

**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO DA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

PROANTOCIANIDINAS DO VINHO

**MANUEL ESTEVÃO SILVA PEREIRA DE OLIVEIRA FARIA
PORTO – 2000**

ABREVIATURAS:

ADN – Ácido Desoxiribonucleico

CG – Cromatografia Gasosa

HDL – High Density Lipoproteins – Lipoproteínas de Alta Densidade

**HPLC – High Performance Liquid Chromatography – Cromatografia Líquida de Alta
Eficiência**

LDL – Low Density Lipoproteins – Lipoproteínas de Baixa Densidade

pH – Potencial Hidrogenoiónico

ÍNDICE



1. Introdução	pág. 1
2. Compostos fenólicos	pág. 2
2.1 Classificação	pág. 4
2.1.1 Compostos fenólicos monoméricos	pág. 5
Fenóis simples	pág. 5
Ácidos fenólicos	pág. 5
Aldeídos	pág. 5
Ácidos fenilacéticos e acetofenonas	pág. 5
Fenilpropanóides	pág. 5
Flavonóides	pág. 6
2.1.2 Compostos fenólicos poliméricos	pág. 7
2.1.2.1 Lenhinas	pág. 7
2.1.2.2 Taninos	pág. 8
- <i>Taninos hidrolizáveis</i>	pág. 8
- <i>Taninos condensados</i>	pág. 9
3. Proantocianidinas: efeitos nutricionais e físico-químicos	pág. 10
3.1 Interação com macronutrientes	pág. 11
3.2 Interação com minerais	pág. 14
3.3 Ação antioxidante	pág. 16
4. Proantocianidinas, sua biodisponibilidade: absorção e metabolismo	pág. 19
5. Proantocianidinas: possíveis influências na saúde humana	pág. 21
5.1 Doença cardiovascular	pág. 21
5.1.1 Oxidação das LDL	pág. 23
5.1.2 Agregação plaquetária	pág. 24
5.2 Cancro	pág. 26
6. Métodos de análise e detecção de proantocianidinas	pág. 26
7. Conclusão	pág. 29
Bibliografia	
Bibliografia consultada	

1. INTRODUÇÃO

O vinho, em Portugal faz parte da nossa história, das nossas tradições, que ao contrário de outras, ainda permanece viva e ao que parece está para durar. Na realidade esta é uma bebida com um papel fundamental nos nossos hábitos alimentares.

Esta situação, não é um exclusivo dos portugueses nem tão pouco da história recente da humanidade. A nenhuma outra bebida foi atribuído tanto respeito, dedicação e devoção. A prová-lo está a parceria que desde muito cedo teve com as religiões. Danel na Fenícia, Osiris no Egipto, Dionísio na Grécia, Baco em Roma e o seu valor sacro na religião cristã, são apenas alguns dos exemplos que se podem referir. Mas porque é que esta bebida desde muito cedo fez mover com tanta força a imaginação dos homens? *O vinho é uma bebida privilegiada capaz de colocar o Homem numa situação de euforia e êxtase que o aproxima dos deuses, fazendo-o esquecer-se das vicissitudes da sua existência terrena. É por isso que o vinho aparece carregado de um valor sacramental, a que não é estranha a sua semelhança com o sangue, desde sempre considerado a essência da própria vida!*¹

Em Portugal não é fácil traçar a história da vinha e do vinho. A videira foi muito provavelmente uma das plantas que de uma forma espontânea já existia nos terrenos que hoje formam o nosso país, desde o período Terciário. A existência de grainhas de uvas e sarmentos de videira carbonizadas datam dos períodos do Bronze I e III, mas no entanto torna-se muito difícil perceber se se trata de vinha espontânea ou cultura.

É fácil de perceber que o vinho, que apesar de tudo não é mais do que uma solução química, é hoje em dia parte integrante e intrínseca da nossa cultura.

Transformou-se num produtor e produto da mesma!

O interesse, a centralidade e a importância que o vinho ganhou quer na cultura, quer nos hábitos alimentares dos portugueses, torna-o, inequivocamente, um excelente objecto de estudo. De entre as várias vertentes que se podem abordar, as interferências entre esta bebida e a saúde humana, são, além de pertinentes, extremamente cativantes.

Quando se fala de vinho como potencial interferente na saúde, deve ter-se o discernimento necessário para perceber que se trata de uma complexa mistura de componentes. Esta pesquisa direccionou-se para uma pequena parte destes. Assim, no universo dos polifenóis, a escolha recaiu no mundo das proantocianidinas. A opção por estes compostos não é de forma nenhuma aleatória, já que é baseada no facto de constituírem um factor fundamental na composição organoléptica do vinho, de terem vindo a centrar um crescente interesse por parte da comunidade científica e também por constituírem um desafio consequente do reduzido conhecimento que existe sobre estes.

2. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os polifenóis, também designados por compostos fenólicos², constituem um dos grupos mais numerosos de metabolitos das plantas.²

Presentes no fruto, estes constituintes, participam de uma forma decisiva na morfologia (ex.: pigmentação), crescimento, reprodução e resistência a patogenicias e predadores (através do aumento da adstringência, o que leva a que a sua ingestão seja pouco atractiva).^{2,3}

No que se refere ao vinho, estes compostos desempenham, de uma forma directa ou indirecta, um papel importante na sua qualidade final.⁴ Intervêm em muitos processos biológicos e tecnológicos⁵, sendo que, as suas moléculas possuem numerosas propriedades fisiológicas, farmacológicas, oxi-redutivas e organolépticas.⁵ Participam na coloração dos bagos e regulação de maturação dos frutos⁵, nas características organolépticas do vinho (amargor, adstringência e dureza entre outros) e nas transformações do vinho (tratamentos e envelhecimento).⁶

Os polifenóis presentes no vinho provêm essencialmente do bago, mais concretamente das suas película e grainhas. As concentrações encontradas no bago dependem obrigatoriamente da sua casta de proveniência, do clima, do solo e da exposição solar.⁵

Os ácidos fenólicos, os flavonóis e compostos similares, as antocianas e os taninos, são os principais compostos fenólicos que poderemos encontrar no vinho^{2,7,8}, sendo que os dois últimos existem em maior quantidade.^{7,8}

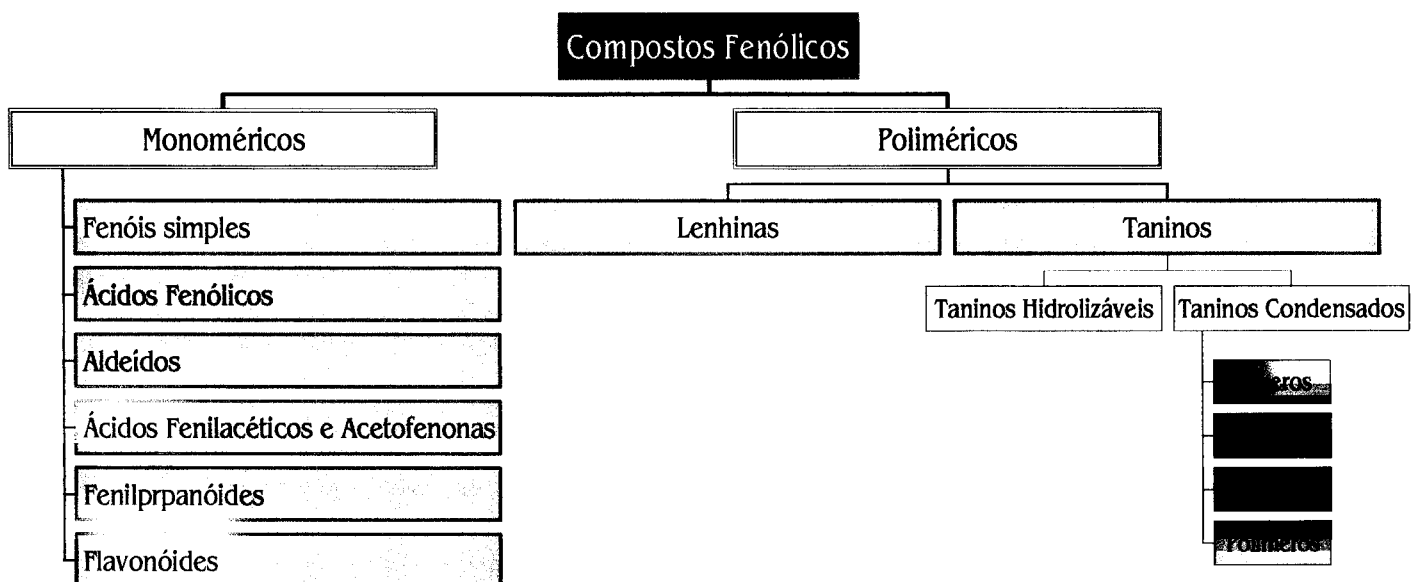
Todavia, existem diferenças significativas entre os vinhos tintos e os vinhos brancos, e entre os vinhos novos e os vinhos envelhecidos, no que diz respeito à quantidade e qualidade destes compostos.² Assim sendo, nos vinhos tintos poderemos encontrar valores na ordem de 1000 a 4000mg/mL de polifenóis, enquanto que nos vinhos brancos apenas se

encontram cerca de 200 a 300mg/mL destes compostos. Por outro lado, os polifenóis encontrados nos vinhos envelhecidos comportam importantes diferenças relativamente aos vinhos mais jovens,² nomeadamente no grau de polimerização, que é mais elevado nos primeiros.

2.1 CLASSIFICAÇÃO

Em 1995, Torres de Castro e A. Fontainhas, dividiram estes compostos em dois grandes grupos: os compostos fenólicos monoméricos e os compostos fenólicos poliméricos.⁹

Classificação dos compostos fenólicos



Quadro n.º 1: Adaptado de Laura Bravo.(1998) "Polyphenols, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. Nutrition Reviews. Vol.56. (No.11): 317-333

Actualmente podem-se classificar os polifenóis conforme o seu peso molecular. Assim sendo, os compostos monoméricos apresentam normalmente baixo peso molecular, enquanto que os poliméricos poderão ser de baixo, intermédio e elevado peso molecular.²

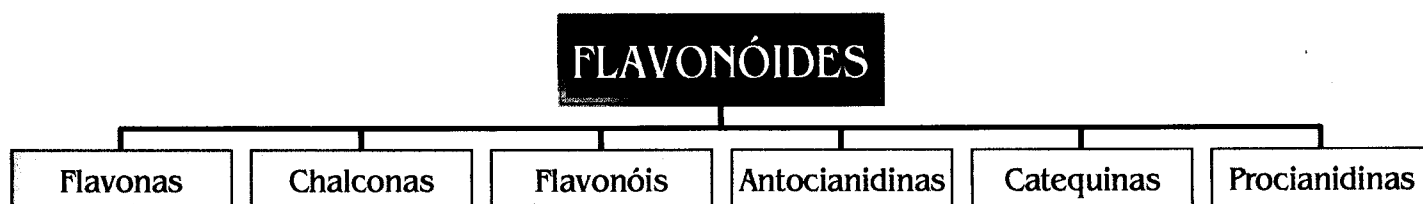
2.1.1 COMPOSTOS FENÓLICOS MONOMÉRICOS

Este grupo subdivide-se em (Quadro n.º 1):

- ✓ Fenóis simples (C_6).² Destes compostos, que estão largamente espalhados pelas diferentes espécies de castas, podem-se destacar o meta-cresol, o etil-4-fenol, o vinil-4-fenol, o etil-4-gaiacol, e ainda a hidroquinona e seus derivados (ex.: Arbutina).^{6,9}
- ✓ Ácidos fenólicos (C_6-C_1).² De entre estes compostos é importante salientar o Ácido protocatecólico e o Ácido gálico. Este último é uma unidade estrutural dos taninos hidrolizáveis que se encontram, entre outras, na casca dos carvalhos.⁹
- ✓ Aldeídos. Compostos com uma estrutura semelhante aos Ácidos fenólicos, isto é C_6-C_1 .²
- ✓ Ácidos fenilacéticos e Acetofenonas (C_6-C_2).²
- ✓ Fenilpropanóides (C_6-C_3).^{2,9} Estes derivados do Fenilpropano, juntamente com alguns fenóis simples (ex.: Ácido benzóico), são os precursores das unidades que formam a estrutura da Lenhina^{2,9}, através de ligações covalentes com polissacarídeos. Tratam-se fundamentalmente de ligações éster com unidades de arabinose

das hemiceluloses.² Salientam-se os Ácidos cumérico, ferúlico e sinápico.^{2,9}

- ✓ Flavonóides (C₆-C₃-C₆). A mais comum e mais vasta família de compostos fenólicos é constituída por pigmentos hidrossolúveis, formados por dois anéis aromáticos ligados através de três átomos de Carbono que, normalmente constituem um heterociclo central contendo oxigénio.^{2,4,9} O Flavonóides subdividem-se nos grupos das Flavonas (ex.: Apigenina), das Chalconas (único Flavonóide em que o anel central é aberto), dos Flavonóis (ex.: Quercitina), das Antocianidinas (precursores das Antocianinas), das Catequinas e das Procianidinas (precursores dos taninos).^{2,7} (Quadro n.º 2)



Quadro n.º 2: Adaptado de Laura Bravo.(1998) "Polyphenols, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. Nutrition Reviews. Vol.56. (No.11): 317-333 e de Torres de Castro, L. F. e A. Fontainhas. 1995. "Substâncias Fenólicas – breves notas sobre a sua estrutura e biossíntese". Vila Real. U.T.A.D..

Dentro desta família de compostos, resta referir que as antocianinas, glicosídeos de antocianidinas, constituem um dos mais importantes membros do grupo de pigmentos hidrossolúveis, sendo responsáveis pelas cores vermelha, violeta e azul dos frutos. Por consequência têm um papel fundamental na coloração dos vinhos tintos.^{2,9,10} Apesar do referido, não se deve pensar que as

antocianas são responsáveis exclusivas deste processo. Segundo Victor Freitas, investigador da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, *as proantocianidinas colaboram com as antocianas na fixação da cor. Têm, desta forma, um papel fundamental neste processo. Sem elas, mesmo que um vinho tenha grande quantidade de antocianas, não poderá desenvolver uma boa cor se não tiver proantocianidinas suficientes. Inversamente, se um vinho for rico em proantocianidinas, não necessita de ter uma grande abundância de antocianas para obter boa cor.*

2.1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS POLIMÉRICOS

Deste grupo de compostos fazem parte os taninos e as lenhinas. Ambos têm em comum o facto de serem polímeros que têm como unidades estruturais compostos fenólicos monoméricos.⁹

2.1.2.1 LENHINAS

Estes compostos, são polímeros de fenilpropanóides e alguns fenóis simples.^{2,9} Devido à sua composição, têm funções essencialmente estruturais.⁹

2.1.2.2 TANINOS

Quimicamente são compostos poli-hidroxifenólicos resultantes da polimerização de substâncias elementares.^{2,9,10} Tem a capacidade de formar complexos insolúveis com hidratos de carbono e proteínas.² São estas características que explicam o seu poder adstringente, devido à precipitação das proteínas salivares², e a sua capacidade de inibição enzimática, constituindo desta forma o princípio das colagens, na clarificação e estabilização dos vinhos.⁶

Os taninos poderão ser divididos em dois grandes grupos. Os taninos hidrolizáveis e os taninos condensados.^{2,10,12} Existe ainda um terceiro grupo, designado por florotaninos, que apenas podem ser encontrados em algas castanhas, e que não são normalmente consumidos pelo homem.²

↳ Taninos hidrolizáveis. São constituídos por um poliol cíclico, normalmente a glicose, em torno da qual se esterificam diferentes substâncias fenólicas, sendo as mais importantes o ácido gálico e o ácido elágico, originando, respectivamente, os taninos gálicos e elágicos.^{2,6,9,12}

Como o seu próprio nome indica, estes taninos podem ser hidrolisados com ácidos, bases e enzimas hidrolíticas.^{2,9,10}

Esta espécie de taninos existe em pequenas quantidades nos vinhos⁷, e segundo Curvelo-Garcia, a sua presença nos mesmos, serve como indicador da adição de taninos comerciais.

↳ Taninos condensados. Estes taninos são polímeros que tem como unidade elementar compostos com a estrutura 3-Flavanol (ex.: catequina, epicatequina).^{2,3,12,13,14} Os taninos condensados mais comuns são formados por procianidinas (3',4'-Flavanodiol) e prodelfinidinas (3',4',5'-Flavanotriol).³ Estas unidades têm como esqueleto típico o C₆-C₃-C₆ e a ligação entre elas é feita normalmente através de ligações do tipo C-C. Só muito raramente ocorrem ligações do tipo C-O-C. Assim sendo, as ligações C-C estabelecem-se entre o C₄ de uma unidade (extensão ou unidade superior) e o C₈ ou o C₆ de outra unidade (unidade inferior).^{3, 15}

Também se podem encontrar unidades com duplas ligações (Taninos tipo-A). Nestes casos, além da típica ligação C₄-C₈ ou C₄-C₆, encontram-se também ligações do tipo C-O, entre o C₂ e o oxigénio de C₇ ou C₅.³

Quanto ao seu grau de condensação podem-se classificar em dímeros (com duas unidades elementares), trímeros (com três unidades elementares), oligómeros (com um grau de polimerização entre três e seis unidades elementares) e polímeros (com um grau de polimerização superior a seis unidades elementares).^{12, 15}

Existem autores, que acrescentam a esta classificação os monómeros (as unidades elementares)¹². Na minha opinião, esta não é uma classificação correcta pois, tal como o próprio nome indica, os taninos condensados, são constituídos por mais do que uma unidade elementar. Caso as unidades elementares fossem consideradas proantocianidinas, e tendo em conta que essas unidades são por

definição flavonóides, então, com este tipo de classificação, os monómeros seriam ao mesmo tempo flavonóides e proantocianidinas.

É importante referir que quanto mais idade tem um vinho maior será o grau de condensação dos seus taninos condensados.^{3,8}

Aos taninos condensados também se dá o nome de *Proantocianidinas*.

3. PROANTOCIANIDIDAS: EFEITOS NUTRICIONAIS E FÍSICO-QUÍMICOS

Existem diversos estudos *in vitro* e *in vivo*, realizados com catequinas ou com extractos de plantas contendo catequinas e proantocianidinas, que têm como objectivo o estudo das actividades biológicas destes compostos.³

A enorme variedade destes compostos fenólicos tal como a complexa mistura em que aparecem nas plantas, tem revelado uma grande dificuldade em estudar os seus efeitos fisiológicos e nutricionais². Todavia sabe-se que a composição fenólica das proantocianidinas, lhes confere três propriedades essenciais: interacção com macronutrientes, interacção com minerais e acção antioxidante. Os efeitos biológicos que estes taninos poderão ter, estão directamente dependentes das referidas propriedades.³

61060



400282

3.1 INTERACÇÃO COM MACRONUTRIMENTOS

As ligações estabelecidas entre os taninos e as proteínas, são o resultado de efeitos hidrofóbicos e o estabelecimento de pontes de hidrogénio entre os grupos fenólicos e os grupos carbonil das ligações peptídicas. Os primeiros actuam como doadores de protões enquanto que os segundos actuam como aceitadores de protões.³

A força deste tipo de interacção, que normalmente é reversível, depende da natureza das moléculas de ambos os intervenientes.

No que diz respeito às proteínas, nomeadamente às suas características, a riqueza em prolina é um dos factores influenciadores deste tipo de ligações, já que quanto maior for essa riqueza maior vai ser a afinidade para com os taninos. O estado de glicosilação das proteínas também pode ter influência para com a afinidade da ligação. Assim sendo, a presença de resíduos de hidratos de carbono nas glicoproteínas salivares poderá aumentar a afinidade e especificidade da interacção. Por outro lado, esta situação leva a que enzimas como a α -amilase e a invertase, reduzam a sua afinidade para com as proantocianidinas e até mesmo aumentem a resistência à sua capacidade inibitória.³

Por sua vez as características estruturais das proantocianidinas influenciam directamente a força destas interligações. Assim, o peso molecular, o grau de galuilação e o padrão de hidroxilação, são fundamentais neste processo.³

Quanto maior for o grau de polimerização do tanino, e consequentemente maior for o peso molecular, maior será a afinidade

para as proteínas^{2,3}. No entanto, a capacidade das proantocianidinas para formar este tipo de interligações, está dependente das moléculas fisicamente acessíveis às proteínas. Taninos altamente polimerizados, são insolúveis e participam na formação de uma complexa estrutura com polissacarídeos das paredes celulares, ou formam grânulos tanínicos insolúveis, que reduzem significativamente a capacidade de realizar este tipo de ligações.²

A presença de grupos galuilo (Esteres de Ácido gálico) resulta, também, num aumento da afinidade para as proteínas.

No que se refere ao padrão de hidroxilação, as certezas são menores.³ No entanto, há experiências que demonstram que o referido padrão de um anel B de uma proantocianidina sintética não teve qualquer influência na afinidade para com a albumina bovina.³

Com base no que já foi enunciado, os taninos foram tradicionalmente considerados como antinutrientes. Isto porque, a sua presença leva a uma redução da digestibilidade das proteínas e a um aumento da excreção fecal de nitrogénio.²

Todavia foram executadas experiências, que, através de proteínas marcadas, parecem indicar que o aumento de nitrogénio excretado se deve ao aumento das proteínas endógenas, nomeadamente as salivares ricas em prolina, e não devido a uma redução na digestibilidade das proteínas.^{2,3}

A secreção de proteínas salivares ricas em prolina parece pois um mecanismo de defesa contra a ingestão de taninos, isto porque, se constatou que nos herbívoros, e possivelmente nos humanos, a produção

deste tipo de proteínas é incrementada quando a ingestão de proantocianidinas aumenta. A formação de complexos entre ambos, impede os taninos de formar complexos com outras proteínas, nutricionalmente mais importantes.^{2,3}

No que diz respeito à redução da digestibilidade das proteínas, a situação também não é linear. Por um lado, os taninos podem ligar-se a proteínas no lumén intestinal, tais como enzimas digestivas², levando-as a sofrer uma inibição e não poder actuar normalmente. Por outro lado, alguns níveis de proteases e lipases digestivas e ácidos biliares sofrem um incremento com a ingestão de proantocianidinas.³

Parece provável que o aumento do nitrogénio fecal seja principalmente causado pela eliminação de proteínas endógenas e não por uma significativa redução da digestibilidade das proteínas presentes no plano alimentar.²

Os taninos podem inibir algumas enzimas digestivas ao longo do lumén intestinal. Com esta situação, não é só a digestibilidade das proteínas que poderá sair afectada. Também os outros macronutrientes poderão ser atingidos.² No caso dos hidratos de carbono, a inibição de enzimas amilolíticas, e conseqüente redução da hidrólise destes nutrientes, pode levar a uma diminuição da resposta glicémica pós-prandial. Por outro lado, os polifenóis podem formar complexos com polissacarídeos, e afectar a resposta glicémica, bem como a insulinémica.²

A interacção possível entre os taninos e as enzimas digestivas pode também ocasionar alterações da digestibilidade dos lípidos. Apesar das influências destes compostos no metabolismo lipídico ainda não se

encontrarem totalmente esclarecidas, foi verificado que o consumo de taninos, leva a um aumento da excreção fecal de gordura. Efeitos hipocolesterolémicos, com um aumento das concentrações de HDL-colesterol e diminuição das de LDL-colesterol, apontam para uma intervenção dos compostos fenólicos na redução da absorção intestinal de colesterol e no aumento da excreção biliar.²

Importa referir que os dímeros, os trímeros e os metabolitos de baixo peso molecular originados pela degradação das proantocianidinas, depois de absorvidos, poderão formar complexos com as proteínas ou enzimas do plasma e receptores de membrana presentes na superfície dos órgãos.³ No entanto, o significado nutricional aparenta não ter a mesma importância que há nas ligações realizadas em pleno lúmen intestinal.³

3.2 INTERACÇÃO COM MINERAIS

As proantocianidinas podem formar complexos com o ferro (III), com o alumínio (III) e com o cobre (II).^{2,3} Esta complexão precipita facilmente quando o pH se encontra neutro, desde que a concentração dos complexos não seja muito elevada relativamente à concentração do metal em causa.³

Os grupos *o*-dihidroxifenílicos presentes nos taninos condensados, são excelentes quelantes de ferro (III). Assim sendo, o consumo de vinho tinto ou chá, bebidas ricas em proantocianidinas, leva à inibição da biodisponibilidade do ferro.^{2,3} A inibição de ferro por parte dos taninos depende da presença de outros nutrientes.³ Cook *et al* verificou que o

consumo de vinho tinto levou à inibição da absorção de ferro numa refeição constituída por um pão³. Inversamente, o efeito torna-se mais suave quando se trata de uma refeição mais complexa³.

Apesar do referido é importante reter a ideia que este tipo de ligação só acontece quando o metal e a fonte de proantocianidinas são consumidos em simultâneo.³

Populações susceptíveis de desenvolverem deficiências em ferro, devem evitar o consumo excessivo de alimentos ricos em taninos condensados bem como polifenóis de uma forma geral.³

O alumínio (III), à semelhança do que acontece com o ferro, também se liga aos taninos, diminuindo assim a sua absorção e conseqüente biodisponibilidade. Como curiosidade, refira-se que o consumo de água, rica em alumínio, está associado a um aumento do risco de incidência da doença de Alzheimer. Contrariamente, o consumo moderado em vinho tinto, está associado a uma diminuição do risco de aparecimento de demência senil. Estes dois factos poderão estar intimamente relacionados em conseqüência de uma possível interacção existente entre as proantocianidinas e o alumínio.³

No que se refere ao cobre (II), e apesar de já ter sido observado que a absorção de cobre diminui, após o consumo de chá, em humanos, outras experiências levadas a cabo com ratos parecem comprovar o oposto.^{2,3} O que parece certo é que há uma influência clara dos taninos condensados na absorção e biodisponibilidade do cobre.

À semelhança do que acontece com o cobre, a possível influência sobre o zinco, não está completamente definida. As informações além de parcas são, em muitos casos, contraditórias.^{2,3}

Esta situação, que representa o conhecimento sobre a interacção entre os compostos fenólicos e a maioria dos outros metais, pode traduzir um grau de influência muito pequeno, ou a necessidade de realizar mais ensaios nesta matéria.

Apesar desta acção das proantocianidinas sobre o cobre e o alumínio levar à diminuição da sua biodisponibilidade, esta acção não é totalmente negativa. Estes metais no seu estado natural podem iniciar a produção de radicais hidroxil através das reacções de Fenton e Haber-Weiss. A quelação dos mesmos por parte dos taninos, impede-os de iniciarem estas reacções. Esta é uma das formas com que os taninos poderão exercer a sua actividade antioxidante.²

3.3 ACÇÃO ANTIOXIDANTE

O crescente interesse pelos polifenóis deve-se essencialmente ao seu papel como antioxidantes, antimutagénicos e supressores de radicais livres. A possibilidade de constituírem um importante protector no aparecimento de patologias como o cancro e doenças cardiovasculares, foi-lhes dando uma crescente importância.²

Regularmente são produzidos no nosso organismo espécies de oxigénio reactivo, tais como o singuleto ($^1\text{O}_2$), o superóxido (O_2^-), o hidroxilo (OH^\cdot), o monóxido de azoto (NO^\cdot), o aquil e o peroxil, que causam profundas

modificações em lípidos, em proteínas e no ADN, participando desta forma no processo de envelhecimento para além do já referido papel no desenvolvimento de patologias.^{3,16}

A capacidade de rapidamente poderem doar um átomo de hidrogénio aos radicais livres, dando origem a relativamente estáveis radicais fenoxil, justifica a atribuição aos polifenóis do estatuto de antioxidante.^{2,3,16}

A sua capacidade de quelar alguns minerais precursores de radicais de oxigénio através das reacções de Fenton e Haber-Weiss, também contribui para o referido estatuto.

Dentro do grupo dos polifenóis, as proantocianidinas, não têm merecido muita atenção por parte dos investigadores. No entanto, já foi comprovado que em condições controladas, estes compostos são capazes de suprimir o $O_2^{\cdot-}$, o OH^{\cdot} e o radical livre sintético "ABTS⁺", com a mesma eficácia que a quercitina³ (um dos mais potentes antioxidantes naturais²).

Relativamente aos taninos condensados, uma das questões que tem sido levantada, é a possibilidade do grau de polimerização influenciar directamente a capacidade antioxidante. Neste campo, as conclusões não são muitas. Se por um lado há resultados que indicam não haver qualquer influência, no caso de serem dímeros ou trímeros³, por outro lado há resultados que traduzem o oposto.³ Dentro dos resultados que parecem traduzir uma relação entre a acção antioxidante e o grau de polimerização, alguns definem que esta relação aumenta até ao trímero e depois vai diminuindo com graus mais elevados³. Outros referem que só existe relação nos dímeros e que com o aumento da polimerização ela desaparece³. Por outro lado, assinalam-se outras opiniões que apontam

para a existência de uma relação positiva entre o aumento do grau de polimerização e o aumento da capacidade antioxidante, nomeadamente no que se refere aos radicais peroxil¹⁷.

A acção protectora destes compostos fenólicos, pode também ser efectuada no lumén intestinal. Quando estes compostos não são absorvidos, é crível que exerçam a sua actividade antioxidante, na protecção de lípidos, proteínas e hidratos de carbono, durante a digestão.^{2,17}

No entanto, e apesar de tudo o que já foi referido sobre a acção antioxidante das proantocianidinas, há estudos que nos transportam em direcção oposta. Efectivamente, em determinadas condições, estes compostos apresentam uma actividade prooxidante.^{2,3,18}

Na realidade, no processo de quelação de metais, estes podem manter ou aumentar a sua actividade catalítica. Podem também ser reduzidos, aumentando assim a sua capacidade de peroxidação.¹⁹

O pH pode também ser um factor importante a considerar, já que a sua diminuição aumenta a capacidade redutora do ferro e diminui a capacidade dos polifenóis em quelarem e inibirem os metais. Ao contrário, um aumento do pH, aumenta a oxidação da desoxirribose, do ADN e em alguns casos dos lípidos.¹⁹

Uma questão que não deve ser esquecida quando se fala da acção antioxidante das proantocianidinas e vinho, tem a ver com a acção do Etanol. O metabolismo deste álcool, é responsável pela formação de radicais livres e pode ajudar à peroxidação lipídica²⁰. É, desta forma, fácil

compreender, que para falarmos de accção antioxidante/prooxidante do vinho, esta, deve ser uma questão a ter em conta.

Considerando, também, que existem estudos que indicam que o consumo dos compostos fenólicos existentes no vinho tinto provoca um aumento da capacidade antioxidante do plasma^{16,20,21}, facilmente se conclui que as incertezas são grandes. A opinião geral é a de que é necessária mais investigação, quer a nível fisiológico, quer bioquímico, para que se possam obter conclusões mais uniformes e creíveis^{2,3,19}.

4. PROANTOCIANIDINAS, SUA BIODISPONIBILIDADE:

ABSORÇÃO E METABOLISMO

A biodisponibilidade das proantocianidinas, é mais uma vez, um assunto sobre o qual os conhecimentos ainda são muito reduzidos, essencialmente devido ao facto de existirem poucos estudos realizados nesta área.³ Por outro lado, o estudo da biodisponibilidade destas estruturas, torna-se ainda mais complicado, dada a dificuldade que existe em determinar qual a quantidade real destes compostos nos alimentos^{2,3}, e qual a percentagem desse todo que vai ser absorvida. A dificultar esta situação está ainda o parco conhecimento existente sobre os processos de absorção e metabolismo.

Todavia, e de uma maneira geral, a absorção e o metabolismo dos polifenóis, são determinados basicamente pela estrutura química dos mesmos, dependendo desta forma do seu grau de glicosilação e acilação,

da sua estrutura básica, da conjugação com outros compostos fenólicos, do seu tamanho molecular, do seu grau de polimerização e da sua capacidade de solubilização.² Outros factores que parecem estar intimamente ligados com o processo de absorção destes compostos, são a presença de Etanol e fibras alimentares. Na realidade, tem-se verificado que este álcool, aumenta a solubilização dos polifenóis, facilitando a sua absorção¹², enquanto as fibras alimentares poderão ter uma influência contrária¹².

No caso específico dos taninos condensados, o que parece acontecer, é que os dímeros e os trímeros, são bem absorvidos através do lúmen intestinal, enquanto que polímeros com maior grau de polimerização, ou não são absorvidos, ou aderem à parede celular. Estes polímeros, também podem ser degradados pela microflora do cólon, em ácidos fenólicos de baixo peso molecular, e poderão aí ser absorvidos. Estes pressupostos, necessitam de confirmação em estudos realizados em seres humanos.³

No que concerne à metabolização destes compostos, o principal envolvido parece ser o fígado, apesar de outras estruturas como são exemplo o rim e a mucosa intestinal, conterem as enzimas envolvidas no metabolismo polifenólico.²

Apesar de não existir nenhum estudo *in vivo*, as proantocianidinas, devem sofrer no fígado, à semelhança do que acontece com outros compostos fenólicos, a metabolização, através de dihidroxilações, metilações ou conjugações com glicuronídeos ou esteres sulfitados.³ É muito provável que estas transformações deixem uma pequena quantidade de proantocianidinas com o seu grupo *o*-dihidroxifenil intacto,

o que reforça a importância de se realizarem estudos sobre a acção dos metabolitos resultantes destes compostos e não sobre a acção dos mesmos no estado natural.³

Uma outra questão dependente deste processo de metabolização, é o tempo que quer os compostos fenólicos, quer os seus conjugados e derivados, permanecem no organismo antes de serem excretados.² O seu esclarecimento é de extrema importância, já que a capacidade que poderão ter de exercer a sua acção, irá depender do tempo que terão para o fazer. Isto é, o tempo que passarão dentro do organismo.

Aqui também são muito exíguos os conhecimentos, sendo que no caso da quercitina, que é um flavenól, o ritmo de eliminação é muito baixo, e bons níveis plasmáticos podem ser mantidos através da alimentação.² No entanto, também se encontram estudos contrários que apontam para uma rápida eliminação destes compostos.²

5. PROANTOCIANIDINAS: POSSÍVEIS INFLUÊNCIAS NA SAÚDE HUMANA

5.1 DOENÇA CARDIOVASCULAR

O consumo moderado de bebidas alcoólicas, particularmente o vinho tinto, influencia negativamente a incidência e mortalidade das doenças cardiovasculares.^{3,12,20,22,23,24}

Este facto é suportado por diversos estudos incluindo alguns na área da Epidemiologia.^{3,23,24} Um dos mais debatidos e documentados é o caso francês que já é conhecido como “paradoxo francês”.

Altos índices de mortalidade causados por doenças cardiovasculares, verificam-se na maioria dos países possuidores de padrões alimentares caracterizados por dietas que veiculam grandes quantidades de gordura e particularmente de colesterol.²⁴ Parece haver uma relação directa entre estes dois factores. No entanto, em certas regiões da França, esta situação não acontece. Apesar do consumo de gordura neste país ser semelhante a países como os Estados Unidos da América ou o Reino Unido, a taxa de mortalidade por doença coronária, é semelhante aos países menos consumidores de gordura.^{24,25} Esta diferença parece ser causada pelo consumo de vinho. Outros factores de risco também foram tidos em conta (ex.: pressão sanguínea, índice de massa corporal, consumo de tabaco), mas as diferenças não eram significativas.²⁶

Assim sendo, e tendo por base estes pressupostos, é lícito pensar que o vinho e conseqüentemente a sua constituição em proantocianidinas, têm um papel importante na protecção contra doenças cardiovasculares.^{3,24,27}

Provavelmente, os mecanismos através dos quais o vinho exerce os seus efeitos protectores, encontram-se relacionados com a prevenção da oxidação das LDL e com a diminuição da agregação plaquetária.

5.1.1 OXIDAÇÃO DAS LDL

As LDL oxidadas, tem um importante significado na evolução da Aterosclerose. Esta situação baseia-se no facto de se encontrarem grandes quantidades destas lipoproteínas nas regiões afectadas, e no papel que têm na formação de *foam cells*. Por outro lado, esta interacção, depende também do aumento da permeabilidade do endotélio vascular às LDL, da activação das células endoteliais para a libertação de diversos factores e proteínas que promovem a adesão monocitária e a transformação de macrófagos em *foam cells*, e ainda da estimulação de aniões superóxido por parte das células presentes no local da lesão.²¹

A oxidação das LDL pode ser inibida através da acção dos polifenóis onde se incluem as proantocianidinas.^{2,3,12,22,23,27}

Esta acção poderá ser exercida através dos seguintes mecanismos²:

- redução das formação de radicais livres;
- protecção do α -tocoferol, nas LDL, de oxidação;
- regeneração do α -tocoferol;
- quelação de iões metálicos (ex.: cobre²³).

Um outro mecanismo sugerido aponta para a hipótese de alguns polifenóis conseguirem integrar-se nas LDL, impedindo desta forma a sua oxidação.³

Apesar do referido, as proantocianidinas inibem a oxidação das LDL *in vitro*, no entanto, os resultados não podem ser cegamente extrapolados para os humanos, uma vez que, estes compostos, por absorção, raramente alcançam os tecidos na sua forma nativa.³

O aumento da concentração das HDL, está normalmente associado a um aumento da protecção contra as doenças cardiovasculares.²⁸ Tendo por base o pressuposto que o Etanol, presente nos vinhos, pode ser o responsável por um aumento de concentrações de HDL^{2,20,21,24,26,28}, poder-se-á considerar que o vinho exerce um efeito inibidor indirecto sobre as doenças cardiovasculares, através deste seu álcool.

Esta possibilidade está na base da consideração de que o vinho, quando consumido moderadamente, é benéfico para o ser humano, protegendo-o da evolução de doenças cardiovasculares.

5.1.2 AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Os polifenóis, são capazes de alterar o metabolismo das prostaglandinas, através da inibição da actividade da cicloxigenase e da lipoxigenase sobre as plaquetas e os macrófagos, diminuindo as tendências trombóticas.²⁶

É inegável que os polifenóis e particularmente os taninos condensados, podem levar a uma inibição da agregação plaquetária.^{3,26}

No entanto, os estudos realizados com humanos, não têm inequivocamente comprovado esta relação. Inclusivamente, a ingestão de vinho tinto e vinho branco não leva a qualquer alteração na agregação plaquetária, *ex vivo*, quer seja induzido pelo colagénio, quer pela trombina.³

Uma situação que tem obrigatoriamente que se ter em conta, é a de que o consumo de vinho desalcoholizado, não tem qualquer efeito neste

processo, ao contrário do que acontece quer com o vinho, quer com uma mistura de álcool com sumo de fruta.³ Esta situação pode dever-se ao facto do etanol, poder levar a um aumento da concentração de HDL, que, por sua vez aumenta a estimulação da produção de prostaciclina, que é um potente vasodilatador e anticoagulante.²⁰ A reforçar esta ideia, está um pequeno estudo²⁸ efectuado com dez voluntários, e que, parece indicar que os polifenóis constituintes do vinho tinto, têm um efeito vasorelaxante potente.

5.2 CANCRO

Grande parte dos estudos efectuados nesta área, apontam para a probabilidade dos compostos polifenólicos possuírem um efeito anticarcinogénico.^{2,3,12} É possível que esta situação se deva essencialmente ao facto de estes compostos interferirem em diversos passos do processo de oncogénese, como são exemplos a protecção na oxidação do ADN, a inibição da expressão de genes mutantes, a inibição de enzimas envolvidas na activação de procarcinogénicos e a activação de sistemas enzimáticos envolvidos na desintoxicação de xenobióticos.²

Em oposição, o vinho, é geralmente considerado um produto carcinogénico, essencialmente devido à presença de etanol. Por outro lado, o risco cancerígeno aumenta com o consumo de bebidas destiladas e cerveja, sendo que esse risco será tanto menor quanto maior for a percentagem de vinho na totalidade de álcool consumido. Esta dado poderá resultar das diferenças em nitrosaminas, muito mais escassas no

vinho, do aparecimento na urina de substâncias protectoras dos efeitos tóxicos do álcool ou com a presença de reverterol, que é um polifenól com propriedades anticarcinogénicas.³

Poderá ser, também, um factor influenciador de toda esta dinâmica, a presença de proantocianidinas. Os estudos são contraditórios. Se a maioria confere a estes compostos propriedades benéficas, alguns atribuem-lhes propriedades cancerígenas.³ No entanto, parece que, tendo em consideração os referidos estudos, nos quais os resultados contraditórios devem ser a consequência do tipo de ensaio e do tipo de composto analisado, tudo aponta para que as proantocianidinas tenham uma acção anticarcinogénica e não o contrário.^{2,3,12}

6. PROANTOCIANIDINAS: MÉTODOS DE ANÁLISE E DETECÇÃO

A determinação destes compostos é crucial e justifica-se não só para se poder avançar no conhecimento da composição e comportamento do vinho, bem como as influências deste na saúde humana.

Os métodos actualmente usados para a detecção de proantocianidinas, diferem entre si, no que se refere aos seus princípios base e às suas especificidades. Além disso, nenhum deles pode ser considerado satisfatório, dado não serem completamente fiáveis.³

Nos nossos dias, os métodos usados na determinação global de proantocianidinas podem ser divididos em cinco categorias distintas³:

- a. Métodos baseados nas características fenólicas. As proantocianidinas são ricas em grupos fenólicos capazes de

reduzirem o reagente de Folin e o ferro (III) na reacção azul prussiana. Esta é uma metodologia falível, já que estas características não são específicas destes compostos.

- b. Métodos baseados na capacidade que as proantocianidinas têm de precipitar proteínas. Mais uma vez, estes ensaios têm falta de especificidade. Estes compostos não são os únicos detentores desta característica. Assim sendo, este tipo de metodologia seria mais indicado para avaliar a adstringência do que para quantificar estas moléculas.
- c. Métodos que se baseiam na capacidade que os flavonóis têm de reagir com aldeídos aromáticos, em meios ácidos, e dar origem a um colorido aducto. Os reagentes usados neste procedimento são a vanilina e o 4-dimetilaminocinamaldeído. A reactividade dos compostos depende da estrutura e do grau de polimerização, o que torna difícil a comparação entre amostras com composições de flavonóis distintas.
- d. Métodos baseados na despolimerização das proantocianidinas através da acção do calor em meio ácido e na determinação colorimétrica das antocianidinas libertadas²⁹. Nesta determinação poderá dar-se a formação de outros produtos poliméricos. Esta situação irá depender da estrutura das procianidinas presentes e das condições empregues.
- e. Tiolise baseada na despolimerização dos taninos condensados na presença de benzilmercaptano. A adição deste reagente leva à formação de um tioeter com o C4 de cada polímero, limitando

assim a formação de produtos indesejáveis. Os produtos de degradação quer das procianidinas, quer das prodelfinidinas, são separados e quantificados através de CG ou HPLC.

De entre todos os métodos referidos, a tiolise é sem dúvida um método bem adaptado para a quantificação de proantocianidinas, já que para além de não haver ambiguidades na sua determinação, permite também adquirir informação sobre quais as unidades básicas constituintes e qual o grau de polimerização. Apesar de ser moroso, será um método que se deverá desenvolver no futuro já que detém grande grau de especificidade.

Determinações absolutamente fiáveis destes compostos são ainda muito difíceis de obter. Dado não haver um método padrão definido, os resultados obtidos por diferentes métodos são muitas vezes incompatíveis. Apesar deste facto, é importante referir que em alguns casos, diferentes tipos de ensaios traduzem-se em boas correlações (ex.: tiolise e ensaio com vanilina).³

Estas determinações dependem grandemente da capacidade de extracção do solvente. A acetona aquosa, é o solvente com melhores resultados atingidos, no entanto, há ainda uma parte destes compostos que resiste a este solvente. Desta forma os resultados finais estão mais sujeitos a erros.^{2,3}

7. CONCLUSÃO

O mundo das proantocianidinas e a sua correlação com a saúde humana, é ainda um caminho relativamente desconhecido para a ciência. São escassos os estudos e poucas as conclusões.

No entanto, parece-me que para que se possa avançar mais nesta área é fundamental apostar em dois campos essenciais, a partir dos quais julgo poderem-se atingir os conhecimentos pretendidos. São eles a investigação das técnicas laboratoriais de detecção e identificação de compostos fenólicos, e, a aposta no aprofundar do conhecimento de todos os processos fisiopatológicos envolvidos na absorção, metabolização e excreção destas moléculas no corpo humano. Creio que uma exacta avaliação qualitativa e quantitativa deste compostos, é fundamental para o desaparecimento de incertezas relativamente aos processos fisiopatológicos. Para além disso, irá ajudar a melhor compreender as características do vinho, particularmente a nível organoléptico, o que poderá trazer inúmeras vantagens para o seu processo tecnológico. Acredito que sem o aprofundar destas duas áreas, o conhecimento terá muitas dificuldades em avançar, e basear-se-á fundamentalmente em especulações,

Gostaria de deixar o meu humilde comentário a uma célebre frase de Pasteur, que dizia: *"a penicilina cura os homens, mas é o vinho que os alegra"*.

Acredito que, pelo que investiguei sobre as possíveis acções do vinho e particularmente das suas proantocianidinas, na saúde humana, este néctar

poderá vir a ter, num futuro próximo, um papel que não sendo equivalente ao da penicilina, não será seguramente o de estar reduzido à simples satisfação dos sentidos.

BIBLIOGRAFIA

1. J. Duarte Amaral. 1994. O Grande livro do vinho. Lisboa. Circulo de Leitores.
2. Laura Bravo, Ph.D. (1998) "Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance". Nutrition Reviews. Vol. 56. (11): 317-333.
3. Celestino Santos-Buelga e Augustin Scalbert. (2000) "Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health". Journal of Science and Food Agriculture. (80):1094-1117.
4. Souquet J. M., et al. (1996) "La Viticulture à l'Aube du III^e millenaire: Les composés phenoliques du raisin". Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin. Numéro Hors Série. 99-107.
5. De Freitas, V.. Octobre 1995. These pour obtenir le Doctorat de l'Université de Bourdeaux II – "Recherches sur les tanins condensés: Application à l'étude des structures et propriétés des procyanidines du raisin et du vin". Université de Bordeaux II – Faculté D'Oenologie. These n.º 353.
6. Ribereau-Gayon P., et al. (1972) "Composés phénoliques" in, Ribereau-Gayon P. et al, Sciences et techniques du vin. Paris. Dunot ed.
7. Ribereau-Gayon P. (1964) "Les composés phénoliques du raisin et du vin". Ann. Physiol. Vég. (6): 119-147.
8. Glories, Y.. 1978. "Recherches sur la matière colorante des vins rouges". Thèse d'État. Institut d'oenologie, Université de Bourdeaux II.
9. Torres de Castro, L. F., et al. 1995. Série Didática n.º9 "Substâncias Fenólicas – breves notas sobre a sua estrutura e biossíntese". U.T.A.D. – Vila Real.
10. Macheix, J. J., et al. 1990. Fruit Phenolics. Florida. CRC Press.
11. Haslam E.. (1980) "In vino veritas: oligomeric procyanidins and the ageing of red wines" Phytochemistry. (19): 2477-2582.

12. C. Remesy, et al. (1996). Intérêt Nutritionnel des flavonoïdes". *Médecine et Nutrition*. Vol. 32. (1): 17-27.
13. Benoît Labarbe, et al. (1999) "Quantitative Fractionation of Grape Proanthocyanidins According to Their Degree of Polymerization". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. (7): 2719-2723.
14. Jean-Marc Souquet, et al. (2000) "Phenolic Composition of Grapes Stems". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. (48): 1076-1080.
15. Jean-Marc Souquet, et al. (1996) "Polymeric Proanthocyanidins from grape skins". *Phytochemistry*. Vol. 43. (2): 509-512.
16. F. Leighton, et al. (1998) "Propriétés antioxydantes du vin et de ses composants". *Bulletin O.I.V.*. (807-808): 463-490.
17. Fulvio Ursini, M.D., et al. (1999) "Optimisation of Nutrition : Polyphenols and Vascular Protection". *Nutrition Reviews*. Vol. 57. (8): 241-9.
18. Garry G. Duthie. (1999) "Parsley, polyphenols and nutritional antioxidants". *British Journal of Nutrition*. (81):425-426.
19. Eric A. Decker, Ph.D.. (1997) "Phenolics: Prooxidants or Antioxidants?". *Nutrition Reviews*. Vol. 55. (11): 396-398.
20. Mauro Serafini, et al. (1998) "Alcohol-Free red Wine Enhances Plasma Antioxidant Capacity in Humans" *Journal of Nutrition*. (128): 1003-7.
21. M-A Carbonneau, et al. (1997). "Supplementation with wine phenolic compounds increases antioxidant capacity of plasma and vitamin E of low-density lipoprotein without changing the lipoprotein Cu²⁺-oxidizability: Possible explanation by phenolic location". *European Journal of Clinical Nutrition*. (51): 682-690.
22. Joe A. Vinson, et al. (1999) "Vitamins and Especially Flavonoids in Common Beverages Are Powerful in Vitro Antioxidants Which Enrich Lower Density Lipoproteins and Increase Their Oxidative Resistance after ex Vivo Spiking in Human Plasma". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. Vol 47.(7):2502-4

23. E. N. Frankel, et al. (1993) "Inhibition of oxidation of low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine". *The Lancet*. Vol. 341. 454-457.
24. S.Renaud e M. de Lorgeril. (1992) "Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease". *The Lancet*. Vol. 339. 1523-6.
25. Suzanne Brun. (1995) "Les propriétés biologique des constituants non-alcooliques du vin". *Cahier de Nutrition et Diététique*. Vol. 30. (4): 224-9.
26. J. C. Ruf, Ph.D. (1999) "Effets du vin et des polyphénols sur l'agrégation plaquettaire et l'athéreo-thrombose". *Bulletin O.I.V.*. Vol. 72. (817-818): 243-259.
27. Shailja V. Nigdikar, et al. (1998). "Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo". *American Journal of Clinical Nutrition*. (68): 258-65.
28. Kenei Shimada, et al. (1999). "Effect of red wine on coronary flow-velocity reserve". *The Lancet*. Vol. 354. 1002.
29. Tair Lapidot, et al. (1998) "Bioavailability of Red Wine Anthocyanins As detected in Human Urine". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. (46): 4297-4302.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Emile Andriambelason, et al. (1998) "Natural Dietary Polyphenolic Compounds Cause Endothelium-Dependent Vasorelaxation in Rat Thoracic Aorta". *Journal of Nutrition*. (128): 2324-2333.
- George J. Soleas, et al. (1997) "Relative Contributions of Polyphenolic Constituents to the Antioxidant Status of Wines: Development of a Predictive Model". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. Vol. 45. (10):3995-4003.
- J. Blouin, et al. (2000) "Étude de la structure polyphénolique des vins rouges par analyses physico-chimiques et sensorielles". *J. Int. Sci. Vigne Vin*. Vol. 34. (1):33-40.
- Jennifer L. Donovan, et al. (1999) "Catechin Is Present as Metabolites in Human Plasma after Consumption of Red Wine". *Journal of Nutrition*. (129):1662-8.
- Lubert Stryer. (1995) "DNA Structure, Replication, and Repair" in, Lubert Stryer, *Biochemistry*. USA. Library of Congress Cataloging-in-publication Data.
- Lubert Stryer. (1995) "Enzymes: Basic Concepts and Kinetics" in, Lubert Stryer, *Biochemistry*. USA. Library of Congress Cataloging-in-publication Data.
- Lubert Stryer. (1995) "Fatty Acid Metabolism" in, Lubert Stryer, *Biochemistry*. USA. Library of Congress Cataloging-in-publication Data.
- Luc Djoussé, MD, MPH., et al. (1999) "Acute Effects of a High-Fat Meal With and Without Red Wine on Endothelial Function in Healthy Subjects". *American Journal of Cardiology*. (84): 660-664.
- Pascal Chatonnet, et al. (1997) "Influence of Polyphenolic Components of Red Wines on the Microbial Synthesis of Volatile Phenols". *American Journal of Enology and Viticulture*. Vol. 48. (4): 443-447.

- Pascal Sarni-Manchado, et al. (1999) "Analysis and Characterization of Wine Condensed Tannins Precipitated by Proteins Used as Fining Agent in Enology". American Journal of Enology and Viticulture. Vol. 50. (1): 81-6.
- Raymond Brouillard e Olivier Dangles. (1994) « Anthocyanin molecular interactions : the first step in the formation of new pigments during wine aging? ». Food Chemistry. (51): 365-371.
- Sheila Gorinstein. (1999) Comments on "Potential Explanation for the French Paradox". Nutrition Research. Vol. 19. (11):1599-1602.
- Takuro Koga, et al. (1999) "Increase of Antioxidative Potential of Rat Plasma by Oral Administration of Proanthocyanidin - Rich Extract from Grape Seeds". Journal of Agriculture and Food Chemistry. Vol. 47. (5): 1892-1897.
- Tom Brody. (1999) "Digestion and Absorption" in, Tom Brody, Nutritional Biochemistry. USA. Academic Press.
- Tom Brody. (1999) "Lipids" in, Tom Brody, Nutritional Biochemistry. USA. Academic Press.
- Tom Brody. (1999) "Protein" in, Tom Brody, Nutritional Biochemistry. USA. Academic Press.
- Victor AP de Freitas and Yves Glories.(1999) "Concentration and compositional changes of procyanidins in grape seeds skin of white *Vitis vinifera* varieties". Journal of Science and Food Agriculture. (79): 1601-6.