevinhos.iol.pt/artigo195-a_uva, acessado a 13 de Agosto de 2010.
5. Canas, S., 2009. http://www.revistadevinhos.iol.pt/artigo96-a_aguardente_velha_e_a_saude, acessado a 13 de Agosto de 2010.
6. Mirinha, M.; Ferro, G., 2005. *Plantas medicinais da Serra d'Ossa*.
7. Asolini, F.C.; Tedesco, A.M.; Carpes, S.T., 2005. Antioxidant and antibacterial activities of phenolic compounds from extracts of plants used as tea. *Braz. J. Food Technol.*, **9**, 209-215.
8. Matkowski, A., 2008. Plant in vitro culture for the production of antioxidants- a review. *Biotechnol. Adv.*, **26**, 548-560.
9. Schneider, E.; Heydt, H.V.; Esperester, A., 2008. Evaluation of polyphenol composition in red leaves from different varieties of *Vitis vinifera*. *Planta Med*, **74**, 565-572
10. Souquet, J. M.; Labarbe, B.; Guerneve, C.; Cheynier, V.; Moutounet, M., 2000. Phenolic Composition of Grape Stems. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1076-1080.
11. Monagas, M.; Garrido, I.; Bartolomé, B.; Gómez-Cordovés, C., 2006. Chemical characterization of commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. *Anal. Chim. Acta*, **563**, 401-410.
12. Cardoso, A.D.; Carvalheira, J.; Coimbra, M.A.; Rocha, S., 2005. Tecnologia dos vinhos tintos. *Ministério da Agricultura, Pescas e Florestas*.
13. Anónimo, <http://www.infovini.com/classic/pagina.php?codPagina=52>, acessado a 9 Julho de 2010.
14. Bravo, P.; Oliveira, D.. 1990. *Viticultura Moderna*. 4ª edição

15. Birt, D.F.; Pelling, J.C.; Pour, P.M.; Tibbels, M.G.; Schweickert, L.; Bresnick, E., 1987. Enhanced pancreatic and skin tumorigenesis in cabbage-fed hamsters and mice. *Carcinogenesis*, **8**, 913-917.
16. Abe, L. T.; Mota, R. V.; Lajolo, F. M.; Genoveve, M. I. 2007. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Vitis labrusca* and *Vitis vinifera* cultivars. *Ciênc. Tecnol. Alim.*, **27**, 394-400
17. Wang, S. Y.; Lin, H. S., 2000. Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 140-146
18. Kahkonen, M.P.; Hopia, A.I.; Vuorela, H.J.; Heinonen, M., 1999. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3954-3962
19. Huber, L.S.; Amaya, D.B.R., 2008. *Flavonóis e flavonas*. *Alim. Nutr.*, **19**, 97-108.
20. Seigler, D., 2000. *Plant Secondary Metabolism*. Kluwer Academic Publishers, 1-435.
21. Andrade, P.B.; Seabra, R.M., 2005. Phenolic compounds, analysis by HPLC. In: Cazes J, editor. *Encyclopedia of Chromatography*. 2nd ed. New York: Taylor & Francis. p. 215-230.
22. Pereira, O.C.F, 2009. *Rumex induratus*: Caracterização Química e Potencial Antioxidante. *Tese Mest. Cont. Qualidade*. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
23. Malacrida, C. R.; Motta, S., 2005. Compostos fenólicos totais e antocianinas em sumo de uva. *Ciênc. Tecnol. Alim.*, **25**, 659-664
24. Ferreira, I.C.F.R.; Abreu, R.M.V., 2007. *Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos*.
25. Youdim, K.A.; Shukitt-Hale, B.; MacKinnon, S.; Kalt, W; Joseph, J.A., 2000. Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*, **1523**, 117-122.
26. Dey, P.; Harbone, J., 1997. *Plant Biochemistry*. Academic Press, 337-421.
27. Van Sumere, F., 1989. "Phenols and phenolic Acids" In *Methods in Plant Biochemistry*, Vol 1. Academic Press Inc., San Diego, 29-75.

28. Harbone, B., 1991. *Flavonoid pigments, in Herbivores: Their interactives with Secondary Plants Metabolites*. vol. 1. Academic Press. San Diego. CA, 389-429.
29. Matsubara, S.; Rodriguez-Amaya, D.B., 2006. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **26**, 380-385.
30. Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, M.J.; Tuñón, M.J., 2002. *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*. *Nutr. Hosp.*, **27**, 271-278
31. Spanos, A.; Wrolstad, E., Heatherbell, A., 1990. Influence of procedure and storage on the phenolic composition apple juice. *J. Sci. Food Agric.*, **38**, 1572-1579.
32. Macheix, J.J.; Fleuriet, A.; Billot, J. 1990. Fruit phenolic; CRC: Boca Raton.cFL. USA.
33. Ryan, D.; Antolovich, M.; Prenzler, P.; Robards, K.; Lavee, S., 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L.. *Sci. Hortic.*, **92**, 147-176.
34. Rovellini, P.; Cortesi, N.; Fedeli, E., 1997. Analysis of *Olea europaea* by HPLC-UV and HPLC-electrospray-MS. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, **74**, 273-279.
35. Howard, M.; Gary, B., 2000. Measurement of food flavonoids by HPLC-HighPerformance liquid chromatography: A review. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 577-594.
36. Bian, S.; Jiang, Y., 2009. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. *Sci. Hortic.*, **120**, 264-270.
37. Monagas, M.; Hernández-Ledesma, B.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B., 2006. Commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. Leaves and grape skins: antioxidant and chemical characterization. *J. Agric. Food Chem*, **54**, 319-327.
38. Fernandes, M.F.G., 2006. *Determinação da composição química e da actividade antioxidante da Brassica rapa var rapa* L. *Trabalho de fim de curso da Lic. Eng. Biotecnol.*, Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.
39. Ferreira, I.C.F.R.; Baptista, P.; Vilas-Boas, M.; Barros, L., 2007. Free radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *J. Agric. Food Chem*, **100**, 1511-1516.
40. Taveira, A.J.S.C. Radicais oxidantes: da Química à Biologia, 66-71.

41. Chiou, A.; Karathanos, V.T.; Mylona, A.; Salta, F.N.; Preventi, F.; Andrikopoulos, N.K., 2007. Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolic and antioxidant activity. *Food Chem.*, **102**, 516-522.
42. Rufino, M.S.M.; Alves, R.E.; Brito, E.S., 2007. Metodologia Científica: *Determinação da actividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH*. ISSN 1679-6535.
43. Gonçalves, R.M.F, 2007. *Estudo da inibição de tripsina por compostos fenólicos isolados de fontes naturais. Efeito antinutricional de bebidas comuns. Tese de Mest. Tecnol. Ciência e Seg. Alimentar*. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
44. Valentão, P., 2003. *Limonete, Hipericão-D-Gerês, Cardo-Do-Coalho, Fel-Da-Terra Metodologias de Controlo de Qualidade com base na fracção fenólica. Estudos de acção antioxidante e hepatoprotectora. Tese Dout. Ciências Farmacêuticas*. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
45. Santos, C.M.M., 2000. *Síntese e avaliação da actividade antioxidante de 2-estirilcromonas. Tese Mest. em Química dos Produtos Naturais e Alimentos*. Departamento de Química da Universidade de Aveiro.
46. Gomes, A.M.C.M.G., 2005. *Avaliação da actividade captadora de espécies reactivas de oxigénio e azoto. Tese Mest. Contr. Qualidade*. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
47. <http://www.ivv.min-agricultura.pt/np4/33>, acedido a 16 de Abril de 2010
49. Oliveira, I.V., 2007. *Avaliação nutricional, composição química e actividade biológica de folhas e frutos de noqueira e aveleira. Trabalho de fim de curso da Lic. Eng. Biotecnol.*, Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.
50. Hatano, T.; Kagawa, H.; Yasuhara, T.; Okuda, T., 1988. Two new flavonoids and *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2090-2097.
51. Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jap. J. Nutr.*, **44**, 307-315.
52. Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 1841-1856.
53. Costa, R.M., Magalhães, A.S.; Pereira, J.A., Andrade, P.B., Valentão, P., Carvalho, M., Silva, B.M., 2009. Evaluation of free radical-scavenging and antihemolytic

activities of quince (*Cydonia oblonga*) leaf: A comparative study with gree tea (*Camellia sinensis*). *Food Chem. Tox.*, **47**, 860-865.

54. Pastana.Bonilla, E. et al , 2003. Phenolic content anda antioxidant capacity of muscadine grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 5497-5503.

55. Kosar, M.B., Peli, E.K., Malyer, H., 2007. Effect of Brining on Biological Activity of Leaves of *Vitis vinifera* L. (Cv. Sultani Cü ekirdeksiz) from Turkey. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 4596-4603.

56. Katalinic, V., Generalic, I., Skroza, D., 2009. Insight in the phenolic composition and antioxidative properties of *Vitis vinifera* leaves extracts. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 1 (2) 7-15.