

Artículo Original

LOS VINOS DE MORA DE MERIDA SON UNA BUENA FUENTE DE ANTIOXIDANTES

Elizabeth M Pérez-Pérez, ^{1*}; Antonio Rodríguez-Malaver²; Patricia Vit, ³.

¹Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias, ²Laboratorio de Bioquímica Adaptativa, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina; y, ³Apiterapia y Bioquímica Antioxidante, Departamento de Ciencia de Los Alimentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis; Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela.

*Autor de Correspondencia: Elizabeth M. Pérez-Pérez. Urb. La Linda, Calle B, Casa 48, La Pedregosa Baja, Mérida, Venezuela. 0274-2666473, 0416-4398138. e-mail: elimariana@ula.ve

RESUMEN

Fue evaluada la actividad antioxidantes de 12 vinos de mora fabricados artesanalmente en el Páramo La Culata (Mérida, Venezuela) a través de la inhibición de la formación del anión superóxido y radical hidroxilo, y el método de la Actividad Antioxidante (AOA). Además, fue determinado el contenido de fenoles y de proteínas de acuerdo al procedimiento de Folin-Ciocalteu. En lo que se refiere al efecto de los diferentes vinos de mora en la generación del anión superóxido y el radical hidroxilo, se obtuvieron los mayores porcentajes de inhibición por las muestras 2, 4, 9, 11 y 12, siendo en muchos casos los porcentajes de inhibición superiores a los observados con melatonina y vitamina E. En relación a los valores de AOA, se encontró que las muestras de vino de mora presentaron valores de AOA entre 0.80-0.95 mM, siendo en casi todos los casos superiores o similares a los presentados por la melatonina y la vitamina E. En todos los casos existió una correlación lineal entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles de las muestras en estudio, representado por valores de correlación (R^2) entre 0.988 y 0.997 y valores de P entre 0.005 y 0.021. Se ha demostrado que los vinos de mora producidos artesanalmente en Mérida (Venezuela) analizados en este estudio son una buena fuente de antioxidantes naturales.

ABSTRACT

The antioxidative activity of a total of 12 mulberry wines was examined by inhibition of superoxide anion and hydroxyl radical generation, and antioxidant activity method (AOA) autoxidation of methyl linoleate. The content of total phenolics in the samples was determined spectrometrically according to the Folin-Ciocalteu procedure. In relation to the effect of different mulberry wines in superoxide anion and hydroxyl radical generation, were founded the highest inhibition percentages for samples 2, 4, 9, 11 and 12, being in some cases bigger than those founded with melatonin and vitamin E. On the other hand, was founded that mulberry wine samples had AOA values between 0.80-0.95 mM, being in all cases bigger or similar to those founded with melatonin and vitamin E. In all cases, there was a lineal relation between antioxidant capacity and phenol content of samples, represented by correlation values (R^2) between 0.988 and 0.997 and P values between 0.005 and 0.021. Has been demonstrated that mulberry wines produced in Mérida (Venezuela) assayed in this study are a good source of natural antioxidants.

INTRODUCCIÓN

Los polifenoles y compuestos relacionados se pueden encontrar en cada especie de planta. En plantas, los polifenoles son importantes para la pigmentación, la reproducción, el crecimiento, y la protección contra patógenos. En la industria, los polifenoles se utilizan en la producción de pinturas, de papel, y de cosméticos. así como aditivos alimenticios⁽¹⁾. Sin embargo, en los últimos años, los polifenoles han recibido mucha atención en el tratamiento y prevención de enfermedades debido a sus capacidades antioxidantes⁽²⁾.

Actualmente, se conocen más de 8000 estructuras polifenólicas⁽¹⁾. Los polifenoles comparten una estructura química común y se diferencian solamente en sus acoplamientos adicionales con otros compuestos. La mayoría de polifenoles tienen un residuo de azúcar ligado al esqueleto de carbono. La glucosa es el residuo de azúcar encontrado con más frecuencia, sin embargo, se pueden encontrar diversos monosacáridos, disacáridos, u oligosacáridos. Se puede encontrar en la estructura de ciertos polifenoles residuos como aminas, ácidos orgánicos, ácidos carboxílicos, lípidos, y otros polifenoles⁽¹⁾.

Debido a la abundancia de polifenoles en naturaleza, no es de extrañar que puedan ser encontrados en frutas, vegetales, café, té, chocolate, y soja⁽³⁾. Una vez que son ingeridos, los polifenoles tienen varios destinos posibles, incluyendo la absorción en el intestino delgado o el colon, y/o la excreción en las heces o la orina. El sitio y el grado de absorción dependen de la estructura química, del grado de glicosilación/acilación, de la conjugación con otros grupos fenólicos, del tamaño molecular, del grado de polimerización, y de la solubilidad^(1,3).

En el intestino delgado, los polifenoles pueden entrar en la mucosa a través de difusión pasiva. En el colon, los polifenoles son digeridos inicialmente en estructuras fenólicas más pequeñas por la microflora. Después de que esta digestión inicial se completa, los polifenoles y sus metabolitos pueden ser absorbidos⁽¹⁾. Más de dos tercios de los polifenoles consumidos en la dieta son generalmente flavonoides⁽⁴⁾. La mayoría de investigación de flavonoides y polifenoles se ha centrado en la reducción LDL in vivo e in vitro.

Muchos estudios epidemiológicos han demostrado que la ingestión regular de polifenoles naturales en alimentos como jugo de uva, vino rojo, jugo de mora y otras bebidas está asociado a la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares^(5,6).

En general, más de dos tercios de los polifenoles consumidos en la dieta son flavonoides. Los flavonoides del vino rojo han generado un gran interés especialmente debido a sus capacidades antioxidantes *in vivo* e *in vitro*. Su efecto beneficioso sobre el sistema cardiovascular fue descrito principalmente en lo referente al fenómeno de la Paradoja Francesa de la dieta mediterránea. La paradoja francesa se define como la baja incidencia de enfermedades cardíacas coronarias a pesar de consumir una dieta rica en grasas saturadas. Se demostró que la dieta mediterránea, rica en frutas y vino rojo, protege contra el desarrollo de enfermedades cardiovasculares^(7,8).

El consumo de frutas, vegetales y vino rojo puede ayudar a revertir la hiperlipidemia, a disminuir el aterogénesis de las partículas LDL⁽⁹⁾ y a proteger el colesterol LDL contra la oxidación⁽¹⁰⁾.

Las uvas y las moras contienen una gran variedad de polifenoles incluyendo el resveratrol (estilbeno), catecol, los flavonoides y sus derivados tales como flavonas, flavonoles, y antocianinas. De hecho, estos compuestos presentes en el vino rojo poseen un número de efectos biológicos que pueden participar en la protección vascular, incluyendo características antioxidantes y de secuestradores de radicales libres. Otro efecto terapéutico relevante de los flavonoides puede ser su capacidad de interactuar con la generación de NO del endotelio vascular, lo cual contribuye no solo con la vasodilatación, sino también con la expresión de los genes que protegen el sistema cardiovascular^(6, 11, 12, 13).

Los polifenoles también contribuyen a la preservación de la integridad de las células de la pared vascular, principalmente las del endotelio, actuando en las cascadas de la señalización implicadas en apoptosis endotelial. Debido a sus características antioxidantes, las dietas complementadas con alimentos que contienen flavonoides, pueden proteger diversos tejidos contra daño isquémico. Los flavonoides reducen el estrés oxidativo implicado en la muerte celular⁽¹³⁾. Recientemente, se han realizado hipótesis acerca de la posible ventaja de un consumo moderado de vino en pacientes con falla renal crónica⁽¹⁴⁾.

Por lo tanto, se espera que las fuentes alimenticias ricas en antioxidantes, tales como frutas, vegetales, té o vino, también atenúen el daño renal causado por el estrés oxidativo.

El vino es una bebida alcohólica hecha de la fermentación de jugo de frutas. El equilibrio químico natural de ciertas frutas es tal que pueden fermentar sin la adición de azúcares, ácidos, enzimas u otros alimentos. Aunque otras frutas como manzanas y bayas puedan también ser fermentadas, el vino

resultante se nombra después de la fruta (por ejemplo, vino de la manzana o vino de la baya del saúco). Otros, tales como vino de cebada y vino de arroz (e.g. sake) se hacen de materiales a base de almidón y se asemejan a la cerveza más que al vino, mientras que el vino del jengibre se fortifica con brandy. En estos casos, el uso del término es una referencia al contenido en alcohol más que al proceso de producción. El vino posee una alta variedad de compuestos polifenólicos, principalmente flavonoides tales como catequinas, epicatequinas y de epigallocatequinas⁽¹⁵⁾.

Debido a todo lo mencionado anteriormente, en este trabajo fue realizado el estudio de la actividad antioxidante de 12 variedades de los vinos de la mora que se producen en Mérida (Venezuela).

METODOLOGÍA

1. Muestras de Vino de Mora.

Los diferentes vinos de mora fueron obtenidos en 12 fábricas artesanales de este vino que se encuentran en la región del Valle del Páramo La Culata de la ciudad de Mérida. El proceso de elaboración consiste en recoger la fruta, prensarla a mano o con ayuda de una pequeña prensa o una licuadora, y colocarlo en un envase para dejarla fermentar. En algunos casos, para evitar que la fermentación produzca demasiado alcohol, se añade azúcar. Por último, en 10 o 12 días se cuela la preparación y se embotella.

2. Medición de la capacidad antioxidante.

2.1. Método de la Actividad Antioxidante (AOA).

El AOA fue determinado usando el método desarrollado por Korasevic⁽¹⁶⁾. En este método una solución estandarizada del complejo Fe-EDTA reacciona con el peróxido de hidrógeno a través de una reacción tipo Fenton, produciendo la formación de radicales hidroxilo. Estos radicales degradan el benzoato, resultando en la formación de TBARS. Esta reacción fue monitoreada espectrofotométricamente y se define como AOA la inhibición del desarrollo de color.

2.2. Ensayo del Anión Superóxido.

Se desarrolló un microensayo adaptando el método descrito por⁽¹⁷⁾. El anión superóxido fue generado por la reacción entre el NADH y el PMS, y detectado por medio de la reducción del NBT. La mezcla de reacción contenía 20 µL de cada vino de mora, 50 µL de NADH 320mM, y 50 µL de NBT 0.1

mM. Después de la incubación por 10 minutos a temperatura ambiente, se inició la reacción añadiendo 15 µL de PMS 40 mM. Entonces, fue detectado el cambio de absorbancia a 560 nm durante los primeros 3 minutos de reacción.

2.3. Ensayo del radical hidroxilo.

El radical hidroxilo fue generado por medio de la reacción de Fenton siguiendo el método descrito por⁽¹⁸⁾. Fueron agregados los siguientes reactivos en la mezcla de reacción 0.1 mL de desoxiribose 28 mM, 0.5 mL de buffer fosfato (pH 7.4) 40 mM, 0.1 mL de FeCl₃ 1 mM, 0.1 mL de EDTA 1.04 mM, 0.1 mL de H₂O₂ 1 mM, 0.1 de ácido ascórbico 1 mM, y 0.2 mL de cada vino de mora. Esta mezcla fue incubada por 1 h a 37°C. Entonces, se agregaron 0.5 mL de TBA 1% (p/v) en 0.05 M de NaOH y 0.5 mL de ácido tricloroacético 2.8% (v/v) y se dejó reaccionar por 10 min a 100°C. Fue registrada la absorbancia a 532 mM.

3. Medición de la concentración de grupos fenólicos.

La determinación de la concentración de grupos fenólicos fue llevada a cabo mediante una técnica colorimétrica basada en el reactivo de Folin-Ciocalteu's siguiendo el método de Singlenton⁽¹⁹⁾.

4. Medición de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas fue determinada espectrofotométricamente a 750 mM por el método de Lowry⁽²⁰⁾. Usando albúmina bovina como estándar.

5. Estadística.

Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado. Los datos fueron analizados usando el análisis de varianza ANOVA y el test de comparación múltiple Newman-Keuls (Prism®, Graph Pad, San Diego, CA).

RESULTADOS

1. Efecto de los vinos de mora en la generación del anión superóxido y el radical hidroxilo.

Fue estudiado el efecto de los diferentes vinos de mora en la generación de radicales libres, en este caso, anión superóxido y radical hidroxilo. Puede observarse en la Tabla 1, que todos los vinos de mora tienen la capacidad de disminuir la generación del

anión superóxido y el radical hidroxilo de una manera estadísticamente significativa. En general, el vino de mora 2 presentó el mayor porcentaje de inhibición de la formación de estos dos radicales, seguido de los vinos 4, 9, 11 y 12. El resto de las muestras presentó porcentajes de inhibición inferiores a 27% (Tabla 1). Cuando las muestras de vino son comparadas con la melatonina y la vitamina E, puede observarse que en el caso del anión superóxido el vino 2 tiene valores de inhibición superiores a los encontrados para la melatonina y la vitamina E, mientras que los vinos 4, 9, 11 y 12 poseen porcentaje de inhibición similares a estos compuestos puros. En el caso del radical hidroxilo, nuevamente el vino 2 presenta valores de inhibición muy superiores a los reportados para la melatonina y la vitamina E, siendo el mismo caso el presentado por los vinos 4, 9, 11 y 12 (Tabla 1).

2. Medición del valor de AOA de diferentes muestras de vino de mora.

Los valores de AOA de los diferentes vinos de mora muestran una capacidad antioxidante que es comparable a la del ácido úrico, un potente antioxidante encontrado en sistemas vivos⁽¹⁶⁾. Los valores de AOA se presentan en la Tabla 2, observándose que los valores de AOA de las muestras de vino de mora se encuentran en concentraciones equivalentes entre 0.80-0.95 mM de ácido úrico, lo cual representa valores altos al compararlos con el ácido úrico usado a una concentración de 1 mM en este estudio. Nuevamente, el vino 2 es el que presenta el mayor valor de AOA (0.95 mM), mayor incluso que las muestras de melatonina y vitamina E; seguido por los vinos 4, 9, 11 y 12 (Tabla 2).

DISCUSIÓN

En lo que se refiere al efecto de los diferentes vinos de mora en la generación del anión superóxido y el radical hidroxilo, se obtuvieron los mayores porcentajes de inhibición por las muestras 2, 4, 9, 11 y 12, siendo en muchos casos los porcentajes de inhibición superiores a los observados con melatonina y vitamina E (Tabla 1). En relación a los valores de AOA, se encontró que las muestras de vino de mora presentaron valores de AOA entre 0.80-0.95 mM, siendo en casi todos los casos superiores o similares a los presentados por la melatonina y la vitamina E (Tabla 2). Los valores de AOA presentados por las muestras de vino de mora se encuentran dentro del rango de valores de AOA cuando se comparan con otros compuestos analizados por este método, tales como humos acuoso ocular (0.061 mM), fluido cerebroespinal (0.095 mM), orina (0.17 mM), y saliva

(0.84 mM) (Koracevic *et al.*, 2001). Es importante destacar que los valores de capacidad antioxidante son comparados con la melatonina y la vitamina E ya que estos dos compuestos presentan una gran capacidad antioxidante. Por una parte, la vitamina E se ha relacionado con la protección contra enfermedades cardiovasculares, Alzheimer, Parkinson, cáncer, e infecciones inmunes⁽²¹⁾. Por otra parte, la melatonina es un eficiente secuestrador de radicales libre en el organismo, protegiendo contra el proceso de envejecimiento^(22,23).

La actividad antioxidante observada a través de todos los métodos utilizados en este estudio fue comparable con la reportada por Sun y Pellegrini^(24,25) y pudiera ser atribuida a la alta concentración de grupos fenólicos encontrados en todas las muestras de mora estudiados en este trabajo (Tabla 3), en comparación con otros compuestos fenólicos reportados previamente^(26,27,24). En todos los casos existió una correlación lineal entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles de las muestras en estudio, representado por valores de correlación (R^2) entre 0.988 y 0.997 y valores de P entre 0.005 y 0.021 (Tablas 1 y 2). Ha sido reportado por varios autores que existe una relación entre los grupos fenólicos y la capacidad antioxidante presentada por extractos de diversas frutas y vegetales, teniendo las frutas mayor concentración de grupos fenólicos que los vegetales^(28,24, 29).

En el caso de los vinos, resultados similares a los encontrados en este trabajo son reportados por Yildrin⁽³⁰⁾ quien evaluó el contenido de fenoles y capacidad antioxidante de diferentes vinos de frutas, entre los que se encontraban vinos de mora negra, zarzamora, membrillo, manzana, albaricoque, melón, frambuesa roja, arándano, cereza amarga y fresa. Este autor encontró que los mayores valores de capacidad antioxidante y contenido total de fenoles correspondían a los vinos de arándano, zarzamora y mora negra, encontrando una correlación positiva ($r=0.958$, $P = 0.001$) entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles de las muestras analizadas, revelando la importancia de este tipo de bebidas como agentes antioxidantes⁽³⁰⁾.

Aunque en este trabajo no se evaluó la composición de antioxidantes de las muestras de vinos de mora, algunos autores han reportado que los vinos contienen varios antioxidantes tales como resveratrol (estilbeno), catecol, los flavonoides y sus derivados tales como flavonas, flavonoles, y antocianinas (6, 11, 12,13). Se sabe que los compuestos fenólicos son secuestradores eficientes del radical piróxilo debido a sus estructuras moleculares, las cuales incluyen anillos aromáticos con grupos hidroxilos que poseen

hidrógenos móviles (31). Además, la acción de los compuestos fenólicos puede estar relacionada con su capacidad de reducir o quela iones divalentes involucrados en reacciones de generación de radicales libres (32). Por otra parte, los antioxidantes fenólicos (ArOH) pueden interrumpir las cadenas de formación de radicales iniciadas por transferencia de átomos de hidrógeno (Ecuación 1) o por transferencia de electrones (Ecuación 2), llevando a la producción del catión radical fenoxilo (ArOH[•]), el cual es rápida y reversiblemente despretinado, formando el radical fenoxilo (Aro[•]) (Ecuación 3) (33). Estos dos mecanismos siempre ocurren en paralelo pero con diferentes velocidades de reacción.



(Transferencia de átomos H)



(Transferencia de electrones)



Los componentes fenólicos presentes en las muestras de vinos de mora pueden actuar de acuerdo a alguno de los mecanismos mencionados previamente, considerando a los vinos de mora como una buena fuente de antioxidantes naturales.

En conclusión, todas las muestras de vinos de mora presentaron una capacidad antioxidante que es dependiente de su contenido de grupos fenólicos. Esta capacidad antioxidante fue en muchos casos superior o similar a la presentada por la melatonina y la vitamina E. Estos resultados indican que los compuestos fenólicos presentes en las muestras de vinos de mora son altamente eficientes como antioxidantes naturales, y es necesario realizar más estudios para determinar que tipo de compuestos fenólicos se encuentran presentes en este tipo de vinos.

Muestra	Anión Superóxido	Radical Hidroxilo
1	20.57 ± 0.23a	38.68 ± 0.15a
2	57.67 ± 0.12b	65.32 ± 0.13b
3	27.10 ± 0.14c	47.98 ± 0.15c
4	41.54 ± 0.21d	60.44 ± 0.11d
5	23.01 ± 0.06e	45.78 ± 0.16e
6	20.64 ± 0.22a	41.43 ± 0.09f
7	19.64 ± 0.31a	41.55 ± 0.25f
8	25.54 ± 0.10f	50.52 ± 0.23g
9	38.14 ± 0.23g	58.23 ± 0.07h
10	21.60 ± 0.11a	42.87 ± 0.19f
11	37.90 ± 0.09g	50.32 ± 0.11g
12	36.64 ± 0.08g	58.35 ± 0.18h
Melatonina (1 µM)	45.50 ± 0.14h	40.74 ± 0.01f
Vitamina E (1 µM)	45.30 ± 0.12h	44.00 ± 0.02e
Correlación (R ²)	0.997	0.993
Valor de P	0.021	0.021

Tabla 1. Porcentajes de inhibición de la formación del anión superóxido y radical hidroxilo presentado por diferentes vinos de mora y su comparación con Melatonina y Vitamina E.

Los datos son presentados como Media±DE (n=3). Las medias de la misma columna que comparten la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test de comparación múltiple Newman-Keuls ($P < 0.05$). La correlación R² y el valor P se refieren a la correlación lineal entre el contenido de fenoles y el parámetro de capacidad antioxidante evaluado.

Muestra	AOA (mM)
1	0.82 ± 0.01a
2	0.95 ± 0.04b
3	0.88 ± 0.05c
4	0.91 ± 0.04d
5	0.85 ± 0.03e
6	0.82 ± 0.05a
7	0.80 ± 0.06f
8	0.86 ± 0.02e
9	0.90 ± 0.06d
10	0.83 ± 0.04a
11	0.90 ± 0.05d
12	0.90 ± 0.07d
Melatonina (1 µM)	0.79 ± 0.01f
Vitamina E (1 µM)	0.61 ± 0.01g
Correlación (R ²)	0.988
Valor de P	0.005

Tabla 2. Valores de AOA de los diferentes vinos de mora y su comparación con Melatonina y Vitamina E.

Los datos son presentados como Media±DE (n=3). Las medias de la misma columna que comparten la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test de comparación múltiple Newman-Keuls ($P < 0.05$). La correlación R² y el valor P se refieren a la correlación lineal entre el contenido de fenoles y el parámetro de capacidad antioxidante evaluado.

Muestra	Concentración de grupos fenólicos (mg/L)	Concentración de Proteínas (mg/mL)
1	149.36 ± 0.23a	138.68 ± 0.15a
2	325.47 ± 0.12b	165.21 ± 0.13b
3	174.25 ± 0.14c	234.98 ± 0.15c
4	301.54 ± 0.20d	160.44 ± 0.11d
5	129.35 ± 0.06e	168.88 ± 0.16b
6	152.69 ± 0.22f	169.37 ± 0.09b
7	145.69 ± 0.31g	236.86 ± 0.25c
8	163.78 ± 0.10h	251.36 ± 0.23e
9	275.23 ± 0.23i	258.23 ± 0.07f
10	156.32 ± 0.11f	241.69 ± 0.19g
11	268.36 ± 0.09j	250.32 ± 0.11e
12	254.63 ± 0.08k	158.35 ± 0.10h

Tabla 3. Contenido de grupos fenólicos y proteínas de los diferentes vinos de mora en estudio.

Los datos son presentados como Media±DE (n=3). Las medias de la misma columna que comparten la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test de comparación múltiple Newman-Keuls ($P < 0.05$).

REFERENCIAS

1. Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56:317–333.
2. Zern TL, Fernandez ML. (2005). Cardioprotective Effects of Dietary Polyphenols. *The J of Nutr*. 5: 2291-2294.
3. Scalbert A, Williamson G. (2002). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*. 130:2073S–2085.
4. Dell'Agli M, Busciala A, Bosisio E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardio Res*. 63:593–602.
5. Fuster V, Badimon JJ, Chesebro JH. (1992). The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *New Engl J Med* 326: 242-250.
6. Middleton EJR, Kandaswami C, Theoharides TC. (2000). The effect of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev* 52: 673-751.
7. Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menottia A, Nedeljkovic S. (1995). Flavonoid intake and long term risk of cardiovascular disease in the Seven Countries Study. *Arch Intern Med* 155: 381-386.
8. De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Mamelle N, Monjaud I, Touboul P, Delaye J. (1996). Effect of a Mediterranean type of diet on the rate of cardiovascular complications in patients with coronary artery disease. Insights into the protective effect of certain nutrients. *J Am Coll Cardiol* 28: 1103-1108.
9. Lampe JW. (1999). Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr* 70 (Suppl): 475S-490S.
10. Brouillard R, George F, Fougousse A. (1997). Polyphenols produced during red wine ageing. *Biofactors* 6: 403-410.
11. Zenebe W, Pecháňová O. (2002). Effects of red wine polyphenolic compounds on the cardiovascular system. *Bratisl Lek Listy* 103: 159-165.
12. Curin Y, Andriantsitohaina R. (2005). Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. *Pharmacol Rep* 57: 97-107.
13. Andriantsitohaina R, Curin Y, Ritz MF, Gerald R, Alves A, Mendelowitsch A, Elbaz M. (2005). Polyphenols: protection of neurovascular unit in stroke and inhibition of in-stent-neointimal growth. *Physiol Res* 54: 51P.
14. Caimi G, Carollo C, Lo Presti r. (2004). Chronic renal failure: oxidative stress, endothelial dysfunction and wine. *Clin Nephrol* 62: 331-335.
15. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn D, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74:418–425.
16. Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V. (2001). Method for measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol* 54:356–361.
17. Rice-Evans C, Diplock A, Symons M. (1991). Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. In: *Techniques in Free Radicals Research, Vol. 22* (Burdon RH, van Knippenberg PH, series eds.), Elsevier, Amsterdam, 1991, p. 22.
18. Halliwell B, Gutteridge J, Aruoma O. (1987). The deoxyribose method: a simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 165:215–219.
19. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299:152–178.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
21. Pryor, W. 2000. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radic Biol Med* 28:141–164.
22. Poeggler, B., Reiter, R., Tan, D., Chen, L., Manchester, L., Guerrero, J. 1993. Melatonin hydroxyl radical-mediated oxidative damage and aging: a hypothesis. *J Pineal Res* 14:151–168.
23. Reiter, R., Guerrero, J., Garcia, J., Acuña, D. 1998. Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. *Ann N Y Acad Sci* 854:410–424.
24. Sun, J., Chu, Y.F., Wu, X., Liu, R.H. 2002. Antioxidant and autoproliiferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem* 50:7449–7454.

25. Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F. 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assay. *J Nutr* 133:2812–2819.
26. Pietta, P., Simonetti, P., Mauri, P. 1998. Antioxidant activity of selected medicinal plants. *J Agric Food Chem* 46:4123–4127.
27. Al-Mamary, M., Al-Meer, A., Al-Habori, M. 2002. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutr Res* 22:1041–1047.
28. Vinson, J.A., Su, X., Zubik, L., Bose, P. 2001. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J Agric Food Chem* 49:5315–5321.
29. Heo, H.J., Lee, C.Y. 2005. Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *J Agric Food Chem* 53:1984–1989.
30. Yildirim, K. 2006. Evaluation of colour parameters and antioxidant activities of fruit wines. *Int J Food Sci Nutr*. 57:47-63.
31. Aruoma, O.I. 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol* 32:671–683.
32. Gazzani, G., Papetti, A., Daglia, M., Berte, F., Gregotti, C. 1998. Protective activity of water soluble components of some common diet vegetables on rat liver microsomes and the effect of thermal treatment. *J Agric Food Chem* 46:4123–4127.
33. Simic, M.G. 1992. Antioxidant compounds: an overview. In: *Oxidative Damage and Repair* (Davies KJA, ed.), Pergamon Press, New York. pp. 47–59.
34. Wright, J.S., Johnson, E.R., DiLabio, G.A. 2001. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J Am Chem Soc* 123:1173–1181.