



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO  
UNIVERSIDADE DO PORTO

**Compostos Bioativos em vinhos monocasta Portugueses:**

*Trans-resveratrol e Melatonina*

**Bioactive compounds in monovarietal Portuguese wines:**

*Trans-resveratrol and Melatonin*

**Janete Oliveira Rocha**

**Orientado por:** Professora Doutora Mónica Vera Cruz de Sousa

**Coorientado por:** Professora Doutora Olga Maria da Silva Viegas

**Trabalho de Investigação**

---

**1.º Ciclo em Ciências da Nutrição**

**Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto**

**Porto, 2017**



## Resumo

A diversidade de fitoquímicos presente no vinho, com especial ênfase para o resveratrol (RSV) e a melatonina (MLT), associa-se a efeitos benéficos para a saúde decorrentes do consumo moderado e regular deste produto mediterrânico. O limitado conhecimento analítico do teor de MLT e RSV em géneros alimentícios torna difícil estimar a ingestão diária dos mesmos.

O presente trabalho objetivou quantificar MLT, *trans*-RSV, fenólicos totais e a atividade antioxidante (AA) em vinhos monocasta portugueses, bem como averiguar a correlação entre os compostos bioativos e a AA.

A determinação dos compostos bioativos em 19 vinhos portugueses da região vitivinícola da Península de Setúbal, envolveu a extração por microextração líquido-líquido dispersiva e análise por HPLC-DAD/FD. A quantificação dos fenólicos totais foi realizada pelo ensaio de Folin-Ciocalteu e a AA com os ensaios de ABTS<sup>••</sup> e do DPPH<sup>•</sup>.

Nos vinhos tintos, o teor de MLT variou entre 0,84–7,44 ng/mL, o de *trans*-RSV entre 547,49–2616,04 ng/mL, fenólicos totais entre 4229,67–7542,21 ng/mL, GAE e a AA entre 7972,85–13000,15 mg/L, TE (ABTS<sup>••</sup>) e 4404,07–8418,15 mg/L, TE (DPPH<sup>•</sup>). Os vinhos brancos apresentaram menor quantidade de *trans*-RSV, fenólicos totais e AA comparativamente aos tintos, concordante com o descrito na literatura. Contudo, tal diferença não se verificou para a MLT, contribuindo assim, para o pouco conhecimento analítico deste composto em vinhos.

A variabilidade encontrada nos parâmetros analisados entre castas e anos, não permite isolar a *casta* como o responsável, dada a multiplicidade de fatores com influência na composição química do vinho.

## Abstract

The diversity of phytochemicals in wine, such as resveratrol (RSV) and melatonin (MLT), are associated with health benefits arising from the moderate and regular consumption of this Mediterranean product. The limited analytical knowledge of the MLT and RSV content in food makes it hard to estimate their daily intake.

The present work aimed to determine the quantity of MLT, *trans*-RSV, total phenolics and antioxidant activity (AA) in monovarietal Portuguese wines, as well as to examine the correlation between the bioactive compounds and the AA.

The determination of the bioactive compounds in 19 Portuguese wines of the Península of Setúbal wine region, involved the extraction by dispersive liquid-liquid microextraction and analysis by HPLC-DAD/FD. The quantification of total phenolics was assessed through the Folin-Ciocalteu assay, and the AA through the ABTS<sup>•+</sup> and DPPH<sup>•</sup> assays.

In red wines, the MLT amounts varied between 0,84–7,44 ng/mL, *trans*-RSV between 547,49–2616,04 ng/mL, total phenolics between 4229,67–7542,21 ng/mL, GAE and the AA between 7972,85–13000,15 mg/L, TE (ABTS<sup>•+</sup>) and 4404,07–8418,15 mg/L, TE (DPPH<sup>•</sup>). White wines presented less amounts of *trans*-resveratrol, total phenolics and AA compared to red wines, in agreement with the literature. However, this difference was not observed for MLT, a fact that contributes to the limited analytical knowledge on this compound in wine. Differences were observed in the analyzed parameters among wine varieties and years.

Therefore, it was not possible to isolate the variety as the responsible agent, given the plurality of factors influencing the chemical composition of wines.

**Palavras-Chave**

Vinho, melatonina, *trans*-resveratrol, fenólicos totais, atividade antioxidante.

**Keywords**

Wine, melatonin, *trans*-resveratrol, total phenolics, antioxidant activity.

## **Índice**

Resumo (Português) .....	i
Abstract (English) .....	ii
Palavras-Chave/Keywords .....	iii
Introdução.....	1
Material e Métodos .....	3
Resultados e Discussão .....	7
Conclusões.....	15
Referências Bibliográficas .....	16

**Lista de abreviaturas**

<b>AA</b>	Atividade antioxidante
<b>ABTS<sup>+</sup></b>	Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
<b>C18</b>	Octadecilsilano
<b>DAD</b>	Detetor de varrimento de diodos
<b>DCV</b>	Doenças cardiovasculares
<b>DLLME</b>	Microextração líquido-líquido dispersiva
<b>DPPH<sup>·</sup></b>	2,2-difenil-1-picril-hidrazina
<b>ELISA</b>	Ensaio de imunoabsorção enzimática
<b>FD</b>	Detetor de fluorescência
<b>GAE</b>	Equivalentes de ácido gálico
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>LLE</b>	Extração líquido-líquido
<b>MEPS</b>	Microextração em seringa empacotada
<b>MLT</b>	Melatonina
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>pka</b>	Logaritmo constante de acidez
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SPE</b>	Extração em fase sólida
<b>TE</b>	Equivalentes de trolox
<b><i>trans</i>-RSV</b>	<i>Trans</i> -resveratrol
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>× g</b>	Força centrífuga
<b>λ<sub>em</sub></b>	Comprimento de onda de emissão
<b>λ<sub>exc</sub></b>	Comprimento de onda de excitação



## Introdução

O padrão alimentar mediterrânico começou a ser descrito no início dos anos 60 do século passado<sup>(1)</sup>, sendo originário de áreas de exploração vinícola e de consumo regular de vinho<sup>(2)</sup>. Efeitos benéficos para a saúde têm sido atribuídos a este padrão alimentar, nomeadamente sobre fatores de risco cardiometabólico, incidência de cancro, doenças cardiovasculares (DCV) e neurodegenerativas, diabetes *mellitus* tipo 2 e mortalidade por todas as causas<sup>(1, 3)</sup>. As propriedades benéficas da dieta mediterrânica associam-se à diversidade de fitoquímicos presente e ao efeito sinérgico entre estes compostos<sup>(1, 2)</sup>.

O consumo moderado e regular de vinho, definido como 1 a 2 copos/dia para homens e 1 copo/dia para as mulheres, é um dos elementos característicos deste padrão alimentar<sup>(1)</sup>. Ao vinho têm sido atribuídas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, cardioprotetoras, anti envelhecimento, antidiabéticas, entre outras<sup>(4)</sup>, efeitos benéficos, que poderão resultar do consumo moderado de álcool mas também da diversidade de fitoquímicos presente<sup>(1, 5)</sup>. Os polifenóis, com especial ênfase o resveratrol (RSV)<sup>(6)</sup>, são considerados os principais responsáveis pelo “paradoxo Francês”<sup>(7)</sup>. Contudo, nos últimos 20 anos, especial atenção tem sido dada à melatonina (MLT), de origem alimentar, presente de forma significativa em produtos mediterrânicos, incluindo o vinho.

O RSV (3,4,5' – trihidroxiestilbeno) é um composto fenólico não flavonoide, existindo na natureza sob a forma de dois isómeros geométricos, o *trans*-RSV e o *cis*-RSV<sup>(8)</sup> (Figura 1, Anexo 1). Embora ambos sejam biologicamente ativos, dada a maior frequência e estabilidade do *trans*-RSV, é-lhe atribuído a maioria das funções<sup>(9)</sup>. O RSV é uma fitoalexina produzida a partir da fenilalanina, em resposta a fatores de agressão bióticos ou abióticos<sup>(10)</sup>. O vinho é a principal fonte alimentar

de RSV, estando também presente em uvas, cacau, mirtilos, framboesas, maçãs, amendoins e plantas medicinais como a Japanese Knotweed (*Polygonum cuspidatum*)<sup>(8, 11-14)</sup>. A quantidade de RSV no vinho é influenciada por diversos fatores como a(s) casta(s), a localização geográfica das videiras, os fatores agronômicos e ambientais a que a planta é sujeita e as práticas enológicas utilizadas<sup>(8, 10)</sup>.

As propriedades benéficas associadas ao RSV resultam das suas múltiplas atividades biológicas, com destaque para as antioxidante, anti-inflamatória e anti-proliferativa, contribuindo para a prevenção ou atraso do desenvolvimento de doenças crônicas tais como a diabetes *mellitus*, as DCV e a doença de Alzheimer<sup>(5, 8)</sup>. Conhece-se ainda a neuroprotecção, a inibição da proliferação de algumas linhagens de células cancerígenas e favorece o aumento da longevidade<sup>(8)</sup>.

Por outro lado, a MLT (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina (Figura 2, Anexo 1) sintetizada maioritariamente na glândula pineal dos vertebrados, a partir do triptofano, tendo sido também identificada em invertebrados, bactérias, fungos e plantas<sup>(15)</sup>. Já foi determinada em uvas (com teores superiores no exocarpo, nas sementes e por fim no meso/endocarpo), vinhos, bananas, maçãs, cerveja, azeite e tomate<sup>(16-19)</sup>. A presença de isómeros de MLT foi confirmada em vinhos, mas não em uvas, pelo que se considera que o teor total de MLT no vinho resulte não só do fruto, mas também da produção pelas leveduras durante a fermentação<sup>(4, 20)</sup>. A quantidade de MLT no vinho parece ser influenciada pela(s) casta(s), grau de amadurecimento do fruto, localização geográfica, condições agrometeorológicas, stresse ambiental e procedimentos enológicos<sup>(2, 17)</sup>.

A MLT possui atividades ao nível hormonal, antioxidante, imunoativa, neuroativa e anticancerígena<sup>(21, 22)</sup>.

A investigação sobre a bioatividade dos compostos presentes no vinho e a procura de novas moléculas com atividade biológica sofreu grande evolução, associada ao desenvolvimento de métodos de análise mais sofisticados e sensíveis<sup>(4)</sup> (Tabela 1, Anexo 1).

## **Objetivos**

Dado o pouco conhecimento do teor destes compostos em alimentos, e em vinho em particular, é de especial relevância proceder à sua quantificação nesta bebida habitual na mesa dos portugueses. Em alguns vinhos portugueses o *trans*-RSV já foi quantificado, no entanto para a MLT não existe qualquer estudo. É igualmente importante determinar os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante (AA). Sendo assim foram objetivos específicos deste trabalho:

- Quantificar simultaneamente a MLT e o *trans*-RSV em vinhos monocasta;
- Dosear os compostos fenólicos totais e determinar a AA;
- Averiguar a possível correlação existente entre os compostos bioativos em estudo (MLT e *trans*-RSV) e a AA.

## **Material e Métodos**

### **1. Extração de melatonina e *trans*-resveratrol**

#### Padrões e reagentes

Os padrões de melatonina ( $\geq 98\%$  de pureza), *trans*-resveratrol ( $\geq 99\%$  de pureza) e agomelatina ( $\geq 98\%$  de pureza), bem como o acetonitrilo (grau de HPLC), o ácido o-fosfórico (85% m/m de pureza) fosfato de sódio monobásico foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). O cloreto de sódio (NaCl) e o clorofórmio foram obtidos a partir da VWR Chemicals, Prolab (Leuven, Bélgica). A água ultrapura foi obtida através do sistema SERALPUR Pro 90 CN (Belgolabo, Overijse, Bélgica).

As soluções mãe (1 mg/mL) de MLT, *trans*-RSV e agomelatina foram preparadas em metanol. A solução de trabalho de MLT (300 ng/mL) e de *trans*-RSV (30000 ng/mL) foi preparada em acetonitrilo. A solução de trabalho de agomelatina (padrão interno) foi de 0,25 µg/mL, diluída em metanol. As soluções mãe e de trabalho foram armazenadas a -20°C, em *vials* âmbar.

### Amostragem

A amostragem (Tabela 1) foi constituída por 19 vinhos ( $n=2$ ), provenientes da região vitivinícola da Península de Setúbal, adquiridos em supermercados locais do Porto, sendo 15 monocasta e 4 multicasta.

**Tabela 1.** Lista dos vinhos analisados.

Quinta	Código	Casta	Designação	Ano	Teor alcoólico
1	1	<i>Touriga Nacional</i> (T.N.)	Tinto	2013	14,5% Vol.
	2	<i>Syrah</i>	Tinto	2013	14,5% Vol.
	2B	<i>Syrah</i>	Tinto	2014	14% Vol.
	3B	<i>Alicante Bouschet</i>	Tinto	2013	14,5% Vol.
	3	<i>Alicante Bouschet</i>	Tinto	2012	14,5% Vol.
	4	<i>Cabernet Sauvignon</i> (C.S)	Tinto	2013	14,5% Vol.
	5	<i>Castelão</i> (70%), C.S. (15%) e T.N. (15%)	Tinto	2013	14% Vol.
	5B	<i>Castelão</i> (70%), C.S. (15%) e T.N. (15%)	Tinto	2014	14% Vol.
	11	<i>Fernão Pires</i> (30%), <i>Arinto</i> (30%), <i>Antão Vaz</i> (20%) e <i>Chardonnay</i> (20%)	Branco	2015	13,5% Vol.
	14	<i>Touriga Franca</i>	Tinto	2013	14,5% Vol.
2	6	<i>Castelão</i> (40%), <i>Aragonez</i> (40%) e C.S.(20%)	Tinto	2014	14% Vol.
	7	<i>Touriga Nacional</i>	Tinto	2013	14,5% Vol.
	8	<i>Aragonez</i>	Tinto	2012	14,5% Vol.
	9	<i>Cabernet Sauvignon</i>	Tinto	2013	14% Vol.
	9B	<i>Cabernet Sauvignon</i>	Tinto	2012	14% Vol.
	10	<i>Castelão</i>	Tinto	2013	13,5% Vol.
	13	<i>Syrah</i>	Tinto	2013	14% Vol.
	15	<i>Trincadeira</i>	Tinto	2012	13,5% Vol.
3	12	<i>Moscatel Graúdo</i>	Branco	2015	11,5% Vol.

B – Ano diferente da mesma casta; Todas as amostras foram analisadas no dia de abertura.

### Pré-tratamento da amostra

A extração de MLT e *trans*-RSV foi realizada com base na técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) otimizada por Viegas *et al.*<sup>(23)</sup>.

A amostra foi centrifugada a 4000 rotações por minuto (rpm) (2951 × g) durante 5 minutos. Posteriormente, num tubo de polipropileno colocou-se 7 mL de

água, 2 mL de vinho e 20 µL de padrão interno. De seguida, adicionou-se 1,5 mL de acetonitrilo como solvente dispersor e 1,5 g de NaCl. Por fim, colocou-se 300 µL de clorofórmio como solvente extrator formando uma “*cloudy solution*”. Agitou-se vigorosamente durante 1 minuto e centrifugou-se (4000 rpm, 5 minutos). Depois retirou-se a gota depositada no fundo (contendo os analitos) para um *vial* âmbar, onde foi evaporada em corrente de azoto e reconstituída em 150 µL de fase móvel inicial para posterior análise em HPLC. Para melhor seletividade na análise de MLT procedeu-se à lavagem da gota com 500 µL de NaOH 1M, seguida de agitação em vórtex e nova centrifugação. Nas Figuras 1 a 4 do Anexo 2, encontra-se a representação visual da metodologia descrita. Para cada amostra realizou-se duas extrações com lavagem (para a MLT) e duas extrações sem lavagem (para o *trans*-RSV). Para confirmação dos compostos adicionou-se em extrações adicionais, 40 µL da mistura de padrões. A quantificação dos compostos (ng/mL) foi feita com recurso às curvas de calibração obtida por Viegas *et al.*<sup>(23)</sup>.

#### Condições cromatográficas

As condições cromatográficas foram realizadas de acordo com Viegas *et al.*<sup>(23)</sup>. O sistema HPLC utilizado, da marca Jasco (Japão), incluía uma bomba PU-1580, um injetor automático AS-2057 com um *loop* de 100 µL, um detetor de fluorescência FP 2020 e um detetor de diodos MD-910. A separação foi feita numa coluna C18 YMC-Pack ODS-A (120 Å, 5 µm, 250mm × 4,6mm), à temperatura ambiente e com um fluxo de 0,8 mL/minuto. A fase móvel composta pelo eluente A - acetonitrilo/ tampão fosfato (40 mM), pH de 3,0 (20/80, %v/v) e pelo eluente B - acetonitrilo/tampão fosfato (40 mM), pH de 3,0 (40/60, %v/v) seguiu o gradiente descrito na Tabela 2. A fluorescência ( $\lambda_{em}/\lambda_{exc}$ ) foi monitorizada a 386/298 nm até aos 30 minutos e a 370/230 nm dos 30 aos 45 minutos.

**Tabela 2.** Gradiente de eluição da fase móvel.

Tempo (min.)	% Eluente A	% Eluente B
0	100	0
7	75	25
30	0	100
35	0	100
40	100	0
45	100	0

A identificação dos picos foi feita por comparação com os tempos de retenção dos padrões dos respetivos compostos e avaliação dos espetros.

## 2. Doseamento dos fenólicos totais e atividade antioxidante

### Padrões e reagentes

Os padrões de ácido gálico ( $\geq 98\%$  de pureza) e trolox (97% de pureza), foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA), bem como o carbonato de sódio, o acetato de sódio anidro, o ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico (ABTS<sup>••</sup>) e o 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH<sup>•</sup>). O reagente de Folin-Ciocalteu (F-C) e o etanol (grau analítico) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha), o persulfato de potássio da Acros Organics (New Jersey, USA) e o ácido acético glacial da VWR Chemicals Prolab (Leuven, Bélgica).

A solução de ácido gálico (1 mM) foi preparada em água. As soluções de trolox (1 mM) foram preparadas em 10 e 50% de etanol/água (%v/v) respetivamente para os ensaios de ABTS<sup>••</sup> e DPPH<sup>•</sup>. A determinação dos fenólicos totais e da AA foi feita através de curvas de calibração (Tabela 1, Anexo 3).

Preparação das amostras: As amostras foram diluídas em água para os ensaios de ABTS<sup>••</sup> e fenólicos totais e em 50% de etanol/água (% v/v) para o do DPPH<sup>•</sup>. Para os vinhos tintos o fator de diluição foi de 1:100 e para os brancos foi de 1:5.

Ensaio dos fenólicos totais, ABTS<sup>••</sup> e DPPH<sup>•</sup>: Os procedimentos experimentais estão descritos no Anexo 3 e foram baseados em Magalhães *et al.*<sup>(24)</sup>.

Equipamento: O espectrofotômetro Spectro Star Nano da BMG Labteck e o programa de Spectrostar Nano–Data Analysis com o software 2.30 R3, foram utilizados para leitura das microplacas de 96 poços (CoStar®, Ref. 11913008).

As amostras foram analisadas em quadruplicado ( $n=4$ ), sendo os resultados expressos em mg/L equivalentes de ácido gálico (GAE) e  $\mu\text{M}$ , GAE para os fenólicos totais e mg/L equivalentes de trolox (TE) e  $\mu\text{M}$ , TE para o ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•</sup>.

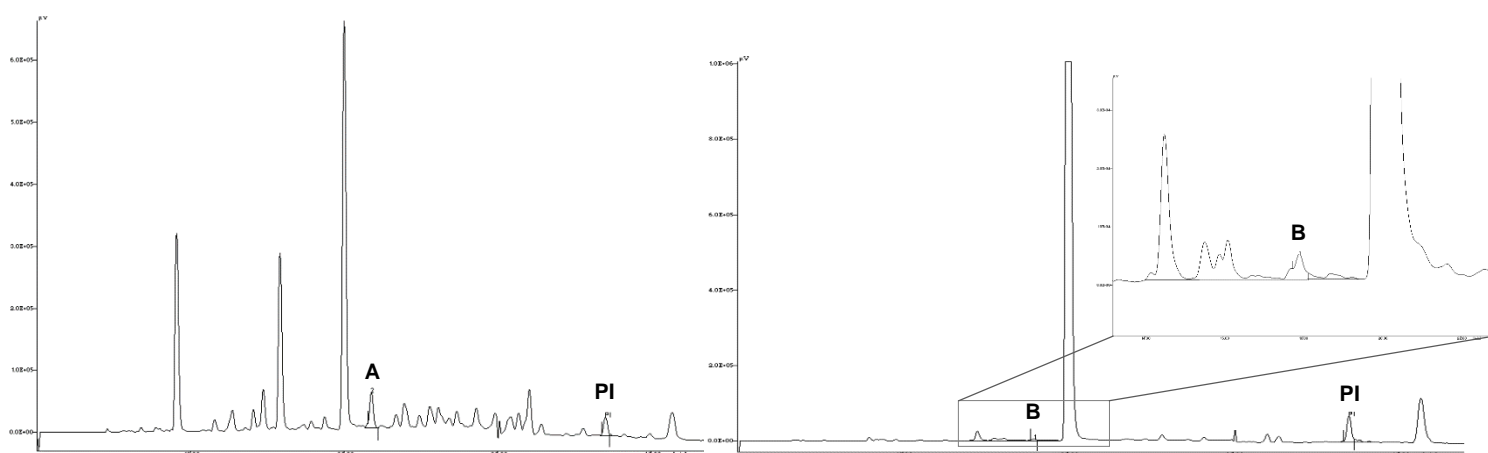
### 3. Análise estatística

O *Microsoft Excel 2016* e o *SPSS 24.0* foram utilizados para tratamento dos resultados. Estes foram submetidos a análise de variância (One-Way ANOVA) e ao teste *post-hoc* (Tukey's test). A análise da correlação de Pearson foi feita entre: a) compostos bioativos em estudo e a AA; b) conteúdo de fenólicos totais e a AA; e c) ensaios para quantificar a AA. O nível de significância foi definido em 5% para o teste ANOVA e *post-hoc*, e em 1% para a correlação de Pearson.

## Resultados e Discussão

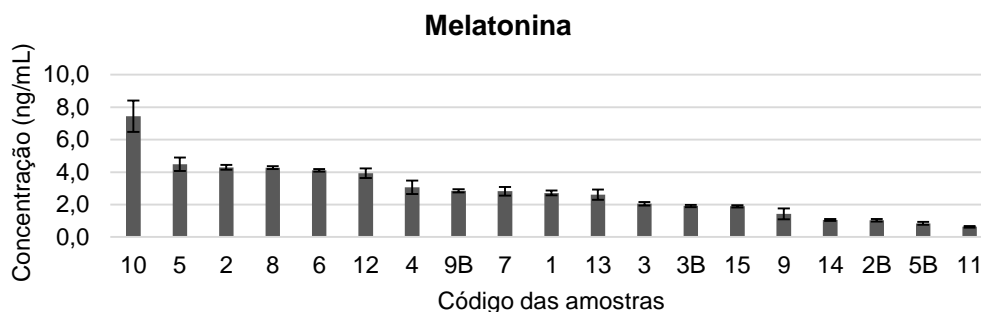
### Trans-resveratrol e melatonina

A partir dos cromatogramas (e.g. Figura 1) quantificou-se os compostos.



**Figura 1.** Cromatograma de vinho tinto monocasta. **A** – *Trans*-resveratrol; **B** – melatonina; **PI** – padrão interno (agomelatina).

Nas Figuras 2 e 3, encontram-se respetivamente as representações gráficas da concentração de MLT e *trans*-RSV nas amostras analisadas. Os resultados encontram-se detalhados na Tabela 1 do Anexo 4.

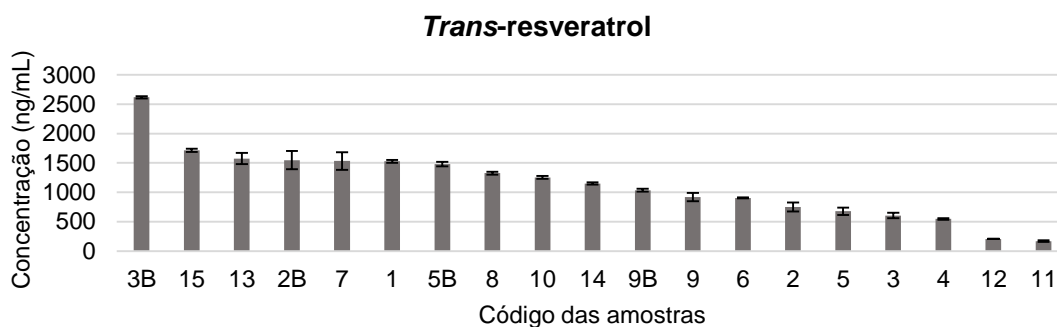


**Figura 2.** Concentração de MLT (ng/mL) nas amostras analisadas. As barras de erro representam o desvio padrão (d.p.) ( $n=2$ ).

Nas amostras analisadas, a concentração de MLT variou entre 0,63 e 7,44 ng/mL, não se observando uma distinção entre vinhos brancos e tintos, embora se verifiquem diferenças ( $p<0,001$ ) entre os dois vinhos brancos. A presença de MLT em vinhos deve-se sobretudo à estirpe e à atividade das leveduras<sup>(25)</sup>, apesar de não ser inequívoco que o conteúdo de MLT nas uvas também influencie<sup>(26)</sup>. Sabe-se que a quantidade de MLT no exocarpo diminui com o amadurecimento, o que não acontece no endocarpo, mesocarpo e sementes<sup>(17)</sup>. Porém, Iriti *et al.*<sup>(27)</sup> refere que os vinhos tintos apresentam um teor de MLT superior ao dos vinhos brancos.

O vinho de casta tinta *Castelão* foi o que apresentou maior teor de MLT ( $p<0,05$ ), na mesma ordem de grandeza dos vinhos tintos descritos por Vitalini *et al.*<sup>(28)</sup> (5,2 e 8,1 ng/mL). As restantes amostras apresentam concentrações inferiores. Vitalini *et al.*<sup>(29)</sup> reporta valores entre 0,05 – 0,62 ng/mL. Concentrações de MLT muito superiores às encontradas estão descritas para vinhos de casta *Syrah* (423,01 e 86,5 ng/mL) e *Cabernet Sauvignon* (74,13 e 14,2 ng/mL)<sup>(4, 30)</sup>, enquanto Stege *et al.*<sup>(31)</sup> reporta 0,32 ng/mL para vinho de casta *Cabernet Sauvignon*.

Para vinhos brancos, Mercolini *et al.*<sup>(7, 32)</sup> reporta concentrações de 0,4 ng/mL e 0,6 ng/mL e Stege *et al.*<sup>(31)</sup> e Vietalini *et al.*<sup>(29)</sup> reportaram 0,16 ng/mL e 0,18 ng/mL, respectivamente. Porém, Rodriguez-Naranjo *et al.*<sup>(30)</sup> descreve uma quantidade de MLT de 390,82 ng/mL, bastante superior à encontrada. Nestes estudos foram utilizados vinhos provenientes de castas diferentes das analisadas.



**Figura 3.** Concentração de *trans*-RSV (ng/mL) nas amostras analisadas. As barras de erro representam o d.p. ( $n=2$ ).

A concentração de *trans*-RSV presente nos vinhos tintos variou entre 547,49 e 2616,04 ng/mL. Para os vinhos brancos obteve-se valores inferiores (169,34 e 208,56 ng/mL), tal como o descrito na literatura<sup>(7, 8, 33, 34)</sup>. Entre os dois vinhos brancos não se verificou diferenças com significado estatístico. No entanto, para vinhos tintos observou-se grande variabilidade, sendo a amostra de casta *Alicante Bouschet* da quinta 1 (3B) a que apresenta um teor superior ( $p<0,05$ ) comparativamente às restantes. A diferença no teor de *trans*-RSV em vinhos tintos e brancos resulta principalmente da fermentação. Na produção do vinho tinto, o exocarpo, parte da uva com maior teor de polifenóis<sup>(7, 35)</sup>, está em contacto com o mosto durante todo o processo fermentativo, possibilitando uma maior extração destes compostos<sup>(10)</sup>, enquanto no vinho branco este é removido<sup>(7, 34)</sup>.

As concentrações encontradas de *trans*-RSV em vinhos brancos estão de acordo com o descrito na literatura, incluindo vinhos portugueses<sup>(7, 29, 36-38)</sup>. Para

vinhos tintos, alguns autores reportam valores na mesma ordem de grandeza dos encontrados no presente trabalho, nomeadamente Baptista *et al.*<sup>(39)</sup> descreve uma concentração média de 1,56 mg/L, Ribeiro de Lima *et al.*<sup>(38)</sup> reporta um intervalo de concentrações entre n.d. – 5,7 mg/L (1,0 mg/L), Paulo *et al.*<sup>(40)</sup> de 0,05 – 10,9 µg/mL e Ratola *et al.*<sup>(37)</sup> de 0,13 – 2,64 mg/L. Quanto a vinhos provenientes de Setúbal, De Revel *et al.*<sup>(33)</sup> descreve uma concentração média de 572 µg/L, valor semelhante ao encontrado neste trabalho para os vinhos tintos com menor teor (3 e 4). Lee *et al.*<sup>(41)</sup> e Cantos Villar *et al.*<sup>(34)</sup> reportam intervalos de concentrações para vinhos de casta *Cabernet Sauvignon* e *Syrah*<sup>(34)</sup> que incluem os valores encontrados nas amostras analisadas. Por outro lado, Gürbüz *et al.*<sup>(36)</sup> e Yoo *et al.*<sup>(42)</sup> reportam respetivamente, teores inferiores (0,311 mg/L) e superiores (1,07 – 6,66 mg/L), aos encontrados para vinhos de casta *Cabernet Sauvignon*.

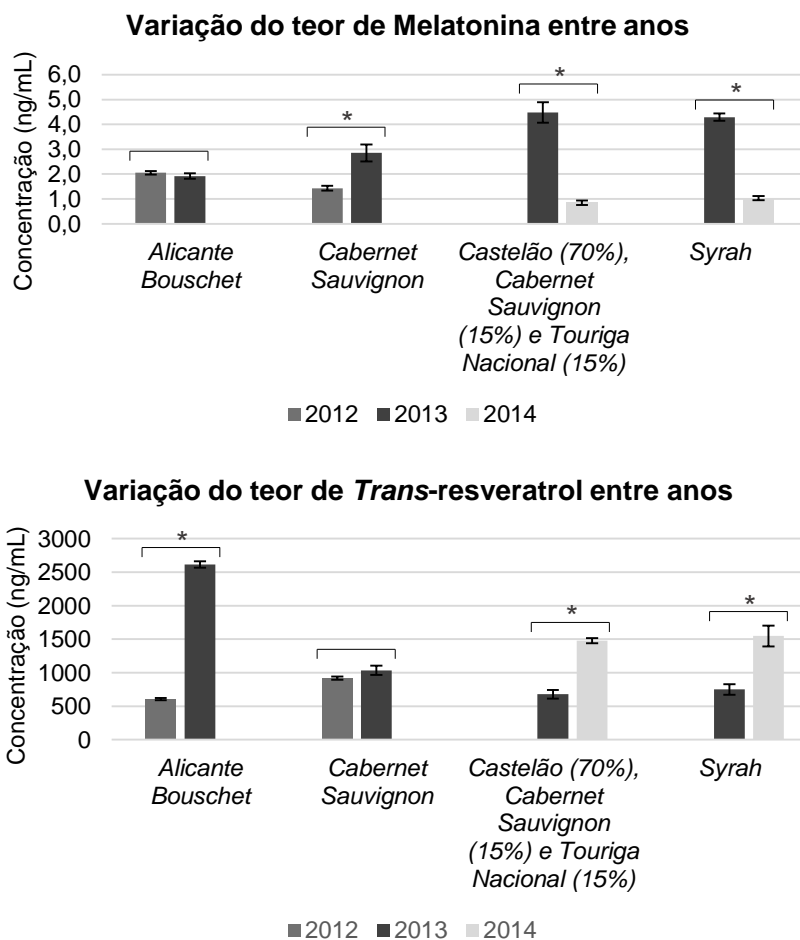
Averiguou-se uma possível correlação entre os teores de MLT e de *trans*-RSV, no entanto, esta não parece existir.

Com o intuito de perceber a variação interanual do teor de MLT e *trans*-RSV, foi comparado o teor destes compostos entre amostras produzidas com a(s) mesma(s) casta(s), pela mesma quinta, mas em anos diferentes (Figura 4).

No que concerne à MLT, verificou-se que na amostra de casta *Alicante Bouschet* não houve uma redução significativa de 2012 para 2013, contrariamente à amostra de casta *Cabernet Sauvignon* que sofreu um aumento significativo da concentração de MLT ( $p=0,016$ ). De 2013 para 2014, observou-se uma redução significativa de MLT ( $p<0,001$ ) em ambas as amostras analisadas, para cerca de 5 vezes na amostra multicasta e de 4 vezes para a monocasta.

Relativamente à variação do teor de *trans*-RSV, o que se verificou foi um aumento de 2012 para 2013, sendo que para a amostra de casta *Alicante Bouschet*

esse aumento foi de 4 vezes ( $p < 0,001$ ). Entre 2013 e 2014, verificou-se igualmente um incremento significativo ( $p < 0,001$ ) para cerca do dobro em ambas as amostras.



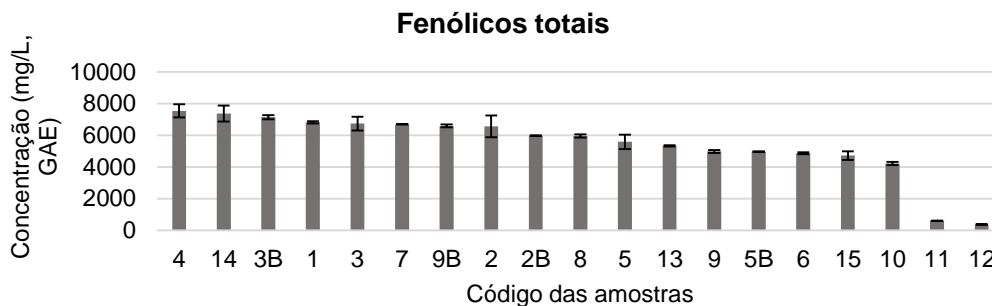
**Figura 4.** Varição interanual da concentração de MLT e *trans*-RSV em 4 vinhos. As barras de erro representam o d.p. ( $n=4$ ). Diferenças com significado estatístico estão representadas por \* ( $p < 0,05$ ).

Assim, verifica-se que existe variabilidade interanual nos teores de MLT e *trans*-RSV nestes vinhos, e conseqüentemente na sua composição química.

#### Fenólicos totais e atividade antioxidante

Em concordância com as propriedades antioxidantes que estão amplamente associadas aos polifenóis e à correlação positiva, que é de esperar existir, entre fenólicos totais e AA<sup>(7, 34, 42-45)</sup>, confirma-se igualmente neste trabalho uma correlação altamente significativa entre o ensaio de fenólicos totais com os ensaios de ABTS<sup>••</sup> ( $r=0,812$ ,  $p < 0,001$ ) e do DPPH<sup>•</sup> ( $r=0,872$ ,  $p < 0,001$ ).

Nas Figuras 5 e 6, encontram-se respetivamente as representações gráficas do teor de fenólicos totais e da AA associada a cada amostra analisada. Nas Tabelas 3 e 4 do Anexo 4, encontram-se detalhados os resultados obtidos.



**Figura 5.** Concentração de fenólicos totais (em mg/L, GAE) nas amostras analisadas. As barras de erro representam o d.p. ( $n=4$ ).

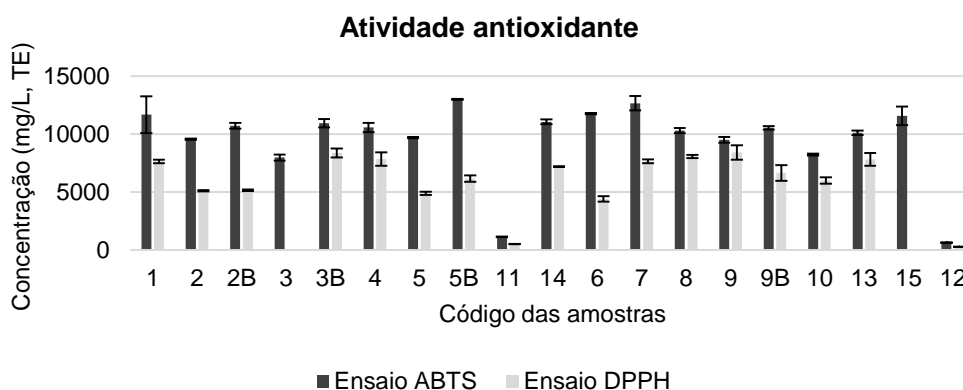
O menor teor de compostos fenólicos totais foi observado nos vinhos brancos, apresentando um valor médio de 481,95 mg/L. Os vinhos tintos apresentaram uma concentração média de 6005,85 mg/L, com um intervalo de valores entre 4229,67 - 7542,21 mg/L, sendo a amostra da quinta 1 de casta *Cabernet Sauvignon* (4) a que detém maior quantidade. Estes resultados vão de encontro ao descrito na literatura, onde claramente se verificam teores superiores de fenólicos totais em vinhos tintos<sup>(7, 42-44, 46)</sup>. Tal como para o *trans*-RSV, a diferença resulta principalmente da forma como é realizada a fermentação<sup>(7, 35)</sup>.

Para vinhos brancos, Vitalini *et al.*<sup>(29)</sup> descreve uma concentração média de 0,63 g/L, um pouco superior às descritas por Paixão *et al.*<sup>(44)</sup> (282 – 434 mg/L), encontrando-se os resultados obtidos na mesma ordem de grandeza. Relativamente aos vinhos tintos, o conteúdo encontrado é superior ao descrito na literatura, onde Vitalini *et al.*<sup>(29)</sup> e Ivanova-Petropolis *et al.*<sup>(47)</sup> descrevem respetivamente, valores médios de 2,25 g/L e de 2037 mg/L e Paixão *et al.*<sup>(44)</sup> um intervalo de valores entre 1827 – 1936 mg/L. Para vinhos de casta *Cabernet Sauvignon*, os vários valores descritos são inferiores aos encontrados, com valores

médios de 1386 mg/L e 2382 mg/L e um intervalo entre 1417,14 – 3944,3 mg/L<sup>(42, 43, 48, 49)</sup>.

A variabilidade encontrada no teor de *trans*-RSV, MLT e fenólicos totais, prende-se principalmente com os fatores mencionados anteriormente. Porém, outros fatores como a casta, condições agrometeorológicas, tratamento dos cultivares, estado de maturação do fruto, infecções patogénicas e os processos enológicos, também podem justificar esta variabilidade<sup>(29, 44, 46)</sup>. A escolha de vinhos da mesma região vitivinícola permite atenuar a influência da localização geográfica e do tipo de solo como fatores adicionais para a variabilidade encontrada.

São várias as técnicas utilizadas para avaliar a AA em matrizes alimentares, entre as quais os ensaios de ABTS\* e do DPPH\*. Como seria de esperar, verificou-se a existência de uma correlação altamente significativa entre estes ensaios ( $r=0,816$ ,  $p<0,001$ ). Porém, de acordo com o que está descrito, o ensaio de ABTS\* estima de forma mais precisa a AA, nomeadamente em alimentos de origem vegetal com compostos antioxidantes pigmentados, hidrofílicos e lipofílicos<sup>(24, 50)</sup>.



**Figura 6.** AA (mg/L, TE) das amostras analisadas. As barras de erro representam o d.p. ( $n=4$ ).

Para ambos os ensaios, as amostras com menor AA *in vitro*, correspondem às de vinho branco. Com o ensaio de ABTS\*, a amostra da mistura de castas

*Castelão*, *Cabernet Sauvignon* e *Touriga Nacional* da quinta 1 (5B) é a que detém maior AA. Com o ensaio do DPPH\*, é a amostra de casta *Cabernet Sauvignon* da quinta 2 (9B). A Tabela 4 sumariza o intervalo de valores e o valor médio obtidos, em cada ensaio, para os vinhos brancos e tintos.

**Tabela 4.** Intervalo de valores e valor médio da atividade antioxidante para vinhos brancos e tintos.

		Ensaio ABTS*		Ensaio DPPH*	
		Média	Mínimo – Máximo	Média	Mínimo – Máximo
<b>Vinhos brancos</b>	mg/L	886,55	637,51 – 1135,58	394,49	273,66 – 515,31
	µM	3444,21	2531,62 – 4536,79	1576,09	1093,35 – 2058,82
<b>Vinhos tintos</b>	mg/L	10582,32	7972,85 – 13000,15	6786,31	4404,07 – 8859,96
	µM	42080,83	31939,77 – 51938,36	26603,72	15155,71 – 33633,82

Com o ensaio de ABTS\*, Magalhães *et al.*<sup>(24)</sup> descreve para vinhos brancos valores na mesma ordem de grandeza (3,19 – 6,4 mM, TE) dos encontrados, enquanto Vitalini *et al.*<sup>(29)</sup> reporta valores inferiores (0,13 mM, TE). Para vinhos tintos a mesma tendência é observada com este ensaio, Magalhães *et al.*<sup>(24)</sup> descreve valores na mesma ordem de grandeza (11,64 – 18,88 mM, TE) enquanto Vitalini *et al.*<sup>(29)</sup> e Cristino *et al.*<sup>(51)</sup> reportam valores inferiores, respetivamente de 10,37 mM, TE e 11,64 – 18,88 mM, TE. Para o ensaio do DPPH\* em vinhos tintos, Cristino *et al.*<sup>(51)</sup> descreve valores inferiores (8,02 – 23,32 mM, TE) aos encontrados.

Ginjom *et al.*<sup>(43)</sup> descreve valores de AA para vinhos de casta *Cabernet Sauvignon* inferiores aos encontrados, quer no ensaio de ABTS\* (18,85 mM, TE) quer no do DPPH\* (15,90 mM, TE). Também Yoo *et al.*<sup>(42)</sup> reporta valores de AA inferiores para vinhos da mesma casta com o ensaio do DPPH\*. Para vinhos de casta *Syrah*, Ivanova-Petropolis *et al.*<sup>(47)</sup> reporta valores de AA, obtidos com o ensaio do DPPH\*, inferiores (104 mg/L, TE) aos encontrados.

#### Atividade antioxidante e compostos bioativos

Observa-se a existência de uma correlação altamente significativa entre a

AA e o *trans*-RSV ( $r_{ABTS^{**}}=0,652$ ,  $p<0,001$ ;  $r_{DPPH^{*}}=0,671$ ,  $p<0,001$ ), ao contrário da MLT, para a qual não se verifica qualquer correlação. Apesar do *trans*-RSV apresentar uma correlação positiva com a AA, há referência na literatura que outros compostos fenólicos presentes em maior quantidade, são os principais responsáveis pelas propriedades antioxidantes do vinho, como as antocianinas<sup>(52)</sup>, particularmente em vinhos tintos jovens<sup>(53)</sup>, os taninos nomeadamente em vinhos brancos e tintos velhos<sup>(53)</sup> e o ácido gálico e o cafeico<sup>(35, 54)</sup>.

### **Conclusões**

Este é o primeiro estudo que quantificou simultaneamente MLT e *trans*-RSV em vinhos portugueses, com especial ênfase para os monocasta.

Foi possível diferenciar o teor de *trans*-RSV, fenólicos totais e AA entre vinhos tintos e vinhos brancos, contrariamente ao que se verificou com a MLT. A explicação provável para o encontrado, prende-se com a origem distinta de *trans*-RSV, fenólicos totais e MLT em vinhos. Observou-se uma variabilidade nos parâmetros analisados entre castas e anos. Contudo, não é possível afirmar que o fator *casta* seja o responsável pelas diferenças encontradas, dada a multiplicidade de fatores com influência nos parâmetros analisados.

Este estudo quantitativo permitiu contribuir para o conhecimento analítico destes compostos num produto mediterrânico e que é consumido largamente pela população portuguesa. Importa denotar que o estudo isolado dos compostos *in vitro* não estabelece uma relação direta com os efeitos benéficos descritos na literatura para o vinho, *trans*-RSV e MLT. A alimentação é constituída por matrizes alimentares complexas e a influência que esta exerce sobre o organismo depende da interação entre alimentos, entre os compostos de cada alimento e dos processos que afetam a biodisponibilidade dos mesmos.

## Referências Bibliográficas

1. Shen J, Wilmot KA, Ghasemzadeh N, Molloy DL, Burkman G, Mekonnen G, et al. Mediterranean Dietary Patterns and Cardiovascular Health. *Annual review of nutrition*. 2015; 35:425-49.
2. Iriti M, Varoni EM. Melatonin in Mediterranean diet, a new perspective [Short Survey]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015; 95(12):2355-59.
3. Dinu M, Pagliai G, Casini A, Sofi F. Mediterranean diet and multiple health outcomes: an umbrella review of meta-analyses of observational studies and randomised trials. *European journal of clinical nutrition*. 2017
4. Rodriguez-Naranjo MI, Gil-Izquierdo A, Troncoso AM, Cantos-Villar E, Garcia-Parrilla MC. Melatonin is synthesised by yeast during alcoholic fermentation in wines. *Food Chem*. 2011; 126(4):1608-13.
5. Giacosa A, Barale R, Bavaresco L, Faliva MA, Gerbi V, La Vecchia C, et al. Mediterranean Way of Drinking and Longevity. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2016; 56(4):635-40.
6. Gresele P, Cerletti C, Guglielmini G, Pignatelli P, de Gaetano G, Violi F. Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2011; 22(3):201-11.
7. Mercolini L, Addolorata Saracino M, Bugamelli F, Ferranti A, Malaguti M, Hrelia S, et al. HPLC-F analysis of melatonin and resveratrol isomers in wine using an SPE procedure. *Journal of separation science*. 2008; 31(6-7):1007-14.
8. Weiskirchen S, Weiskirchen R. Resveratrol: How Much Wine Do You Have to Drink to Stay Healthy? *Advances in nutrition (Bethesda, Md)*. 2016; 7(4):706-18.
9. Huang X, Mazza G. Simultaneous analysis of serotonin, melatonin, piceid and resveratrol in fruits using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*. 2011; 1218(25):3890-9.
10. Fernández-Mar MI, Mateos R, García-Parrilla MC, Puertas B, Cantos-Villar E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chemistry*. 2012; 130(4):797-813.
11. Artero A, Artero A, Tarín JJ, Cano A. The impact of moderate wine consumption on health. *Maturitas*. 2015; 80(1):3-13.

12. Gambini J, Ingles M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, et al. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015; 2015:837042.
13. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature reviews Drug discovery*. 2006; 5(6):493-506.
14. Hurst WJ, Glinski JA, Miller KB, Apgar J, Davey MH, Stuart DA. Survey of the trans-resveratrol and trans-piceid content of cocoa-containing and chocolate products. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008; 56(18):8374-8.
15. Korkmaz A, Değer Ö, Cuci Y. Profiling the melatonin content in organs of the pepper plant during different growth stages. *Scientia Horticulturae*. 2014; 172:242-47.
16. Iriti M, Vitalini S. Health-Promoting Effects of Traditional Mediterranean Diets - A Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2012. [citado em: 2017-07-06t16:10:56.213+02:00].  
71. Disponível em: [//www.degruyter.com/view/j/pjfn.2012.62.issue-2/v10222-011-0047-z/v10222-011-0047-z.xml](http://www.degruyter.com/view/j/pjfn.2012.62.issue-2/v10222-011-0047-z/v10222-011-0047-z.xml).
17. Feng X, Wang M, Zhao Y, Han P, Dai Y. Melatonin from different fruit sources, functional roles, and analytical methods. *Trends in Food Science & Technology*. 2014; 37(1):21-31.
18. Reiter RJ, Tan DX, Burkhardt S, Manchester LC. Melatonin in plants. *Nutrition reviews*. 2001; 59(9):286-90.
19. Maldonado MD, Moreno H, Calvo JR. Melatonin present in beer contributes to increase the levels of melatonin and antioxidant capacity of the human serum. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 2009; 28(2):188-91.
20. Fernandez-Pachon MS, Medina S, Herrero-Martin G, Cerrillo I, Berna G, Escudero-Lopez B, et al. Alcoholic fermentation induces melatonin synthesis in orange juice. *Journal of pineal research*. 2014; 56(1):31-8.
21. Cutando A, Lopez-Valverde A, Arias-Santiago S, J DEV, RG DED. Role of melatonin in cancer treatment. *Anticancer research*. 2012; 32(7):2747-53.
22. Sierra R. Concentrations and Profiles of Melatonin and Serotonin in Fruits and Vegetables during Fruit Ripening: A Mini-Review. *Nature Precedings*. 2010

23. Viegas O, Carones, C., Melo, A., Ferreira, IMPLVO. Simultaneous determination of melatonin and trans-resveratrol in wines using dispersive liquid-liquid microextraction (submitted). 2017
24. Magalhães LM, Barreiros L, Reis S, Segundo MA. Kinetic matching approach applied to ABTS assay for high-throughput determination of total antioxidant capacity of food products. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2014; 33(2):187-94.
25. Vigentini I, Gardana C, Fracassetti D, Gabrielli M, Foschino R, Simonetti P, et al. Yeast contribution to melatonin, melatonin isomers and tryptophan ethyl ester during alcoholic fermentation of grape musts. *Journal of pineal research*. 2015; 58(4):388-96.
26. Meng JF, Shi TC, Song S, Zhang ZW, Fang YL. Melatonin in grapes and grape-related foodstuffs: A review [Review]. *Food Chemistry*. 2017; 231:185-91.
27. Iriti M, Varoni EM, Vitalini S. Melatonin in traditional Mediterranean diets. *Journal Of Pineal Research*. 2010; 49(2):101-05.
28. Vitalini S, Gardana C, Zanzotto A, Fico G, Faoro F, Simonetti P, et al. From vineyard to glass: agrochemicals enhance the melatonin and total polyphenol contents and antiradical activity of red wines. *J Pineal Res*. 2011; 51(3):278-85.
29. Vitalini S, Gardana C, Simonetti P, Fico G, Iriti M. Melatonin, melatonin isomers and stilbenes in Italian traditional grape products and their antiradical capacity. *Journal of pineal research*. 2013; 54(3):322-33.
30. Rodriguez-Naranjo MI, Gil-Izquierdo A, Troncoso AM, Cantos E, Garcia-Parrilla MC. Melatonin: A new bioactive compound in wine. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011; 24(4–5):603-08.
31. Stege PW, Sombra LL, Messina G, Martinez LD, Silva MF. Determination of melatonin in wine and plant extracts by capillary electrochromatography with immobilized carboxylic multi-walled carbon nanotubes as stationary phase. *Electrophoresis*. 2010; 31(13):2242-8.
32. Mercolini L, Mandrioli R, Raggi MA. Content of melatonin and other antioxidants in grape-related foodstuffs: measurement using a MEPS-HPLC-F method. *J Pineal Res*. 2012; 53(1):21-8.
33. de Revel G, Hogg, T., Santos, C. Analyse du cis-et trans-resveratrol dans les vins produits au portugal. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*. 1996; 30:31-37.

34. Cantos Villar E, Fernández-Mar MI, García-Parrilla MC, Mateos R, Puertas B. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. 2012
35. Agatonovic-Kustrin S, Morton DW, Yusof AP. Development and validation of a simple high performance thin layer chromatography method combined with direct 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl assay to quantify free radical scavenging activity in wine. *Food chemistry*. 2016; 197(Pt A):285-90.
36. Gürbüz O, Göçmen D, Dagdelen F, Gürsoy M, Aydın S, Şahin İ, et al. Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*. 2007; 100(2):518-25.
37. Ratola N, Faria, J. L., Alves, A. . Analysis and Quantification of trans-Resveratrol in Wines from Alentejo Region (Portugal). *Food Technology and Biotechnology*. 2004
38. Ribeiro de Lima MT, Waffo-Teguo P, Teissedre PL, Pujolas A, Vercauteren J, Cabanis JC, et al. Determination of stilbenes (trans-astringin, cis- and trans-piceid, and cis- and trans-resveratrol) in Portuguese wines. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1999; 47(7):2666-70.
39. Baptista JAB, Tavares JFdP, Carvalho RCB. Comparison of polyphenols and aroma in red wines from Portuguese mainland versus Azores Islands. *Food Research International*. 2001; 34(4):345-55.
40. Paulo L, Domingues F, Queiroz JA, Gallardo E. Development and validation of an analytical method for the determination of trans- and cis-resveratrol in wine: analysis of its contents in 186 Portuguese red wines. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011; 59(6):2157-68.
41. Lee J, Rennaker C. Antioxidant capacity and stilbene contents of wines produced in the Snake River Valley of Idaho. *Food Chemistry*. 2007; 105(1):195-203.
42. Yoo YJ, Prenzler PD, Saliba AJ, Ryan D. Assessment of some Australian red wines for price, phenolic content, antioxidant activity, and vintage in relation to functional food prospects. *Journal of food science*. 2011; 76(9):C1355-64.
43. Ginjom IR, D'Arcy BR, Caffin NA, Gidley MJ. Phenolic contents and antioxidant activities of major Australian red wines throughout the winemaking process. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010; 58(18):10133-42.
44. Paixão N, Perestrelo R, Marques JC, Câmara JS. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*. 2007; 105(1):204-14.

45. Barros A, Gironés-Vilaplana A, Teixeira A, Collado-González J, Moreno DA, Gil-Izquierdo A, et al. Evaluation of grape (*Vitis vinifera* L.) stems from Portuguese varieties as a resource of (poly)phenolic compounds: A comparative study. *Food Research International*. 2014; 65, Part C:375-84.
46. Bravo MN, Silva S, Coelho AV, Boas LV, Bronze MR. Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. *Analytica Chimica Acta*. 2006; 563(1):84-92.
47. Ivanova-Petropulos V, Ricci A, Nedelkovski D, Dimovska V, Parpinello GP, Versari A. Targeted analysis of bioactive phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines. *Food Chemistry*. 2015; 171:412-20.
48. Monagas M, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. *Food Chemistry*. 2006; 95(3):405-12.
49. Fanzone M, Peña-Neira A, Gil M, Jofré V, Assof M, Zamora F. Impact of phenolic and polysaccharidic composition on commercial value of Argentinean Malbec and Cabernet Sauvignon wines. *Food Research International*. 2012; 45(1):402-14.
50. Floegel A, Kim D-O, Chung S-J, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011; 24(7):1043-48.
51. Cristino R, Costa E, Cosme F, Jordao AM. General phenolic characterisation, individual anthocyanin and antioxidant capacity of matured red wines from two Portuguese Appellations of Origins. *Journal of the science of food and agriculture*. 2013; 93(10):2486-93.
52. Tedesco I, Luigi Russo G, Nazzaro F, Russo M, Palumbo R. Antioxidant effect of red wine anthocyanins in normal and catalase-inactive human erythrocytes. *J Nutr Biochem*. 2001; 12(9):505-11.
53. Tubaro F, Rapuzzi P, Ursini F. Kinetic analysis of antioxidant capacity of wine. *BioFactors* (Oxford, England). 1999; 9(1):37-47.
54. Xiang L, Xiao L, Wang Y, Li H, Huang Z, He X. Health benefits of wine: don't expect resveratrol too much. *Food chemistry*. 2014; 156:258-63.
55. educação K. Simulado de vestibular Klick educação; 2009.

56. Talebianpoor MS, Khodadoust S, Rozbehi A, Akbartabar Toori M, Zoladl M, Ghaedi M, et al. Application of optimized dispersive liquid–liquid microextraction for determination of melatonin by HPLC–UV in plasma samples. *Journal of Chromatography B*. 2014; 960:1-7.
57. Bravo MN, Feliciano R, Silva S, Coelho AV, Vilas Boas L, Bronze MR. Analysis of trans-resveratrol: Comparison of methods and contents in Muscatel fortified wines from Setúbal region in Portugal. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008; 21(8):634-43.
58. García-López M, Rodríguez I, Cela R. Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for organophosphorus flame retardants and plasticizers determination in water samples. *Journal of Chromatography A*. 2007; 1166(1–2):9-15.
59. Rezaee M, Yamini Y, Faraji M. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. *Journal of Chromatography A*. 2010; 1217(16):2342-57.
60. Konieczna L, Roszkowska A, Niedzwiecki M, Baczek T. Hydrophilic interaction chromatography combined with dispersive liquid-liquid microextraction as a preconcentration tool for the simultaneous determination of the panel of underivatized neurotransmitters in human urine samples. *Journal of chromatography A*. 2016; 1431:111-21.
61. Campone L, Piccinelli AL, Celano R, Rastrelli L. pH-controlled dispersive liquid–liquid microextraction for the analysis of ionisable compounds in complex matrices: Case study of ochratoxin A in cereals. *Analytica Chimica Acta*. 2012; 754:61-66.
62. Huang X, Mazza G. Application of LC and LC-MS to the analysis of melatonin and serotonin in edible plants. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2011; 51(4):269-84.
63. Garcia-Parrilla MC, Cantos E, Troncoso AM. Analysis of melatonin in foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2009; 22(3):177-83.
64. Van Tassel DL, Roberts N, Lewy A, O'Neill SD. Melatonin in plant organs. *J Pineal Res*. 2001; 31(1):8-15.
65. Johns NP, Johns J, Porasuphatana S, Plaimée P, Sae-Teaw M. Dietary intake of melatonin from tropical fruit altered urinary excretion of 6-sulfatoxymelatonin in healthy volunteers. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013; 61(4):913-9.
66. Feng X, Wang M, Zhao Y, Han P, Dai Y. Melatonin from different fruit sources, functional roles, and analytical methods [Review]. *Trends in Food Science and Technology*. 2014; 37(1):21-31.

67. Magalhães LM, Barreiros L, Maia MA, Reis S, Segundo MA. Rapid assessment of endpoint antioxidant capacity of red wines through microchemical methods using a kinetic matching approach. *Talanta*. 2012; 97:473-83.
68. Viegas O, Amaro LF, Ferreira IM, Pinho O. Inhibitory effect of antioxidant-rich marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines in pan-fried beef. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2012; 60(24):6235-40.

## Anexo 1

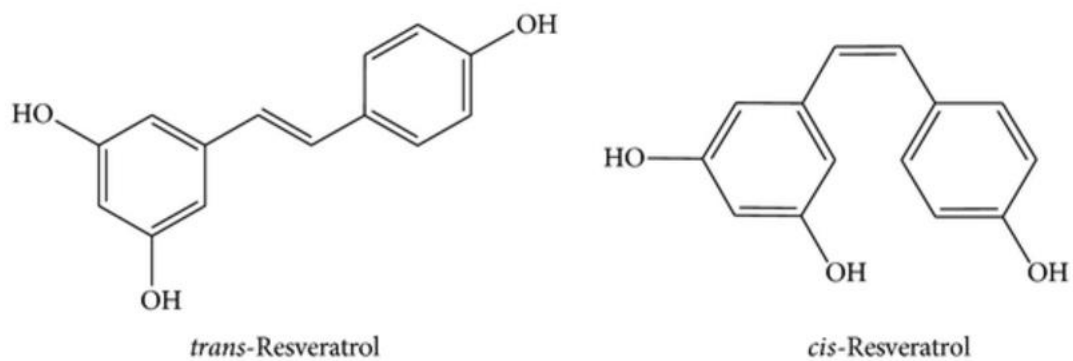


Figura 1. Estrutura química do *trans*-resveratrol e do *cis*-resveratrol<sup>(12)</sup>.

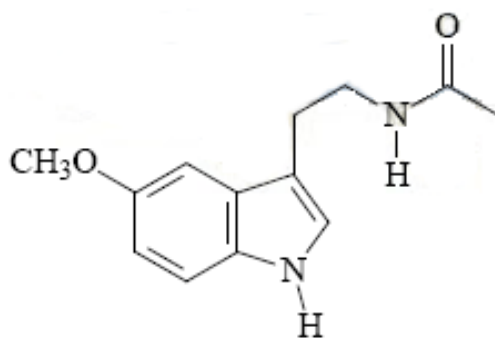


Figura 2. Estrutura química da melatonina<sup>(55)</sup>.

## **Métodos de extração**

Os vinhos são matrizes complexas pelo que uma etapa prévia de preparação das amostras é fundamental para se obter um extrato mais puro. As técnicas mais utilizadas para a limpeza (*clean-up*) e/ou pré concentração da MLT e do *trans*-RSV em vinho têm sido descritas, sendo predominantemente as extrações mais clássicas a líquido-líquido (LLE), em fase sólida (SPE) e mais recentemente a microextração em seringa empacotada (MEPS) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)<sup>(7, 32, 56-58)</sup>.

### ***Microextração líquido-líquido dispersiva***

É uma técnica de extração relativamente recente e corresponde a uma miniaturização da LLE<sup>(58)</sup>. A DLLME assenta num sistema ternário de solventes (fase aquosa com a amostra, solvente dispersor e solvente extrator) e consiste no equilíbrio de partição dos analitos entre a fase aquosa e o solvente extrator<sup>(58)</sup>. Compreende duas etapas sucessivas: na primeira, introduz-se o solvente dispersor e extrator na fase aquosa. O solvente extrator dispersa-se na fase aquosa, formando pequenas gotículas (*cloudy solution*) que permite aumentar a superfície de contacto entre as duas fases, facilitando um rápido estabelecimento do estado de equilíbrio. Na segunda etapa, procede-se à centrifugação da mistura provocando a separação da fase aquosa da orgânica, recolhendo por fim, a gota (fase orgânica depositada no fundo do tubo) que contém os analitos<sup>(59)</sup>.

As vantagens desta técnica são a simplicidade de operação, rapidez, baixo custo dado não necessitar de fases sólidas e requerer menor volume de solventes orgânicos, com menor impacto ambiental, elevada recuperação e elevado fator de pré-concentração.

A eficiência da extração é determinada pelo tipo e volume de solvente extrator e dispersor, tempo de extração e quantidade de sal adicionado. O solvente extrator deve ter as seguintes características: maior densidade relativamente à água, baixa solubilidade na fase aquosa e grande afinidade para os analitos a extrair<sup>(60)</sup>. A miscibilidade entre solvente extrator e dispersor é igualmente importante, para que a superfície de contacto seja maximizada entre os solventes conseguindo-se assim, uma extração mais eficiente<sup>(58)</sup>.

O sal serve para aumentar a força iónica da solução, algo que determina uma diminuição da solubilidade dos analitos e do solvente extrator na fase aquosa, favorecendo assim, a passagem dos compostos para a fase orgânica<sup>(58)</sup>.

O pH da fase aquosa é um parâmetro com influência na eficiência da extração de compostos ionizáveis, ou seja, compostos com maior solubilidade em água quando estão na forma ionizada do que na fase orgânica, o que compromete a transferência destes para o solvente extrator<sup>(61)</sup>.

### **Métodos analíticos utilizados na determinação de MLT e *trans*-RSV em vinhos**

A análise da MLT em plantas edíveis ou nos seus derivados reveste-se de grandes dificuldades. A quantidade presente habitualmente é muito baixa (inferior a  $\mu\text{g/g}$ ), necessitando de métodos muito sensíveis, por outro lado a escolha de um método de extração com recuperações completas e precisas é difícil, devido principalmente ao seu carácter anfipático. A estabilidade da MLT está relacionada com a sua atividade, que sendo antioxidante reage facilmente<sup>(62, 63)</sup>.

A deteção da MLT pode ser feita com recurso a métodos com sensibilidade e especificidade distintas. Nas Tabelas 1 e 2, encontram-se descritos os métodos analíticos frequentemente utilizados na determinação dos compostos bioativos em

estudo e a síntese de alguns estudos com quantificação dos mesmos, respetivamente.

**Tabela 1.** Síntese dos métodos analíticos utilizados para determinação da MLT e/ou do *trans*-RSV.

Técnicas imunológicas	
	Notas
Radioimunoensaios (RIA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Possível sobre quantificação do analito;</li> <li>• Possíveis falsos positivos; <i>Como consequência da presença de compostos com reatividade cruzada para anticorpos anti melatonina</i><sup>(64)</sup></li> </ul>
Ensaio imunoabsorção enzimática (ELISA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilizado para identificação e quantificação da MLT;</li> <li>• Pode haver reatividade cruzada com compostos estruturalmente semelhantes – contudo esta é baixa;</li> <li>• Pode ser aplicado depois do HPLC para averiguar a possibilidade de ter ocorrido co eluição com outro composto com o mesmo tempo de retenção<sup>(65)</sup>.</li> </ul>
Métodos cromatográficos – os mais utilizados para determinação da MLT e <i>trans</i> -RSV	
	Notas
Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GS-MS)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Método sensível e específico;</li> <li>• Possibilita a confirmação da identidade dos analitos;</li> <li>• Desvantagem: Derivatização prévia, aumentando a duração do procedimento e, devido às altas temperaturas, pode provocar a isomerização e degradação do <i>trans</i>-RSV<sup>(40, 63)</sup>.</li> </ul>
Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Com detetor eletroquímico (HPLC-EDC);</li> <li>• Com detetor de fluorescência (HPLC-FD);</li> <li>• Espectrometria de massa (HPLC-MS); <i>Têm sido utilizados para deteção dos dois analitos</i><sup>(7, 66)</sup></li> <li>• Com detetor de diodos (HPLC-DAD); <i>Utilizado para deteção do <i>trans</i>-RSV</i><sup>(7)</sup></li> <li>• <u>Vantagem</u>: Métodos mais económicos e eficientes no tempo<sup>(56)</sup>.</li> </ul>

**Tabela 2.** Métodos para determinação de MLT e *trans*-RSV e respectivas concentrações em amostras de vinhos.

Composto	Vinho	Método de extração	Técnica cromatográfica	Coluna	Fase móvel e eluição	Deteção	Concentração	Referência bibliográfica
<b>Melatonina</b>	Albana	MEPS	HPLC-FD	Coluna C8, com pré-coluna C8	Mistura de acetonitrilo (20%, v/v) e tampão fosfato (80%, v/v), pH 3,0; Fase reversa;	$\lambda_{exc}$ 298 nm $\lambda_{em}$ 386 nm	0,6 ng/mL	(32)
	Trebbiano (branco); Sangiovese (tinto)	SPE com coluna C18	HPLC-FD	Coluna RP C8 com pré-coluna C8	Mistura de acetonitrilo (21%, v/v) e tampão fosfato pH 3, contendo 0,2% de trietilamina (79%, v/v)	$\lambda_{exc}$ 298 nm $\lambda_{em}$ 386 nm	0,4; 0,5 ng/mL	(7)
	Groppello DOC, Melag DOC, Nebbiolo IGT, Terre di Rubinoro DOCG, Syrah IGT (tinto monocasta) Placido Rizzotto IGT, La Segreta IGT (tinto multicasta) Chaudelune – Vin de glace DOC (branco)	SPE	UPLC-MS/MS e UPLC-HR-MS	Coluna BEH C18	<i>Eluente A</i> - 0,05% TFA; <i>Eluente B</i> - 0,05% TFA em acetonitrilo; 0,55 mL/min	<b>UPLC-MS/MS</b> VC: 3,5kV; CV: 16V e Elab - específica para cada transição. Toda a informação das massas foi obtida no modo de ião positivo. T. da fonte - 130°C e T. de dessolvatação -350°C. O argon foi utilizado para	0,05-0,62 ng/mL	(29)

					<p>aumentar a fragmentação na célula de colisão.</p> <p><b>UPLC-HR-MS</b></p> <p>VC do <i>eletrospray</i> - 3,5Kv; voltagem do <i>skimmer</i> - 20V; Dessolvatação - fluxo contracorrente de azoto gasoso (150°C). O árgon foi utilizado para aumentar a fragmentação</p>		
Groppello, Merlot	-----	UPLC-MS/MS	Coluna BEH C18	<p>Gradiente linear de eluição:  <i>Eluente A</i> – 0,05% TFA;  <i>Eluente B</i> – 0,05% TFA em acetonitrilo;  0,5 mL/min;  A coluna foi mantida a 60°C</p>	<p>VC - 3kV;  CV – 16 Ev  E. colisão – 14Ev;  T. fonte - 130°C;  T. dessolvatação - 350°C.  O árgon foi utilizado para aumentar a fragmentação na célula de colisão</p>	5,2-8,1 ng/mL	(28)

	Branco e tintos	Ultrassonificação	Electrocromatografia capilar	-----	-----	-----	0,16-0,32 ng/mL	(31)
	Cabernet Sauvignon, Jaen Tinto, Merlot, Palomino Negro, Petit Verdot, Prieto Picudo, Syrah and Tempranillo	SPE	HPLC-FD	Coluna C18	Ácido fórmico/água 0,1% (A) e metanol (B), com 40% A e 60% B; Fluxo isocrático 0,8mL/min (9 min.)	$\lambda_{exc}$ 285 nm $\lambda_{em}$ 345 nm	<i>nq</i>	(30)
		-----	HPLC-ESI-MS/MS				5,1-129,5 ng/mL	
		SPE	ELISA				0,14-0,28 ng/mL	
<b>Trans-resveratrol</b>	Groppello DOC, Melag DOC, Nebbiolo IGT, Terre di Rubinoro DOCG, Syrah IGT (Tinto monocasta) Placido Rizzotto IGT, La Segreta IGT (Tinto multicasta) Chaudelune – Vin de glace DOC (Branco)	SPE	UPLC-MS/MS	Coluna BEH C18	Gradiente linear de eluição: Eluente A – 0,1% ácido fórmico; Eluente B – 0,1% ácido fórmico em acetonitrilo; 0,55mL/min	Modo de ião negativo – Obtenção dados de massas; T. fonte - 130°C; T. dessolvatação - 350°C. O argon foi utilizado para aumentar a fragmentação na célula de colisão	0,10-0,33 ng/mL (monocasta) 0,22;0,14 ng/mL (multicasta) <i>nq</i> (branco)	(29)
	Trebbiano (branco); Sangiovese (tinto)	SPE com coluna C18	HPLC-FD	Coluna RP C8 com pré-coluna C8	Mistura de acetonitrilo (21%, v/v) e tampão fosfato pH 3, contendo	$\lambda_{exc}$ 298 nm $\lambda_{em}$ 386 nm	153 ng/mL; 210 ng/mL	(7)

				0,2% de trietilamina (79%, v/v)			
Albana	MEPS	HPLC-FD	Coluna C8, com pré-coluna C8	Mistura de acetonitrilo (20%, v/v) e tampão fosfato (80%, v/v), pH 3,0; Fase reversa;	$\lambda_{exc}$ 298 nm $\lambda_{em}$ 386 nm	0,220 ng/mL	(32)
Kalecikkarasi, Çalkarasa, Bogazkere, Cabernet Sauvignon, Cinsaut, Merlot, Okuzgozu, Merlot (Tinto)				<b>Eluente A</b> - 9% acetonitrilo, 91% (5%: solução aquosa de ácido acético) (v/v); <b>Eluente B</b> - 25% acetonitrilo, 75% (5%: sol. aquosa de ácido acético) (v/v); <b>Eluente C</b> - 70% acetonitrilo, 30% (5%: sol. aquosa de ácido acético) (v/v); 1mL/min	$\lambda_{exc}$ 324 nm $\lambda_{em}$ 370 nm	0,176-4,403 mg/L (Tinto)	
Emir, Narince, Clairette, Semillion (Branco)		HPLC-FD	Coluna C18 Hypersil BDS			0,116-1,931 mg/L (Branco)	(36)

Vinhos tintos	SPE com coluna C8	HPLC-DAD	Mistura de água, acetonitrilo e ácido acético (66:33,9:0,1, v/v/v, pH 3,4); 0,5mL/min	0,05-10,9 µg/mL	(40)
---------------	----------------------	----------	---	-----------------	------

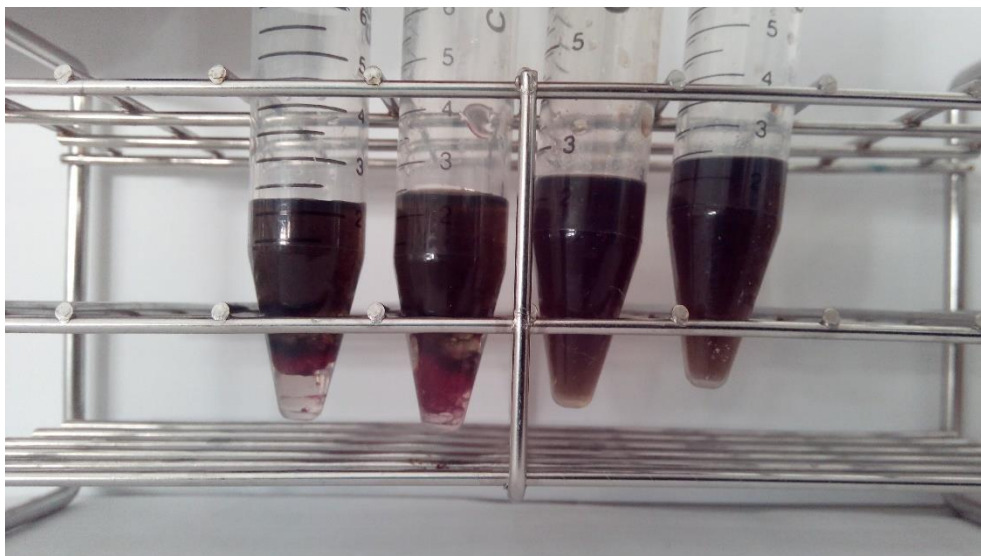
CV – Voltagem capilar  
VC – Voltagem do cone  
Elab – Energia aplicada durante a fragmentação  
T. - Temperatura  
Nq – não quantificado

**Anexo 2****Pré-preparação das amostras – extração dos compostos bioativos pelo método de DLLME**

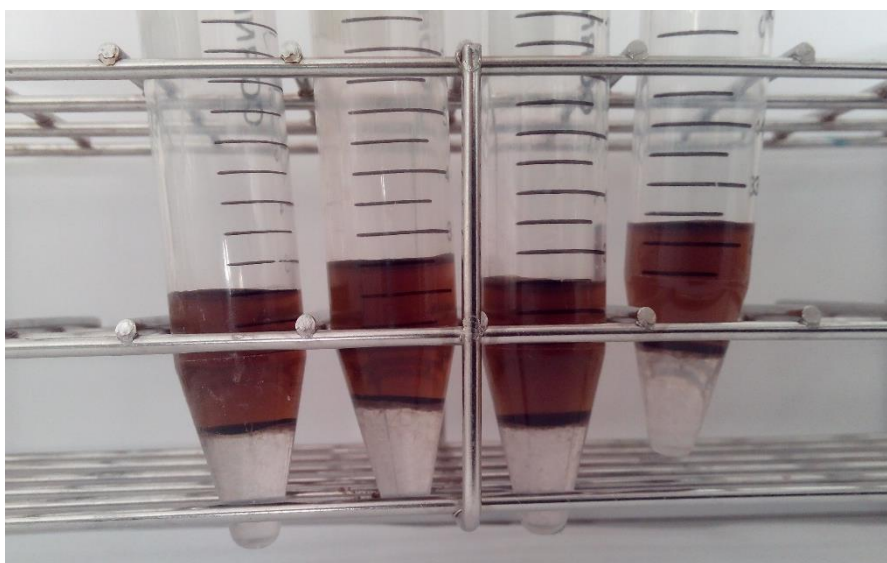
**Figura 1.** Amostras em tubo de polipropileno com adição de água, agomelatina, acetonitrilo, NaCl e clorofórmio.



**Figura 2.** Amostras após centrifugação. Gota depositada no fundo do tubo correspondendo à fase orgânica com os analitos.



**Figura 3.** Lavagem da gota através da adição de 500  $\mu\text{L}$  de NaOH 1M. 2 tubos da esquerda, antes vortexar; 2 tubos da direita, após vortexar.



**Figura 4.** Gota lavada após centrifugação.

### Anexo 3

**Tabela 1.** Gama de concentrações ( $\mu\text{M}$ ) e de linearidade obtidas para a curva de calibração do padrão utilizado no ensaio para quantificar fenólicos totais e avaliar a atividade antioxidante.

Ensaio	Padrão	Gama de concentrações ( $\mu\text{M}$ )	Gama de linearidade ( $\mu\text{M}$ )
Fenólicos totais	Ácido gálico	3,91 – 500	31,25 - 250
ABTS <sup>•+</sup>	Trolox (10%, %v/v)	15,63 – 500	15,63 – 62,5
DPPH <sup>•</sup>	Trolox (50%, %v/v)	15,63 – 500	15,63 – 125

#### Preparação de soluções:

##### Ensaio Fenólicos totais

O reagente de F-C foi diluído na proporção de 4:10 (v/v) em água, com ligeiras modificações a partir de Magalhães *et al.*<sup>(24)</sup> e o carbonato de sódio a 6% (% m/v) foi diluído em água.

##### Ensaio ABTS<sup>•+</sup>

Para o ensaio de ABTS<sup>•+</sup>, inicialmente preparou-se uma solução mãe de ABTS (7mM) à qual foi adicionado em parte igual persulfato de potássio (2,45 mM), originando a solução do catião radical (ABTS<sup>•+</sup>) (3,5 mM). Esta foi preparada pelo menos 12-16h (*overnight*) antes da sua utilização, momento em que foi diluída com tampão acetato (50 mM, pH=4,6) de forma a obter-se uma absorvência de  $0,800 \pm 0,020$ . O tampão acetato foi preparado misturando acetato de sódio anidro (50 mM) com ácido acético glacial.

##### Ensaio DPPH<sup>•</sup>

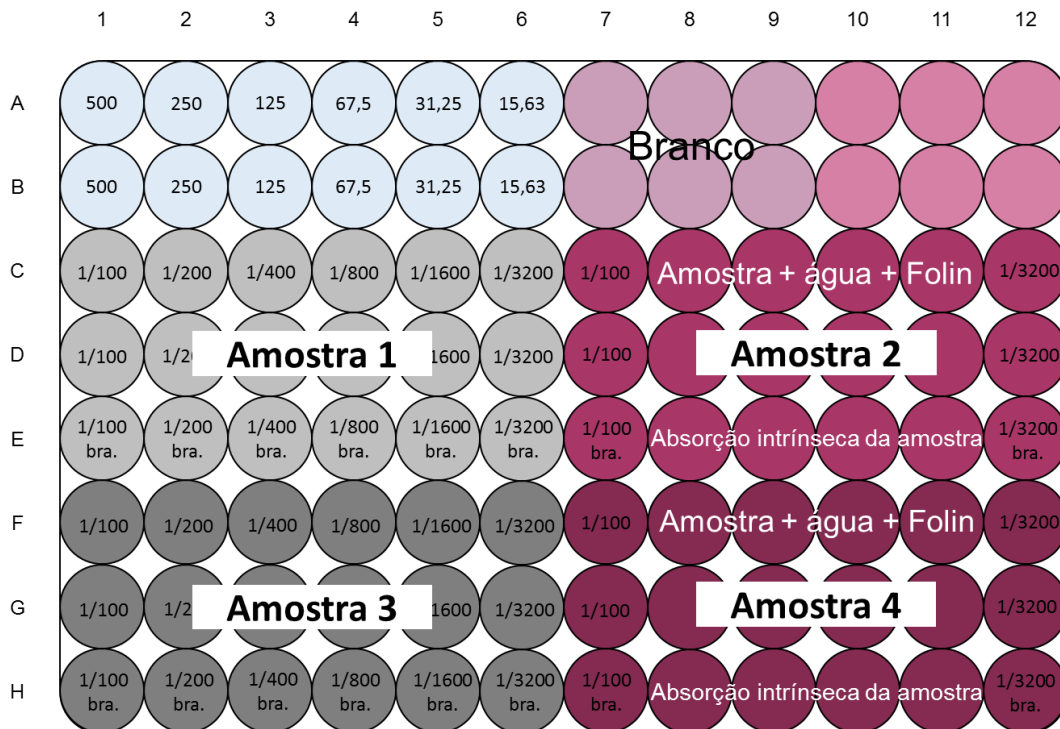
A solução mãe do DPPH<sup>•</sup> (1 mM) foi preparada com EtOH absoluto e mantida a 4°C, protegida da luz. No dia da sua utilização foi diluída com EtOH 50% (%v/v) de forma a obter-se uma absorvência de  $0,800 \pm 0,020$ .

Procedimento experimental para doseamento dos compostos fenólicos totais:

Na microplaca colocou-se 75  $\mu$ L de água ultrapura nos poços, com exceção das posições C1 a H1 e C7 a H7. De seguida, colocou-se 75  $\mu$ L de solução padrão (com concentrações entre 500 mM e 15,63 mM) ou 75  $\mu$ L de amostra de vinho (diluída entre 1:100 e 1:3200) e 25  $\mu$ L de solução de F-C em cada poço, exceto nos destinados à avaliação da absorção intrínseca das amostras (branco da amostra - E1 a E12 e H1 a H12). Esta foi determinada através da adição de 25  $\mu$ L de água aos 75  $\mu$ L de amostra. O branco (branco da placa) realizou-se através da adição de 25  $\mu$ L de água em vez de padrão.

A microplaca foi sujeita a posterior agitação (1 minuto) no leitor espectrofotométrico, seguido de 10 minutos de incubação antes da adição, a todos os poços, de 100  $\mu$ L de carbonato de sódio. A redução em meio alcalino do complexo fosfotungstato-fosfomolibdato pelos fenóis foi monitorizada a 765 nm, a cada minuto, durante 120 minutos.

Na Figura 1, encontra-se a representação esquemática da microplaca para o ensaio de F-C.



**Figura 1.** Representação esquemática da microplaca de 96 poços utilizada para o ensaio de F-C.

Azul: Diluições sucessivas da solução de ácido gálico (padrão) (75 µL de água + 75 µL de padrão + 25 µL de F-C) com concentrações entre 500 mM e 15,63 mM, utilizadas para construção da curva de calibração.

Lilás: Branco (75 µL de água + 25 µL de água)

Cinza e bordô: Linhas C, D, F e G correspondem a diluições sucessivas da amostra (entre 1:100 e 1:3200) (75 µL de água + 75 µL de amostra + 25 µL de F-C) e a linha E e H correspondem aos poços para avaliação da absorção intrínseca das amostras (75 µL de água + 75 µL de amostra + 25 µL de água).

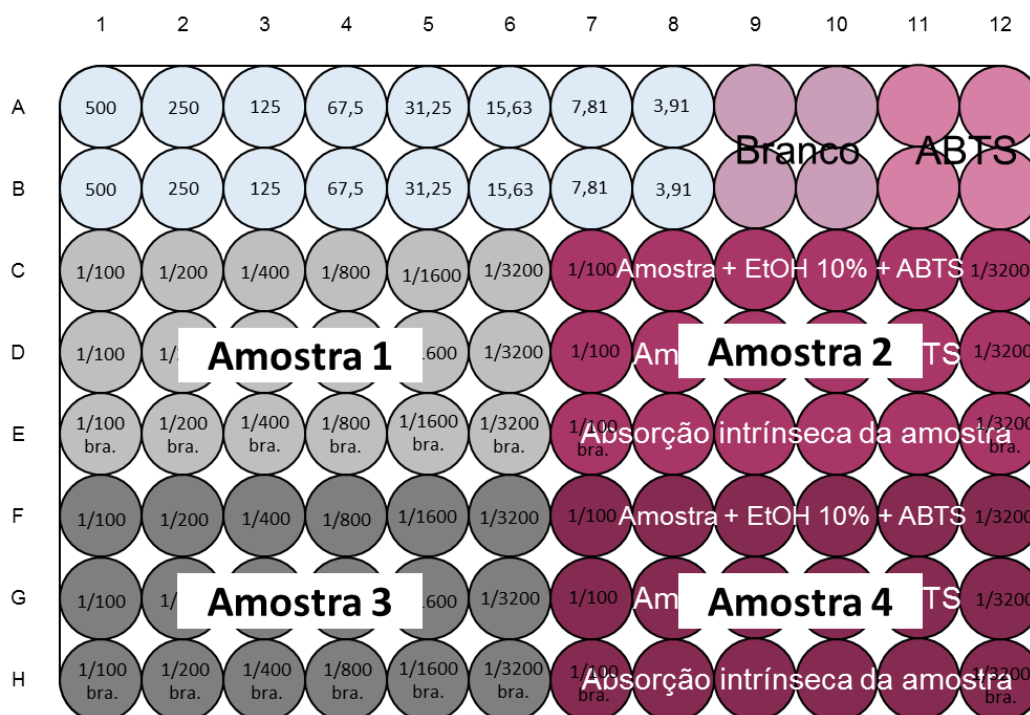
## Procedimentos experimentais para avaliação da atividade antioxidante:

### Ensaio de ABTS<sup>•+</sup>

Na microplaca colocou-se 150 µL de água ultrapura nos poços, com exceção das posições C1 a H1 e C7 a H7, e 150 µL de solução padrão (com concentrações entre 500 mM e 3,91 mM) ou de amostra de vinho diluída (entre 1:100 e 1:3200), nos poços destinados. De seguida, adicionou-se 150 µL de solução ABTS<sup>•+</sup> em tampão acetato a todos os poços (exceto nos brancos da amostra e da placa). Para avaliar a absorção intrínseca das amostras (E1 a E12 e H1 a H12), adicionou-se 150 µL de tampão acetato a 150 µL de amostra e o branco da placa foi realizado através da adição de 150 µL de tampão acetato ao invés de padrão. Para avaliar a absorvência do ABTS<sup>•+</sup> na ausência de espécies antioxidantes, 150 µL de água foi colocado em substituição do padrão ou de amostras.

A redução do ABTS<sup>•+</sup> foi monitorizada a 734 nm após 300 minutos.

Na Figura 2, encontra-se a representação esquemática da microplaca para o ensaio de ABTS<sup>•+</sup>.



**Figura 2.** Representação esquemática da microplaca de 96 poços utilizada para o ensaio de ABTS<sup>•+</sup>.

Azul: Diluições sucessivas da solução de trolox 10% (%v/v) (padrão) (150 µL de água + 150 µL de padrão + 150 µL de solução do ABTS\* em tampão acetato) com concentrações entre 500 mM e 3,91 mM, utilizadas para construção da curva de calibração.

Lilás: Branco (150 µL de água + 150 µL de tampão acetato)

Cor de rosa: Controlo (150 µL de água + 150 µL de solução ABTS\* em tampão acetato)

Cinzentos e bordô: Linhas C, D, F e G correspondem a diluições sucessivas da amostra (entre 1:100 e 1:3200) (150 µL de água (exceto na posição 1 e 7) + 150 µL de amostra + 150 µL de solução ABTS\* em tampão acetato) e a linha E e H correspondem aos poços para avaliação da absorção intrínseca das amostras (150 µL de água (exceto na posição 1 e 7) + 150 µL de amostra + 150 µL de tampão acetato).

### **Ensaio do DPPH\***

Sob as condições de redução do radical pelos antioxidantes e de acordo com o descrito por Magalhães *et al.*, apesar da leitura espectrofotométrica ser feita para um comprimento de onda de 517 nm, na região do visível, a utilização de microplacas transparentes UV seriam mais adequadas, dada a diminuição de absorvência do DPPH\* na ausência de espécies antioxidantes ser menor após a cinética, comparativamente à verificada quando se utilizam microplacas para a região do visível<sup>(67)</sup>. A menor estabilidade do radical nas placas para a região do visível deve-se à incompatibilidade do material com o alto teor em etanol, algo que não se verifica na presença de um meio aquoso. Assim, o ensaio foi feito em *ependorf*, sendo que próximo do fim da cinética da reação, o volume final destinado a cada poço (200 µL) foi transferido para uma microplaca para a região do visível.

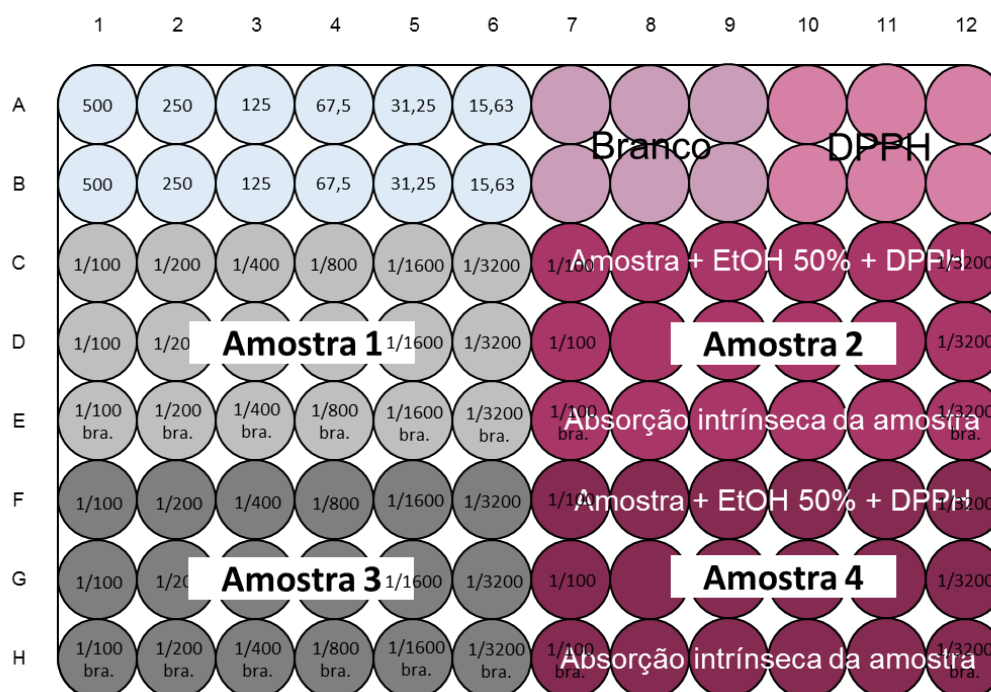
A proporção de cada reagente foi baseada em Viegas *et al.*<sup>(68)</sup>.

Inicialmente, colocou-se 1 mL de EtOH 50% (% v/v) e 1 mL de solução padrão (com concentrações entre 500 mM e 15,63 mM) ou de amostra de vinho diluída (entre 1:100 e 1:3200) em cada *ependorf*. De seguida, transferiu-se 500 µL de cada mistura inicial para novos *ependorfs*, aos quais foram adicionados 500 µL do DPPH\*. Para avaliar a absorção intrínseca das amostras, utilizou-se os 500 µL que restaram dos *ependorfs* iniciais e o

branco do padrão foi realizado através da adição de 1 mL de EtOH 50% (% v/v) em vez do padrão. Para avaliar a absorvência do DPPH', na ausência de espécies antioxidantes, colocou-se 1 mL de EtOH 50% (% v/v) em substituição do padrão ou de amostras.

Após cinética de 120 minutos, foram transferidos 200  $\mu$ L das misturas e brancos para os poços respetivos da microplaca, realizando-se a leitura espectrofotométrica para um comprimento de onda de 517 nm.

Na Figura 3, encontra-se a representação esquemática da microplaca para o ensaio do DPPH'.



**Figura 3.** Representação esquemática da microplaca de 96 poços utilizada para o ensaio do DPPH' (atividade antioxidante).

Azul: Diluições sucessivas da solução de Trolox 50% (%v/v) (padrão) (100  $\mu$ L de EtOH 50% (%v/v) + 100  $\mu$ L de padrão + 100  $\mu$ L de solução do DPPH') com concentrações entre 500 mM e 15,63 mM, utilizadas para construção da curva de calibração.

Lilás: Branco (100  $\mu$ L de EtOH 50% (%v/v) + 100  $\mu$ L de EtOH 50% (%v/v))

Cor de rosa: Controlo (100  $\mu$ L de EtOH 50% (%v/v) + 100  $\mu$ L de solução do DPPH')

Cinzeno e bordô: Linhas C, D, F e G correspondem a diluições sucessivas da amostra (entre 1:100 e 1:3200) (100 µL de EtOH 50% (%v/v)) + 100 µL de amostra + 100 µL de solução do DPPH') e a linha E e H correspondem aos poços para avaliação da absorção intrínseca das amostras (100 µL de EtOH 50% (%v/v) + 100 µL amostra + 100 µL de EtOH 50% (%v/v)).

## Anexo 4

Tabela 1. Concentração de *trans*-RSV e MLT (ng/mL) nas amostras estudadas.

Quinta	Casta	Ano	<i>Trans-resveratrol</i> (ng/mL)*	Melatonina (ng/mL)*
1	<i>Touriga Nacional</i>	2013	1526,81 ± 26,73 (1,75%)	2,71 ± 0,15 (5,34%)
	<i>Syrah</i>	2013	750,35 ± 78,16 (10,42%)	4,29 ± 0,15 (3,60%)
	<i>Syrah</i>	2014	1547,92 ± 153,90 (9,94%)	1,03 ± 0,08 (7,51%)
	<i>Alicante Bouschet</i>	2012	605,80 ± 17,08 (2,82%)	2,05 ± 0,07 (3,56%)
	<i>Alicante Bouschet</i>	2013	2616,04 ± 47,70 (1,82%)	1,92 ± 0,11 (5,54%)
	<i>Cabernet Sauvignon</i>	2013	547,49 ± 13,15 (2,40%)	3,06 ± 0,42 (13,82%)
	<i>Castelão (70%), Cabernet Sauvignon (15%) e Touriga Nacional (15%)</i>	2013	678,48 ± 62,47 (9,21%)	4,48 ± 0,41 (9,19%)
	<i>Castelão (70%), Cabernet Sauvignon (15%) e Touriga Nacional (15%)</i>	2014	1479,19 ± 39,40 (2,66%)	0,84 ± 0,09 (10,59%)
	<i>Fernão Pires (30%), Arinto (30%), Antão Vaz (20%) e Chardonnay (20%)*</i>	2015	169,34 ± 14,60 (8,62%)	0,63 ± 0,05 (8,46%)
<i>Touriga Franca</i>	2013	1149,71 ± 17,55 (1,53%)	1,05 ± 0,06 (5,63%)	
2	<i>Castelão (40%), Aragonez (40%) e</i>	2014	905,66 ± 8,25 (0,91%)	4,11 ± 0,08 (1,96%)

	<i>Cabernet Sauvignon</i> (20%)			
	<i>Touriga Nacional</i>	2013	1534,22 ± 149,97 (9,78%)	2,82 ± 0,27 (9,74%)
	<i>Aragonez</i>	2012	1325,27 ± 25,86 (1,95%)	4,27 ± 0,09 (2,04%)
	<i>Cabernet Sauvignon</i>	2012	919,76 ± 25,15 (2,73%)	1,43 ± 0,10 (7,09%)
	<i>Cabernet Sauvignon</i>	2013	1035,36 ± 69,10 (6,67%)	2,85 ± 0,34 (12,03%)
	<i>Castelão</i>	2013	1253,97 ± 23,6 (1,88%)	7,44 ± 0,97 (13,07%)
	<i>Syrah</i>	2013	1573,37 ± 95,02 (6,04%)	2,61 ± 0,31 (12,05%)
	<i>Trincadeira</i>	2012	1714,32 ± 29,58 (1,73%)	1,90 ± 0,07 (3,44%)
<b>3</b>	<i>Moscatel Graúdo</i>	2015	208,56 ± 4,24 (2,03%)	3,93 ± 0,29 (7,47%)

\* Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão (desvio padrão relativo %) ( $n=2$ )

**Tabela 2.** Concentração de fenólicos totais (mg/L, GAE) e da atividade antioxidante (mg/L, TE) associada a cada amostra analisada.

Quinta	Casta	Ano	F-C (120 min.)* mg/L,GAE	DPPH* (120 min.)* mg/L, TE	ABTS* (300 min.)* mg/L, TE
1	<i>Touriga Nacional</i>	2013	6824,01 ± 73,92 (1,08%)	7641,53 ± 152,77 (2,00%)	11673,28 ± 1585,65 (13,58%)
	<i>Syrah</i>	2013	6566,66 ± 685,65 (10,44%)	5098,92 ± 56,91 (1,12%)	9566,05 ± 52,05 (0,54%)
	<i>Syrah</i>	2014	5973,71 ± 22,48 0,38%)	5146,49 ± 61,56 (1,20%)	10725,36 ± 249,85 (2,33%)
	<i>Alicante Bouschet</i>	2012	6742,39 ± 128,05 (1,90%)	-----	7972,85 ± 262,04 (3,29%)
	<i>Alicante Bouschet</i>	2013	7145,05 ± 437,09 (6,12%)	8366,54 ± 380,00 (4,54%)	10941,31 ± 368,12 (3,36%)
	<i>Cabernet Sauvignon</i>	2013	7542,21 ± 413,01 (5,48%)	7846,47 ± 577,21 (7,36%)	10569,81 ± 395,59 (3,74%)
	<i>Castelão (70%), Cabernet Sauvignon (15%) e Touriga Nacional (15%)</i>	2013	5588,59 ± 453,68 (8,12%)	4892,04 ± 134,97 (2,76%)	9700,31 ± 62,46 (0,64%)
	<i>Castelão (70%), Cabernet Sauvignon (15%) e Touriga Nacional (15%)</i>	2014	4970,32 ± 14,31 (0,29%)	6160,60 ± 272,44 (4,42%)	13000,15 ± 36,80 (0,28%)
	<i>Fernão Pires (30%), Arinto (30%), Antão Vaz (20%) e Chardonnay (20%)*</i>	2015	601,46 ± 8,72 (1,45%)	515,31 ± 12,40 (2,41%)	1135,58 ± 28,20 (2,48%)
<i>Touriga Franca</i>	2013	7370,41 ± 511,70 (6,94%)	7194,13 ± 15,96 (0,22%)	11061,98 ± 212,10 (1,92%)	

2	<i>Castelão (40%), Aragonez (40%) e Cabernet Sauvignon (20%)</i>	2014	4862,13 ± 61,13 (1,26%)	4404,07 ± 230,77 (5,24%)	11771,66 ± 60,14 (0,51%)
	<i>Touriga Nacional</i>	2013	6695,52 ± 9,32 (0,14%)	7651,32 ± 176,47 (2,31%)	12660,65 ± 624,32 (4,93%)
	<i>Aragonez</i>	2012	5960,55 ± 93,77 (1,57%)	8070,25 ± 130,03 (1,61%)	10294,26 ± 222,85 (2,16%)
	<i>Cabernet Sauvignon</i>	2012	4985,69 ± 97,13 (1,95%)	6654,31 ± 677,56 (10,18%)	9506,38 ± 243,58 (2,56%)
	<i>Cabernet Sauvignon</i>	2013	6591,83 ± 89,01 (1,35%)	8418,15 ± 624,83 (7,42%)	10544,30 ± 154,69 (1,47%)
	<i>Castelão</i>	2013	4229,67 ± 100,92 (2,39%)	5995,88 ± 267,48 (4,46%)	8229,37 ± 79,18 (0,96%)
	<i>Syrah</i>	2014	5332,44 ± 45,87 (0,86%)	7812,17 ± 556,80 (7,13%)	10101,87 ± 189,16 (1,87%)
	<i>Trincadeira</i>	2012	4718,35 ± 274,06 (5,81%)	-----	11579,88 ± 806,14 (6,96%)
3	<i>Moscatel Graúdo</i>	2015	362,43 ± 9,97 (2,75%)	273,66 ± 0,62 (0,23%)	637,51 ± 5,42 (0,85%)

\*Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão (desvio padrão relativo (%)) (n=4).

**Tabela 3.** Concentração de fenólicos totais ( $\mu\text{M}$ , GAE) e da atividade antioxidante ( $\mu\text{M}$ , TE) associada a cada amostra analisada.

Quinta	Casta	Ano	F-C (120 min) $\mu\text{M}$ , GAE*	DPPH* (120 min.) $\mu\text{M}$ , TE*	ABTS** (300 min.) $\mu\text{M}$ , TE*
1	<i>Touriga Nacional</i>	2013	20056,47 $\pm$ 217,25 (1,08%)	30529,52 $\pm$ 610,32 (2,00%)	46641,82 $\pm$ 6334,37 (13,59%)
	Syrah	2013	19300,09 $\pm$ 2015,20 (10,44%)	20371,09 $\pm$ 227,63 (1,12%)	38228,54 $\pm$ 207,94 (0,54%)
	Syrah	2014	17554,48 $\pm$ 62,04 (0,35%)	20563,89 $\pm$ 245,91 (1,20%)	42853,52 $\pm$ 998,13 (2,33%)
	<i>Alicante Bouschet</i>	2012	19816,56 $\pm$ 376,35 (1,90%)	----	31939,77 $\pm$ 930,37 (2,91%)
	<i>Alicante Bouschet</i>	2013	21000,02 $\pm$ 1284,65 (6,12%)	33425,93 $\pm$ 1518,10 (4,54%)	42219,86 $\pm$ 1378,81 (3,27%)
	<i>Cabernet Sauvignon</i>	2013	22167,33 $\pm$ 1213,89 (5,48%)	29193,76 $\pm$ 1996,40 (6,84%)	42228,93 $\pm$ 1580,37 (3,74%)
	<i>Castelão (70%), Cabernet Sauvignon (15%) e Touriga Nacional (15%)</i>	2013	16425,44 $\pm$ 1333,42 (8,12%)	18461,49 $\pm$ 1193,46 (6,47%)	38758,52 $\pm$ 249,53 (0,64%)
	<i>Castelão (70%), Cabernet Sauvignon (15%) e Touriga Nacional (15%)</i>	2014	14608,28 $\pm$ 42,05 (0,29%)	24614,73 $\pm$ 1088,40 (4,42%)	51938,36 $\pm$ 147,04 (0,28%)
	<i>Fernão Pires (30%), Arinto (30%), Antão Vaz (20%) e Chardonnay (20%)*</i>	2015	1767,75 $\pm$ 25,62 (1,45%)	2058,82 $\pm$ 49,54 (2,41%)	4536,79 $\pm$ 112,66 (2,48%)
<i>Touriga Franca</i>	2013	21662,39 $\pm$ 1503,93 (6,94%)	28741,38 $\pm$ 63,74 (0,22%)	42671,83 $\pm$ 794,42 (1,86%)	

2	<i>Castelão (40%), Aragonez (40%) e Cabernet Sauvignon (20%)</i>	2014	14290,29 ± 179,65 (1,26%)	15155,71 ± 958,26 (6,32%)	47033,43 ± 240,26 (0,51%)
	<i>Touriga Nacional</i>	2013	19678,82 ± 27,40 (0,14%)	28639,80 ± 732,79 (2,56%)	50584,89 ± 2494,10 (4,93%)
	<i>Aragonez</i>	2012	17518,67 ± 275,60 (1,57%)	32937,09 ± 513,32 (1,56%)	41130,46 ± 890,28 (2,17%)
	<i>Cabernet Sauvignon</i>	2012	14653,46 ± 285,48 (1,95%)	26686,54 ± 2846,52 (10,67%)	37982,86 ± 973,09 (2,56%)
	<i>Cabernet Sauvignon</i>	2013	19374,05 ± 261,60 (1,35%)	33633,82 ± 2496,16 (7,42%)	42127,15 ± 617,99 (1,47%)
	<i>Castelão</i>	2013	12431,42 ± 296,60 (2,39%)	23955,15 ± 1068,57 (4,46%)	32405,69 ± 319,13 (0,99%)
	<i>Syrah</i>	2013	15672,59 ± 134,83 (0,86%)	31212,09 ± 2225,64 (7,13%)	40361,86 ± 755,70 (1,87%)
	<i>Trincadeira</i>	2012	13867,70 ± 805,50 (5,81%)	----	46266,63 ± 2277,28 (4,92%)
3	<i>Moscatel Graúdo</i>	2015	1065,22 ± 29,30 (2,75%)	1093,35 ± 2,47 (0,23%)	2546,95 ± 21,67 (0,85%)

\*Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão (desvio padrão relativo (%)) (n=4).