

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E FARMACOLÓGICAS DE VINHOS DO VALE DO SÃO FRANCISCO

PHYSICOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE SÃO FRANCISCO
VALLEY WINES

Helen Gabriele Ferreira Costa

Enfermeiro. Graduados pela Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF. Residente Multiprofissional em Urgência pela UNIVASF, Petrolina – PE.

Daniel Wilson Cunha

Enfermeiros Graduados pela Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF. Residente Multiprofissional em Urgência pela UNIVASF, Petrolina – PE.

Iêda Maria dos Santos

Acadêmica de Farmácia pela Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Petrolina – PE.

Marcos Vinícius Oliveira Carneiro

Educador Físico graduado pela Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF. Mestrando em Ciências da Saúde pela UNIVASF, Petrolina – PE.

Ferdinando Oliveira Carvalho

Educador Físico. Doutor em Educação Física pela Universidade Católica de Brasília – DF. Professor permanente do Colegiado de Educação Física – UNIVASF, Petrolina – PE.

Giuliano Elias Pereira

Agrônomo. Doutor em Viticultura-Enologia pela Universidade de Bordeaux. Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa – Semiárido, Petrolina – PE.

Melissa Negro-Dellacqua

Farmacêutica. Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba (UFBP). Professora permanente do Campus de Araranguá da UFSC, Araranguá – SC. E-mail: melissanegroluciano@gmail.com.

RESUMO

As doenças cardiovasculares representam um grande problema de saúde pública e alimentos contendo polifenóis, como uvas e vinhos, podem desencadear benefícios ao sistema cardiovascular. Neste trabalho objetivou-se avaliar as características físico-químicas e o efeito vasorelaxante de Vinhos Tintos do Vale do São Francisco (VTVSF), safra 2010: Duccos (uva *Petit verdot*), Terranova (uva *Shiraz*) e Rio Sol (uva *Cabernet Sauvignon/Shiraz* 50% de cada). Foram avaliados os seguintes parâmetros: pH, Extrato Seco (ES), Fenólicos Totais (FT) e Antocianinas Totais (AT). Resultados: Duccos (pH: $3,81 \pm 0,00$; ES: $41,03 \text{ g/L} \pm 0,14$; FT (280 nm): $83,13 \pm 0,14$; AT: $171,21 \text{ mg/L} \pm 0,58$); Terranova (pH: $3,69 \pm 0,00$; ES: $34,17 \text{ g/L} \pm 0,17$; FT (280 nm): $104,87 \pm 0,17$; AT: $78,33 \text{ mg/L} \pm 0,17$) e o Rio Sol (pH: $3,71 \pm 0,00$; ES: $32,00 \text{ g/L} \pm 0,03$; FT (280 nm): $82,57 \pm 0,17$; AT: $78,33 \text{ mg/L} \pm 0,17$). Para avaliação do efeito vasorelaxante, utilizou-se anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato (n=6). Demonstrando-se que o efeito vasorelaxante é predominantemente dependente da presença de endotélio vascular, com valores de vasorrelaxamento expressos como efeito máximo ($E_{\text{máx}}$): Duccos ($104,63 \pm 7,45\%$), Terranova ($80,74 \pm 6,85\%$) e Rio Sol ($100,31 \pm 4,70\%$). O vinho Duccos apresentou maior potencial relaxante desencadeado pela ativação da via NO-GMPc-PKG e maior quantidade de: ES, FT e AT, o que sugere que dentre os vinhos analisados é o que pode desencadear o melhor benefício cardiovascular.

Palavras chaves: Vinho; polifenóis; vasodilatação; óxido nítrico.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases represent a greater public health problem and foods containing polyphenols, such as grapes and wine, can trigger benefits to the cardiovascular system. The following study aimed to evaluate the physicochemical characteristics and the vasorelaxant effect of red wines from São Francisco Valley (RWVSF), 2010 harvest: Duccos (*Petit verdot* grape), Terranova (*Shiraz* grape) e Rio Sol (grape *Cabernet Sauvignon/Shiraz* 50% of each). The following parameters were evaluated: pH, dry extract (DE), total phenolics (TP) and total anthocyanins (TA). Results: Duccos (pH: 3.81 ± 0.00 ; DE: $41.03 \text{ g/L} \pm 0.14$; TP (280 nm): 83.13 ± 0.14 ; TA: $171.21 \text{ mg/L} \pm 0.58$); Terranova (pH: 3.69 ± 0.00 ; DE: $34.17 \text{ g/L} \pm 0.17$; TP (280 nm): 104.87 ± 0.17 ; TA: $78.33 \text{ mg/L} \pm 0.17$) e o Rio Sol (pH: 3.71 ± 0.00 ; DE: $32.00 \text{ g/L} \pm 0.03$; TP (280 nm): 82.57 ± 0.17 ; TA: $78.33 \text{ mg/L} \pm 0.17$). In order to evaluate the vasorelaxant effect, superior mesenteric artery rings isolated from rats (n=6) were used. It demonstrated that the vasorelaxant effect is predominantly dependent on the presence of vascular endothelium, with values expressed as maximum effect (E_{max}). Duccos ($104.63 \pm 7.45\%$), Terranova ($80.74 \pm 6.85\%$) and Rio Sol ($100.31 \pm 4.70\%$). The Duccos wine showed the highest relaxing potential, which was triggered by the activation of NO-GMPc-PKG pathway and a greater amount of: DE, TP and AT, which suggests that one of the wines reviewed, is what may trigger a better cardiovascular benefit.

Key words: Wine; polyphenols; vasodilation; nitric oxide.

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) representam grande problema de saúde pública, responsáveis por aproximadamente 17 milhões de mortes no mundo, das quais 80% ocorrem nos países em desenvolvimento. Estima-se que em 2030 mais de 23 milhões de pessoas morrerão por DCV (CARDOSO e MAFRA, 2015, p 87).

A alimentação é hoje reconhecidamente um dos fatores mais importantes para a prevenção cardiovascular primária e secundária (ALBUQUERQUE e OLIVEIRA, 2015, p 44). A inclusão do vinho na alimentação, ingerido em quantidade moderada, traz vários benefícios à saúde, já que o mesmo apresenta compostos bioativos capazes de melhorar a função circulatória e cardíaca (DOMENEGHINI e LEMES, 2011, p 168).

Um estudo, em especial, foi muito importante para o surgimento de outros estudos relacionando o vinho com a saúde. O experimento demonstrou que embora os franceses ingerissem uma quantidade alta de gordura saturada quanto os norte-americanos, o número de mortes por doença arterial coronariana era bem menor na França do que nos Estados Unidos, e este benefício foi atribuído ao consumo maior de vinho pelos franceses (RENAULD e LORGERIL, 1992, p 1523). Este fenômeno foi denominado como “Paradoxo Francês” (BLATOUNI, 2006, p 14).

O consumo de vinho deve ser regular e moderado, de uma a duas taças ao dia (totalizando 300 mL), para oferecer efeitos benéficos sem comprometer a saúde do organismo e proteger o sistema cardiovascular (ABE et al., 2007, p 394), já que pesquisas na área concluem que o consumo moderado de polifenóis, inclusive os polifenóis presentes no vinho, melhoram a função endotelial e diminuem a agregação plaquetária (STOCLET et al., 2004, p 302).

O presente estudo busca resultados que comprovem que os vinhos tintos do Vale do São Francisco (VSF) possuem características físico-químicas e farmacológicas relevantes à saúde cardiovascular, no que tange principalmente aos componentes encontrados nos vinhos, especialmente os polifenóis. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar características físico-químicas dos vinhos tintos e avaliar os seus efeitos vasorelaxantes, através de metodologia *in vitro*, utilizando-se a artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos, correlacionando as propriedades físico-químicas com o efeito vasorelaxante, quando possível.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de três vinhos tintos do VSF: Duccos (uva *Petit Verdot*, safra 2010), Terranova (uva *Shiraz*, safra 2010) e Rio Sol (uva *Cabernet Sauvignon/Shiraz* 50% de cada, safra 2010). As análises físico-químicas destes vinhos foram realizadas na sede da Empresa Brasileira de Agropecuária (EMBRAPA – Semiárido) no município de Petrolina-PE, com amostras adquiridas no comércio local de Petrolina-PE.

Para a avaliação do efeito vasorelaxante foram utilizados nos ratos *Wistar* procedentes do Biotério Central da UNIVASF pesando entre 250 e 300 gramas, mantidos em caixas de polipropileno, submetidos à ventilação e temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) controladas e constantes, ao ciclo claro/escuro de 12 h (6-18 h), com livre acesso a água e a ração. As substâncias e sais utilizados foram adquiridos da Merck® e Sigma-Aldrich®.

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco (CEEHA/UNIVASF) com parecer nº 0038/240811.

Para os experimentos com artéria mesentérica, foi utilizada a solução nutritiva de Tyrode (pH 7,4) cuja composição segue: NaCl: 158,3 mM, KCl: 4,0 mM, CaCl₂: 2,0 mM, MgCl₂: 1,05 mM, NaH₂PO₄: 0,42 mM, C₆H₁₂O₆: 5,6 mM, NaHCO₃: 10,0 mM (Fonte: Tanaka et al, 1999), mantida a 37 ° C e aerada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂).

Rotaevaporação e liofilização dos vinhos

O etanol dos vinhos do VSF foram rotaevaporizados e posteriormente liofilizados conforme MOURA et al., 2004, p 302. O resíduo foi acondicionado em recipiente de vidro em alíquotas, protegido com filme de PVC e papel laminado, e conservado a temperatura de -20°C até o dia de uso.

Preparação da amostra em estudo

Para os experimentos *in vitro*, os vinhos foram diluídos em água destilada com concentrações crescentes e cumulativas (0,00001; 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10; 100; 300; 500 e 1000 µg/mL). Estas concentrações foram previamente definidas em estudo anterior e publicadas em LUCIANO et al., 2011, p 697. Todas as soluções foram mantidas a 0°C antes da utilização em cada protocolo experimental.

MÉTODOS

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Todas as análises físico-químicas foram realizadas em triplicata.

Determinação do pH

O potencial hidrogeniônico (pH) foi verificado utilizando pHmetro (Tecnal®). O potenciômetro digital foi ligado 15 minutos antes do início das análises para estabilizar o circuito elétrico sendo em seguida, calibrado com soluções tampões de pH 7,0 e 4,0 a temperatura de 20°C (OIV, 1990, p 3).

Quantificação do extrato seco

A análise do extrato seco foi realizada com a utilização do Módulo de Leitura AlcoMat-2® e da Balança Hidrostática Densi-Mat® que determina o valor do extrato seco total de vinhos. Primeiro foi realizado a leitura da amostra pura, e depois, a da amostra

desalcoholizada por meio de arraste a vapor, e pela diferença de valores foi determinado o extrato seco (OIV, 1990, p 3).

Quantificação de polifenóis totais

Os polifenóis totais foram identificados pelo índice a 280 nm conforme HARBERTSON e SPAYD, 2006, p 282. As amostras foram diluídas em água a 1%, lidas em espectrofotômetro a 280 nm, com cubetas de quartzo e os resultados expressos pela absorbância, considerando o fator de diluição.

Determinação de antocianinas totais

As antocianinas totais foram determinadas através do método espectrofotométrico de diferencial de pH com leitura a 520 nm, conforme OIV, 1990, p 3; PEREIRA et al., 2005, p 6383. A concentração de antocianinas livre, expressa em mg.L⁻¹, foi obtida relacionando as diferenças de densidade ótica a uma curva padrão estabelecida com os seguintes valores: Antocianinas (mg L⁻¹) = 388 x Δd, onde Δd= diferença de leitura entre os dois tubos e 388 o fator de linearidade.

ENSAIOS FARMACOLÓGICOS IN VITRO

Preparações de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato normotenso

Os ratos *Wistar* foram mortos por deslocamento cervical. Foi feita a diérese abdominal e retirada a artéria mesentérica sendo imediatamente imersa em solução de Tyrode a 37 °C e aerada com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂), mantida em pH constante de 7,2-7,4. Após, foi feita a limpeza do tecido conjuntivo e gordura aderidos à artéria, sendo a mesma seccionada em anéis (1-2 mm de comprimento). Estes anéis foram colocados em

haste de aço inoxidável e suspensos por uma linha de algodão fixada ao transdutor isométrico de força modelo TRO015 (Panlab[®], s.l., Espanha), acoplados a um amplificador de força do tipo “Bridge System” (Insight[®], Brasil), conectados a um computador e imersos em um sistema de banho para órgãos isolados modelo EFF-321 (Insight[®] Instruments, Brasil). A depender do protocolo (com presença ou ausência de endotélio) foi feita a remoção mecânica do endotélio perpassando levemente a haste no seu lúmen. Constatando a presença do endotélio, foram considerados funcionais os anéis com relaxamento superior a 80% sobre a pré-contracção com fenilefrina. Já os anéis com relaxamentos inferiores a 10%, foram considerados sem endotélio (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980, p 373). Anéis com relaxamento entre 10% e 80% foram descartados. Foram submetidos a uma tensão basal de 0,75 g por 60 minutos (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980, p 373) para estabilização, havendo troca da solução nutritiva a cada 15 minutos, para evitar o acúmulo de metabólitos na cuba, e ajustando a linha de base (ALTURA e ALTURA, 1970, p 1698) quando necessário antes do início do experimento. Essas informações foram captadas pelo transdutor isométrico, gravadas e convertidas em gráficos pelo programa WindaQ DataQ.

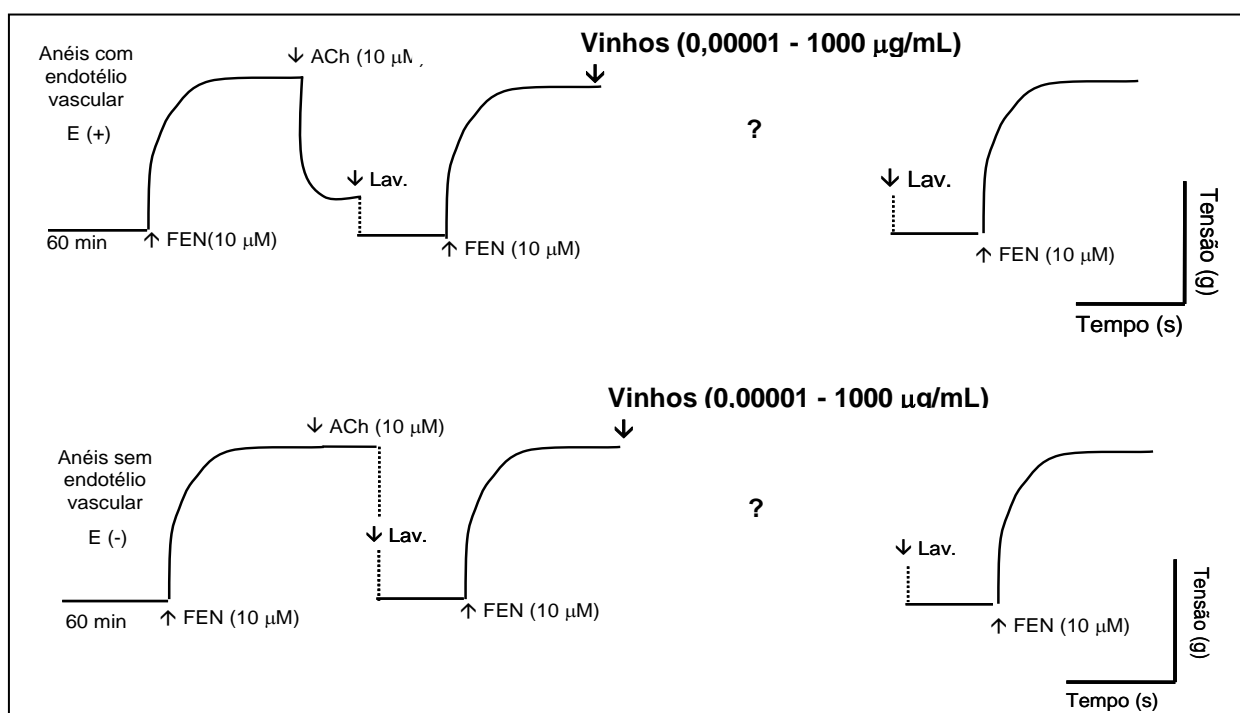
PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS DESENVOLVIDOS IN VITRO

Avaliação da atividade de vinhos do Vale do São Francisco (VTVSF) sobre anéis de artéria mesentérica isolada de ratos normotensos pré-contráidos com fenilefrina (FEN).

Após o período de estabilização de 1h e verificação da funcionalidade do endotélio vascular (relaxamento desencadeado pela Ach superior a 80% sobre a pré-contracção de FEN), foi induzida a segunda contracção (fase tônica de aproximadamente 15 min) com FEN (10 μ M) (conforme a Figura 1), com valor de contracção semelhante a primeira. Após 40 minutos, foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas (0,00001; 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 300; 500 e 1000 μ g/mL) (LUCIANO et al, 2011, p 697) dos VTVSF,

para a obtenção de uma curva concentração-resposta (n=6) na presença ou ausência de endotélio vascular (Figura 1). O tempo de intervalo entre cada concentração do vinho aplicada foi de 4 minutos. A resposta foi expressa em % de relaxamento em relação à contração produzida pela FEN. No final de cada experimento, foi realizada lavagem seguida de vinte minutos de estabilização. Posteriormente, uma nova contração com fenilefrina foi realizada com o objetivo de verificar a integridade dos anéis da artéria no final do experimento (dados não mostrados). A percentagem de inibição da contração foi mensurada pela comparação da resposta antes e após adição dos VTVSF. Assim a curva obtida do efeito vasorelaxante em preparações montadas com endotélio intacto pré-contraídas com fenilefrina, foi considerada como controle.

Figura 1: Representação esquemática do protocolo experimental para investigação do efeito vasorelaxante de concentrações crescentes e cumulativas do VTVSF (10^{-5} -1000 $\mu\text{g/mL}$), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato normotenso pré-contraídos com FEN (10 μM) na ausência ou presença de endotélio funcional (FEN: fenilefrina; ACh: acetilcolina; Lav: lavagem).



Verificação da influência da inibição da enzima sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) sobre a resposta vasorelaxante induzida pelo liofilizado do VTVSF em anéis de artéria mesentérica isolada de rato normotenso.

Os vasos que obtiveram vasorrelaxamento acima de 80% na presença de ACh previamente incubados com FEN foram considerados providos de endotélio funcional, e então posteriormente a verificação do endotélio funcional, as preparações de anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos foram previamente incubadas com L-NAME (100 μ M), um inibidor competitivo da enzima sintase do óxido nítrico (MONCADA e HIGGS, 1993, p 2005) por 30 min. Após este período, uma contração tônica com fenilefrina (10 μ M) foi obtida e as concentrações crescentes e cumulativas (0,00001; 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 300; 500 e 1000 μ g/mL) do vinho que apresentou maior efeito vasorelaxante foram adicionadas (n=6). As respostas obtidas do vinho na presença do inibidor L-NAME foram comparadas com aquelas obtidas na ausência do inibidor.

Análise Estatística

Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. Quando apropriado, a significância estatística foi determinada por análise ANOVA one-way ou two-way seguido de pós-teste de Bonferroni, usando o software GraphPad Prism[®] versão 5.0. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

Ensaio físico-químico

Os resultados das análises físico-químicas dos vinhos estão ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1: Características físico-químicas dos vinhos testados.

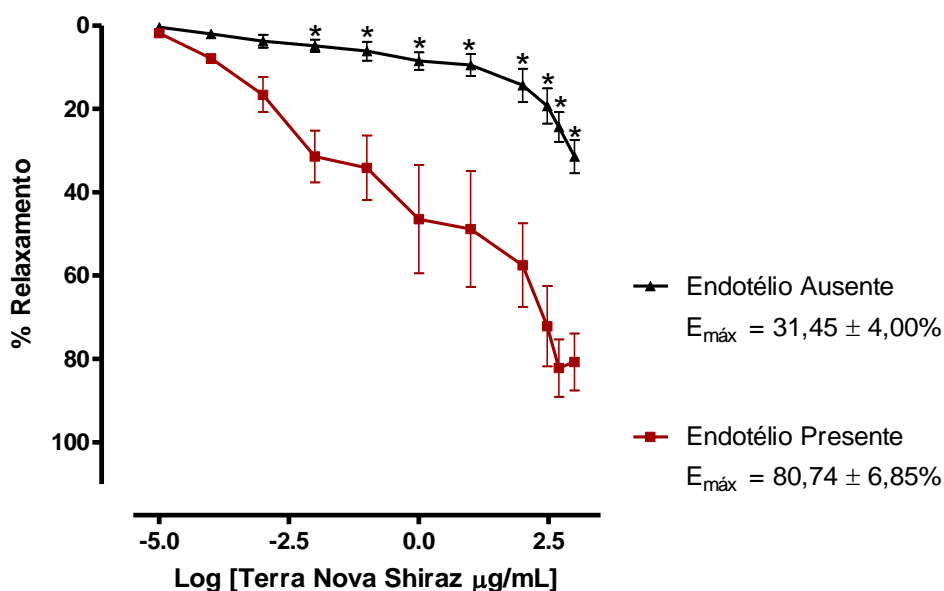
Média \pm e.p.m				
VINHOS	pH	Extrato seco (g/L)	Fenólicos totais (280 nm)	Antocianinas (mg/L)
Duccos	3,81 \pm 0,000	41,03 \pm 0,1453	83,13 \pm 0,14	171,21 \pm 0,58
Terranova	3,69 \pm 0,0034	34,17 \pm 0,0034	78,33 \pm 0,17	104,87 \pm 0,17
Rio Sol	3,71 \pm 0,007	32,00 \pm 0,03	82,59 \pm 0,06	89,02 \pm 0,04

Ensaio *in vitro*

Efeitos dos VTVSF em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos pré-contraídos com fenilefrina.

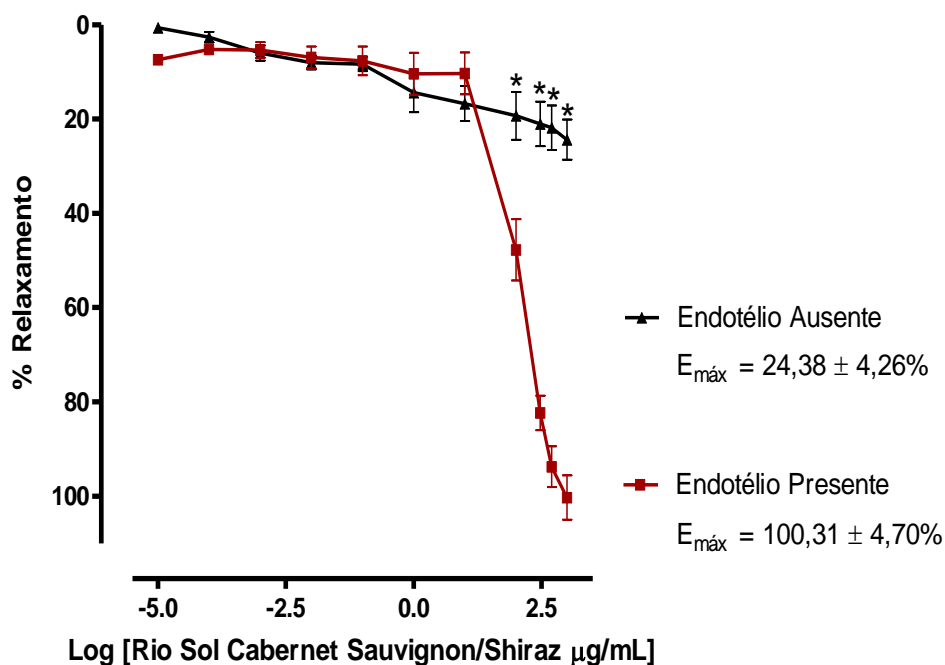
Em preparações com endotélio funcional, a adição crescente e cumulativa do liofilizado livre de álcool do vinho tinto Terra Nova desencadeou vasorrelaxamento ($E_{m\acute{a}x} = 80,74 \pm 6,85\%$, $n = 6$) (Figura 2). Em preparações desprovidas de endotélio funcional, o efeito vasorelaxante foi atenuado ($E_{m\acute{a}x} = 31,45 \pm 4,00\%$, $n = 6$) (Figura 2).

Figura 2: Curva concentração-resposta do vinho tinto Terranova (0,00001-1000 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com fenilefrina (10 μM) na presença (■) e ausência (▲) de endotélio funcional. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ versus endotélio intacto.



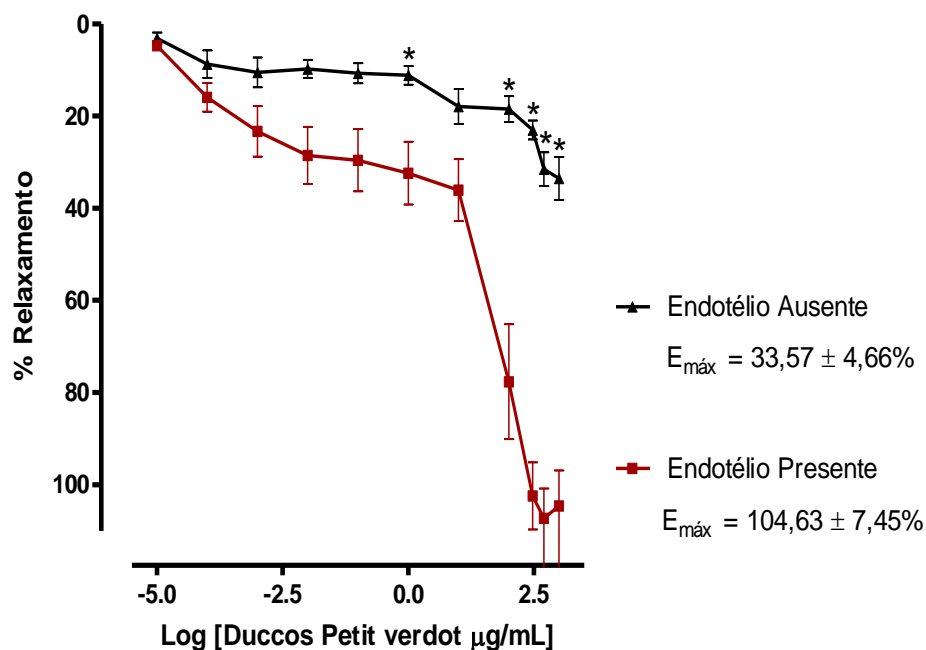
Em preparações com endotélio funcional, a adição crescente e cumulativa do liofilizado livre de álcool do vinho tinto Rio Sol desencadeou vasorrelaxamento ($E_{m\acute{a}x} = 100,31 \pm 4,70\%$, $n = 6$) (Figura 3). Em preparações desprovidas de endotélio funcional, o efeito vasorelaxante foi atenuado ($E_{m\acute{a}x} = 24,38 \pm 4,26\%$, $n = 6$) (Figura 3).

Figura 3: Curva de concentração-resposta do vinho tinto Rio Sol (0,00001-1000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com fenilefrina (10 µM) na presença (■) e ausência (▲) de endotélio funcional. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. *p<0,05 versus endotélio intacto.



Em preparações com endotélio funcional, a adição crescente e cumulativa do liofilizado livre de álcool do vinho tinto Duccos desencadeou vasorrelaxamento ($E_{m\acute{a}x} = 104,63 \pm 7,45\%$, $n = 6$) (Figura 4). Em preparações desprovidas de endotélio funcional, o efeito vasorelaxante foi atenuado ($E_{m\acute{a}x} = 33,57 \pm 4,66\%$, $n = 6$) (Figura 4).

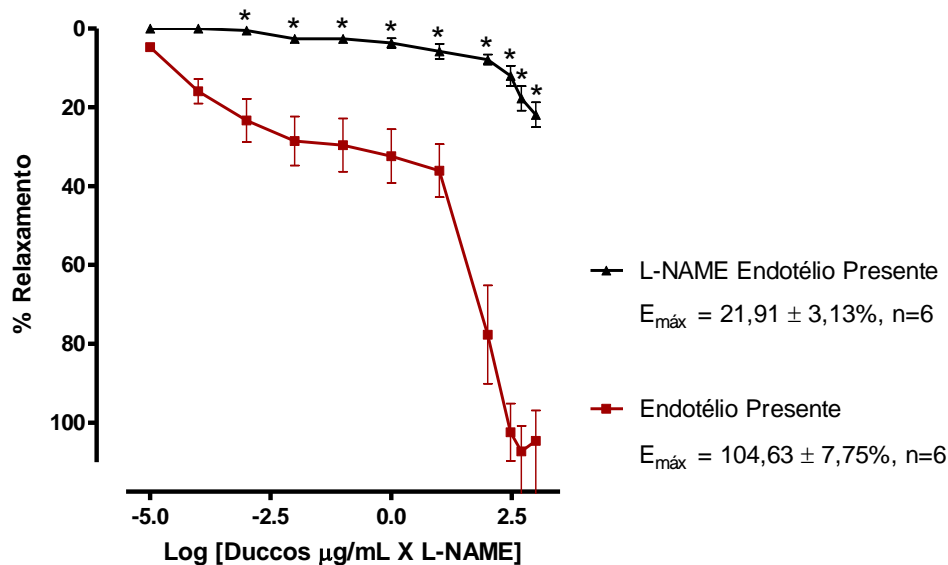
Figura 4: Curva de concentração-resposta do vinho tinto Duccos (0,00001-1000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contráídos com fenilefrina (10 µM) na presença (■) e ausência (▲) de endotélio funcional. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. *p<0,05 versus endotélio intacto.



Participação da enzima sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) na resposta vasorelaxante induzida pelo vinho tinto liofilizado livre de álcool Duccos em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos.

O efeito vasorelaxante induzido pelo liofilizado livre de álcool do vinho tinto Duccos em anéis de artéria mesentérica superior pré-tratados com L-NAME (100 µM) foi significativamente atenuado ($E_{máx} = 21,91 \pm 3,13\%$, $n=6$) (Figura 5) quando comparado a resposta obtida na ausência deste inibidor ($E_{máx} = 104,63 \pm 7,75\%$, $n=6$) (Figura 5).

Figura 5: Curva de concentração-resposta de Duccos (0,00001-1000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato normotenso pré-contraídos com fenilefrina (10 µM) na ausência (■) e presença (▲) de L-NAME (100 µM). Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. *p<0,05 versus endotélio intacto sem L-NAME.



DISCUSSÃO

O presente estudo contemplou a análise das propriedades físico-químicas e a avaliação do efeito vasorelaxante de três vinhos tintos do VSF, através da realização da análise de parâmetros físico-químicos e através de metodologia *in vitro*, utilizando o liofilizado livre de álcool dos vinhos e anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos.

Inicialmente foram testadas algumas características físico-químicas dos vinhos: pH, extrato seco, fenólicos totais e antocianinas totais (tabela 1).

A concentração de ácido de um vinho e o pH são importantes parâmetros tecnológicos em enologia. Vinhos com altos valores de pH são resultantes, principalmente, de uvas com valores excessivos de potássio e podem comprometer a sua conservação, requerendo então a prévia correção com ácido tartárico (FOGAÇA et al., 2007, p 597), já que o ácido tartárico é o mais forte ácido orgânico dos vinhos, e por isso influencia de modo

direto nas suas características biológicas e sensoriais (RIZZON e MIELE, 2001, p 893). No estudo do pH, a literatura mostra que os valores adequados se encontram na faixa entre 3,0 a 3,8. Os resultados deste estudo se encontram compreendidos neste intervalo. O vinho tinto Duccos apresentou valor maior de pH estatisticamente significativa quando comparado aos outros dois vinhos, sugerindo que o vinho Duccos apresenta propensão maior às alterações oxidativas e biológicas, todavia, encontra-se dentro da faixa de referência de pH aceita pela literatura (OLIVEIRA et al., 2009, p 4).

O extrato seco total do vinho representa o peso do resíduo seco obtido após a evaporação dos compostos voláteis (OIV, 1990, p 3). Dentre os componentes fundamentais que compõem o extrato seco total estão os ácidos fixos, sais orgânicos e minerais, poliálcoois, compostos fenólicos, compostos nitrogenados, açúcares e polissacarídeos (OLIVEIRA et al., 2012, p 1760). Logo, dentre os vinhos analisados o que possui o maior número de compostos não voláteis é o vinho Duccos, seguido pelo vinho Terranova e em seguida, o vinho Rio Sol.

Para a quantificação mínima do extrato seco, o valor de referência é 8,0 g/L, sem limites máximos estabelecidos, pois este valor pode variar conforme a região do país em que as uvas são cultivadas (BRASIL, 2008, p 3). Todos os vinhos analisados no presente trabalho tiveram resultados variando entre 30 g/L e 42 g/L (tabela 1), logo estão acima dos valores propostos pela legislação, o que pode estar relacionado com as condições climáticas peculiares da região do VSF. Para avaliar a quantidade de polifenóis no extrato seco, procedeu-se a análise de FT dos três vinhos.

Segundo a literatura, os vinhos do VSF possuem valores superiores de polifenóis, quando comparados a outros vinhos, como os vinhos produzidos na Serra Gaúcha (NASCIMENTO, 2010, p 140). No presente estudo, os três vinhos apresentam alto teor de FT (tabela 1), o que pode ser explicado pela alta exposição solar da uva nesta região, o que proporciona uma característica diferenciada com relação ao quantitativo de fenólicos totais com outras regiões do Brasil ou do mundo (OLIVEIRA, SOUZA e MAMEDE, 2011, p 163).

Dentre os três vinhos analisados o que possui maior quantidade de antocianinas é o vinho Duccos (171 mg/L), seguido pelo vinho Terra Nova (104,87 mg/L) e por último o vinho Rio Sol (89,02 mg/L) (tabela 1). As antocianinas são derivadas da classe dos flavonoides, e

demonstram ter atividade biológica antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica (MAZZA, 2007, p 370). O vinho Duccos, com maior teor de antocianinas dentre os vinhos analisados sugere uma atividade antioxidante maior, quando comparado aos outros dois vinhos do estudo.

Visto a alta quantidade de polifenóis totais encontrados nos vinhos do estudo bem como alta quantidade de antocianinas e a demonstração prévia em estudo de que os vinhos tintos do VSF desencadeiam vasorrelaxamento em vaso isolado de animal (LUCIANO et al, 2011, p 699), foram realizados protocolos experimentais com artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos para investigar se estes VTVSF apresentam efeito direto nos vasos sanguíneos.

In vitro, o etanol aumenta a expressão da enzima responsável pela síntese de óxido nítrico, a sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS), e consequentemente a produção de óxido nítrico (NO) nas células endoteliais aórticas (VENKOV et al., 1999, p 638). Os polifenóis do vinho tinto, em especial o resveratrol, aumentam a expressão da eNOS, a sua liberação e a liberação de NO das células endoteliais (WALLERATH et al., 2002, p 1652). Assim, no presente estudo, a extração do álcool e da água por rotaevaporação e liofilização visa garantir que o efeito vasorelaxante seja desencadeado pelos polifenóis presentes neste vinho, e não pelo álcool.

Em condições controladas (citadas na metodologia), quando os VTVSF foram testados em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato ocorreu vasorrelaxamento, que foi significativamente atenuado após a remoção do endotélio funcional, mostrando que o efeito vasorelaxante é predominantemente dependente da presença do endotélio funcional do vaso. Todavia, foi observado que os padrões de vasorrelaxamento induzidos pelos VTVSF ocorreram de modo diferenciado. A aplicação crescente e cumulativa do liofilizado Duccos em endotélio funcional apresentou maior efeito vasorelaxante quando comparado ao Terranova e ao Rio Sol. Além disso, o efeito vasorelaxante máximo com percentual ótimo foi obtido com a aplicação da concentração de 500 µg/mL no liofilizado Duccos, o que ocorreu da mesma maneira na aplicação do liofilizado Terranova (500 µg/mL), mas diferentemente na aplicação do liofilizado Rio Sol (1000 µg/mL), em relação ao percentual ótimo obtido. Estudos realizados anteriormente,

respectivamente, por Moura et al., (2004, p 302), com vinhos tintos Brasileiros da Serra Gaúcha, e por Luciano et al (2011, p 697), com vinho tinto Garziera (uva Shiraz, safra 2005) do VSF, mostraram efeito vasorelaxante em leito vascular mesentérico isolado e em artéria mesentérica isolada de rato normotenso respectivamente, acordando com os presentes resultados.

Em preparações desprovidas de endotélio funcional quando comparado com as preparações providas do mesmo, o efeito vasorelaxante foi significativamente atenuado nos três vinhos estudados. Não foi objeto de estudo deste trabalho o aprofundamento de estudo das vias envolvidas no vasorrelaxamento em preparações desprovidas de endotélio funcional.

Visto o efeito vasorelaxante predominantemente dependente de endotélio vascular ocorrido nos vinhos estudados, a literatura mostra que, nos vasos sanguíneos, as células endoteliais têm um papel crítico na manutenção local da homeostasia, através da liberação de vários autacoides sobre a vasculatura. A enzima eNOS é expressa principalmente nas células endoteliais e plaquetas (MONCADA et al., 1997, p 138) e mensageiros intracelulares agem nos estoques intracelulares de cálcio, o qual, ligado à calmodulina estimula a eNOS, dando início a síntese do NO (MONCADA et al., 1989, p 1709). O vasorrelaxamento induzido pelo NO ocorre predominantemente através da ativação da enzima ciclase de guanilil solúvel (GCs) em células musculares lisas vasculares, levando ao acúmulo de GMPc e subsequente ativação da proteína cinase G (PKG) (RAJAPAKSE e MATTSON, 2009, p 252). Entretanto, o NO pode mediar uma variedade de efeitos por mecanismos independentes de GMPc (WANSTALL et al., 2005, p 41).

Nestas condições, as preparações de anéis de artéria foram pré-incubadas com L-NAME, um inibidor não seletivo da enzima eNOS, e testadas com o vinho que desencadeou maior vasorrelaxamento na presença de endotélio vascular, o Duccos. Em condições controladas, a resposta vasorelaxante induzida por Duccos na presença de L-NAME foi significativamente inibida quando comparada com seu controle, sugerindo a participação da via NO-GMPc-PKG no vasorrelaxamento predominantemente dependente de endotélio vascular induzido pelo vinho Duccos. A participação da via NO-GMPc-PKG é descrita na literatura como uma das vias que pode ser ativada através de polifenóis para desencadear vasorrelaxamento. Um estudo com polifenóis derivados de vinhos/uvas demonstrou

possíveis mecanismos pelo quais os polifenois agem como a melhora da função endotelial e indicaram que, além de suas propriedades antioxidantes, os polifenois apresentam a capacidade de aumentar a disponibilidade de mediadores com atividade vasodilatadora como o óxido nítrico (NO), o fator hiperpolarizante derivado de endotélio (EDHF) e prostaciclina; e capacidade de inibir a síntese de mediadores vasoconstritores, como a endotelina-1 em células endoteliais, a expressão de fatores proangiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a metaloproteinase do tipo II (MMP-2) (STOCLET et al, 2004, p 306).

No presente estudo, os três vinhos analisados apresentaram vasorrelaxamento predominantemente dependente da presença de endotélio vascular. O vinho tinto Duccos apresentou maior quantidade de extrato seco, maior quantidade de fenólicos totais, maior quantidade de antocianinas totais, o que sugere um maior efeito antioxidante, fato que pode explicar o maior percentual de vasorrelaxamento obtido com este vinho. Sendo assim, os resultados encontrados estão de acordo com a literatura, sugerindo que os polifenois encontrados nas uvas e vinhos do Vale do São Francisco possam beneficiar o sistema cardiovascular. Mais estudos serão necessários para comprovar esta hipótese.

CONCLUSÕES

- Todos os vinhos apresentaram efeito vasorelaxante em anéis de artéria mesentérica isolada de rato normotenso, e este efeito é predominantemente dependente da presença de endotélio vascular;
- Dentre os três vinhos, o vinho tinto Duccos apresentou maior efeito vasorelaxante na presença de endotélio vascular, maior pH, maior concentração de fenólicos totais e maior teor de antocianinas;
- O efeito vasorelaxante predominantemente dependente de endotélio vascular do vinho tinto Duccos foi atenuado na presença de L-NAME, sugerindo o envolvimento

da enzima eNOS, e, portanto, a participação da via NO-GMPc-PKG no vasorrelaxamento;

- Os resultados encontrados sugerem um possível benefício na saúde humana desencadeado pelo consumo de polifenóis das uvas e dos vinhos tintos do VSF, no entanto, mais estudos serão necessários para comprovar esta hipótese.

REFERÊNCIAS

ABE, L. T.; MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. **Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L.** Ciência Tecnologia Alimentos, Campinas, 2007; 27 (2): 394-400.

ALBUQUERQUE, G.; OLIVEIRA, A.M. **Alimentação saudável e dietas específicas na prevenção cardiovascular: realidade e mitos.** Revista Factores de Risco, 2015; 35: 44-51.

ALTURA, B.M.; ALTURA, B.T. **Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta.** American Journal of Physiology, 1970; 219: 1698-1705.

BLATOUNI, M. **Álcool e Sistema Cardiovascular.** Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Arquivos Médicos, ABC, São Paulo, 2006; 2: 14-6.

BRASIL, 2008. **Instrução Normativa**, n. 51, de 7 de outubro de 2008. Publicado no Diário Oficial da União de 08/08/2008, seção 1, página 3.

CARDOSO, L.; MAFRA, D. **Alimentação Pode Levar a Benefícios para o Sistema Cardiovascular: Fato ou Ficção?** International Journal of Cardiovascular Sciences, 2015; 28 (2): 87-88.

DOMENEGHINI, D. C. S. J.; LEMES, S. A. F. **Effects of wine components on cardiovascular function.** Nutrire: Revista Brasileira de Alimentação e Nutrição = Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition, São Paulo, 2011; 36 (1): 163-176.

FOGAÇA, A; DAUDT, C; DORNELES, F. **Potássio em uvas. II – análise peciolar e sua correlação com a quantidade de potássio em uvas viníferas.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 2007; 3: 597-601.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. **The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.** Nature, 1980; 288: p 373-376.

HARBERTSON, J; SPAYD, S. **Measuring phenolics in the winery.** American Journal Enological and Viticulture, 2006; 57 (3): p 280-288.

LUCIANO, M. N.; RIBEIRO, T.P.; FRANÇA-SILVA, M.S.; NASCIMENTO, R. J. B.; JESUS OLIVEIRA, E.; FRANÇA, K.C; ANTUNES, A.A.; NAKAO, L.S.; AITA, C.A.M.; BRAGA, V.A.; MEDEIROS, I.A. **Uncovering the vasorelaxant effect induced by Vale do São Francisco red wine: A role for nitric oxide.** Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2011; 57 (6): p 696-701.

MAZZA, G.J. **Anthocyanins and heart health.** Annali Dell Institute Superiore Di Sanita, 2007; 43, (4): 369-374.

MONCADA, S., HIGGS E.A. **The L-arginine - nitric oxide pathway.** The New England Journal of Medicine, 1993; 29: 2002–2012.

MONCADA, S., HIGGS, A. AND FURCHGOTT, R. **International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research.** Pharmacological Reviews, 1997; 49 (2): 137-142.

MONCADA, S., PALMER R. M., HIGGS, E. A. **Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication.** Biochemical Pharmacology, 1989; 38 (11): 1709-15.

MOURA, R.S.; MIRANDA, D.Z.; PINTO, A.C.A.; SICCA, R.F.; SOUZA, M.A.V.; RUBENICH, L.M.S.; CARVALHO, L.C.R.M.; RANGEL, B.M.; TANO, T.; MADEIRA, S.V.F.; REZENDE, A.C. **Mechanism of endothelium-dependent vasodilation and the antihypertensive effect of Brazilian red wine.** Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2004; 44 (3): 302-309.

NASCIMENTO, R.J.B. **Desenvolvimento de método de quantificação de resveratrol (cis e trans) e quercetina, determinação de fenólicos totais e ação anti-radicalar em vinhos tintos nacionais e importados.** 167 f. Tese (Doutorado). Programa de pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos/ Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

OLIVEIRA, J.B; SILVA, G.G; ARAÚJO, A.J.B; CASTRO, R; CRUZ, A; PEREIRA, G.E. **Potencial da CV. Carmenere para a elaboração de vinhos finos em região tropical do Brasil.** Anais Eletrônico. XXII Congresso Brasileiro de Frutivicultura. Bento Gonçalves-RS, 2012: 1758-1761.

OLIVEIRA, L.C; SOUZA, S.O; MAMEDE, M.E.O. **Avaliação das características físico-químicas e colorimétricas de vinhos finos de duas principais regiões vinícolas do Brasil.** Rev. Inst. Adolfo Lutz, 2011; 70 (2): 158-67.

OLIVEIRA, V.S; MARTINS, A.M; DINIZ, B.C.R; SANTOS, A.F. **Caracterização físico-química de vinho tinto elaborado com a variedade Syrah proveniente do vinhedo didático do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano,** 2009; 1-6. Disponível em <http://www.connepi.ifal.edu.br/ocs/index.php/connepi/CONNEPI2010/paper/.../531.pdf> Acesso em: 12 Mai. 2016.

O.I.V. **Recueil des methodes internacionales d'analyse des vins et des musts.** Office Internacional de la Vigne et du Vin, Paris. 2015; 2 : 1-4.

PEREIRA, G. E; GAUDILLERE, J.P; VAN LEEUWEN, C; HILBERT, G; LAVIALLE, O; MAUCOURT, M; DEBORDE, C; MOING, A; ROLIN, D. **¹H NMR and Chemometrics to Characterize Mature Grape Berries in Four Wine-Growing Areas in Bordeaux-France.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53, p. 6382-6389, 2005.

RAJAPAKSE N, MATTSON DL. **Role of L-arginine in nitric oxide production in health and hypertension.** Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2009 ; 36: 249–255.

RENAULD S, DE LORGERIL M. **Wine, alcohol, platelets and the French Paradox for coronary heart disease.** Lancet, 1992; 339 (8808): 1523-1526.

*Helen Gabriele Ferreira Costa, Daniel Wilson Cunha, Iêda Maria dos Santos,
Marcos Vinícius Oliveira Carneiro, Ferdinando Oliveira Carvalho, Giuliano Elias
Pereira e Melissa Negro-Dellacqua*

RIZZON, L; MIELE, A. **Concentração de ácido tartárico dos vinhos da serra gaúcha.** Ciência Rural, 2001; 31:893-895.

STOCLET, J. C., CHATAIGNEAU, T. NDIAYE, M.; OAK, M. H.; EL BEDOUUI, J. CHATAIGNEAU, M.; SCHINI-KERTH, V. B. **Vascular protection by dietary polyphenols.** European Journal of Pharmacology, 2004; 500: 299-313.

TANAKA, Y.; MOCHIZUKI, Y.; TANAKA, H.; SHIGENOBU, K. **Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric artery.** British Journal of Pharmacology, 1999; 128: 1602-1608.

VENKOV, C.D.; MYERS P.R.; TANNER, M.A.; SU, M.; VAUGHAN, D.E. **Ethanol increases endothelial nitric oxide production through modulation of nitric oxide synthase expression.** Thrombosis and Haemostasis, 1999; 81 (4): 638-42.

WALLERATH T, DECKERT G, TERNES T, ANDERSON H, LI H, Witte K, Forstermann U. **Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase.** Circulation 2002; 106 (13): 1652-8.

WANSTALL, J.C.; HOMER, K.L.; DOGGRELL, S.A. **Evidence for, and importance of, cGMP independent mechanisms with NO and NO donors on blood vessels and platelets.** Current Vascular Pharmacology, 2005; 3 (1): 41-53.