



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**EFEITO ANTIOXIDANTE DO VINHO TANNAT PRODUZIDO EM ITAQUI (RS)  
SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO DE HIPERGLICEMIA *IN VITRO***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Camila Eliza Fernandes Pazzini**

**Uruguaiana, RS, Brasil.**

**2012**

**EFEITO ANTIOXIDANTE DO VINHO TANNAT PRODUZIDO EM ITAQUI (RS)  
SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO DE HIPERGLICEMIA *IN VITRO***

**Por**

**Camila Eliza Fernandes Pazzini**

Dissertação apresentada como exigência parcial para obtenção de **grau de Mestra em Bioquímica**, pelo programa de pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA.

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Folmer

Coorientador: Prof. Dr. Júlio César Mendes Soares

Uruguaiana, RS, Brasil.

2012

Universidade Federal do Pampa  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado,

**EFEITO ANTIOXIDANTE DO VINHO TANNAT PRODUZIDO EM ITAQUI (RS)  
SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO DE HIPERGLICEMIA *IN VITRO***

Por  
**Camila Eliza Fernandes Pazzini**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestra em Bioquímica**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Dr. Vanderlei Folmer  
(Presidente/Orientador)**

---

**Dr. Félix Alexandre Antunes Soares  
(UFSM)**

---

**Dra. Daiana Silva de Ávila  
(UNIPAMPA)**

Uruguaiana, RS, Brasil.  
2012

*“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles”.*

**(Augusto Cury)**

## DEDICATÓRIA

A Deus, que me deu força, coragem e determinação para alcançar este objetivo tão almejado.

Aos meus pais Mauro e Vera, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade. Muito obrigada por todo apoio e incentivo!

A minha querida irmã e amiga Danielle, que foi fundamental na correção do inglês do artigo. Contigo compartilhei muitos momentos de alegria e aflição. Muito obrigada pela sua enorme paciência, carinho e dedicação!

Ao meu amado Diego, que foi mais do que um marido, foi amigo, meu maior incentivador. Sem seu apoio seria impossível concluir mais essa etapa da minha vida. Você foi a pessoa que mais dividiu comigo todas as experiências do mestrado e soube entender e aceitar todas as ausências e os momentos difíceis. Te amo!

Ao meu orientador Vanderlei Folmer pelo incentivo, atenção e por acreditar sempre no meu trabalho.

Ao meu coorientador Júlio César Mendes Soares, pelos ensinamentos, paciência e por toda ajuda na parte experimental do meu trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos professores Paula Augusti, Larissa Canhadas Bertan, Miriane Azevedo e Osmar Prestes pelo apoio e conselhos.

Ao professor Andréas Mendes pela ajuda na parte experimental de quantificação dos compostos fenólicos.

À Universidade Federal do Pampa pela oportunidade oferecida de realizar o mestrado.

Ao professor Eloir Missio (diretor do campus Itaqui) e ao professor Ricardo Howes Carpes (coordenador acadêmico do campus Itaqui) pelo incentivo e liberação do trabalho para frequentar as aulas do mestrado às sextas-feiras.

À Vinícola Campos de Cima por fornecer as amostras de vinho para análise.

Ao Hospital São Patrício (Itaqui, RS) por fornecer as bolsas de sangue de descarte para a realização deste trabalho.

Aos alunos de graduação Márcia Poetini, Cauê Ferreira Pires, Vanessa Brum e Geovana Pereira por toda ajuda na realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de química do campus Itaqui, especialmente o colega Jeferson Damásio pela paciência e ajuda na formulação de reagentes.

Às minhas queridas amigas Cláudia, Fê e Fran pelo apoio, amizade e incentivo.

Aos meus colegas de pós-graduação, em especial Ana Colpo e Hemerson da Rosa pela amizade.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica  
Universidade Federal do Pampa

### EFEITO ANTIOXIDANTE DO VINHO TANNAT PRODUZIDO EM ITAQUI (RS) SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM MODELO DE HIPERGLICEMIA *IN VITRO*

Autor: Camila Eliza Fernandes Pazzini  
Orientador: Vanderlei Folmer  
Coorientador: Júlio César Mendes Soares  
Data e Local da Defesa: Uruguaiana, 16 de novembro de 2012

A hiperglicemia leva a uma série de fenômenos bioquímicos que estão envolvidos na gênese do estresse oxidativo. O vinho é considerado um alimento antioxidante por conter uma grande quantidade de compostos fenólicos. O objetivo desse estudo foi observar o efeito antioxidante do vinho Tannat (safra 2006), produzido em Itaqui (RS), sobre o estresse oxidativo induzido por glicose ou frutose em eritrócitos *in vitro*. Eritrócitos foram incubados durante 24 horas a 37°C com concentrações de 5, 10, 30 e 100 mmol/L de glicose ou frutose, na presença ou ausência de diferentes volumes de vinho (0,075, 0,15 e 0,225 mL de vinho/mL de eritrócitos). Foram determinadas espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, consumo de glicose e fragilidade osmótica dos eritrócitos, além de polifenóis totais, antocianinas totais, ácido gálico, ácido caféico, epicatequina, resveratrol e a capacidade antioxidante (DPPH) do vinho. Os eritrócitos incubados com glicose e frutose apresentaram um aumento significativo da peroxidação lipídica quando comparados com eritrócitos incubados com 5 mmol/L de glicose ou frutose, o que foi prevenido com a adição de vinho. O vinho tinto apresentou altas concentrações de polifenóis totais, ácido gálico, ácido caféico, epicatequina e resveratrol, além de boa capacidade antioxidante. O consumo de glicose pelos eritrócitos nas concentrações de 5 e 10 mmol/L foi significativo, o que não ocorreu para os eritrócitos incubados com 30 e 100 mmol/L de glicose. O volume de 0,075 mL de vinho foi capaz de prevenir a inibição da captação de glicose pelos eritrócitos incubados com 30 e 100 mmol/L de glicose. No teste de fragilidade osmótica concentrações hipotônicas de NaCl induziram lise progressiva dos eritrócitos, que foi significativa apenas para os eritrócitos incubados com 30 e 100 mmol/L de frutose, sendo esta revertida através do tratamento dos eritrócitos com o vinho. Podemos concluir que o vinho tinto, a partir do volume mais baixo utilizado, pode diminuir a peroxidação lipídica, prevenir a inibição da captação de glicose pelos eritrócitos, além de diminuir a fragilidade osmótica de eritrócitos incubados com frutose. Este efeito antioxidante do vinho se deve, provavelmente, às altas concentrações de polifenóis encontrados e sua boa capacidade antioxidante.

**Palavras-chave:** Diabetes mellitus, hiperglicemia, vinho, peroxidação lipídica, eritrócitos, polifenóis.

## ABSTRACT

Dissertation of Master  
Program of Post-Graduation in Biochemistry  
Federal University of Pampa

### ANTIOXIDANT EFFECT OF TANNAT WINE PRODUCED IN ITAQUI (RS) ON OXIDATIVE STRESS IN MODEL OF HYPERGLYCEMIA *IN VITRO*

Author: Camila Eliza Fernandes Pazzini

Advisor: Vanderlei Folmer

Co-advisor: Júlio César Mendes Soares

Date and Location of Defense: Uruguaiana, November 16, 2012

Hyperglycemia leads a series of biochemical phenomena that are involved in the genesis of oxidative stress. The wine is considered an antioxidant food to contain a large amount of phenolic compounds. The aim of this study was to observe the antioxidant effect of Tannat wine (vintage 2006), produced in Itaqui (RS), on oxidative stress induced by glucose or fructose in erythrocytes *in vitro*. Erythrocytes were incubated for 24 hours at 37°C with concentrations of 5, 10, 30 and 100 mmol/L glucose or fructose in the presence or absence at different volumes of wine (0.075, 0.15 and 0.225 mL of red wine/mL of erythrocytes). Were determined Thiobarbituric acid reactive species, glucose consumption and osmotic fragility of erythrocytes; in addition total phenolic, anthocyanins, gallic acid, caffeic acid, epicatechin, resveratrol and the DPPH Scavenging Activity of wine. Erythrocytes incubated with glucose and fructose showed a significant increase in lipid peroxidation compared with erythrocytes incubated with 5 mmol/L glucose or fructose, which was prevented by addition of wine. The red wine presented high concentrations of total polyphenols, gallic acid, caffeic acid, epicatechin and resveratrol, further good antioxidant potential. The consumption of glucose by the erythrocytes at concentrations of 5 and 10 mmol/L was significant, this was not observed for the erythrocytes incubated with 30 and 100 mmol/L glucose. The volume of 0.075 ml of wine was able to prevent the inhibition of glucose uptake by erythrocytes incubated with 30 and 100 mmol/L glucose. In the test of osmotic fragility hypotonic concentrations of NaCl induced lysis of erythrocytes progressive, which was significant only for erythrocytes incubated with 30 and 100 mmol/L fructose, this being reversed by treating cells with wine. We conclude that red wine, from the lower volume used, can decrease lipid peroxidation, prevented the inhibition of glucose uptake and decreased osmotic fragility of erythrocytes incubated with fructose. This antioxidant effect of wine is probably due to high concentrations of polyphenols and its good antioxidant capacity.

**Word Keys:** Diabetes mellitus, hyperglycemia, wine, lipid peroxidation, erythrocytes, polyphenols.



## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	5
AGRADECIMENTOS.....	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVEATURA.....	13
APRESENTAÇÃO.....	14
1- INTRODUÇÃO.....	15
2- JUSTIFICATIVA.....	17
3- OBJETIVOS.....	19
3.1 - Objetivo geral.....	19
3.2 - Objetivos específicos.....	19
4- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
4.1- Hiperglicemia e estresse oxidativo.....	20
4.1.1- Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e Nitrogênio (RNS).....	20
4.2- Mecanismos propostos para explicar anormalidades associadas a exposição prolongada dos eritrócitos à hiperglicemia.....	21
4.2.1- Aumento da atividade da aldose redutase – Via dos polióis.....	21
4.2.2- Formação de produtos de glicação avançada (AGEs).....	22
4.3- Eritrócitos e peroxidação lipídica.....	23
4.4- Mecanismos de defesa antioxidantes.....	25
4.5- Derivados da uva e sua ação antioxidante.....	26
4.5.1- Efeito cardioprotetor.....	27
4.5.2- Função Vascular.....	28
4.5.3- Efeitos antiplaquetários.....	28
4.5.4- Aterosclerose.....	28
4.5.5- Efeitos anticâncer.....	29
4.5.6- Efeito antidiabético.....	29
4.6- Efeito do álcool.....	30
4.7- Compostos fenólicos ou polifenóis do vinho.....	30

4.7.1- Fenólicos não-flavonoides.....	31
4.7.1.1- Resveratrol.....	32
4.7.2- Flavonoides.....	32
4.7.2.1- Flavonóis.....	33
4.7.2.2- Flavanóis.....	33
4.7.2.3- Antocianinas.....	34
4.7.2.4- Taninos.....	35
4.8- Produção de vinho no Rio Grande do Sul.....	35
4.9- Condições Climáticas e Fases do Ciclo Vegetativo da Videira.....	38
4.10- Solo para a viticultura.....	40
4.11- Cultivar Tannat.....	40
5- MANUSCRITO.....	42
6- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
7- PERSPECTIVAS.....	68
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Aldose redutase e via dos polióis.....	22
<b>Figura 2:</b> Principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica.....	24
<b>Figura 3:</b> Mecanismos de defesa antioxidante enzimático.....	26
<b>Figura 4:</b> Ácidos hidroxinâmicos encontrados em <i>Vitis vinífera</i> .....	31
<b>Figura 5:</b> Estrutura química do trans-resveratrol.....	32
<b>Figura 6:</b> Estrutura química dos flavonóis.....	33
<b>Figura 7:</b> Estrutura química dos flavanóis.....	34
<b>Figura 8:</b> Estrutura química das antocianinas.....	34
<b>Figura 9:</b> Cachos da cv. Tannat.....	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Exemplos de compostos dos sistemas de defesa enzimático e não enzimático .....	25
---	----

## LISTA DE ABREVEATURAS

**AGEs**- Produtos de glicação avançada

**ATP**- Adenosina trifosfato

**CAT**- Catalase

**CuZnSOD**- CuZn superóxido dismutase

**DM**- Diabetes mellitus

**DNA**- Ácido desoxirribonucleico

**DPPH**- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

**ECSOD**- Superóxido dismutase extracelular

**G6PDH**- Glicose-6-fosfato-desidrogenase

**GPx**- Glutaciona peroxidase

**GR**- Glutaciona redutase

**GSH**- Glutaciona reduzida

**GSSG**- Glutaciona oxidada

**GST**- Glutaciona-S-Transferase

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**- Peróxido de hidrogênio

**HbA**- Hemoglobina

**HbA<sub>1c</sub>**- Hemoglobina glicada

**HNO<sub>2</sub>**- Ácido Nitroso

**HO<sup>•</sup>**- Radical hidroxil

**LDL**- Lipoproteína de baixa densidade

**MnSOD**- Mn superóxido dismutase

**N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**- Oxido Nitroso

**NAD<sup>+</sup>**- Nicotinamida adenina dinucleotídeo

**NADH**- Nicotinamida adenina dinucleotídeo hidreto

**NADPH**- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

**NO**- Óxido nítrico

**NO<sub>2</sub>**- Nitritos

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>**- Nitratos

**O<sub>2</sub><sup>-•</sup>**- Ânion superóxido

**OMS**- Organização Mundial de Saúde

**ONOO<sup>-</sup>**- Peroxinitritos

**RNS**- Espécies Reativas de Nitrogênio

**RO<sub>2</sub><sup>•</sup>**- Radical peroxil

**ROS**- Espécies Reativas de Oxigênio

**SDH**- Sorbitol desidrogenase

**SOD**- Enzima superóxido dismutase

**TBA-RS**- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

## APRESENTAÇÃO

O presente estudo encontra-se estruturado da seguinte forma: um primeiro capítulo introdutório, a fim de apresentar o tema ao leitor, seguido do segundo e terceiro capítulo, contendo a **JUSTIFICATIVA** e **OBJETIVOS**, respectivamente.

O quarto capítulo apresenta o ferramental teórico, ou seja, a **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** utilizada na pesquisa, abordando sobre a hiperglicemia e seu papel na geração do estresse oxidativo, além de alguns mecanismos bioquímicos que se tem sugerido para explicar as anormalidades estruturais e funcionais decorrentes da exposição prolongada dos eritrócitos à hiperglicemia.

Fazem parte também do quarto capítulo uma revisão sobre os mecanismos de defesa antioxidantes, a ação antioxidante do vinho em algumas doenças, bem como os compostos fenólicos presentes nesta bebida, um panorama da produção do vinho no Rio Grande do Sul, e por último alguns aspectos sobre a cultivar Tannat.

O quinto capítulo apresenta o **MANUSCRITO** que contém os resultados que fazem parte desta dissertação. As seções materiais e métodos, resultados, discussão dos resultados e referências bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito e representam à íntegra deste estudo.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica Food Chemistry, a qual será submetido após a defesa desta dissertação.

O sexto capítulo refere-se às **CONSIDERAÇÕES FINAIS** com interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido nessa dissertação.

O sétimo capítulo contém as **PERSPECTIVAS**, onde estão expostos os possíveis estudos que possam dar continuidade a este trabalho.

E, por fim, o oitavo capítulo apresenta as **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** que se referem somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **JUSTIFICATIVA**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e **CONSIDERAÇÕES FINAIS**.

## 1- INTRODUÇÃO

O Diabetes mellitus (DM) caracteriza-se por desordem metabólica de etiologia múltipla, decorrente da redução da secreção de insulina e/ou perda da capacidade desse hormônio de exercer adequadamente seus efeitos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007). Recentes estudos têm apontado forte relação entre hiperglicemia e estresse oxidativo. A glicose provoca alterações celulares resultantes do processo de glicação não enzimática e da glicoxidação. Estes processos, por sua vez, estão relacionados à produção de ROS e à formação de produtos de glicação avançada (AGEs) que contribuem para a modificação irreversível de proteínas, DNA e lipídeos (CHIS et al, 2009; ÖZKAYA et al, 2011).

Atualmente, o DM é tratado com drogas hipoglicemiantes e insulino-terapia levando uma maior sobrevida aos seus portadores, no entanto, esta é uma doença crônica que leva ao desenvolvimento de uma série de complicações secundárias, decorrentes do estresse oxidativo gerado pela hiperglicemia, como nefropatias, neuropatias, hepatopatias, retinopatia, dentre outras, as quais prejudicam a qualidade de vida dos pacientes, bem como, abreviam seu tempo de vida (BROWNLEE, 2005). Assim, pesquisadores têm se dedicado na busca de alternativas para amenizar tais complicações e o vinho tinto, por ser uma bebida com altas concentrações de compostos bioativos, tem se mostrado um poderoso antioxidante em diversas doenças (RODRIGO, MIRANDA & VERGARA, 2011).

O vinho tinto é uma bebida obtida pela fermentação alcoólica, total e/ou parcial, do mosto (suco de uva), onde as leveduras, à medida que amadurecem quando em contato com o suco produzem enzimas que convertem glicose e frutose em álcool etílico e dióxido de carbono, que normalmente é descartado, exceto no caso de vinhos espumantes (AMARANTE, 2005).

O que diferencia o vinho tinto de outras bebidas alcoólicas são os polifenóis presentes em sua composição. Essas substâncias exercem uma forte ação antioxidante em humanos e animais.

A concentração de polifenóis presentes no vinho tinto pode variar conforme a variedade, origem e processamento da uva, além de condições climáticas e solo do lugar onde elas serão cultivadas (RODRIGO, MIRANDA & VERGARA, 2011). Sendo assim, a cidade de Itaqui, localizada na região da Campanha Oriental do Rio Grande do Sul tem

emergido como região vitícola, por possuir um clima propenso para o desenvolvimento de videiras.

Tendo em vista a falta de produção científica acerca do efeito antioxidante do vinho tinto da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul e a pouca literatura sobre os benefícios do vinho tinto em situações de hiperglicemia, o objetivo desse estudo foi analisar o efeito antioxidante do vinho produzido em Itaqui (RS) sobre o estresse oxidativo induzido por glicose ou frutose em eritrócitos *in vitro*.



## 2- JUSTIFICATIVA

Segundo a Federação Internacional de Diabetes o Diabetes mellitus (DM) é considerado a quinta maior causa de morte no mundo, com projeções para 2025 de 300 a 334 milhões de portadores, o que corresponde a 5,4% da população mundial.

Em 2004, WILD, ROGLIC e GREEN, publicaram resultados de um estudo desenvolvido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) referente às estimativas de prevalência do diabetes mellitus entre 2000 e 2030. Segundo estes autores, o Brasil, que no ano de 2000 ocupava o oitavo lugar entre os dez países com a maior prevalência de diabetes (4,6 milhões), ocupará, em 2030, a sexta posição, quando contará com 8,9 milhões de pessoas com o diagnóstico. Outro estudo, o VIGITEL 2007 (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), obteve como resultado 6,3% de brasileiros com diagnóstico prévio de diabetes no ano de 2010. Assim, tendo em vista esse panorama da Diabetes no mundo e no Brasil, podemos dizer o DM está se tornando uma das principais ameaças à saúde humana do século 21.

O diabetes também pode gerar uma série de complicações secundárias, isto é, enfermidades que aparecem com o decorrer da doença, principalmente em indivíduos diabéticos com descontrole glicêmico. Essas complicações secundárias que incluem arteriosclerose, falência renal, catarata, retinopatia, dentre outras, são decorrentes do estresse oxidativo gerado pela hiperglicemia. Elas são também responsáveis pela mortalidade aumentada e a diminuição da qualidade de vida de portadores de DM (CHOI et al., 2008).

A insulina é importante para uma maior sobrevivência e uma melhor coexistência com a doença pelos pacientes, porém, ela não é capaz de prevenir o aparecimento dessas enfermidades secundárias (SOARES, 2005). Assim, compostos bioativos, como os polifenóis presentes no vinho, podem ser capazes de atenuar esse processo, por possuírem propriedades antioxidantes.

Esse interesse nutricional nos polifenóis do vinho tinto vem crescendo desde a publicação do “Paradoxo Francês” por RENOUD & DE LONGERIL (1992). Estes autores concluíram que apesar do alto consumo de gordura saturada pelos franceses, a mortalidade por doenças coronarianas é três vezes menor que no Reino Unido, por exemplo. Tal efeito foi atribuído ao alto consumo de vinho pela população francesa.

Porém, apesar do vinho apresentar em sua composição várias substâncias benéficas à saúde, os estudos limitam-se, principalmente, à presença de resveratrol e outros composto fenólicos como os flavonóides, quercetina e catequinas, encontrados em grande quantidade no vinho. Além disso, a maioria dos estudos relacionam os benefícios dessa bebida com a prevenção de doenças cardiovasculares, havendo, portanto, deficiência de estudos que associem os efeitos protetores do vinho tinto em outras enfermidades, tais como Diabetes Mellitus.

Ademais, o vinho analisado é produzido em Itaqui (RS), cidade localizada na fronteira oeste do Rio Grande do Sul, região agropecuária, voltada para a criação de gado e cultivo de arroz que, recentemente, tem apostado no cultivo de uvas como forma de diversificação e inovação. É importante salientar também que esta região tem apresentado condições climáticas e solo favoráveis para a vitivinicultura. Logo, fazem-se necessárias análises fitoquímicas mais apuradas.

Em razão do exposto acima, a relevância deste estudo está em descobrir nova alternativa que diminua todo este processo de estresse oxidativo decorrente do DM e possibilite novas conclusões a respeito do vinho, que embora seja pouco consumido no Brasil, pode ser considerado um alimento funcional.

### **3- OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Analisar o efeito antioxidante de diferentes volumes do vinho tinto Tannat, elaborado na cidade de Itaqui – RS, sobre o estresse oxidativo induzido por altas concentrações de glicose ou frutose em eritrócitos *in vitro*.

#### **3.2 - Objetivos Específicos**

- Analisar os efeitos do vinho tinto sobre: os níveis de lipoperoxidação (TBA-RS); a fragilidade osmótica; consumo da glicose;
- Uma vez analisados os efeitos antioxidantes do vinho sobre o estresse oxidativo gerado nos eritrócitos, quantificar:
  - a) os compostos fenólicos totais;
  - b) as antocianinas totais,
  - c) ácido gálico, ácido caféico, epicatequina e resveratrol;
- Determinar a capacidade antioxidante do vinho.

## **4- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1- Hiperglicemia e estresse oxidativo**

Durante o metabolismo normal, o oxigênio é reduzido a água e, neste processo, os produtos intermediários são o radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil, que em conjunto são chamados de espécies reativas de oxigênios (ROS). Na presença de um elétron não pareado estes radicais tornam-se reativos e capazes de causar danos a moléculas de DNA, lipídeos e proteínas. O estresse oxidativo acontece quando há um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, de modo que os primeiros sejam predominantes, e as defesas antioxidantes, insuficientes para detoxificar as ROS ou, quando há uma produção excessiva de ROS (VALKO et al., 2007; CORRÊA-GIANNELLA & VIEIRA, 2008).

Geralmente acentuado aumento do metabolismo da glicose em situações de hiperglicemia crônica está associado à formação de ROS, levando a danos teciduais devido a modificações agudas no metabolismo celular. Além disso, exposição a altas concentrações de glicose também podem ocasionar alterações cumulativas em macromoléculas que podem persistir mesmo com a restauração da glicemia (ROLO & PALMEIRA, 2006).

Mecanismos bioquímicos têm sido sugeridos a fim de explicar as anormalidades estruturais e funcionais associadas com a exposição prolongada dos tecidos vasculares à hiperglicemia. Há suspeitas de que a capacidade antioxidante endógena esteja prejudicada nos indivíduos diabéticos, dificultando a neutralização dos radicais livres (ROLO & PALMEIRA, 2006).

#### **4.1.1- Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e Nitrogênio (RNS)**

Na hiperglicemia geralmente ocorre um aumento da captação de glicose pelas células, o que ocasiona um aumento na produção de espécies reativas pela mitocôndria (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

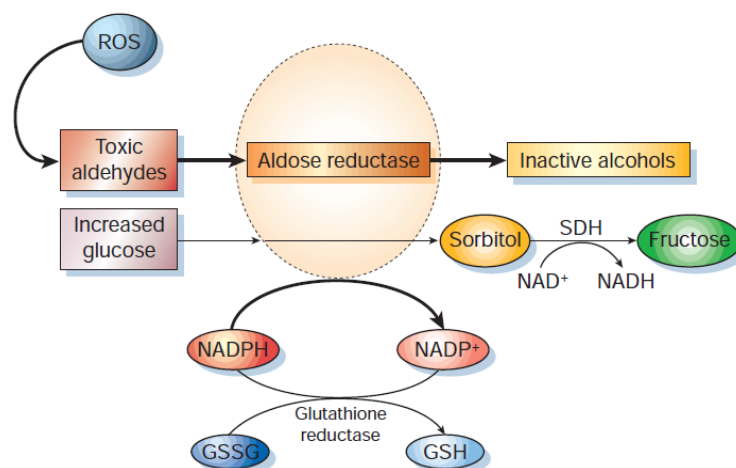
Radicais livres são espécies cuja reatividade resulta da presença de um ou mais elétrons não pareados em sua órbita externa. Já o ROS e RNS são termos que compreendem todas as formas reativas do oxigênio e nitrogênio, incluindo radicais e não

radicais que participam da iniciação e progressão das reações em cadeia envolvendo a formação de espécies radicalares (CERQUEIRA, MEDEIROS, AUGUSTO, 2007). São caracterizadas por alta instabilidade e reatividade, além disso, tendem a ligar o elétron não-pareado com outros presentes em estruturas próximas de sua formação, comportando-se como receptores (oxidantes) ou doadores (redutores) de elétrons. Os radicais livres podem reagir com as principais classes de biomoléculas, sendo os lipídeos os mais susceptíveis. Os principais ROS são o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o radical hidroxil ( $HO^{\bullet}$ ) e o radical peróxil ( $RO_2^{\bullet}$ ) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Dentre as RNS incluem-se o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ), óxido nitroso ( $N_2O_3$ ), ácido nitroso ( $HNO_2$ ), nitritos ( $NO_2^-$ ), nitratos ( $NO_3^-$ ) e peroxinitritos ( $ONOO^-$ ) (BARREIROS & DAVID, 2006).

#### **4.2- Mecanismos propostos para explicar anormalidades associadas a exposição prolongada dos eritrócitos à hiperglicemia.**

##### 4.2.1- Aumento da atividade da aldose redutase – Via dos polióis

A hiperglicemia, com conseqüente aumento de ROS, reduz os níveis de óxido nítrico (NO) ativando a aldose redutase (primeira enzima da via dos polióis). O aumento do fluxo pela via dos polióis, induzido pelo aumento de ROS, leva a conversão de glicose a sorbitol, reduzindo NADPH e glutatona (antioxidante endógeno) e aumentando o estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia. O sorbitol é convertido à frutose, resultando aumento da relação NADH: NAD<sup>+</sup>. (Figura 1) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; BROWNLEE, 2001).



**Figura 1: Aldose redutase e via dos polióis.** Aldose redutase reduz os aldeídos gerados por ROS a álcoois inativos, e glicose a sorbitol, usando NADPH como cofator. Nas células onde a atividade da aldose redutase é suficiente para diminuir a glutatona reduzida (GSH), o estresse oxidativo é aumentado. Sorbitol desidrogenase (SDH) oxida sorbitol a frutose usando NAD + como cofator.

Fonte: BROWNLEE, 2001.

#### 4.2.2- Formação de produtos de glicação avançada (AGEs)

Os AGEs são proteínas ou lipídeos que se tornam glicosados após a exposição a açúcares oxidados, formando glicotoxinas. (BROWNLEE, 2005). Primeiramente, a glicose forma produtos de glicação quimicamente reversíveis com as proteínas (denominadas bases de Schiff), que podem sofrer rearranjo e formar produtos mais estáveis, que são lentamente reversíveis (produtos de Amadori). Após rearranjos moleculares esses produtos de Amadori podem formar os produtos finais de glicação avançada (AGEs), que são irreversíveis (MANTILLA, 2001; GOLDIN et al., 2006).

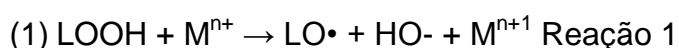
Todas as proteínas do organismo podem sofrer glicação. Um exemplo é a hemoglobina (HbA), cuja glicação ocorre na valina terminal da cadeia  $\beta$ , formando o que chamamos de hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>). Ao sofrer glicação a hemoglobina tem sua capacidade de liberar O<sub>2</sub> para os tecidos prejudicada (CHANDALIA & KRISHNASWAMY, 2002).

### 4.3- Eritrócitos e Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica é um processo complexo que envolve a interação de radicais livres com ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e até morte celular. As alterações nas membranas celulares provocam desordens na permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, resultando na perda de seletividade para a entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas às células, alterações do DNA, oxidação da LDL e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (REED, 2011).

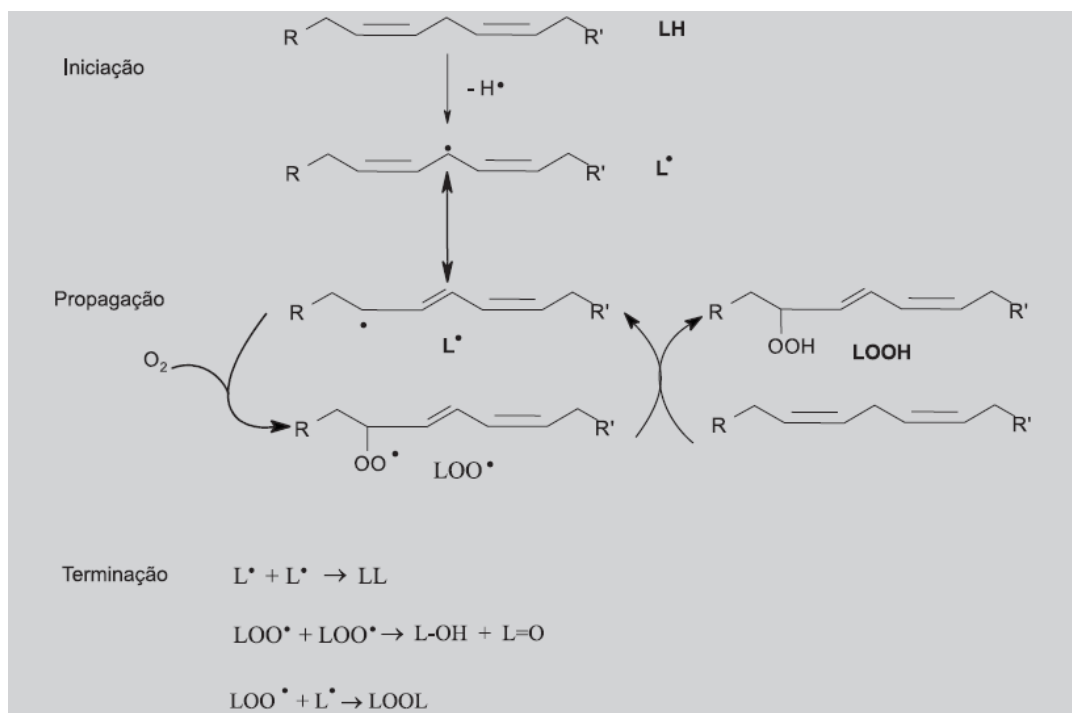
O processo geral de peroxidação lipídica consiste em três etapas: iniciação, propagação e terminação. A fase de iniciação representa o início da peroxidação, em que o ácido graxo poli-insaturado sofre ataque de uma espécie que é suficientemente reativa para sequestrar um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-), formando um radical de carbono. Este radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples. Em meio aeróbio, o radical alquila inicialmente formado se combina com o oxigênio formando o radical peroxila, o qual pode abstrair um hidrogênio alílico de outro ácido graxo, gerando outro radical de carbono e dando início a fase de propagação. A reação do radical peroxila com o átomo de hidrogênio sequestrado gera um hidroperóxido lipídico (LOOH). Peróxidos cíclicos também podem ser formados, quando o radical peroxila reage com uma dupla ligação na mesma cadeia de ácido graxo, o que também pode aumentar a peroxidação (Figura 2) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Alguns íons de metais de transição como Fe<sup>n+</sup> e Cu<sup>n+</sup>, podem fazer parte do processo catalisando a formação de radicais lipídicos alcóxila, peroxila e hidroxila a partir dos hidroperóxidos, conforme descrito nas reações 1 e 2 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999):



A última etapa da reação, a fase de terminação, dá-se pela aniquilação dos radicais formados originando produtos não radicalares. Os radicais peroxila e alcóxila também

podem: sofrer dismutação ou clivagem formando aldeídos; formar uma ligação covalente com resíduos de aminoácidos ou sofrer um rearranjo formando produtos secundários da peroxidação (derivados hidroxi-, ceto-, cetohidroxi- e epoxi-hidroxi-ácido graxo) (Figura 2) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



**Figura 2:** Principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica.

Fonte: LIMA & ABADALLA, 2001.

A oxidação dos eritrócitos tem sido muito estudada como um modelo de dano oxidativo das biomembranas, demonstrando que os ROS atacam as membranas dos eritrócitos para induzir a oxidação de lipídeos e proteínas, levando a hemólise (RACEK et al., 2001). Porém os mesmo possuem um sistema enzimático detoxificador de radicais livres formado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) (CRIMI at al, 2006). Este sistema detoxificador, em situações de hiperglicemia crônica, como o diabetes, não consegue impedir o efeito da grande formação de radicais livres (RAINS & JAIN, 2011).



#### 4.4- Mecanismos de defesa antioxidante

Devido aos efeitos maléficos do estresse oxidativo, mesmo sob condições fisiológicas normais, organismos aeróbios desenvolveram um complexo sistema antioxidante (STYKAL et al, 2012).

HALLIWELL e GUTTERIGE (1999) definem antioxidante como alguma substância presente em baixas concentrações, comparadas às concentrações do substrato oxidante, que previne ou atrasa significativamente a oxidação de substratos susceptíveis. Esta definição abrange compostos de natureza enzimática e não enzimática. A tabela 1 mostra exemplo de compostos dos sistemas de defesa enzimático e não enzimático.

**Tabela 1:** Exemplos de compostos dos sistemas de defesa enzimático e não enzimático.

<b>Enzimáticos</b>	<b>Não Enzimáticos</b>
Superóxido Dismutase (SOD)	Ácido Úrico
Catalase (CAT)	Glutaciona (GSH)
Glutaciona Peroxidase (GPx)	Coenzima Q
Glutaciona Redutase (GR)	$\alpha$ -tocoferol (Vitamina E)
Glutaciona-S-Transferase (GST)	Vitamina C
Glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH)	B-caroteno
	Flavonóides
	Polifenóis

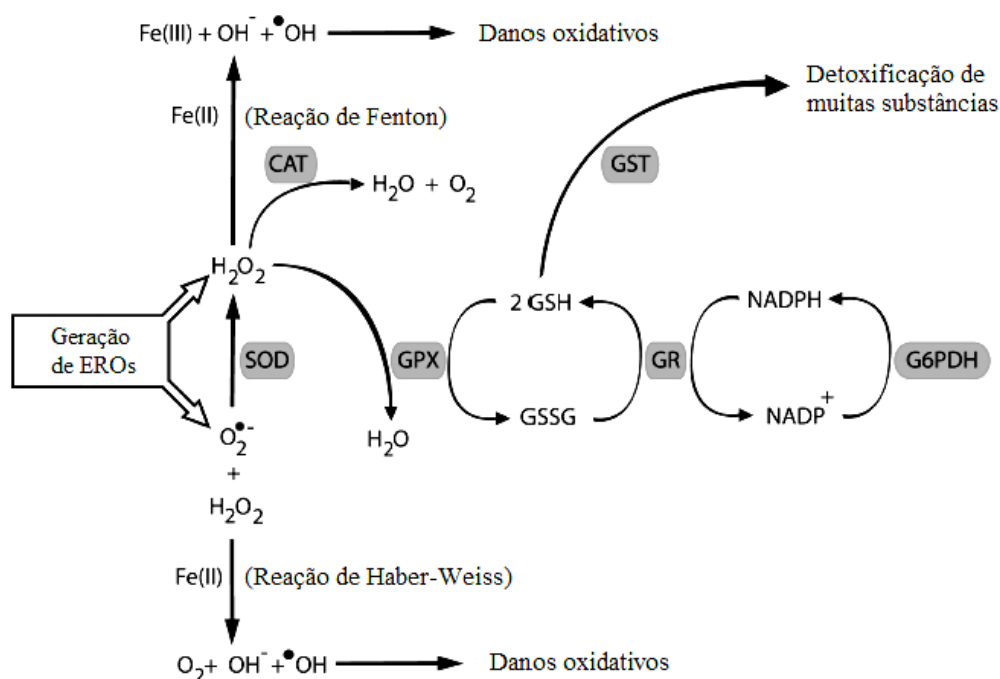
Entre as principais enzimas citadas na tabela 1 destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutaciona peroxidase (GPx), que constituem a primeira defesa endógena de neutralização dos ROS. Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do radical superóxido e de peróxidos de hidrogênio, impedindo assim, a formação do radical hidroxil.

A SOD é responsável pela redução dos níveis de superóxido na célula. Ela catalisa a dismutação do radical  $O_2^{\bullet-}$  em  $O_2$  e  $H_2O_2$  (Figura 3). Nos mamíferos são encontrados três isoformas principais da SOD: CuZn superóxido dismutase (CuZnSOD; SOD 1), Mn superóxido dismutase (MnSOD; SOD 2) e superóxido dismutase extracelular (ECSOD; SOD 3). Cada isoforma localiza-se em diferentes compartimentos celulares, sendo a SOD 1 encontrada principalmente no citoplasma e no espaço mitocondrial intermembranar, a

SOD 2 na matriz mitocondrial e a SOD 3 nos fluídos e interstício extracelular (STYKAL et al, 2012).

O  $H_2O_2$  é degradado pela ação da CAT, que catalisa diretamente a decomposição de  $H_2O_2$ , ou pelas GPx, as quais removem  $H_2O_2$  para oxidar outros substratos. A CAT localiza-se principalmente nos peroxissomas (STYKAL et al, 2012).

A família das GPx reduz  $H_2O_2$  para formas menos tóxicas, como água e álcoois. Para esta redução a GPx utiliza como substrato um tripeptídeo de baixo peso molecular contendo tiol (-SH) (GSH). A glutationa oxidada (GSSG), resultante da reação catalisada pela GPx, é reduzida a GSH pela enzima glutationa redutase (GR) que utiliza NADPH (proveniente da via das pentoses) para catalisar a reação. A G6PDH é a enzima responsável pela reciclagem de  $NADP^+$  a NADH (Figura 3) (STYKAL et al, 2012).



**Figura 3:** Mecanismos de defesa antioxidante enzimático.

Fonte: MATTOS, 2009

#### 4.5- Derivados da uva e sua ação antioxidante

Nos últimos anos, a sociedade vem buscando cada vez mais o consumo de alimentos que possam tratar e/ou prevenir doenças, bem como aumentar a longevidade. Assim, o vinho, por ser uma bebida rica em compostos antioxidantes, tem se destacado.

O vinho é uma das bebidas alcoólicas mais nobres e, entre os países com maior produção e consumo estão a França, Itália, Espanha e Argentina. Seu consumo teve início há aproximadamente 7.000 anos no Mediterrâneo, sendo sua comprovação benéfica em 1992 quando foi publicado o Paradoxo Francês (RODRIGO, MIRANDA & VERGARA, 2011).

O Paradoxo Francês foi introduzido por RENAUD e DE LONGERIL (1992) com o objetivo de justificar a baixa taxa de mortalidade por isquemia coronariana entre os franceses, que consomem dietas com altas doses de gordura saturada. Os autores atribuíram esse efeito ao consumo regular do vinho tinto baseado nas descobertas do projeto MONICA (sistema de monitoramento de doenças cardiovasculares). Esse projeto envolveu pesquisadores de 21 países e mais de 7 milhões de pessoas com idades entre 35 e 64 anos durante dez anos (1980-1990). Os organizadores descobriram que a França apresentava menor mortalidade por doenças cardiovasculares do que os Estados Unidos e o Reino Unido, por exemplo. Os fatores de risco como hipertensão, índice de massa corporal e o hábito de fumar eram semelhantes nesses países, sendo que o consumo de vinho tinto era o fator que diferenciava as três populações.

O vinho é uma bebida alcoólica resultante da transformação biológica da uva, onde durante a fermentação uma série de reações químicas provocadas por leveduras agem sobre os açúcares da uva, transformando-os em álcool (AMARANTE, 2005). Ele possui substâncias inicialmente protetoras da uva e da videira conhecidas como polifenóis ou compostos fenólicos, que acompanham a fermentação do vinho e até são exacerbadas neste processo. Essas substâncias exercem uma forte ação antioxidante em humanos e animais (GIEHL et al., 2007). Assim, listam-se abaixo alguns efeitos terapêuticos do vinho.

#### 4.5.1- Efeito cardioprotetor

O moderado consumo de vinho tinto tem sido associado à redução do risco de desenvolvimento de doenças coronarianas. Os polifenóis do vinho agem em vários níveis do sistema cardiovascular, como função endotelial, aterosclerose, agregação plaquetária e eventos de isquemia-reperfusão (RODRIGO, MIRANDA & VERGARA, 2011).

GARCIA et al. (2005), em estudo com pacientes com síndrome coronariana aguda, que consumiram 250 mL de vinho por dia durante dois meses, observaram uma melhora

significativa na proporção de dilatação do endotélio além de benefícios em parâmetros de estresse oxidativo.

#### 4.5.2- Função vascular

A disfunção endotelial é o principal evento no desenvolvimento da hipertensão, aterosclerose e infarto (BAHIA et al, 2006). Na hipertensão humana verificou-se o aumento da produção do ânion superóxido e a redução da síntese de NO, levando a vasoconstrição e aumento da pressão sanguínea (RODRIGO, MIRANDA & VERGARA, 2011).

Demonstrou-se que a administração oral de extrato da casca da uva diminuiu significativamente a pressão sanguínea arterial sistólica e diastólica em modelo de hipertensão em ratos (SOARES DE MOURA et al., 2002). Em outro estudo o consumo de suco de uva por pacientes com hipertensão provocou um aumento da liberação de NO e redução na produção de superóxido nos vasos (ZENEBE, PECHÁNOVÁ & ANDRIANTSITOHAINA, 2003).

#### 4.5.3- Efeitos antiplaquetários

PIGNATELLI et al. (2000) mostraram que polifenóis do vinho tinto podem diminuir a produção de plaquetas e peróxido de hidrogênio, além de inibir a ativação da fosfolipase C e proteína quinase C. Em outro estudo com extratos de semente de uva ricos em polifenóis observou-se a redução da adesão e agregação plaquetária e da geração do ânion superóxido (OLAS, et al., 2008).

#### 4.5.4- Aterosclerose

O resveratrol tem sido largamente estudado quanto ao seu efeito sobre a aterosclerose. Ele favorece a produção pelo fígado de HDL-colesterol e proporciona uma redução na produção de LDL-colesterol, além de impedir a oxidação do LDL-colesterol-circulante (MUKHERJEE, DUDLEY & DAS, 2010).

A fim de avaliar a ação benéfica dos compostos fenólicos contra a aterosclerose, um estudo foi desenvolvido utilizando pó de uva liofilizado elaborado a partir de uvas

frescas. Os animais utilizados no estudo foram avaliados durante 10 semanas. Após o tratamento, os autores observaram que os camundongos tratados com o pó de uva liofilizado apresentaram uma redução considerável no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas e estresse oxidativo, em razão da capacidade antioxidante dos polifenóis encontrados na uva (FUHRMAN, et al., 2005)

#### 4.5.5- Efeitos anticâncer

Compostos fenólicos e suas atividades anticâncer têm sido bastante estudados, principalmente a ação do resveratrol em diversos tipos de câncer. Ele age controlando o ciclo de progressão, regulação dos sinais de apoptose, inibição do crescimento do tumor, angiogênese e modulação da atividade de fatores de transcrição relacionados com a patogênese do câncer (FULDA & DEBATIN, 2004; RODRIGO, MIRANDA & VERGARA, 2011).

Também foi demonstrado que o extrato da casca da uva induziu apoptose de células tumorais em câncer de próstata (HUDSON et al., 2007) . Polifenóis do suco de uva também inibiram significativamente a síntese de DNA em células de câncer de mama (SCARLATTI et al., 2007).

A ação de polifenóis do vinho tinto em outros tipos de câncer também tem sido estudada, como por exemplo, em hepatocarcinoma (BISHAYEE & DHIR, 2009) e câncer de pulmão (CHAO et al., 2008).

#### 4.5.6- Efeito antidiabético

Como já mencionado anteriormente, a longo prazo, Diabetes Mellitus leva a complicações secundárias como retinopatia, nefropatia, neuropatia e disfunções sexuais que são provocadas pelo aumento dos níveis de ROS.

MONTILLA et al. (2004) em estudo sobre o efeito do vinho tinto no estresse oxidativo em ratos diabéticos observou o aumento da glutatona reduzida e da catalase, enquanto que os níveis de oxidação lipídica reduziram. Além disso, o vinho tinto induziu a diminuição dos níveis de glicemia, frutossamina no plasma, percentual de hemoglobina glicada e aumentou os níveis de insulina. Em outro estudo com 9 indivíduos portadores de

diabetes tipo 2 que consumiram 360 mL de vinho tinto por dia durante 2 semanas, observou-se uma melhora da resistência insulínica (NAPOLI et al., 2005).

#### **4.6- Efeito do etanol**

O álcool quando consumido em pequenas doses (30g) está associado com baixo risco de doenças cardiovascular e diabetes mellitus, isto se deve ao efeito do álcool sobre a sensibilidade à insulina e no aumento de HDL (DAVIES, et al, 2002; O'KEEFE, BYBEE & LAVIE, 2007). Outro fator importante é que a presença do etanol no vinho aumenta a absorção dos compostos fenólicos, pois previne a precipitação de polifenóis no trato gastrointestinal (SERAFINI, MAIANI & FERRO-LUZZI, 1997).

Porém o consumo de doses elevadas e uso indiscriminado de álcool, assim como de vinho, estão associados à hipertensão e, portanto, deve ser evitado. Em indivíduos que ingerem álcool em excesso, há risco de oclusão vascular, arritmias, cirrose hepática, câncer gastrointestinal, síndrome alcoólica fetal e dependência alcoólica (OPIE & LECOUR, 2007).

#### **4.7- Compostos fenólicos ou polifenóis do vinho**

Os compostos fenólicos têm grande importância no vinho, pois conferem a coloração e grande parte do sabor, além de proteger a uva contra fungos, bactérias, vírus e radiação solar. São encontrados principalmente na casca, semente e polpa da uva (RODRIGO, MIRANDA & VERGARA, 2011).

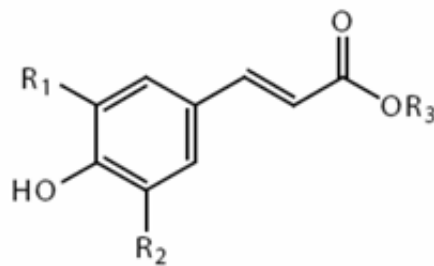
O conteúdo de polifenóis no vinho é altamente variável devido a diferenças na variedade e origem da uva, bem como seu processamento. O vinho tinto contém uma concentração mais alta (cerca de 10 vezes) de polifenóis que o vinho branco, isso porque no processo de vinificação o vinho tinto é macerado por semanas juntamente com as cascas e sementes e estas contém a maioria dos compostos fenólicos (COVAS et al., 2010).

Os compostos fenólicos encontrados em uvas e vinhos podem ser separados em dois grandes grupos em razão da semelhança de suas cadeias de átomos de carbonos: não-flavonoides e flavonoides. Os flavonoides mais comuns nos vinhos em ordem crescente de concentração são os flavonóis (quercetina, caempferol e mircetina), flavan-3-óis (catequina, epicatequina e os taninos) e as antocianinas. Na classe dos não-

flavonoides estão os derivados do ácido cinâmico e benzoicos, encontrados frequentemente na forma de ésteres de ácido tartárico (FERNÁNDEZ-PACHÓN et al., 2006).

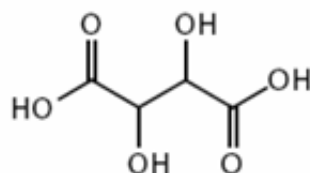
#### 4.7.1- Fenólicos não-flavonoides

Os compostos não-flavonoides compreendem os ácidos benzoicos e cinâmicos (figura 4), e outros fenólicos como estilbenos (resveratrol). Nas uvas, os ácidos fenólicos são principalmente os ácidos hidroxinâmicos que se encontram nos vacúolos da célula da película e da polpa, sob a forma de ésteres tartáricos (MACHEIX, SAPIS & FLEURIET, 1991).



Ácidos hidroxicinâmicos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<i>p</i> -cumárico	H	H
Cafeico	OH	H
Ferúlico	OCH <sub>3</sub>	H
Sináptico	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

#### Esterificação R<sub>3</sub>



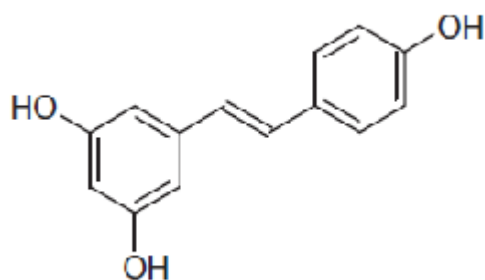
Ácido tartárico

**Figura 4:** Ácidos hidroxinâmicos encontrados em *Vitis vinífera*.

Fonte: ZOCHE, 2009

#### 4.7.1.1- Resveratrol

O resveratrol (figura 5) é uma substância natural produzida por diversas plantas, sendo as principais fontes as uvas e seus derivados. Na uva, essa substância é sintetizada na casca em resposta ao estresse causado por ataque fúngico, por dano mecânico ou por irradiação ultravioleta. Sua concentração no vinho tinto é maior do que no vinho branco, isto ocorre porque na produção de vinhos tintos a casca participa do processo de fermentação, o que não ocorre no vinho branco. Assim as concentrações de resveratrol encontradas nos diferentes tipos de vinho variam de acordo com a infecção fúngica, cultivo da uva, origem geográfica, tipo de vinho e práticas enológicas (FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012).



**Figura 5:** Estrutura química do trans-resveratrol.

Fonte: ZOCCHÉ, 2009

Alguns estudos confirmam que o resveratrol diminui a agregação plaquetária, através da interferência na síntese de prostaglandinas, inibindo o risco para doença cardiovascular (GIEHL et al., 2007). O resveratrol também seria responsável pela redução da viscosidade do sangue, como anticoagulante e vasodilatador, diminuindo, assim, os riscos de aterosclerose (GUTIÉRREZ MAYDATA, 2002; FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012).

#### 4.7.2- Flavonoides

Os flavonoides são compostos fenólicos que se caracterizam por um esqueleto básico e comum C6-C3-C6. A estrutura base consiste em dois anéis aromáticos ligados por um anel pirano. Esta classe de compostos fenólicos pode-se dividir em famílias que se diferenciam pelo grau de oxidação do anel pirano: flavonas, flavonóis, isoflavonas,

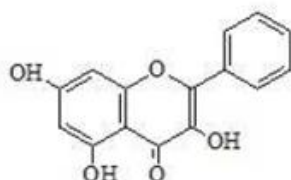


flavanóis, antocianinas, proantocianidinas e flavononas (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000).

Grande parte da estrutura e da cor dos vinhos deve-se a essa família de compostos que se localizam nas sementes, na polpa e na casca das uvas. De todos eles, os flavanóis e as proantocianidinas (2-50 moléculas de flavonol com adição ou não de antocianinas) se destacam (PASTRANA-BONILLA et al., 2003).

#### 4.7.2.1- Flavonóis

Os flavonóis são uma das maiores subclasses de flavonoides. Eles possuem um anel de carbono com dupla ligação na posição C2-C3 (figura 6). Estão presentes principalmente na casca na forma de monoglicosídeos com um resíduo de açúcar ligado ao radical hidroxila. Fazem parte dessa subclasse a quercetina, a miricetina e o caempferol (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003). Estes compostos possuem atividade antioxidante e antiestamínica (STECHEER et al., 2001). A quercetina também é reconhecida como inibidora da carcinogênese *in vivo* (FLAMINI, 2003).



FLAVONÓIS	Posição do OH
Quercetina	3,5,7,3',4'
Kaempferol	3,5,7,4'
Miricetina	3,5,7,3',4',5'

**Figura 6:** Estrutura química dos flavonóis.

Fonte: SCALBERT & WILLIAMSON, 2000

#### 4.7.2.2- Flavanóis

Dentre os flavanóis destacam-se os flavan-3-óis, que se caracterizam por possuírem um anel heterocíclico saturado. Os principais flavan-3-óis encontrados nos vinhos são a (+)-catequina e a (-)-epicatequina (figura 7), sendo que a (+)-catequina é a mais representativa e encontra-se nas cascas das uvas. Esses compostos são

responsáveis pela adstringência, amargor e corpo dos vinhos (KENNEDY, SAUCIER & GLORIES, 2006).



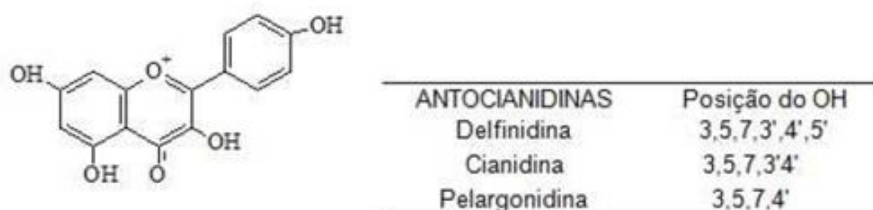
**Figura 7:** Estrutura química dos flavanóis.

Fonte: SCALBERT & WILLIAMSON, 2000

#### 4.7.2.3- Antocianinas

As antocianinas (figura 8) são os pigmentos responsáveis pela cor roxa das uvas, concentram-se principalmente na casca. Também estão presentes nas folhas no final do ciclo vegetativo (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003).

Os principais pigmentos antociânicos encontrados nas uvas são: malvinidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo, sendo que seu teor depende da variedade, e principalmente das condições climáticas e agrícolas a que as uvas são expostas (KELEBEK et al., 2006).



**Figura 8:** Estrutura química das antocianinas.

Fonte: SCALBERT & WILLIAMSON, 2000

A maioria destes compostos condensam-se com taninos do vinho para formar outra classe de cor mais estável. Uma parte das antocianinas desaparece devido à degradação

por agentes externos (temperatura, luz, oxigênio, etc.), ocorrendo uma precipitação que prejudica a qualidade do vinho, levando a uma diminuição da cor (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003).

As antocianinas são de grande interesse nutricional por seu potencial antioxidante, capacidade antineoplásica, anti-inflamatória, antiviral e antibacteriana (PEDRESCHI & CISNEROS-ZEVALLOS, 2007). Apresentam também efeitos positivos na produção de insulina em células pancreáticas isoladas (JAYAPRAKASAM et al., 2005).

#### 4.7.2.4- Taninos

Os taninos são moléculas fenólicas relativamente grandes, resultantes da polimerização de moléculas elementares de função fenol. Eles são responsáveis pelas propriedades de adstringência e amargor dos vinhos, sendo que a primeira é derivada da combinação dos taninos com as proteínas salivares (SACCHI, BISSON & ADAMS, 2005). Segundo a natureza das moléculas elementares, os taninos são divididos em hidrolisáveis e condensados (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003).

Os taninos hidrolisáveis não são naturais da uva, sendo originários das barricas de madeira. Correspondem aos ésteres dos ácidos fenólicos ou de seus derivados, que liberam ácido gálico ou ácido elágico após hidrólise ácida, contendo também uma molécula de glicose (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003).

Os taninos condensados da uva são polímeros formados por duas ou mais unidades de flavan-3-óis (como a (+)-catequina e a (-)-epicatequina) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003), estão presentes em todas as partes sólidas do cacho (cascas, sementes e engaço) e solubilizam-se no vinho durante a maceração. Seu teor nos vinhos tintos depende da variedade e das condições de vinificação (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003).

### **4.8- Produção de vinho no Rio Grande do Sul**

A vitivinicultura no Rio Grande do Sul teve início com a colonização italiana estabelecida no estado a partir de 1875, principalmente na Serra Gaúcha e na região Central (SUSIN, 2003).

Na segunda metade da década de 1970, iniciou-se na região da Serra Gaúcha e na região da Campanha a produção de vinhos finos e espumantes. Mais tarde, a partir da

década de 1980, com a globalização da economia brasileira surgiu uma nova vitivinicultura, com tecnologias mais modernas, que se estabeleceu nas regiões da Serra do Sudoeste e Campanha. Assim, em 2010, a vitivinicultura do Rio Grande do Sul estava estruturada em quatro polos produtores: Serra Gaúcha (região tradicional), Região da Campanha, Serra do Sudoeste e Região Central (novas regiões) (SUSIN, 2003).

### Serra Gaúcha

A Serra Gaúcha, localizada no Nordeste do Estado do Rio Grande do Sul, é o maior polo vitivinícola brasileiro. As coordenadas geográficas e indicadores climáticos médios são: latitude 29°S, longitude 51°W, altitude 600-800m, precipitação 1.700mm, temperatura 17,2°C e umidade relativa do ar 76%. Nesta região a poda é realizada entre os meses de julho e agosto e a colheita nos meses de janeiro e fevereiro. Mais de 80% da produção da região se origina de cultivares de uvas americanas (*V. labrusca*, *V. bourquina*) e híbridas interespecíficas, sendo “Isabel”, “Bordô” (“Ives”), “Niágara Branca”, “Concord”, “Niágara Rosada”, “Jacquez” (“Seibel Pica Longa”) e “Seibel 1077” (“Couderc Tinto”) as cultivares de maior representatividade neste grupo. Em relação às castas de *Vitis vinifera*, destacam-se as cultivares de uvas brancas “Moscatto Branco”, “Riesling Itálico”, “Chardonnay” e “Trebiano” (“Ugni Blanc”); entre as tintas as principais são “Cabernet Sauvignon”, “Merlot”, “Cabernet Franc”, “Tannat”, “Pinot Noir”, “Ancellota” e “Pinotage” (PROTAS & CAMARGO, 2010).

Segundo o Cadastro Vitícola do Rio Grande do Sul (2005/ 2007), são registrados no Estado 38.505,23 ha. de parreirais, distribuídos em 15.384 propriedades. Sendo que a região da Serra Gaúcha possui uma área total de 31.363,42 ha de parreirais distribuídos em 12.037 propriedades (PROTAS & CAMARGO, 2010).

Quanto às condições climáticas para o plantio, a Serra Gaúcha possui clima temperado, inverno com temperaturas baixas, podendo, inclusive, haver ocorrência de neve. (SCHNEIDER, 2006; TONIETTO et al., 2012). Os principais riscos climáticos que as videiras da Serra Gaúcha estão sujeitas são: geadas do final do inverno e início da primavera, podendo danificar a brotação da videira e causar graves prejuízos ao viticultor; o granizo, que é um fenômeno ocasional e não generalizado, mas que pode afetar as videiras da Serra Gaúcha em todas as estações do ano. Os danos podem ocorrer desde o

início do período vegetativo, mas são mais graves quando ocorrem no período reprodutivo da videira.

Por fim, devido às condições de precipitação bem distribuídas ao longo do ciclo da videira e de elevada umidade relativa do ar, as doenças fúngicas podem ser consideradas como a principal causa da variabilidade da produção e qualidade das uvas da Serra Gaúcha (SCHNEIDER, 2006; TONIETTO et al., 2012).

Quanto à radiação solar, o Estado do Rio Grande do Sul no período de setembro a abril apresentam valores médios de densidade de fluxo de energia dentro dos padrões das regiões vitícolas europeias, entre 2.150 a 2.650 horas de insolação anual. Esses valores são maiores durante o período de primavera-verão, favorecendo a formação de gemas e maturação (SCHNEIDER, 2006).

### Região da Campanha

A região vitivinícola da Campanha Gaúcha localiza-se a oeste/sudoeste do Estado do Rio Grande do Sul, sendo que grande parte da região faz fronteira com o Uruguai. Do ponto de vista fisiográfico, a Campanha corresponde à área denominada pelas coxilhas-onduladas recobertas por campos, conhecida como região dos pampas gaúchos (TONIETTO et al., 2012).

A vitivinicultura na Região da Campanha Gaúcha tem como marco referencial o estudo de zoneamento vitícola do Instituto de Pesquisas Agrícolas da Secretaria de Agricultura do Rio Grande do Sul (IPAGRO), na década de 1970. O primeiro empreendimento foi consolidado com a implantação dos vinhedos e vinícola da empresa Almadén, no município de Santana do Livramento. A partir do ano 2000, estimulados pelos bons preços pagos pelas uvas viníferas, principalmente as tintas, diversos proprietários de terras de municípios da Campanha Gaúcha como: Itaqui, Maçambará, Uruguaiana, Quaraí, Alegrete, Rosário do Sul, Santana do Livramento, Dom Pedrito, Bagé e Candiota, implantaram vinhedos com o objetivo de suprir à demanda crescente por uvas finas, tanto das vinícolas da Serra Gaúcha quanto daquelas instaladas na própria região, como a Almadén (PROTAS & CAMARGO, 2010).

As principais variedades de uvas cultivadas nesta região são: Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Tannat, Tempranillo e Pinot Noir, para vinhos tintos, e

Chardonnay, Sauvignon Blanc, Viognier e Pinot Gris, para vinhos brancos (TONIETTO et al., 2012).

Segundo PROTAS & CAMARGO (2010) atualmente a vitivinicultura nesta região está estruturada com base em três tipos de empreendedores:

- Os grandes grupos empresariais, como os grupos Miolo, Salton e Cooperativa Nova Aliança, cujas origens e matrizes encontram-se na região da Serra Gaúcha;

- Os novos empreendedores, formado por pessoas de diferentes perfis, cuja característica comum está na estrutura do empreendimento de forma vertical, contemplando investimento nas parreiras e na instalação de vinícolas. Sendo as áreas dos vinhedos variando entre 10 a 50 ha de variedades vinícolas;

Dentre os novos empreendedores vitícolas da Campanha Gaúcha podemos incluir a vinícola Campos de Cima, situada na Região da Campanha Oriental do Rio Grande do Sul e implantada no ano de 2002. A propriedade possui 15 ha de vinhedos com mudas importadas da França e da Itália.

- Viticultores independentes.

Quanto às condições climáticas, pode-se dizer que, a Região da Campanha, dentre as principais regiões produtoras de vinhos finos, é a mais quente do Estado do Rio Grande do Sul, possuindo um clima subtropical (TONIETTO et al., 2012). Os riscos por danos provenientes de geadas primaveris classificam-se na média dos anos de baixo a muito baixo. Os valores de precipitação pluvial são menores do que os da Serra Gaúcha e variam em média de 800 mm a 1000 mm no período de crescimento ativo, minimizando a presença de moléstias (SCHNEIDER, 2006).

#### **4.9- Condições Climáticas e Fases do Ciclo Vegetativo da Videira**

O clima exerce forte influência sobre a videira, sendo importante na definição das potencialidades das regiões para a cultura. Ele interage com os demais componentes do meio natural, principalmente com o solo, assim como com a cultivar e com as técnicas de cultivo da videira. Pode-se afirmar que grande parte da diversidade encontrada nos produtos vitivinícolas deve-se ao efeito do clima das regiões vitícolas (MELO, 2003). Assim, são apresentados a seguir alguns elementos meteorológicos do clima e a sua relação com as fases do ciclo vegetativo da videira:

### Temperaturas de inverno:

No inverno a videira encontra-se no período de **repouso vegetativo**, quanto menor a temperatura, melhores serão as condições para brotação. A videira é bastante resistente às baixas temperaturas desta estação, podendo suportar sem que haja a morte da planta temperaturas mínimas de até -10°C a -20°C (MELO, 2003).

### Temperaturas de Primavera:

Na primavera ocorre a brotação e floração das videiras. De forma geral, considera-se a temperatura de 10°C como mínima para que possa haver desenvolvimento vegetativo. Temperaturas muito baixas nesta fase podem acarretar a geadas que levam a destruição dos órgãos herbáceos da planta (MELO, 2003).

No período de floração da videira, temperaturas iguais ou superiores a 18°C são favoráveis, especialmente se associadas a dias com insolação intensa e pouca umidade (MELO, 2003).

### Temperaturas de Verão

Nesta estação ocorre a maturação e colheita das uvas. A maior atividade fotossintética é obtida na faixa de temperatura de 20 a 15°C, sendo que temperaturas acima de 35°C são excessivas, podendo resultar na obtenção de uvas com maiores teores de açúcar, porém com baixa acidez (MELO, 2003).

### Insolação e radiação solar

A videira é uma planta que exige bastante luz, requerendo elevada insolação durante o período vegetativo, fator importante no processo de fotossíntese, bem como na composição química da uva, favorecendo, por exemplo, a biossíntese de polifenóis. Normalmente, uma maior insolação correlaciona-se com um menor número de dias chuvosos (MELO, 2003).

### Pluviometria

A precipitação pluviométrica é um dos elementos mais importantes do clima em viticultura, pois a videira é uma cultura bastante resistente à seca. Por isso, para as

videiras, interfere não apenas a quantidade de chuvas, mas sua intensidade e o número de dias ou horas em que ela ocorre (MELO, 2003).

As chuvas de inverno exercem pouca influência sobre a videira, mas são importantes para as reservas hídricas do solo, necessárias para o início do ciclo vegetativo. Durante a primavera, as chuvas são importantes para o desenvolvimento da planta, porém, quando em excesso, favorecem o aparecimento de algumas doenças fúngicas. Já no período do verão as chuvas excessivas podem prejudicar a maturação da videira, quando isso ocorre observa-se a colheita antecipada das uvas, em relação ao ponto ótimo de colheita, prejudicando a qualidade da uva (MELO, 2003).

#### Umidade relativa do ar

A umidade relativa do ar também se faz importante para a viticultura. Climas mais áridos possuem menor umidade relativa do ar e, climas mais úmidos, como o encontrado em algumas regiões sul-brasileiras, apresentam umidade mais elevada. Tais condições são favoráveis à ocorrência de certas doenças fúngicas e estimulam também o desenvolvimento vegetativo da videira (MELO, 2003).

#### **4.10- Solo para a viticultura**

A videira é uma planta que se adapta a uma ampla variedade de solos, porém dá-se preferência a solos com textura franca e bem drenados, com pH variando de 5,0 a 4,0 e com teor de matéria orgânica com pelo menos 20  $\text{dm}^{-3}$  (MELO, 2003).

A região da Campanha Gaúcha caracteriza-se por solos arenosos, profundos, com boa drenagem, acidez reduzida e baixa fertilidade natural. Os nutrientes que possuem maior carência nos solos brasileiros, em geral, são fósforo, potássio, nitrogênio, cálcio, magnésio e boro, fazendo-se necessária a adubação pelos viticultores (CARDOSO, 2012).

#### **4.11- Cultivar Tannat**

A cultivar Tannat (*Vitis vinífera* L.) (figura 9) é originária da região de Madiran, no sul da França, onde está sua maior área de cultivo. Também é importante no Uruguai, destacando-se como a principal vinífera tinta cultivada (GUERRA et al., 2009).





**Figura 9:** Cachos da cv. Tannat.

Fonte: Guerra et al., 2009

A uva Tannat foi introduzida no Rio Grande do Sul pela Estação Experimental de Caxias do Sul, em 1947, procedente da Argentina. Novas introduções foram feitas por essa mesma instituição em 1971 e 1977, com sementes vindas da Califórnia e da França, respectivamente. Em 1980, foi inserida em Santana do Livramento e a partir de 1987 começou a ser difundida comercialmente na Serra Gaúcha (GUERRA et al., 2009).

O vinho Tannat é rico em cor e em extrato, sendo muito utilizado para corte, a fim de corrigir as deficiências dessas características em outros vinhos de vinífera. Porém também tem sido comercializado como vinho varietal (GUERRA et al., 2009).

## 5- MANUSCRITO

### **Antioxidants effects of red wine Tannat on oxidative stress by model of hyperglycemia in erythrocyte *in vitro***

Camila Eliza Fernandes Pazzini<sup>a</sup>, Márcia Rósula Poetini<sup>a</sup>, Cauê Ferreira Pires<sup>a</sup>, Vanessa Brum de Camargo<sup>b</sup>, Andreas Sebastian Loureiro Mendez<sup>b</sup>, Miriane Azevedo<sup>a</sup>, Júlio César Mendes Soares<sup>a</sup>, Vanderlei Folmer<sup>b,\*</sup>

Este manuscrito foi submetido à revista científica **Food Chemistry** (ISSN: 0308-8146 e qualis B1 na área de Ciências Biológicas 2), a qual se destina a publicação de trabalhos originais de pesquisa que tenham como foco a química e bioquímica de alimentos.

Site da revista: <http://www.journals.elsevier.com/food-chemistry/>

## Submission Confirmation

----Mensagem original-----

De: [ees.foodchem.0.1e0390.62e603a1@eesmail.elsevier.com](mailto:ees.foodchem.0.1e0390.62e603a1@eesmail.elsevier.com)

[mailto:[ees.foodchem.0.1e0390.62e603a1@eesmail.elsevier.com](mailto:ees.foodchem.0.1e0390.62e603a1@eesmail.elsevier.com)] Em nome de Food Chemistry

Enviada em: quinta-feira, 20 de dezembro de 2012 10:58

Para: [vandfolmer@gmail.com](mailto:vandfolmer@gmail.com)

Assunto: Submission Confirmation

Dear Dr. Vanderlei Folmer,

Your submission entitled "Antioxidants effects of red wine Tannat on oxidative stress by model of hyperglycemia in erythrocyte in vitro" has been received by Food Chemistry

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/foodchem/>.

Your username is: [vandfolmer@gmail.com](mailto:vandfolmer@gmail.com)

If you need to retrieve password details, please go to:

[http://ees.elsevier.com/foodchem/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/foodchem/automail_query.asp)

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Antioxidants effects of red wine Tannat on oxidative stress by model of hyperglycemia in erythrocyte *in vitro*

Camila Eliza Fernandes Pazzini<sup>a</sup>, Márcia Rósula Poetini<sup>a</sup>, Cauê Ferreira Pires<sup>a</sup>, Vanessa Brum de Camargo<sup>b</sup>, Andreas Sebastian Loureiro Mendez<sup>b</sup>, Miriane Azevedo<sup>a</sup>, Júlio César Mendes Soares<sup>a</sup>, Vanderlei Folmer<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), campus Itaqui, Rua Joaquim de Sá Brito, s/n, 97650-000, Itaqui, Brasil

<sup>b</sup> Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), campus Uruguaiana, BR 472, Km 592, 97500-970, Uruguaiana, Brasil

\* Corresponding author. Tel.: +55 55 8111-1104

E-mail adress: vandfolmer@gmail.com

Present adress: Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), campus Uruguaiana, BR 472, KM 592, 97500-970 - Caixa Postal 118, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brasil.

## **Abstract**

The aim of this study was investigate the antioxidant effects of Tannat red wine on oxidative stress induced by glucose or fructose in erythrocytes *in vitro*. Erythrocytes were incubated with different concentrations of glucose or fructose in presence or absence of wine. Were determined thiobarbituric acid reactive species, glucose consumption, and osmotic fragility in erythrocytes, in addition to total phenolic, gallic acid, caffeic acid, epicatechin, resveratrol, and DPPH scavenging activity of wine. Erythrocytes incubated with glucose and fructose presented an increase in lipid peroxidation, after the presence of wine prevented this. The red wine presented high concentrations of total polyphenols, gallic acid, caffeic acid, epicatechin, and resveratrol, further high antioxidant potential. The wine caused an increase in glucose uptake by erythrocytes besides, it was able to decrease the osmotic fragility of erythrocytes incubated with fructose. The results suggesting that red wine can decrease lipid peroxidation, prevent the inhibition of glucose uptake, and decrease osmotic fragility of erythrocytes incubated with fructose.

**Keywords:** Hyperglycemia; diabetes mellitus; wine; lipid peroxidation; red blood cells; polyphenols.

## 1- Introduction

Studies have shown a strong relationship between hyperglycemia and oxidative stress (Habib & Othman, 2012; Rains & Jain, 2011; Brito, Folmer, Soares, Silveira & Rocha, 2007; Brownlee, 2005; Folmer, Soares & Rocha, 2002). An organism is under oxidative stress when there is an imbalance between pro-oxidants and antioxidants, so that, the former is predominant, producing toxic or harmful compounds for tissue, called free radicals or reactive oxygen species (ROS) (Rodrigo, Miranda & Vergara, 2011). The excess of free radicals provokes harmful effects such as lipid peroxidation, damage to DNA, proteins, enzymes and carbohydrate (Halliwell, Aeschbach, Löltinger & Aruoma, 1995).

Hyperglycemia causes cellular changes resulting from the process of nonenzymatic glycation and glycooxidation. These processes are relating to production of ROS and to the formation of advanced glycation end products (AGEs) contributing to irreversible modification of proteins, DNA and lipids (Brito et al., 2011; Özkaya et al., 2011; Chis et al., 2009; Brito et al., 2007).

In this context, several experiments, both *in vitro* and *in vivo*, have been conducted with numerous antioxidants, including polyphenols from red wine (Montilla, Barcos, Muñoz, Muñoz-Castañeda, Bujalance & Túnez, 2004; Cimino, Sulfaro, Trombeta, Saija & Tomaino, 2007). Whitehead, Robinson, Allaway, Syms and Hale (1995) have shown that ingestion of 300 mL red wine led to an 18% increase in the serum antioxidant capacity after 1 hour. Another study of 9 individuals with type 2 diabetes who did the intake of 360 mL of red wine per day for two weeks achieved an improvement in insulin sensitivity (Napoli et al., 2005).

This interest in phenolic compounds of wine started in 1992 with the publication of the "French Paradox". In France there is a high consumption of saturated fats, but mortality from coronary heart disease is a third lower than in the UK, for example. One factor that may be contributing to this fact is the high consumption of red wine by French population (Renoud & De Longé, 1992).

Despite wine presenting in its composition several benefit substances to health, the studies are limited primarily to the presence of resveratrol and other phenolic compounds such as flavonoids, quercetin and catechins, found in large quantities in red wine. In addition to, most studies have evaluated the effect of this drink for the prevention of

cardiovascular diseases, making required additional studies to confirm the beneficial effects of red wine in other diseases, such as diabetes mellitus.

Thus, taking into account that diabetes mellitus may cause a series of secondary complications, including atherosclerosis, kidney failure, cataracts, retinopathy, and others, which are due to oxidative stress generated by hyperglycemia (Brito et al., 2007), studies of bioactive compounds that may be able to minimize this process are relevant. So, the objective of this study was to observe the antioxidant effect of Tannat red wine (vintage 2006) Campos de Cima winery (Itaqui – RS) on oxidative stress induced by glucose or fructose in erythrocytes in vitro.

## **2- Materials and methods**

### *2.1- Red Wine samples*

The red wine used in this study was the Tannat (2006 vintage), containing 13% (v/v) ethanol, donated by a winery, located in Itaqui (Rio Grande do Sul – Brazil).

### *2.2- Preparation of erythrocytes*

Discard of blood bags have donated by agency of transfusion at São Patrício Hospital of Itaqui, Brazil. The experimental protocol of this study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Pampa.

Test tubes containing 2.5 mL of erythrocytes were centrifuged at 2000 g for five minutes and the supernatant was replaced by saline solution 0.9% NaCl in the same volume. This procedure was performed twice. After the red blood cells was resuspended with a hematocrit of 50% plus fructose or glucose concentrations corresponding to 5, 10, 30 and 100 mmol/L, in Tris HCl 10 mmol/L, at pH 7.4.

The erythrocytes were incubated at 37°C for 24 hours in the presence or absence of red wine in amounts of 0.075, 0.15 and 0.225 mL of wine/ml incubated erythrocytes. This corresponds to 0.33, 0.66 and 0.99 mg/L GAE of total polyphenols for the respective volumes of wine used.

The volume of wine used were calculated based on consumption of 150, 300 and 450 mL (one, two and three glasses respectively) of wine for an adult man (body weight to a 70 kg) containing an average of 5 liters of blood circulating in your body. So, we made a

linear interpolation to calculate the amount of wine being incubated with 2.5 mL of erythrocytes.

### *2.3- Evaluation of lipid peroxidation*

After washing erythrocytes with 0.9% NaCl twice, the samples, containing glucose or fructose, added or not of red wine in the volumes described above, were precipitated with 40% acetic acid in the ratio 1:2 and centrifuged at 2,000 g for separating from the supernatant.

Lipid peroxidation was determined according the method of formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS), which consists in heating the homogenized with thiobarbituric acid and subsequent formation of a colored product, measured in a spectrophotometer Biospectro® UV-Vis, model SP-220, at 532 nm. This technique uses the malondialdehyde (MDA) for the quantification of reactive substances. The results were expressed in nmol MDA per mL of plasma as Ohkawa, Ohishi and Yagi (1979).

### *2.4- Quantification of glucose uptake*

The quantification of glucose uptake is based on the disappearance of glucose in erythrocytes quantitated before and after incubation for 24 hours. We used a glucose oxidase enzymatic colorimetric kit – a commercial kit (Labtest, Minas Gerais, Brazil).

### *2.5- Osmotic Fragility test*

After incubation of the erythrocytes with the same glucose or fructose (5, 10, 30 and 100 mmol/L) and red wine (0.075, 0.15 and 0.225 mL of wine/ml incubated erythrocytes) were washed with 150 mmol/L NaCl solution (twice) and tested for osmotic fragility. The resistance of erythrocytes to hemolysis was evaluated by measuring due to different concentrations of NaCl.

As Fernandez and Fink (2000), it was determined the concentration of hemoglobin in the supernatant using a commercial kit (Labtest, Minas Gerais, Brazil).

### *2.6- Determination of phenolics in wine*

The concentration of total polyphenols was determined by the colorimetric method of Folin-Ciocalteu described by Singleton and Rossi (1965). This method is based on the reduction reaction of the mixture of phosphotungstic acid and phosphomolybdic in alkaline



medium, oxides of tungsten and molybdenum, caused by phenolic compounds to form a blue colored complex, whose absorption maximum is at 760 nm. The concentration of phenolic compounds was expressed as gallic acid equivalents (GAE). UV-Vis absorbance was measured in a Perkin Elmer® Lambda 35 UV/Vis Double array Spectrophotometer (Norwalk, CT, USA) with 1-cm quartz cells.

The anthocyanins were evaluated by the method Lee & Francis (1972) with modifications, conducting readings in a spectrophotometer Biospectro® UV-Vis, model SP-220, at 520 nm results were expressed in mg/L of wine.

Caffeic acid, gallic acid, epicatechin and resveratrol were also quantified by HPLC in a Prominence Liquid Chromatograph Shimadzu® (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a LC-20AT pump, a SIL-20A auto sampler, a SPD-20AT PDA detector and a CTO-20A column oven. LC Solution V. 1.24 SP1 system software was used to control the equipment and to obtain data and responses from the LC system.

A reversed phase ODS-Hypersil Thermo Scientific C18 column (250 x 4.6 mm i.d., 5- $\mu$ m particle size) (Bellefonte, United States) was used for chromatographic separation. The analyses were performed using a condition previous published (Quirós, Lopez-Hernández, Ferraces-Casais & Lags-Yusty, 2007) in a gradient elution mode with a 0.8 mL/min flow, employing two mobile phases: A (water/acetonitrile/acetic acid, 67:32:1, v/v/v) and B (water/acetic acid, 99:1, v/v). The gradient profile was 0-4 min, 20-30% A and 80-70% B; 4-8 min, 30-40% A and 70-60% B; 8-12 min, 40-65% A and 60-35% B; 12-16 min, 65-80% A and 35-20% B; 16-20 min, 80-95% A and 20-5% B; 20-22 min, 95-97% A and 5-3% B; 22-24 min, 97-100% A and 3-0% B; and 24-35 min, 100% A, followed by re-equilibration of the column for 5 min. Detection was performed at 280 nm. The injection volume was 20  $\mu$ L and all analyses were conducted at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

For standard preparation, the chemicals gallic acid, caffeic acid, epicatechin and resveratrol were dissolved in ethanol and mixed to obtain a solution containing each substance at a final concentration of 250.0  $\mu\text{g/mL}$ . For wine analysis, the samples were injected directly, as marketed. All solutions were filtered through a 0.45- $\mu\text{m}$  membrane filter from Millipore (Milford, MA, USA) before injection.

### *2.7- DPPH Radical Scavenging Assay*

Free radical scavenging activities of the wine were measured by the DPPH assay described by Brand-Williams, Cuvelier and Berset (1995), which is based on a photometric

assay in which the DPPH free radical, that presents purple colored solution in alcohol, is reduced in the presence of antioxidant molecules, forming 2,2 diphenil-1-picrylhydrazyl, which is colorless. A volume of 100 mL of red wine is added to 3.9 mL of methanol solution of DPPH. The absorbance were performed at 517 nm in a spectrophotometer Biospectro® UV-Vis, model SP-220.

We conducted the calculations with the aid of the following formula:

$$\text{Inhibition percentage \%} = \frac{\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} * 100$$

### 2.8- Statistical Analysis

Graphpad prism 5® software was used for statistical analysis and for plotting graphs. The results were analyzed using either Student's t-test or one-way ANOVA for comparison between groups. When ANOVA showed a significant treatment effect, Bonferroni's post hoc test was used to compare individual means. Differences were considered statistically significant at  $P < 0.05$ . All data are reported as mean and S.D.

## 3- Results and Discussion

### 3.1- Polyphenols, free radical scavenging (DPPH) and HPLC chromatograms of Tannat wine (vintage 2006)

Red wines made from *Vitis vinifera* cv. Tannat grapes are known to possess high contents of tannins and intense color due to the presence of pigments such as anthocyanins (Boido, Alcade-Eon, Carrau, Dellacassa & Rivas-Gonzalo, 2006). The total anthocyanins (Table 1) found in the present study was 107.2 mg/L, concentration less than found by Zocche (2009), that used methodology similar to ours in your study with cv. Tannat wines (2008 vintage) of Rio Grande do Sul, whose concentration obtained was 667.36 mg/L. This fact may be explained by age of the wine investigated because anthocyanins are responsible for the intense color of young red wines. During the time, they are combined among themselves or with other tannins present in wine, producing larger molecules that tend to precipitate over time. Thus, the wines will become less stained, acquiring a brownish red tint (Nikfardjam, Márk, Avar, Figler & Ohmacht, 2006; Boido et al., 2006). This fact was proven by McRae et al. (2012) in a study that investigated the color parameters, concentrations of tannins and anthocyanins, and

tannins composition of a 50 year series of Cabernet Sauvignon wines from Australia. They found a concentration of anthocyanins less than 200 mg/L for wines with age of 5 years and 627 mg/L for younger wine.

The concentration of total polyphenols is also shown in table 1. We can observe that red wine used in our study showed high polyphenol content compared to other authors that used the same methodology of this study. Freitas (2006) studying Tannat wines from Bento Gonçalves (RS, Brazil) found 2,282.2 mg/L GAE. In another study with different types of wine from South Africa, the concentrations of total polyphenols varied from 4.03 to 5.00 g/L GAE, and Ruby Cabernet red wine had the lowest concentration and Merlot presented the higher concentration (Beer, Youbert, Gelderblom & Manley, 2005).

Polyphenols are responsible for protecting plants from physical attacks, as the sun's ultraviolet radiation and biological attacks by fungi, bacteria and viruses and are distributed in the leaves, seed and skin of grapes. Its concentration in the wine depends on several factors including the grape variety, weather conditions, cultivation techniques of grapes and winemaking (Rodrigo, Miranda & Vergara, 2011). Increased exposure to sunlight of the vine appears to contribute positively in the biosynthesis of polyphenols (Rastija, Srećnik & Saric, 2009). Another factor that may have favored the biosynthesis of polyphenols in the Campaign Gaúcha is that during budding and flowering vines the days are sunny, dry and little precipitation, unlike Bento Gonçalves that this period is characterized by lots of rain. This explains the high concentrations of polyphenols found in the analyzed wine.

Using HPLC, it was possible to quantify epicatechin, gallic acid, caffeic acid and resveratrol (Table 1 and figure 1). Catechin and gallic acid are the most abundant phenolic compounds in red wine (Rodrigo, Miranda & Vergara, 2011). Catechins and epicatechins are responsible for astringency, bitterness and body of wine and gallic acid has antioxidant properties, antimicrobial and antimutagenic (Kinney, Saucier & Glories, 2006).

The wine Tannat Campos de Cima presented concentration of gallic acid 126.31 mg/L and epicatechin 265.5 mg/L. García-Falcon, Pérez-Lamela, Martínez-Carballo and Simal-Gandara (2007) in study with Spanish wines obtained a variation 7-14 mg/L of gallic acid and 2-20 mg/L of epicatechin. Similar values were also found by Fanzone, Peña-Neira, Gil, Jofré, Assof and Zamora (2012), 15.6-20.9 mg/L of gallic acid and 21.1-30.8 mg/L of epicatechin for Argentinean Cabernet Sauvignon wines. Importantly, the

methodological requirements of both studies are similar to ours, differing only in the volume of wine injected into the HPLC.

Recently, caffeic acid and its derivatives have attracted considerable attention because of their biological activity and pharmacological properties including antioxidative activities, such as metal chelating capacity (Medina et al., 2012). We also found high concentrations of caffeic acid (78.10 mg/L) when compared with other studies. Fanzone et al. (2012) found concentrations (3.0-3.3mg/L), for Argentinean wines.

About resveratrol, the most studied polyphenol in the last years, we found a concentration of 90.87 mg/L. It is synthesized in grape skins in response to stress caused by fungal attack, mechanical damage or ultraviolet irradiation (Fernández-Mar, Mateos, García-Parrilla, Puertas & Cantos-Villar, 2012), its amount in wine varies widely depending on many factors: grape variety, geographic region, agronomic factors, climatic factors, plants stress conditions and oenological practices. It is difficult to predict the amount of resveratrol that a wine will contain because there are so many factors affecting resveratrol biosynthesis (Fernández-Mar et al., 2012).

Souto, Carneiro, Seferin, Senna, Conz, and Gobbi (2001) quantified, using high performance liquid chromatography, the concentration of trans-resveratrol of 36 red wines samples produced in southern Brazil and found a concentration between 0.82-5.75 mg/L, being the highest concentration for Sangiovese wine.

One possible explanation for the good concentrations of polyphenols found in our wine may be due to climatic conditions conducive to grape growing, as low winter temperatures, which favors the growth of these vines, low rainfall and sunny days with temperatures above 18°C in fall, which favors flowering (Guerra, Mandelli, Tonietto, Zanus & Camargo, 2009). In fact, in 2006, Rio Grande do Sul was characterized by summer with high temperatures, severe drought and rigorous winter (Hackbart, 2006).

Finally, we evaluated the free radical scavenging activity measured by the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) assay and verified that the antioxidant capacity of wine was 71% (table 1). In other study with 73 red wines of five *Vitis vinifera* red grape varieties (Merlot, Malbec, Pinot Noir, Cabernet Sauvignon, and Syrah) from South America, Granato, Katayama and Castro (2011), using also the method of DPPH, observed the highest antioxidant activity for the Cabernet Sauvignon from Brazil (66.44%), Syrah from Argentina (64.12%) and Malbec from Chile (66.70%).

### 3.2- Lipid peroxidation

In this study high concentrations of glucose and fructose induced a significant increase in lipid peroxidation in erythrocytes. This has been prevented by the addition of the wine in erythrocytes (Figure 2).

Lipid peroxidation occurs when there is a metabolic imbalance allowing ROS attack unsaturated fatty acids in cell membranes. This mechanism leads to changes in membrane lipids and this loses its architectural features, making it less flexible and strong. Thus it creates "ionic cracks" which alter the membrane permeability favoring the flux of metabolites and cellular debris. The degree of phospholipids peroxidation can be determined by the concentrations of malondialdehyde (MDA) and the method commonly employed is the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Halliwell & Chirico, 1993).

In our study, the increased oxidative stress, determined by TBARS, was increased in erythrocytes incubated with high glucose and fructose concentrations when compared to erythrocytes incubated with 5 mmol/L glucose or fructose (physiological concentration). In this context, under hyperglycemic conditions, glucose auto-oxidation is believed to be an important source of free radicals (Wolff & Dean, 1987). In our study, this additional source of free radicals generated by hyperglycemia is a plausible contributing factor to the increased levels of TBARS.

Do not exist, to date, studies of model of hyperglycemia *in vitro* similar to ours. However, oxidation of the erythrocytes has been studied as a model of oxidative damage biomembranes, demonstrating that ROS attack the membranes of erythrocytes to induce the oxidation of lipids and proteins, leading to hemolysis (Racek, Herynková, Holeček, Faltysová & Krejčová, 2001). Folmer, Soares and Rocha (2002) in a study that evaluated the effect of a high glucose diet in rats on the levels of lipid peroxidation in different tissues (brain, liver and kidney) and  $\delta$ -Aminolevulinatase ( $\delta$ -ALA-D) activity (liver and kidney), observed significant increase in lipid peroxidation in liver and kidney of mice.

We could observe that when adding different volumes of wine in erythrocytes incubated with different glucose concentrations, MDA levels decreased significantly. But for the erythrocytes incubated with different concentrations of fructose this effect was only observed for high levels of fructose (30 and 100 mmol/L).

Thus, we can infer that red wine could prevent lipid peroxidation caused by hyperglycemia. This advantage could be found until on the lowest volume used of wine

(0.075 mL). Similar results were observed for Montilla et al (2004) in experiments with diabetic Wistar rats streptozotocin induced and the protective effect of red wine Montilla-Moriles on oxidative stress. This protective effect of wine can be explained due their high concentration of polyphenols.

### 3.3- Glucose uptake

Figure 3 shows the glucose uptake before and after incubation of erythrocytes with glucose for 24 hours at concentrations of 5, 10, 30 and 100 mmol/L.

Segundo Habib and Othman (2012) the glucose is transported into erythrocytes by facilitated diffusion. About 90% of glucose is consumed by the glycolytic pathway, while 10% flows through the pentose pathway. In our study, we can see the mechanism in Figure 3 (A and B), which shows the uptake of glucose by the erythrocytes incubated with 5 and 10 mmol/L glucose, respectively.

In chronic hyperglycemia, many changes are found in erythrocytes, such as decreased life time, reduced deformability, increased red cell aggregation, and reduced membrane cholesterol and sialic acid contents (Vahalkar & Haldankar, 2008). These changes can affect glucose uptake by erythrocytes, which we can observe in erythrocytes incubated with high glucose concentrations (30 and 100 mmol/L) (Figure 3C and 3D). These changes induced by high concentrations of glucose in erythrocytes can be attributed to oxidative stress which can lead to lipid peroxidation and osmotic fragility *in vitro*. Lipid peroxidation and accumulation of MDA can disturb organization of phospholipids in the erythrocyte membrane bilayer, which may lead to a decrease in glucose uptake by erythrocytes and, therefore, increase the glucose level in plasma (Habib & Othman, 2012).

The figure 4 shows the glucose uptake before and after incubation of erythrocytes with glucose concentrations of 10, 30 and 100 mmol/L added to 0.075 mL of red wine. We can see a significant decrease in glucose uptake by erythrocytes in the presence of red wine. The consumption of glucose by the erythrocytes incubated with high concentrations of glucose was reestablishes, i.e., the wine was able to prevent the inhibition of glucose uptake in erythrocytes. For erythrocytes added with the other volumes of wine (0.15 and 0.225 mL) did not observe significant changes. Though wine is a well-known dietary source of phenolic compounds (Lorrain, Chira & Teissedre, 2011), no studies have specifically investigated the effect of wine on glucose uptake.

Habib and Othman (2012), in study with diabetic patients and *Rhaphanus sativa* extract, observed that glucose uptake by erythrocytes of diabetic patients were decreased with increasing glucose. This was reversed after the addition of 50  $\mu$ L extract.

### 3.4- Osmotic Fragility

Hypotonic concentrations of NaCl induced progressive lyses on the erythrocytes and previous incubation of erythrocytes for 24 hours with fructose (30 and 100mmol/L) caused a significant increase in cell lyses when compared with erythrocytes exposed to fructose 5mmol/L (Figure 5A). Red wine at different volumes, partially suppressed fructose-induced hemolysis (Figure 5B and C). The osmotic fragility test for erythrocytes incubated with glucose showed no significant differences (data not shown).

Erythrocytes are constantly exposed to reactive oxygen species and this can be enhanced by hyperglycemia. The oxidation of erythrocytes has been extensively studied as a model of oxidative damage to biomembranes in which the free radicals attack erythrocyte membranes, oxidizing lipids and proteins. These alterations in membrane structure can subsequently cause hemolysis and, in line with this, previous reports have described an increase in the osmotic fragility of erythrocytes in experimental models of oxidative stress (Kondo, Takahashi & Niki, 1997).

In the present study, erythrocytes exposed to high concentrations of fructose had increased susceptibility to osmotic lysis, which was also accompanied by increased lipid peroxidation. This was not observed in erythrocytes incubated with glucose, since these have not had a significant increase in osmotic fragility. The addition of different volumes of red wine in erythrocytes incubated with the fructose was also able to reduce the osmotic fragility in erythrocyte incubated with 30 and 100 mmol/L fructose. But once, we can attribute this positive effect of wine to their polyphenol content and good antioxidant capacity.

This effect of wine in hemolysis was also confirmed by Tedesco et al. (2000) in a study on the antioxidant effect of extract of oak barrel aged red wine with a high level of polyphenols on red blood cells *in vitro*. They also noted the decrease in osmotic fragility of erythrocytes incubated with 20  $\mu$ L oak barrel aged red wine extract.

## 5. Conclusions

From the above-mentioned observations, we can conclude that a strong radical scavenging activity of Tannat red wine (vintage 2006) produced in Itaqui (RS) may be due to their high concentrations of total polyphenols and concentrations of individual polyphenols, resveratrol, epicatechin, gallic acid and caffeic acid, which to our surprise is present at significant concentrations in wine, although there are few reports in the literature on its presence in red wine. Nevertheless it would be interesting to quantify other polyphenols present in wine, such as quercetin and tannins, which may also be influencing the antioxidant capacity.

We can also conclude that the climate of Campaign of Rio Grande do Sul in Brazil has contributed to the great development of the vines and, consequently, their good concentration of polyphenols. Fact that serves as an incentive for diversification of agriculture in this region, where predominates rice cultivation and livestock rearing.

Moreover, red wine had an antioxidant effect in situations of oxidative stress generated by hyperglycemia such as, reduction of lipid peroxidation and osmotic fragility, in addition to reestablish glucose uptake by erythrocytes in vitro experimental model. However, further studies, especially in a model of diabetes mellitus *in vivo*, are needed to confirm the benefits of wine.

## Acknowledgements

We thank the Federal University of Pampa and the Graduate Program in Biochemistry for support this research. We also thank Campos de Cima Winery® (Itaqui, RS), who kindly donated samples of Tannat red wine (2006 vintage).



## References

- Beer, D., Youbert, E., Gelderblom, W. C. A., Manley, M. (2005). Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines and selected phenolic compound: In vitro inhibition of microsomal lipid peroxidation. *Food Chemistry*, 90, 569-577.
- Boido, E., Alcade-Eon, C., Carrau, F., Dellacassa, E., Rivas-Gonzalo, J. C. (2006). Aging Effect on the Pigment Composition and Color of *Vitis vinifera* L. cv. Tannat Wines. Contribution of the Main Pigment Families to Wine Color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6692-6704.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). The phenolic constituents of *Prunus domestica* L.-The quantitative analysis of phenolic constituents. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 28, 25-30.
- Brito, V. B., Folmer, V., Soares, J. C. M., Silveira, I. D., Rocha, J. B. T. (2007). Long-term sucrose and glucose consumption decreases the  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase activity in mice. *Nutrition*, 26, 818-826.
- Brito, V. B., Rocha, J. B. T., Puntel, G. O., Luz, S. C. A. Barbosa, N. B. V., Carvalho, N. R., Folmer, V. (2011). Inhibition of  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase is not closely related to the development of hyperglycemia in alloxan-induced diabetic mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63, 443-451.
- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of Diabetic Complications. *Diabetes*, 54, 1615-1625.
- Chis, I. C., Ungureanu, M. I., Marton, A., Simedrea, R., Muresan, A., Potescu, Ion-Dan, Decea, N. (2009). Antioxidant effects of a grape seed extract in a rat model of diabetes mellitus. *Diabetes & Vascular Disease Research*, 6 (3), 200-204.
- Cimino, F., Sulfaro, V., Trombetta, D., Saija, A., Tomaino, A. (2007). Radical-scavenging capacity of several Italian red wine. *Food Chemistry*, 103, 75-81.
- Fanzone, M., Peña-Neira, A., Gil, M., Jofré, V., Assof, M., Zamora, F. (2012). Impact phenolic and polysaccharidic composition commercial value of Argentinean Malbec and Cabernet Sauvignon wines. *Food Research International*, 45, 402-414.
- Fernandez, A., A., Fink, N., E. (2000). Red blood cell osmotic fragility confidence intervals: definition by application of a mathematical model. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 38 (5), 433-436.

- Fernández-Mar, M. I., Mateos, R., García-Parrilla, Puertas, B., Cantos-Villar, E. (2012). Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonina: a review. *Food Chemistry*, 130, 797-813.
- Folmer, V., Soares, J. C. M., Rocha, J. B. T. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. (2002). *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34, 1279-1285.
- Freitas, D. M. (2006). Variação dos compostos fenólicos e de cor dos vinhos de uvas (*Vitis vinífera*) tintas em diferentes ambientes. Tese de Doutorado, Programa de Pós Graduação em Agronomia, Santa Maria, Brasil.
- García-Falcon, M. S., Pérez-Lamela, C., Martínez-Carballo, E., Simal-Gandara. (2007). Determination of phenolic compounds in wines: influence of bottle storage of Young red wine on their evolution. *Food Chemistry*, 105, 248-259.
- Granato, D., Katayama, F. C. V., Castro, I. A. (2011). Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. *Food Chemistry*, 129, 366-373.
- Guerra, C. C., Mandelli, F., Tonietto, J., Zanus, M. C., Camargo, U. A. (2009). Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos. *Embrapa uva e vinho*, 48, 1-69.
- Habib, S. A., Othman, E. M. (2012). In vitro upregulation of erythrocytes glucose uptake by *Rhaphanus sativa* extract in diabetic patients. *Biochimie*, 94, 1206-1212.
- Hackbart, E. Retrospectiva: Um olhar da MetSul Meteorologia no clima em 2006, 2006. URL [http://www.metsul.com/secoes/visualiza.php?cod\\_subsecao=47&cod\\_texto=464](http://www.metsul.com/secoes/visualiza.php?cod_subsecao=47&cod_texto=464). Accessed 14.05.12.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Lölinger, J., Aruoma, O. I. (1995). The characterization on antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33, 601-617.
- Halliwell, B., Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 715–725.
- Kennedy, J. A., Saucier, C., Glories, y. (2006). Grape and wine phenolics: history and perspective. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (3), 239-248.
- Kondo, H., Takahashi, M., Niki, E. (1997). Peroxynitrite-induced hemolysis of human erythrocytes and its inhibition by antioxidants. *FEBS Letters*, 413, 236-238.
- Lee, D. H., Francis, F. J. (1972). Standardization of Pigment Analyses in Cranberries. *HortScience*, 7 (1), 83-84.

- Lorrain, B., Chira, K., Teissedre, P. (2011). Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009 vintage: comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chemistry*, 126, 1991-1999.
- McRae, J. M., Damberg, R. G., Kassara, S., Parker, M., Jeffery, D. W., Herderich, M. J., Smith, P. A. (2012). Phenolic Compositions of 50 and 30 Year Sequences of Australian Red Wines: The Impact of Wine Age. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10093-10102.
- Medina, I., Undeland, I., Larsson, K., Storrø, I., Rustad, T., Jacobsen, C., Kristinová, V., Gallardo, J. M. (2012). Activity of caffeic acid in different fish lipid matrices: A review. *Food Chemistry*, 131, 730-740.
- Montilla, P., Barcos, M., Muñoz, M. C., Muñoz-Castañeda, J. R., Bujalance, I., Túnez, I. (2004). Protective effect of Montilla-Moriles appellation red wine on oxidative stress induced by streptozotocin in the rat. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15, 688-693.
- Napoli, R., Cozzolino, D., Guardasole, V., Angelini, V., Zarra, E., Matarazzo, M., Cittadini, A., Saccà, L., Torella, R. (2005). Red wine consumption improves insulin resistance but not endothelial function in type 2 diabetic patients. *Metabolism Clinical and Experimental*, 54, 306-313.
- Nikfardjam, M. S. D. N., Márk, L., Avar, D., Figler, M., Ohmacht, R. (2006). Polyphenols, anthocyanins, and trans-resveratrol in red wines from the Hungarian Villány region. *Food Chemistry*, 98, 453-462.
- Ohkawa, H., Ohishi, H., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, 351-358.
- Özkaya, D., Naziroglu, M., Armagan, A., Demirel, A., Köroglu, B. K., Çolakoglu, N., Kükner, A., Sönmez, T. T. (2011). Dietary vitamin C and E modulates oxidative stress induced –kidney and lens injury in diabetic aged male rats through modulating glucose homeostasis and antioxidant systems. *Cell Biochemistry and Function*, 2011, 1-7.
- Quirós, A. R., López-Hernández J., Ferraces-Casais P., Lags-Yusty, M. A. (2007). Analysis of non –anthocyanin phenolic compounds in wine samples using high performance liquid chromatography with ultravioleta and fluorescence detection. *Journal of Separation Science*, 30, 1262-1266.
- Racek, J., Herynková, R., Holeček, V., Faltysová, J., Krejčová, I. (2001). What is the Source of Free Radicals Causing Hemolysis in Stored Blood? *Physiological Research*, 50, 383-388.

- Rastija, V., Srećnik, G., Saric, M. (2009). Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins. *Food Chemistry*, 115, 54-60.
- Renaud, S., De Longeiril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339, 1523–1526.
- Rodrigo, R., Miranda, A., Vergara, L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, 412, 410-424.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Souto, A. A., Carneiro, M. C., Sefrin, M., Senna, M. J. H., Conz, A., Gobbi, K. (2001). Determination of *trans*-resveratrol concentrations in Brazilian red wines by HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 441-445.
- Tedesco, I., Russo, M., Russo, P., Iacomino, G., Russo, G. L., Carraturo, A., Faruolo, C., Moio, L., Palumbo, R. (2000). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11, 114-119.
- Vahalkar, G. S., Haldankar, V. A. (2008). RBC membrane composition in insulin dependent diabetes mellitus in context of oxidative stress. *Journal Clinical Biochemistry*, 23, 223-226.
- Withehead, T. P., Robinson, D., Allaway, S., Syms, J., Hale, A. (1995). Effect of Red Wine Ingestion on the Antioxidant Capacity of Serum. *Clinical Chemistry*, 41 (1), 32-35.
- Wolff S. P., Dean R. T. (1987). Glucose autoxidation and protein modification— the potential role of ‘autoxidative glycosylation’ in diabetes. *Biochemical Journal*, 245, 243–250.
- Zocche, R. G. S. (2009). Potencial enológico de uvas Tannat, Cabernet Sauvignon e Merlot produzidas no município de Bagé – RS. Tese de Doutorado, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.
- Zorzan, C. (2006). Comparação Físico-Química e Sensorial de vinhos tintos varietais Ancellotta e Tannat. Monografia, Curso Superior de Tecnologia em Viticultura e Enologia, Bento Gonçalves, Brasil.

## Figure Captions

**Table 1:** Polyphenolic constituents and free radical scavenging (DPPH) of the red wine Tannat (vintage 2006).

**Figure 1:** HPLC chromatograms (detection at 280nm) showing the polyphenolic constituents detected in red wine Tannat (vintage 2006). (A) chromatogram of standards; (B) chromatogram of polyphenolic constituents detected in Tannat red wine. Peak identification: (1) gallic acid; (2) caffeic acid; (3) epicatechin; (4) resveratrol.

**Figure 2:** Lipid peroxidation in erythrocytes incubated with different concentrations of glucose (A) or fructose (B) in presence or absence of wine. Tubes incubated only glucose or fructose (I); tubes incubated with glucose or fructose and 0.075mL of wine (II); tubes incubated with glucose or fructose and 0.15 mL of wine (III); tubes incubated with glucose or fructose and 0.225 mL of wine (IV). \* Significant at  $P < 0.05$ , compared with untreated erythrocytes; \*\* significant at  $P < 0.05$ , G5mmol/L vs G100mmol/L, F5mmol/L vs F100mmol/L incubated only glucose or fructose. Values are means  $\pm$  SD.

**Figure 3:** Glucose uptake by erythrocytes before and after incubation with glucose for 24 hours. Tubes containing erythrocytes and 5 mmol/L glucose (A); tubes containing erythrocytes and 10mmol/L glucose (B); tubes containing erythrocytes and 30 mmol/L glucose (C) and tubes containing erythrocytes and 100 mmol/L glucose. \* Significant at  $P < 0.05$ , compared to erythrocytes before incubation for 24 hours. Values are means  $\pm$  SD.

**Figure 4:** Glucose uptake by erythrocytes before and after incubation with glucose and 0.075 mL of wine for 24 hours. Tubes containing erythrocytes, 10mmol/L glucose and 0.075mL of wine (A); tubes containing erythrocytes, 30 mmol/L glucose and 0.075 mL of wine (B); tubes containing erythrocytes, 100 mmol/L glucose and 0.075 mL of wine (C). \* Significant at  $P < 0.05$ , compared with untreated erythrocytes. Values are means  $\pm$  SD.

**Figure 5:** Osmotic fragility test show hemoglobin levels in supernatant of erythrocytes incubated with different fructose concentrations, in presence or absence of wine for 24h, submitted at decreasing NaCl concentration hypotonic for 30 min at 37°C. Erythrocytes

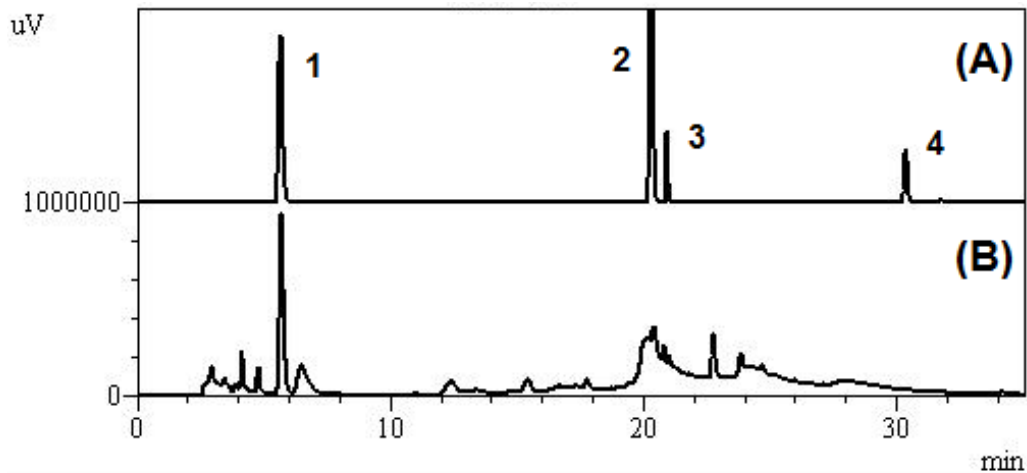
incubated with different fructose concentrations (A). Erythrocytes incubated with 30mmol/L fructose and different volumes of wine (B). Erythrocytes incubated with 100mmol/L fructose and different volumes of wine(C). \* Significant at  $P < 0.05$ , compared with untreated erythrocytes. Values are means  $\pm$  SD.

**Table 1**

Total Polyphenols <sup>1</sup>	4.410 mg/L GAE
Total Anthocyanins <sup>2</sup>	107,2 mg/L
Gallic Acid <sup>3</sup>	126,31 mg/L
Caffeic Acid <sup>3</sup>	78,10 mg/L
Epicatechin <sup>3</sup>	265,5 mg/L
Resveratrol <sup>3</sup>	90,87 mg/L
DPPH <sup>4</sup>	71%

<sup>1</sup>Method of Folin-Ciocalteu; <sup>2</sup>Lee & Francis (1972); <sup>3</sup>HPLC; <sup>4</sup>DPPH assay

**Figure 1**



**Figure 2**

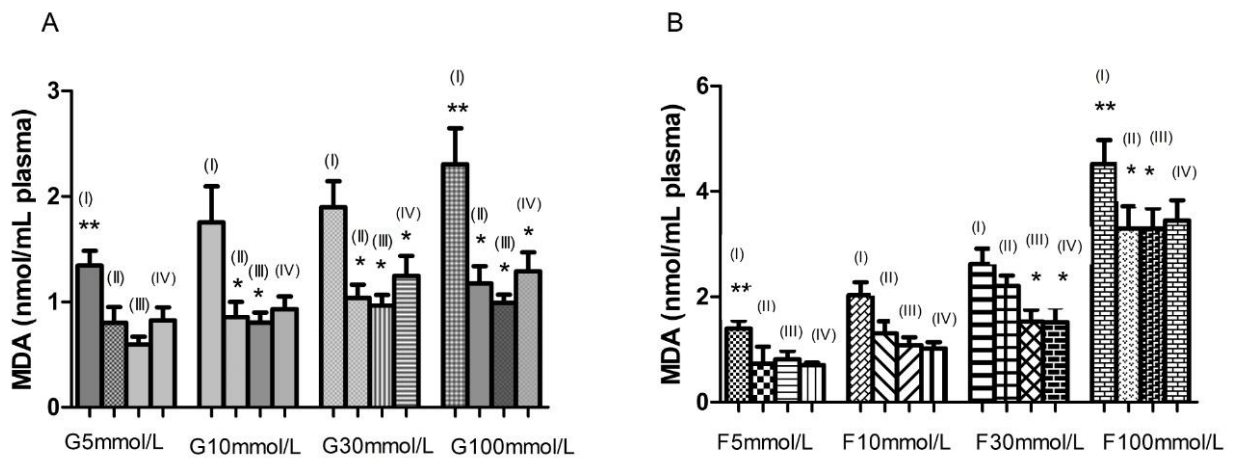


Figure 3

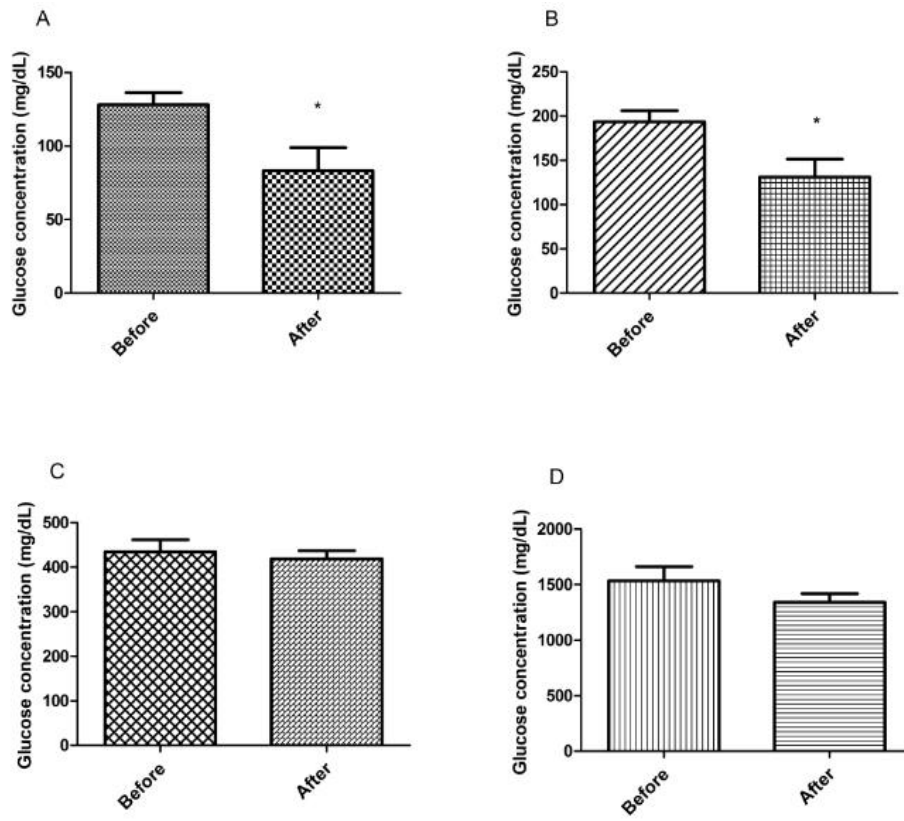


Figure 4

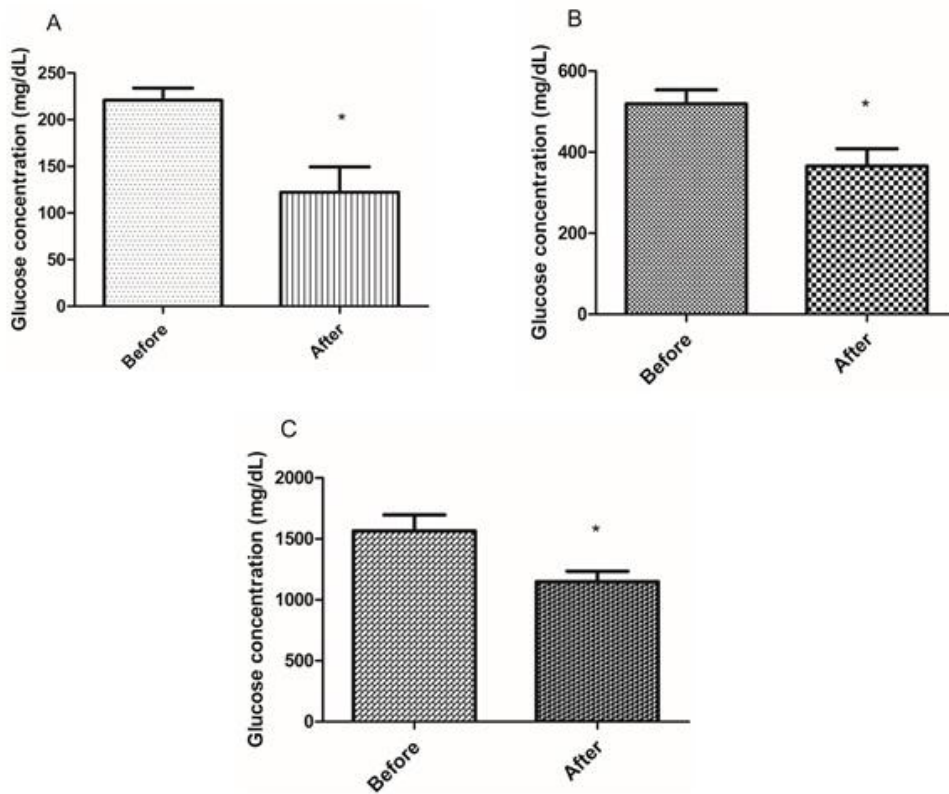
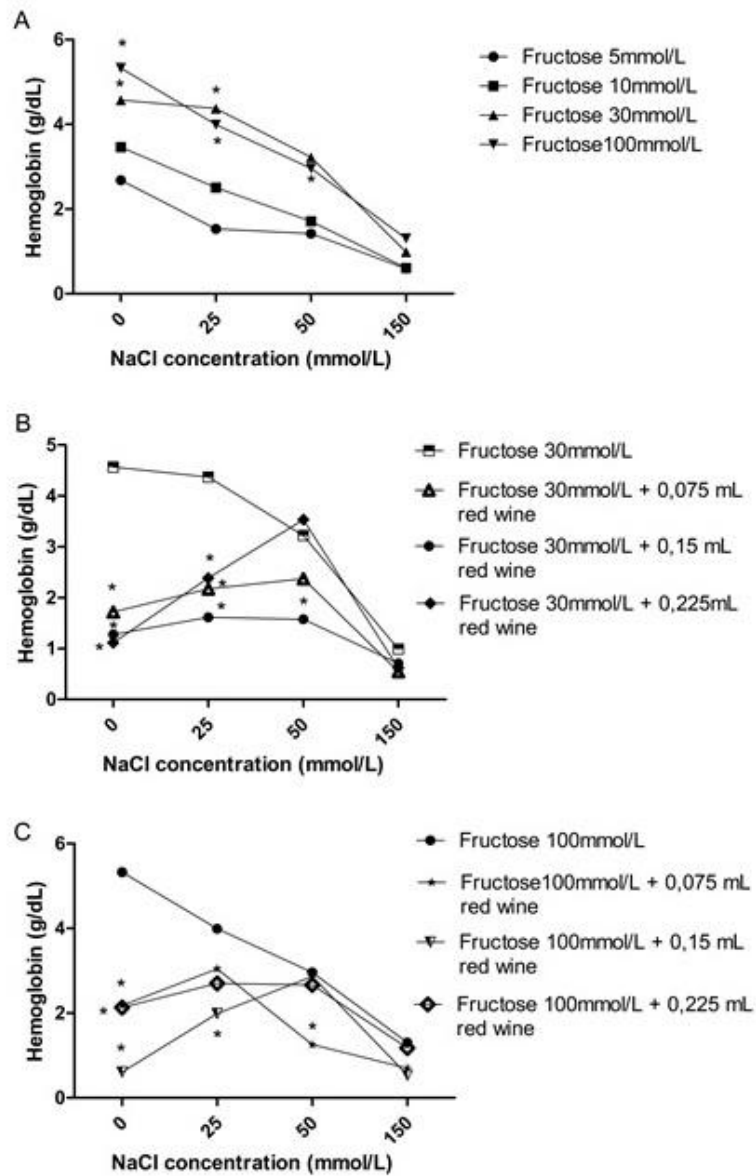




Figure 5



## 6- Considerações Finais

Podemos inferir, pelos resultados obtidos neste trabalho que altas concentrações de glicose e frutose provocaram estresse oxidativo nos eritrócitos, já que foi possível observar um aumento da peroxidação lipídica. Esta ocorre quando há um desequilíbrio metabólico permitindo que ROS ataquem os ácidos graxos insaturados da membrana celular.

Além da peroxidação lipídica também observamos a alteração no consumo da glicose pelos eritrócitos incubados com 30 e 100 mmol/L de glicose. Este resultado já era esperado, visto que a hiperglicemia pode provocar diversas alterações nos eritrócitos.

Em relação aos eritrócitos incubados com frutose podemos concluir que, para as concentrações de 30 e 100 mmol/L de frutose adicionada, houve um aumento da lise celular, ou seja, da fragilidade osmótica. Isso ocorre porque as ROS atacam as membranas dos eritrócitos, oxidando lipídeos e proteínas, podendo subsequentemente causar hemólise.

O vinho tinto Tannat (safra 2006) da vinícola Campos de Cima mostrou-se um poderoso antioxidante, capaz de reverter a peroxidação lipídica e a inibição do consumo da glicose pelos eritrócitos incubados com altas concentrações de glicose, além de diminuir a fragilidade osmótica dos eritrócitos incubados com frutose.

Isto pode ser explicado pela boa capacidade antioxidante observada por este vinho, além de suas altas concentrações de polifenóis totais, resveratrol, epicatequina, ácido gálico e ácido caféico, que por sua vez, podem ser explicadas pelo clima muito favorável para a vitivinicultura na Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul no ano de 2006.

O rico conteúdo de compostos fenólicos presentes no vinho e os diversos estudos existentes sobre seus benefícios à saúde é o que o torna uma bebida diferente de outras bebidas alcoólicas e o motivo pelo qual podemos o chamar de alimento funcional.

É importante lembrar que o vinho exerceu este efeito antioxidante, no presente estudo, a partir da concentração mais baixa utilizada, o que podemos considerar como um bom resultado, pois é sabido que altas doses de ingestão de álcool podem ser prejudiciais à saúde.

O Projeto Diretrizes da Associação Médica Brasileira e do Conselho Federal de Medicina (2005) preconiza 240 mL de vinho tinto, ingerido diariamente junto com a refeição para a redução da resistência a insulina e na prevenção de doenças cardiovasculares.

Segundo SILVA & SALVINI (2009), a importância da ingestão do vinho junto à refeição se deve a presença de um ácido orgânico na bebida, o ácido cinâmico, que estimula a vesícula biliar, a produzir uma quantidade maior de bile, melhorando e aumentando a digestão de gorduras. Há ainda as oxidases e proteases, enzimas que aceleram e facilitam o processo de digestão. Além disso, o alimento retarda a absorção do álcool, com isso o vinho ingerido juntamente com as refeições produz um efeito fidedigno.

## 7- Perspectivas

O presente trabalho objetivou analisar o efeito antioxidante do vinho tinto Tannat, elaborado na cidade de Itaqui (RS), sobre o estresse oxidativo em modelo de hiperglicemia *in vitro*. Constatou-se que altas concentrações de glicose e frutose, de fato, geram estresse oxidativo segundo a metodologia utilizada. Porém, a fim de obter mais explicações e novos resultados sobre o efeito antioxidante deste mesmo vinho em situações de hiperglicemia, uma das perspectivas para trabalhos posteriores é verificar esta capacidade antioxidante do vinho em modelo experimental de Diabetes Mellitus *in vivo*. Paralelamente a este trabalho, seria interessante quantificar outros compostos fenólicos presentes em vinhos tintos, como a quercetina e os taninos, além de verificar a capacidade antioxidante do vinho por outras metodologias.

Trabalhos posteriores também podem incluir uma comparação entre os vinhos produzidos nas regiões da Campanha e Serra Gaúcha, analisando as concentrações de compostos fenólicos e capacidade antioxidante, já que é sabido que as condições meteorológicas exercem uma influência importante sobre a vitivinicultura, e estas duas regiões, apesar de se localizarem no mesmo estado possuem climas distintos.

Outra perspectiva seria avaliar os efeitos antioxidantes do vinho Tannat Campos de Cima em modelos experimentais voltados para outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como câncer e doença de Alzheimer.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE, J. O. A. **Os segredos do vinho para iniciantes e iniciados**. 2. ed. São Paulo: Mescla, 2005.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care for diabetes. *Diabetes Care*, vol. 17, p. 1514-1522, 2007.

BAHIA, L. et al. O endotélio na Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, vol. 50, n. 2, 2006.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, vol. 29, n. 1, 113-123, 2006.

BASTA, G.; SCHMIDT, A.M.; DE CATERINA, R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. **Cardiovascular Research**, vol. 63, p. 582–592, 2004.

BISHAYEE, A.; DHIR, N. Resveratrol-mediated chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis: inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis. **Chemico-biological Interactions**, vol. 179, p. 131–144, 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. *Vigitel Brasil 2010: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Brasília: Ministério da Saúde, 152 p., 2011.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, vol. 414, p. 813-20, 2001.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications – a unifying mechanism. **Diabetes**, vol. 56, p. 1615-1625, 2005.

CARDOSO, F. S. et al. Diagnóstico da fertilidade de vinhedos da Campanha Gaúcha através de amostragem do solo. Disponível em: <<http://www13.unipampa.edu.br/anais-siepe/atual/art1795.html>>. Acesso em: 26 nov. 2012.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: Controvérsias e Perspectivas. **Química Nova**, vol. 30, n. 2, 441-449, 2007.

CHANDALIA, H. B.; KRISHNASWAMY, P. R. Glycated Hemoglobin. **Current Science**, vol. 12, n. 83, p. 1522-1532, 2002.

CHAO, C. et al. Alcoholic beverage intake and risk of lung cancer: the California Men's Health Study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, vol. 17, p. 2692–2699, 2008.

CHIS, I. C. et al. Antioxidant effects of a grape seed extract in a rat model of diabetes mellitus. **Diabetes & Vascular Disease Research**, vol. 6, n. 3, p. 200-204, 2009.

CHOI, S. et al. Acute hyperglycemia and oxidative stress: Direct cause and effect? **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 44, p. 1217-1231, 2008.

CORRÊA-GIANNELLA, M. L.; VIEIRA, S. M. A predisposição genética para o desenvolvimento da microangiopatia no DM1. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, vol. 52, n. 2, p. 375-386, 2008.

COVAS, M. I. et al. Wine and oxidative stress: Up-o-date evidence of the effects of moderate wine consumption on oxidative damage in humans. *Artherosclerosis*, v. 208, p. 297-304, 2010.

CRIMI, E. et al. The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 40, p. 398-406, 2006.

DARLEY-USMAR, V.; WISEMAN, H., HALLIWELL, B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Letters*, vol. 369, n. 2-3, p. 131-135, 1995.

DAVIES, M. J. et al. Effects of moderate alcohol intake on fasting insulin and glucose concentrations and insulin sensitivity in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *JAMA*, vol. 287, p. 2559-2562, 2002.

FERNÁNDEZ-MAR, M. I et al. Bioactive compounds in wine: resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chemistry*, vol. 130, p. 797-813, 2012.

FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; VILLAÑO, D.; TRONCOSO, A. M.; GARCIA-PARRILLA, M. C. Influence of enological practices on the antioxidant activity wines. *Food Chemistry*, vol. 95, p. 394-404, 2006.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, vol. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FLAMINI, R. Mass spectroscopy in grape and wine chemistry. Part I. Polyphenols. *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 22, n. 4, p. 218-250, 2003.

FUHRMAN, B. et al. Grape powder polyphenols attenuate atherosclerosis development in apolipoprotein e deficient (E<sup>0</sup>) mice and reduce macrophage atherogenicity. *The Journal of Nutrition*, vol. 135, n. 4, p. 722-728, 2005.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Sensitization for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Cancer Research*, vol. 64, p. 337-346, 2004.

GARCIA, E. et al. Red wine reduces oxidative stress in patients with acute coronary syndrome. *International Journal of Cardiology*, vol. 104, p. 35-38, 2005.

GIEHL, M. R.; DAL BOSCO, S. M.; LAFLOR, C. M.; WEBER, B. Eficácia dos flavonóides da uva, vinho tinto e suco de uva tinto na prevenção e no tratamento secundário da aterosclerose. *Scientia Medica*, vol. 17, n. 3, p. 145-155, 2007.

GOLDIN, B. A. A.; BECKMAN, J. A.; SCHIMIDT, A. M.; CREAGER, M. A. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*, vol. 114, p. 597-605, 2006.

GUERRA, C. C. et al. Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos. Bento Gonçalves: **Embrapa Uva e Vinho**, 69 p., 2009.

GUTIÉRREZ MAYDATA, A. Vino, Polifenoles y Protección a la Salud. **Revista Cubana de Alimentación y Nutrición**, vol. 16, n. 2, p. 134-141, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press Inc. N. Y. 3th ed, 1999.

HUDSON, T. S. et al. Inhibition of prostate cancer growth by muscadine grape skin extract and resveratrol through distinct mechanisms. **Cancer Research**, vol. 67, p. 8396–8405, 2007.

IDRIS, I.; GRAY, S.; DONNELLY, R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. **Diabetologia**, vol. 44, p. 659-673, 2001.

International Diabetes Federation. Diabetes Atlas – executive summary. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2003. Disponível em: <<http://www.eatlas.idf.org/webdata/docs/Atlas%202003-Summary.pdf>>. Acesso em: 17 jun. 2012.

ISHII, H. et al. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. **Science**, vol. 272, p. 728–731, 1996.

JAYAPRAKASAM, B.; VAREED, S. K.; OESON, L. K.; NAIR, M. G. Insulin secretion by bioactive anthocyanins and antocyanidins present in fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 53, p. 25-31, 2005.

KELEBEK, H. et al. Influence of different maceration times on the anthocyanins compositions of wines made from *Vitis vinifera* L. cvs Bogazkere and Öküzgözü. **Journal of Food Engineering**, vol. 77, n. 4, p. 1012-1017, 2006.

KENNEDY, J. A.; SAUCIER, C.; GLORIES, Y. Grape and wine phenolics: history and perspectives. **American Journal of Enology and Viticulture**, vol. 57, n.3, p. 239-248, 2006.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: Mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

MACHEIX, J. J.; SAPIS, J. C.; FLEURIET, A. Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grape and wines. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol. 30, n. 1, p. 441-486, 1991.

MANTILHA, M. E. T. La hiperglicemia y sus efectos tóxicos. Un concepto patogénico para la micro y macroangiopatía diabética. **Revista Cubana de Angiología Y Cirugía Vascular**, vol. 2, n. 2, p. 131-41, 2001.

MATTOS, T. C. Mecanismo de ação antioxidante dos ácidos caféico e tânico em sistemas contendo ferro. **Dissertação de Mestrado**. Brasília. Universidade de Brasília, 2009.

MELO, G. W. Uvas Viníferas para o Processamento em Regiões de Clima Temperado. 2003. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/index.htm>>. Acesso em: 27 nov. 2012.

MONTILLA, P.; BARCOS, M.; MUÑOZ, M. C.; MUÑOZ-CASTAÑEDA, J. R.; BUJALANCE, I.; TÚNEZ, I. Protective effect of Montilla-Moriles appellation red wine on oxidative stress induced by streptozotocin in the rat. **Journal of Nutritional Biochemistry**, vol. 15, p. 688-693, 2004.

MUKHERJEE, S.; DUDLEY, J. I.; DAS, D. K. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. **Dose Response**, vol. 18, n. 8, p. 478-500, 2010.

NAPOLI, R. et al. Red wine consumption improves insulin resistance but not endothelial function in type 2 diabetic patients. **Metabolism Clinical and Experimental**, vol. 54, p. 306-313, 2005.

O'KEEFE, J. H.; BYBEE, K. A.; LAVIE, C. J. Alcohol and cardiovascular health: the razor-sharp double-edged sword. **Journal of the American College of Cardiology**, vol. 50, p. 1009–1014, 2007.

OLAS, B. et al. Comparative antiplatelet and antioxidant properties of polyphenol-rich extracts from: berries of *Aronia melanocarpa*, seeds of grape and bark of *Yucca schidigera* in vitro. **Platelets**, vol. 19, p. 70–77, 2008.

OPIE, L. H.; LEOCUR, S. The red wine hypothesis: from concepts to protective signaling molecules. **European Heart Journal**, vol. 28, n. 14, p. 1683-1693, 2007.

ÖZKAYA, D. et al. Dietary vitamin C and E modulates oxidative stress induced –kidney and lens injury in diabetic aged male rats through modulating glucose homeostasis and antioxidant systems. **Cell Biochemistry and Function**, vol. 2011, p. 1-7, 2011.

PASTRANA-BONILLA, E.; AKOH, C. C.; SALLOPPAN, S.; KREWER, G. Phenolic content and antioxidant capacity of Muscadine grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 51, n. 18, p. 5497-5503, 2003.

PEDRESCHI, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phenolics profiles of Andean purple corn (*Zeamay L.*). **Food Chemistry**, vol. 100, p. 956-963, 2007.

PIGNATELLI, P. et al. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. **American Journal of Clinical Nutrition**, vol. 72, p. 1150–1155, 2000.

Projeto Diretrizes: Diabetes Mellitus: Recomendações Nutricionais. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2005.



PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A. Vitivinicultura Brasileira: Panorama Setorial em 2010. 2011. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/livro/vitivinicultura.pdf>>. Acesso em: 11 jul. 2012.

RACEK, J. et al. What is the Source of Free Radicals Causing Hemolysis in Stored Blood? **Physiological Research**, vol. 50, p. 383-388, 2001.

RAINS, J. L.; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 50, p. 567-575, 2011.

REED, T. T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 51, p. 1302-1319, 2011.

RENAUD, S., DE LONGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. **Lancet**, vol. 339, p. 1523–1526, 1992.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Tratado de enología: química del vino, estabilización y tratamientos**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, vol. 2, 2003.

RODRIGO, R.; MIRANDA, A.; VERGARA, L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. **Clinica Chimica Acta**, vol. 412, p. 410-424, 2011.

ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicological and Applied Pharmacology**, vol. 212, p. 167-178, 2006.

SACALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, vol. 130, p. 2073-2085, 2000.

SACCHI, K. L.; BISSON, L. F.; ADAMS, D. O. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, vol. 56, n. 3, p. 197-206, 2005.

SCARLATTI, F. et al. Resveratrol sensitization of DU145 prostate cancer cells to ionizing radiation is associated to ceramide increase. **Cancer Letter**, vol. 253, p. 124–130, 2007.

SCHNEIDER, L. Dinâmica locacional da vitivinicultura: novas regiões do Rio Grande do Sul e Vale do São Francisco. **Dissertação de mestrado**. Piracicaba. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

SERAFINI, M.; MAIANI, G.; FERRO-LUZZI, A. F. Effect of ethanol on red wine tannin-protein (BSA) interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 45, p. 3148-3152, 1997.

SILVA, J.; SALVINI, D. V. Efeitos da Vinhoterapia em Parâmetros Sanguíneos. **Revista Visão Acadêmica**, Curitiba, vol. 10, n. 1, 2009.

SOARES DE MOURA, R. et al. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol. 54, p. 1515–1520, 2002.

SOARES, J. C. M. Efeito de compostos organocalcogênicos e do exercício físico em dois modelos experimentais de indução de estresse oxidativo. **Dissertação de doutorado**. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

STECHER, G.; HUCK, C. W.; POPP, H.; BONN, G. K. Determination of flavonoids and stilbines in red wine and related biological products by HPLC and HPLC-ESI-MS-ME. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, vol. 371, p. 73-80, 2001.

STYKAL, J.; REMMEN, H. V.; RICHARDSON, A.; SALMON, A. B. Oxidative stress and diabetes: What can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 52, p. 46-58, 2012.

SUSIN, C. T. Dinâmica estratégica da vinícola Miolo Ltda. e o Vale dos Vinhedos. **Dissertação de mestrado**. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

TONIETTO, J. et al. O Clima Vitícola das Regiões Produtoras de Uva para Vinhos Finos no Brasil. "In" TONIETTO, J.; RUIZ, V. S.; GÓMEZ-MIGUEL, V. D., editores. *Clima, Zonificación y Tipicidad del Vino en Regiones Vitivinícolas Iberoamericanas*. Madrid: Cytel; 2012. p. 105-144.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, vol. 39, p. 44-84, 2007.

WILD, S., ROGLIC, G., GREEN, A. Global prevalence of diabetes. **Diabetes Care**, vol. 27, p. 1047-1053, 2004.

ZENEBE, W.; PECHÁNOVÁ, O.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Red wine polyphenols induce vasorelaxation by increased nitric oxide bioactivity. **Physiological Research**, vol. 52, p. 425–432, 2003.

ZOCHE, R. G. S. Potencial enológico de uvas Tannat Cabernet Sauvignon e Merlot produzidas no município de Bagé-RS. **Dissertação de doutorado**. Pelotas. Universidade Federal de Pelotas, 2009.