

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação química e da potencial atividade antioxidante de extratos ricos em polifenóis, de espécies cultivadas em larga escala no Rio Grande do Sul, para utilização em formulações farmacêuticas

MARIA TEREZINHA KREINECKER DRESCH

Porto Alegre, fevereiro 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação química e da potencial atividade antioxidante de extratos ricos em polifenóis, de espécies cultivadas em larga escala no Rio Grande do Sul, para utilização em formulações farmacêuticas

Dissertação apresentada por **Maria Terezinha Kreinecker Dresch** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Amélia T. Henriques

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo E. Mayorga Borges

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29 de fevereiro de 2008, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Valquíria Linck Bassani

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Carmem Regla Vargas

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a Edna Sayuri Suyenaga

Centro Universitário Feevale

D773a	Dresch, Maria Terezinha Kreinecker Avaliação química e da potencial atividade antioxidante de extratos ricos em polifenóis, de espécies cultivadas em larga escala no Rio Grande do Sul, para utilização em formulações farmacêuticas / Maria Terezinha Kreinecker Dresch – Porto Alegre : UFRGS, 2008. – xxii, 122 p.: il., tab., graf. Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. 1. Polifenóis. 2. Flavonóides. 3. Antocianos. 4. Validação. 5. Atividade antioxidante. I. Henriques, Amélia Teresinha. II. Mayorga Borges, Paulo Eduardo. III. Título. CDU: 547.972.2/.973
-------	--

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitoquímica e Farmacognosia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Laboratório 32, do Departamento de Bioquímica/ UFRGS.

Suporte financeiro e bolsa de estudos foram obtidos junto ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*“Aprender é a única coisa de que a mente
nunca se cansa, nunca tem medo
e nunca se arrepende”.*

(Leonardo da Vinci)

*Ao meu esposo Roger, um homem especial, que soube abrir meu coração para um
sentimento tão nobre: o amor verdadeiro.
Ao seu amor, apoio e compreensão*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de realizar o mestrado nesta instituição altamente conceituada e de qualidade.

À professora Amélia Henriques pela orientação e por acreditar no meu potencial, proporcionando diversas oportunidades de desenvolvimento profissional. Obrigada pelo apoio, confiança, paciência e ensinamentos.

Ao professor Paulo Mayorga, obrigada pela co-orientação e valiosas contribuições.

Ao professor José Cláudio Moreira Fonseca, obrigada pela acolhida e por ter sido praticamente um co-orientador durante a realização de parte deste trabalho.

Ao Prof. José Ângelo Zuanazzi por todo apoio e ensinamentos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas que ministraram disciplinas que cursei e contribuíram para a minha formação.

À bolsista de iniciação científica Renata Biegelmeyer, por toda dedicação, competência, amizade e pelo auxílio fundamental na realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas do laboratório de Farmacognosia pelo companheirismo e amizade: Bruna, Carol, Eduardo, Jean, Juliana, Keli, Laura, Marina, Miriam, Rafaela, Raquel e Rosana. Especialmente à Ana Aboy, pelos diversos auxílios, principalmente pelos ensinamentos em CLAE.

Aos colegas do Laboratório 32 do Departamento de Bioquímica, pelo auxílio nos experimentos e momentos de descontração.

Às amigas Simone Rossato e Virgínia Kappel, pelos momentos de descontração, apoio e troca de conhecimento.

Aos meus pais, Ilka e Paulo, que embora não estejam mais entre nós, foram incentivadores durante a vida acadêmica. Especialmente ao meu pai, que pôde me acompanhar durante a trajetória como farmacêutica e em parte da realização deste mestrado, sendo meu apoio constante.

Aos meus sogros Claide e Remy e à minha cunhada Cibele por todo carinho, apoio e compreensão.

Ao meu marido Roger, pelo amor, compreensão e exemplo incondicionais. Obrigada por todo auxílio, inclusive na realização deste trabalho.

Aos meus familiares que, apesar de tão distantes, sempre torceram por mim, especialmente à minha tia Rosi que carinhosamente enviou alguns produtos contendo extratos de videira.

A Deus, pela oportunidade de encontrar pessoas especiais em minha vida, que me guiaram até aqui.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xxi
INTRODUÇÃO GERAL E RELEVÂNCIA DO TEMA	1
OBJETIVOS	5
Objetivo Geral	7
Objetivos Específicos	7
CAPÍTULO I - ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	9
1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
1.1 Aspectos botânicos, agronômicos e econômicos.....	11
1.2 Aspectos fitoquímicos.....	13
1.3 Aspectos etnofarmacológicos e farmacológicos.....	17
1.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
1.4.1 Obtenção e caracterização da matéria-prima vegetal.....	21
1.4.1.2 Material vegetal.....	21
1.4.1.3 Caracterização da matéria-prima vegetal.....	21
1.4.2 Avaliação preliminar das condições de extração e desenvolvimento de método analítico para análise de antocianos e flavonóides.....	22
1.4.2.1 Procedimentos gerais.....	22
1.4.2.2 Desenvolvimento de método para análise de antocianos e flavonóides.....	24
1.5 VALIDAÇÃO.....	25
1.5.1 Validação de método para análise de antocianos.....	25
1.5.1.1 Condições cromatográficas.....	25
1.5.1.2 Parâmetros de validação.....	26
1.6 Validação de Método para análise de flavonóides.....	30
1.6.1 Condições cromatográficas.....	30
1.6.2 Parâmetros de validação.....	31
1.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
1.7.1 Material vegetal.....	35
1.7.2 Caracterização da matéria-prima vegetal.....	35
1.7.3 Avaliação preliminar das condições de extração e desenvolvimento de método para análise de antocianos e flavonóides.....	37
1.7.4 Desenvolvimento de método para análise de antocianos e flavonóides.....	41
1.7.5 Desenvolvimento de método para análise de flavonóides em folhas de videira.....	46
1.7.6 VALIDAÇÃO.....	53
1.7.6.1 Validação de método para análise de antocianos.....	54

1.7.6.1 Validação de método para análise de flavonóides	61
CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	67
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	69
2.1 Atividade antioxidante de extratos de folhas de videira.....	73
2.2 Potencial antioxidante reativo total não enzimático (TRAP) e reatividade antioxidante total (TAR).....	77
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	79
2.3.1 Preparação e análise dos extratos.....	79
2.3.2 Avaliação do potencial antioxidante total (TRAP).....	79
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
DISCUSSÃO GERAL.....	91
CONCLUSÕES.....	95
PERSPECTIVAS.....	99
REFERÊNCIAS.....	103
ANEXOS.....	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: (A). Sobreposição dos perfis cromatográficos de antocianos de extratos aquosos das folhas da variedade Cabernet sauvignon com a adição de diferentes acidificantes em diferentes pHs.....	39
Figura 1.1: (B). Extrações realizadas com etanol 100 % e metanol 100 %.....	39
Figura 1.1: (C). Áreas correspondentes aos picos 1,2,4,5 e 11	40
Figura 1.2: Perfis cromatográficos de antocianos de folhas da variedade de Cabernet sauvignon em 520 nm. (A) Segundo Darné e Glories (1988).....	42
Figura 1.2: Perfis cromatográficos de antocianos de folhas da variedade de Cabernet sauvignon em 520 nm. (B) Obtido experimentalmente.....	42
Figura 1.2: (C) Estruturas dos principais antocianos mencionados (C).....	42
Figura 1.3: (A) Cromatograma de extrato aquoso da variedade Cabernet sauvignon.....	43
Figura 1.3: (B) Espectros dos picos majoritários 2 e 4.....	43
Figura 1.4: Cromatograma de extrato aquoso de Cabernet sauvignon. A: perfil cromatográfico de antocianos.....	44
Figura 1.4: Cromatograma de extrato aquoso de Cabernet sauvignon. B: perfil cromatográfico de ácidos fenólicos e flavonóides.....	44
Figura 1.5: (A) Perfil cromatográfico de extrato aquoso de Cabernet sauvignon em 356 nm frente a sutis alterações no sistema de eluição em gradiente proposto na tabela 1.5.....	45
Figura 1.5: (B) Espectros UVs correspondentes aos picos assinalados em A.....	45
Figura 1.6: Estruturas de açúcares ligados à aglicona dos flavonóides.....	46
Figura 1.7: Perfil cromatográfico de ácidos fenólicos e flavonóides presentes em extrato aquoso da folha da variedade Cabernet sauvignon durante desenvolvimento do método para determinação de flavonóides.....	47
Figura 1.8: Perfil cromatográfico de ácidos fenólicos e flavonóides presentes em extrato aquoso da folha da variedade Cabernet sauvignon durante desenvolvimento do método para determinação de flavonóides com utilização da coluna X-Terra®	48
Figura 1.9: Cromatogramas referentes aos antocianos obtidos de soluções extrativas aquosas das variedades Cabernet sauvignon (A) e Couderc (B).....	50
Figura 1.10: Cromatogramas referentes aos perfis dos flavonóides obtidos a partir de soluções extrativas aquosas das variedades Cabernet sauvignon (A) e Couderc (B).....	51
Figura 1.11: Relação droga:solvente para a variedade Cabernet sauvignon considerando os dois picos majoritários dos antocianos.....	52
Figura 1.12: Relação droga:solvente para a variedade Cabernet sauvignon, considerando o pico majoritário dos flavonóides.....	53
Figura 1.13: Cromatograma relativo à pureza do pico 2 da amostra de Cabernet sauvignon.....	54
Figura 1.14: Perfil cromatográfico do padrão cloridrato de cianidina obtido por CLAE.....	55
Figura 1.15: Curva-padrão do cloridrato de cianidina obtida por CLAE.....	55
Figura 1.16: Curva de linearidade para amostra.....	56
Figura 1.17: Perfil cromatográfico do padrão rutina obtido por CLAE.....	62
Figura 1.18: Curva-padrão de rutina por CLAE.....	62
Figura 1.19: Curva de linearidade para amostra.....	63
Figura 2.1: <i>Scavenging</i> de ERO (R*) pelos flavonóides.....	72
Figura 2.2: Estrutura básica dos antocianos.....	72
Figura 2.3: Percentual da intensidade de quimioluminescência (contagens por minuto) medida após a adição de concentrações crescentes dos extratos aquosos de (A) var. Cabernet sauvignon.....	83
Figura 2.3: Percentual da intensidade de quimioluminescência (contagens por minuto)	

medida após a adição de concentrações crescentes dos extratos aquosos de (B) var. Couderc.....	83
Figura 2.3: (C) Trolox 200 nM.....	83
Figura 2.4: Análise do TRAP através da AUC para o extrato aquoso da variedade Cabernet sauvignon.....	84
Figura 2.5: Análise do TRAP através da AUC para o extrato aquoso da variedade Couderc.....	85
Figura 2.6: Gráfico representativo da relação entre concentração de droga seca/mL e a AUC para cada concentração avaliada dos extratos aquosos das variedades Cabernet sauvignon e Couderc.....	86
Figura 2.7: Avaliação da relação Io/I dos extratos aquosos das variedades Cabernet (A) e Couderc (B).....	87
Figura 2.8: Diminuição instantânea da quimioluminescência avaliada quanto ao TAR, expressa pela relação entre Io/I: em (A) var. Cabernet sauvignon e (B) var. Couderc.....	88
Figura A1: Conformações dos antocianos em solução aquosa sob variação de pH (Adaptado de Brouillard (1988) por He (2004)).....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Exemplos de flavonóides encontrados em folhas de videira.....	16
Tabela 1.2: Principais flavonóides encontrados na folha da videira e suas denominações.....	16
Tabela 1.3: Condições cromatográficas relatadas na literatura para análise de antocianos em folhas de videira por CLAE.....	16
Tabela 1.4: Parâmetros para análise cromatográfica preliminar da variedade Cabernet sauvignon.....	24
Tabela 1.5: Sistema gradiente utilizado para análise cromatográfica preliminar de antocianos da variedade Cabernet sauvignon.....	25
Tabela 1.6 : Parâmetros para análise cromatográfica da variedade Cabernet sauvignon.....	25
Tabela 1.7: Sistema gradiente utilizado para análise cromatográfica de antocianos da variedade Cabernet sauvignon.....	26
Tabela 1.8: Protocolo de diluições para ensaio de exatidão na determinação de antocianos por CLAE.....	29
Tabela 1.9: Especificações das colunas cromatográficas comparadas no ensaio de robustez.....	30
Tabela 1.10: Parâmetros para análise cromatográfica de flavonóides da variedade Cabernet sauvignon.	30
Tabela 1.11: Sistema gradiente utilizado para análise cromatográfica de flavonóides da variedade Cabernet sauvignon.....	31
Tabela 1.12: Volume (μL) utilizados de solução de rotina e da solução extrativa para cada ponto da exatidão.....	33
Tabela 1.13: Teor de umidade de amostras de Cabernet sauvignon e Couderc coletadas em 2 anos diferentes.....	36
Tabela 1.14: Teor de polifenóis totais.....	36
Tabela 1.15: Teor de antocianos.....	37
Tabela 1.16: Tempos de retenção e absorvâncias obtidas com CLAE/DAD dos padrões de antocianos disponíveis, na forma de cloridrato.....	43
Tabela 1.17: Tempos de retenção e absorvâncias obtidas com CLAE/DAD das substâncias de referência como ácidos fenólicos e flavonóides disponíveis.....	49
Tabela 1.18: Coeficiente de correlação para diferentes faixas avaliadas de relação droga versus volume de solvente.....	52
Tabela 1.19: Análise da variância (ANOVA) para os dados de linearidade da curva padrão do cloridrato de cianidina.....	57
Tabela 1.20: Análise da variância (ANOVA) para os dados de linearidade da curva amostra.....	57
Tabela 1.21: Resultados obtidos no ensaio de repetibilidade (precisão intra-dia) para o extrato aquoso da variedade Cabernet sauvignon por CLAE.....	58
Tabela 1.22: Resultados obtidos no ensaio de repetibilidade (precisão inter-dias) para o extrato aquoso da variedade Cabernet sauvignon por CLAE.....	58
Tabela 1.23: Resultados obtidos no ensaio de exatidão para o extrato aquoso de Cabernet sauvignon por CLAE.....	59
Tabela 1.24: Avaliação do parâmetro robustez para as soluções extrativas de Cabernet sauvignon, considerando alterações no fluxo e fase móvel.....	60
Tabela 1.25: Resultados obtidos para o teste de robustez, aplicado ao método desenvolvido por CLAE, para a análise quantitativa de antocianos em extrato de Cabernet sauvignon, considerando colunas diferentes.....	61

Tabela 1.26: Análise da variância (ANOVA) para os dados de linearidade da curva padrão de rotina.....	64
Tabela 1.27: Análise da variância (ANOVA) para os dados de linearidade da curva amostra.....	64
Tabela 1.28: Resultados obtidos no ensaio de repetibilidade (precisão intra-dia) para o extrato aquoso da variedade Cabernet sauvignon por CLAE.....	65
Tabela 1.29: Resultados obtidos no ensaio de repetibilidade (precisão inter-dias) para o extrato aquoso da variedade Cabernet sauvignon por CLAE.....	65
Tabela 1.30: Resultados obtidos no ensaio de exatidão para o extrato aquoso de Cabernet sauvignon por CLAE para análise dos flavonóides.....	65
Tabela 1.31: Avaliação do parâmetro de robustez por CLAE para análise de flavonóides.....	66
Tabela 2.1.: Comparação estatística (teste t) dos resultados obtidos a partir do cálculo da AUC entre mesmas concentrações de droga seca ($\mu\text{g/mL}$) das variedades Cabernet sauvignon e Couderc.....	85
Tabela 2.2: Comparação estatística (teste t) dos resultados obtidos a partir do cálculo da relação I _o /I entre mesmas concentrações de droga seca ($\mu\text{g/mL}$) das variedades Cabernet sauvignon e Couderc.....	88
Tabela 2.3: Áreas correspondentes à análise cromatográfica por CLAE para os extratos aquosos na concentração de 50 mg de droga/mL, submetidos ao método TRAP.....	89
Tabela A1: Classificação da uva para fins industriais (BRASIL, 1988).....	115
Tabela A2: Exemplos de produtos comercialmente disponíveis contendo folhas de videira.....	116
Tabela A3: Colorações observadas para extratos das variedades Cabernet sauvignon e Couderc obtidos a partir de extração com diferentes solventes extratores aquosos em distintos pH.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH: 2,2'- azobis (2-metilpropionamidina dicloridrato)
ABAP: 2,2'-azo-bis (2-amidinopropano)
ABTS: 2,2'-azino-di(ácido3-etilbenzo-tialozino-sulfônico)
ACh: acetilcolina
ACN: acetonitrila
ANOVA: análise de variância
AUC: área sob a curva
CAT: catalase
CCD: cromatografia em camada delgada
CLAE/DAD: cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos
CPM: contagens por minuto
DP: desvio padrão
DPa: desvio padrão médio do intercepto
DPPH: 2,2-difenil-1-picrilidrazil
DPR: desvio padrão relativo
EPM: erro padrão da média
ERO: espécie reativa de oxigênio
FC: Folin-Ciocalteu
GPx: glutationala peroxidase
GSH: glutationala
IC: inclinação média das curvas de calibração
ICH: *International Conference on Harmonisation* (Conferência Internacional de Harmonização)
LD: limite de detecção
LDL: lipoproteína de baixa densidade
LQ: limite de quantificação
MDA: malondialdeído
MeOH: metanol

MG: monoglicosídeo

ORAC: *oxygen radical absorbance capacity* (capacidade de absorção do radical oxigênio)

P.A.: para análise

PDA: detector de arranjo de fotodiodos

r: coeficiente de correlação

SOD: superóxido dismutase

SPSS: *statistical package for the social sciences* (programa estatístico para ciências sociais)

TAR: reatividade total antioxidante

TFA: ácido trifluoracético

ti: tempo de indução

TR: tempo de retenção

TRAP: potencial antioxidante reativo total

UDP: uridina difosfato

WHO: *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

RESUMO

O cultivo de plantas das espécies de *Vitis* (Vitaceae), conhecidas popularmente como videiras, representa uma das atividades econômicas mais proeminentes no Sul do Brasil. Figuram entre as espécies mais ricas em compostos polifenólicos, sendo os mesmos responsáveis por inúmeras atividades biológicas e farmacológicas importantes, dentre as quais, a antioxidante. Neste contexto, este trabalho objetivou analisar quali e quantitativamente os principais grupos polifenólicos encontrados em extratos de videiras, os antocianos e flavonóides, bem como realizar ensaio para avaliação da atividade antioxidante *in vitro*. Neste sentido foram desenvolvidos e validados dois métodos por cromatografia líquida de alta eficiência, com detector UV/VIS. A análise dos compostos fenólicos incluíram a utilização de duas colunas diferentes, sendo uma constituída por sílica C₁₈ e outra RP-18 com partículas híbridas contendo ligações etano-silicone. Em ambos os métodos foram utilizados sistema de eluição em gradiente, cuja composição das fases móveis foram água e acetonitrila acificadas com ácido trifluoracético. Os métodos desenvolvidos foram validados segundo as normas vigentes e atenderam aos parâmetros de validação como especificidade, linearidade, precisão, sensibilidade, exatidão e robustez nas faixas de concentração avaliadas. O presente estudo também investigou a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos de videira através do método potencial antioxidante reativo total (TRAP), o qual foi otimizado e validado segundo normas internacionais, utilizando Trolox como referência. A partir deste método também foi possível avaliar a reatividade total antioxidante (TAR). Todas as concentrações testadas apresentaram reatividade instantânea inferior ao composto de referência, entretanto, demonstraram atividade antioxidante superior ao Trolox 200 nM.

Palavras-chave: *Vitis*, videira, antocianos, flavonóides, validação, atividade antioxidante.

ABSTRACT

Evaluation of chemical profile and potential antioxidant activity of extracts rich in polyphenols from species widely cultivated in Rio Grande do Sul, with the aim of applying their use in pharmaceutical formulations.

The cultivation of plants from *Vitis* species (Vitaceae), popularly known as grapevine, is one of the most prominent economic activities in southern Brazil. The *Vitis* species is one of the plants that is most rich in polyphenolic compounds, responsible for numerous important pharmacological and biological activities, such as antioxidant activity. In this context, this study aimed to analyze qualitatively and quantitatively the principal groups encountered in grapevine extracts, the anthocyanins and flavonoids, and to assay their antioxidant activities *in vitro*. For this purpose, two methods were developed and validated using high-performance liquid chromatography, employing a UV/VIS detector. The analysis of phenolic compounds included the utilization of two different columns: a column constituted by silica C₁₈ and other RP18 column with bridged ethane-silicon hybrid particles. In both methods, a gradient system was used, with water and acetonitrile acidified with trifluoroacetic acid as a mobile phase. The methods developed were validated according to ICH evaluating parameters such as specificity, linearity, precision, sensibility, accuracy and robustness in the concentration range evaluated. The present study also analyzed the antioxidant activity *in vitro* of grapevine extracts employing the Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP) method, which was optimized and validated according to international patterns, using Trolox as a reference substance. This method also allowed evaluation of the total instantaneous reactivity (TAR). In all concentrations, the samples presented lower instantaneous reactivity than that of the reference compound. In contrast, the samples presented higher antioxidant activity than Trolox 200 nM.

Key-words: *Vitis*, grapevine, flavonoids, anthocyanins, validation, antioxidant activity.

INTRODUÇÃO GERAL E RELEVÂNCIA DO TEMA

Plantas medicinais e seus derivados constituíram durante muito tempo a base da terapêutica da humanidade. Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal encontram-se as plantas do gênero *Vitis*, pertencentes à família Vitaceae, as quais são amplamente distribuídas em vários países.

Folhas de videira, especialmente as vermelhas, estão na medicina popular de diversos países em inúmeras formas farmacêuticas, especialmente na Europa, tanto em formulações para uso tópico quanto sistêmico. No Brasil, no entanto, não há relatos até a presente data de estudo sobre as folhas de videiras cultivadas no País, bem como acerca de suas características fitoquímicas e avaliação de atividade biológica e/ou farmacológica.

O Rio Grande do Sul figura como o principal produtor de uvas no Brasil, o que facilita a pesquisa de novos produtos do metabolismo das videiras de interesse ao setor farmacêutico. Assim, a descoberta de compostos com propriedades biológicas importantes, como os flavonóides, nas espécies de *Vitis*, apresenta-se oportuno para agregar valor a essa matéria-prima, pois possibilita o uso de partes desprezadas da planta, como cascas do fruto, folhas, pecíolos, entre outras. Além disso, tal fonte de matéria-prima é renovável.

Neste contexto, considerando que não há estudo sistemático de folhas de videiras cultivadas no Brasil, o potencial terapêutico ainda inexplorado abre perspectivas para futuras aplicações dos compostos dessas plantas, como no tratamento de diversas doenças.

Inúmeros estudos encontrados na literatura apontaram para várias atividades farmacológicas dos flavonóides. Dessa maneira, distintas linhas de pesquisa poderiam surgir a partir do aprofundamento dos estudos com *Vitis*. O interesse econômico dos flavonóides é decorrente de suas diferentes propriedades. Ensaio biológicos revelaram que os flavonóides exibem uma grande ação sobre os sistemas biológicos demonstrando efeito antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, citotóxico, antineoplásico, antioxidante, anti-hepatotóxico, anti-hipertensivo, hipolipidêmico, antiinflamatório e antiplaquetário. Também provocaram aumento na permeabilidade capilar, inibição da exudação protéica e da migração de leucócitos (PELZER *et al.*, 1998). Estes efeitos podem estar relacionados às propriedades inibitórias que os flavonóides desempenham nos vários sistemas enzimáticos incluindo hidrolases,

isomerases, oxigenases, oxidoreductases, polimerases, fosfatases, proteínas fosfoquinases e amino ácido oxidases (FERGUSON, 2001).

Para realização deste trabalho foram utilizadas folhas das espécies *Vitis* sp. baseando-se em levantamento bibliográfico acerca de seus constituintes, levando em consideração as variedades cultivadas no Rio Grande do Sul. Após a seleção da procedência da matéria-prima vegetal, as soluções extrativas foram submetidas à análise fitoquímica e avaliação preliminar da atividade antioxidante *in vitro*.

Objetivo Geral:

O objetivo geral deste trabalho foi realizar análise fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de duas variedades de espécies do gênero *Vitis*, cultivadas no RS.

Objetivos Específicos:

- Analisar qualitativamente e quantitativamente os principais os compostos flavonoídicos nos extratos.
- Desenvolver e validar métodos analíticos para a análise de antocianos e flavonóides dos extratos preparados, por cromatografia líquida de alta eficiência.
- Investigar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos de duas variedades do gênero *Vitis*.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Aspectos botânicos, agronômicos e econômicos

O gênero *Vitis* L. abrange cerca de 40 espécies pertencentes à família Vitaceae (Ampelidaceae). As espécies deste gênero, popularmente conhecidas no Brasil como videiras, distribuem-se em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Este gênero subdivide-se em dois subgêneros, sendo o mais importante o *Euvitis* dentro do qual se encontram duas espécies de grande importância para a agricultura - *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera*- seja para a produção de vinho, seja para o consumo *in natura* dos frutos (BOMBARDELLI e MORAZZONI, 1995).

Trata-se de planta sarmentosa perene, caracterizada por apresentar um tronco cuja altura pode alcançar 35 metros. Entretanto, devido ao procedimento de poda, chega a medir entre 1 e 3 metros de altura. Apresenta folhas circulares ou ovais, delgadas, que medem entre 5 e 23 cm de diâmetro, dentadas ou não em suas bordas, desprovidas de pêlos e geralmente com coloração esverdeada na face superior e lanugem parda na face inferior, caracterizadas por apresentar entre 4 e 5 lóbulos na espécie *V. vinifera* (ALONSO, 2005) e ausência dos mesmos na espécie *V. labrusca*. O provável centro de origem paleontológica das videiras atuais é a Groenlândia (GIOVANNINI, 1999). *Vitis vinifera*, espécie surgida há aproximadamente 300.000 anos no Cáucaso (entre Armênia e a Pérsia), difundiu-se por toda a Ásia Menor, Oriente Médio e costas do Mediterrâneo. Posteriormente, com a descoberta de novos continentes, foi levada à América e à Oceania. Já a espécie *Vitis labrusca* ocorre desde o sudeste do Canadá até a Carolina do Sul, na costa leste dos E.U.A., sendo a espécie americana há mais tempo conhecida (GIOVANNINI, 1999).

Durante os últimos cem anos diversas espécies americanas e híbridas entre *V. vinifera* e espécies americanas, mais resistentes às infecções, tem sido introduzidas na Europa (BOMBARDELLI e MORAZZONI, 1985). No Brasil, a videira foi introduzida por Martim Afonso de Souza, em 1532, na Capitania de São Vicente e no Rio Grande do Sul, pelo jesuíta espanhol Roque Gonzáles de Santa Cruz, em 1726, quando da fundação da redução de São Nicolau. Uma nova introdução foi feita por açorianos e madeirenses, a partir de 1742. Entretanto, a viticultura brasileira

foi impulsionada a partir de 1875 com a chegada dos primeiros colonos italianos (GIOVANNINI, 1999; IBRAVIN, 2005).

A viticultura mundial ocupa uma área superior a 7 milhões de hectares, sendo a Europa responsável por mais de 4,4 milhões. Os países que se destacam em áreas plantadas são a Espanha, Itália e França. No Brasil, a viticultura ocupa uma área superior a 60 mil hectares e é realizada desde o Rio Grande do Sul até o Nordeste, incluindo Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais. Segundo a União Brasileira da Vitivinicultura (UVIBRA, 2007), a produção de uvas viníferas e uvas comuns foi, respectivamente, em torno de 720.000 e 500.000 toneladas em 2007.

O Rio Grande do Sul figura como o principal produtor de uvas no Brasil (MELLO e PROTAS, 2005). O total de vinhedos no estado abrange cerca de 36000 hectares e está difundido em 24 microrregiões, nas quais a tradicional região produtora, localizada na Serra Gaúcha, ocupa mais de 84 % da área vitícola do Estado (MELLO, 2005). Nos últimos anos, a tendência de ampliação das áreas de espécies viníferas - principalmente Cabernet Sauvignon e Merlot, entre as tintas, e Chardonnay, entre as brancas - acentuou-se significativamente. Contudo, segue a predominância de cultivo de uvas híbridas e americanas (com 90 % da produção, contra 10 % de variedades finas) (UVIBRA, 2007).

A uva para fins industriais é ordenada de acordo com sua aptidão ou qualidade enológica, sendo distribuída conforme a tabela A1 (anexos), a qual retrata as variedades cultivadas no Brasil. As variedades objeto de estudo neste trabalho pertencem às seguintes classes: Grupo I, viníferas nobres tintas (Cabernet sauvignon) e ao Grupo III, designadas de comum tintas, Couderc ou Seibel 1077.

No Brasil, a maior importância econômica está relacionada aos frutos que são comercializados para consumo *in natura* e utilizados na produção de vinhos, sucos, espumantes, geléias e passas. Resíduos de subprodutos da produção ou de outras partes da planta, como as folhas, não possuem destino, exceto para as sementes, das quais é obtido óleo, para utilização em cosméticos.

Por outro lado, em diversos países, principalmente na Europa, com destaque para a França, encontram-se disponíveis para comercialização alguns produtos em

diversas formas farmacêuticas à base de folhas da uva (VANACLOCHA E FOLCLARA, 2003), além de cosméticos, chás e outros produtos correlacionados, vendidos como suplementos alimentares (LABELL, 2003; PL THOMAS, 2005). Outros exemplos são apresentados na tabela A2 (anexos).

1.2 Aspectos fitoquímicos

Desde o início do século 20, *Vitis vinifera* tem sido objeto de muitos estudos químicos que ressaltaram notáveis diferenças na composição química de cultivares e variedades estudadas. Numerosos compostos químicos, pertencentes a diferentes classes, têm sido isolados de frutos, folhas e de outras partes da planta e podem ser classificados de maneira geral em compostos fenólicos, ácidos orgânicos, vitaminas, enzimas, carboidratos, compostos nitrogenados, terpenos e óleos voláteis, ceras, lipídios entre outros (BOMBARDELLI e MORAZZONI, 1995; ALONSO, 2005). Considerando a grande variedade de subespécies de uvas, os compostos ativos podem variar sobretudo de forma quantitativa em relação à qualitativa (ALONSO, 2005). Entre as substâncias encontradas nas diversas partes da planta, indubitavelmente os compostos fenólicos têm despertado o maior interesse quanto à investigação de diversas atividades biológicas e/ou farmacológicas, sobretudo antioxidante.

Em sua maior parte, os estudos demonstram que os compostos presentes nas folhas de videiras pertencem principalmente a flavonóis glicosilados (Tabela 1.1 e Tabela 1.2) e antocianos.

MATAIX *et al.* (1982) estudaram a composição de flavonóis durante a frutificação em folhas de dois cultivares, Airen e Cencibel, na Espanha. Foram identificadas duas agliconas, canferol e quercetina, e três glicosídeos da quercetina por cromatografia em papel, entre eles quercetina-3-O-galactosídeo (hiperosídeo). Segundo os autores, as condições de cultivo e déficit de nutrientes podem influenciar na composição de flavonóis em alguns estágios de desenvolvimento. Entretanto, dois flavonóis extensamente encontrados em folhas de diversos cultivares de *Vitis vinifera*, quercetina-3-O-ramnosídeo (quercitrina) e quercetina-3-O-ramnoglicosídeo (rutina), não foram encontrados nestas variedades. Este último composto é considerado por alguns autores um flavonol marcador das folhas de *Vitis*

vinifera, demonstrando assim que a composição de flavonóis em folhas de videira depende, na maior parte, de características genéticas.

Em estudo realizado por DARNÉ e GLORIES (1988), foram avaliados antocianos totais e individuais de extratos de folhas vermelhas de três variedades de *Vitis vinifera* (Merlot noir, Cabernet Sauvignon e Gamay Fréaux), em três estágios do desenvolvimento sazonal (no início da maturação (*veraison*) e na maturidade das uvas, e na queda das folhas) através de cromatografia líquida de alta eficiência, nas condições que constam na Tabela 1.3. Além disso, compararam a composição das folhas com os frutos, os quais foram distintos entre si. As folhas de uvas que produzem sucos tintos são mais ricas em antocianos do que folhas de cultivares não-coloridos. Em alguns cultivares, o teor de antocianos totais nas folhas aumentou durante a maturação do fruto, o qual diminuiu no período da queda das folhas. A natureza dos antocianos das folhas na maturidade da uva pertence a dois grandes grupos: antocianos e antocianos acilados. Nos três tipos de videiras, 3-monoglicosídeos da peonidina e da cianidina constituíram a composição essencial. Independente da variedade e do estágio de desenvolvimento, os antocianos estiveram presentes.

Um estudo por cromatografia líquida de alta eficiência de antocianos das folhas de *vigne rouge* (*Vitis vinifera*) (Tabela 1.3), efetuadas em diversas preparações farmacêuticas, permitiu a separação de 5 monoglicosídeos antociânicos, dos quais cianidina e peonidina representaram mais de 60 % dos antocianos totais. Entretanto, as formas aciladas foram encontradas em quantidade escassa (LAPARRA e DARNÉ, 1989).

Com o intuito de propor métodos de controle de qualidade com a utilização da cromatografia em camada delgada e da cromatografia líquida de alta eficiência, três flavonóides foram isolados e identificados das folhas de 3 cultivares de *Vitis vinifera* variedade tinta (Alicante, Carignam e Grand noir): hiperina (hiperosídeo), quercetina 3-O-glicosídeo (isoquercitrina) e quercetina 3-O-glicuronídeo, sendo este, para todas as variedades, o composto majoritário (DIAZ LANZA *et al.*, 1989).

PROLIAC *et al.* (1990) isolaram, purificaram e identificaram através de cromatografia em papel quercetina 3-O-glicosídeo e quercetina 3-O-glicuronídeo na

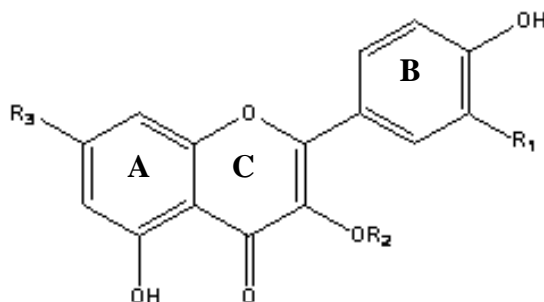
folha de *Vigne rouge*. JEONG e colaboradores (2006) avaliaram a composição de flavonóis em diversos órgãos de três variedades de *Vitis vinifera*, Cabernet Sauvignon, Dornfelder e Muscat Hamburg, que apresentaram quantidade de quercetina superior a miricetina e canferol, particularmente nas folhas pequenas. Em adição, as mesmas apresentaram altas quantidades de prodelfinidinas e procianidinas, e, segundo os autores, alguns cultivares de uvas também acumulam antocianos em folhas jovens pequenas na primavera.

Ao investigar cultivares marroquinos, HMAMOUCI *et al.*, (1996) caracterizaram dez flavonóides entre os quais miricetina, apigenina-7-glicosídeo, luteolina-7-glucosídeo e quercetina-3-ramnogalactosídeo foram descritos pela primeira vez nas folhas de *Vitis vinifera*. Os outros constituintes caracterizados foram: canferol, quercetina, quercetina-3-glicosídeo, quercetina-3-ramnosídeo e quercetina-3-glicosil-ramnosídeo.

Em estudo quimiotaxonômico, com objetivo de correlacionar a morfologia da folha com o tipo de flavonóide presente, MOORE e GIANNASI (1994) isolaram flavonóides de 22 espécies de *Vitis* do Norte do México, utilizando cromatografia bi-dimensional, encontrando para *Vitis labrusca* os seguintes compostos: canferol 3-O-glicosídeo, canferol 3-O-glicuronídeo, quercetina 3-O-glicosídeo, quercetina 3-O-glicuronídeo, miricetina 3-O-glicosídeo, miricetina 3-O-glicuronídeo e luteolina 7-O-glicosídeo, sendo que quercetina 3-O-rutinosídeo e quercetina 3-O-arabinoglicosídeo forma encontrados em menos de 50 % das amostras analisadas.

Recentemente, MONAGAS e colaboradores (2006a) caracterizaram, através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detector de massas, diversos suplementos dietéticos fabricados a partir de subprodutos da produção da uva como sementes, cascas, bagaço e folhas da espécie *Vitis vinifera*. Os compostos encontrados nas folhas foram as cinco antocianidinas glicosiladas na posição 3 do anel B, como delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina, entre os quais cianidina e peonidina figuraram entre os majoritários. Entre os compostos não antociânicos encontrados incluem-se o ácido cafeoiltartárico (ácido caftárico) e os flavonóis quercetina 3-O-galactosídeo, quercetina-3-O-glicuronídeo e quercetina-3-O-glicosídeo entre os compostos majoritários.

Tabela 1.1: Exemplos de flavonóides encontrados em folhas de videira.



Composto	R ₁	R ₂	R ₃
Rutina	-OH	-ramnoglicose	-OH
Hiperosídeo	-OH	-galactose	-OH
Isoquercitrina	-OH	-glicose	-OH
Quercetina 3-O-glicuronídeo	-OH	ácido glicurônico	-OH
Quercitrina	-OH	-ramnose	-OH
Quercetina	-OH	-H	-OH
Canferol	-H	-H	-OH

TABELA 1.2: Principais flavonóides encontrados na folha da videira e suas denominações.

Composto	Sinônimos	Referência
Quercetina 3-O-galactosídeo	Hiperosídeo	BUTTERWECK <i>et al.</i> (2002)
Quercetina 3-O-glicosídeo	Isoquercitrosídeo; Isoquercitrina; Isotrifoliina	BUTTERWECK <i>et al.</i> (2002); CHEMICAL, 2008
Quercetina 3 O-glicuronídeo	Quercetina 3-O-beta-D-glicuronopiranosídeo; Miquelianina	BUTTERWECK <i>et al.</i> (2002)

Tabela 1.3: Condições cromatográficas relatadas na literatura para análise de antocianos em folhas de videira por CLAE.

Coluna	Sistema de eluição	Fase Móvel	Fluxo	Detecção	Referência
XL3-ODS [®] C ₁₈ Beckman (70 mm), 3 µm	gradiente	A: Água com 5 % de ácido fórmico, pH 2,1 B: Metanol com 5 % de ácido fórmico	1mL/min t ambiente	520 nm	DARNÉ; GLORIES, 1988. LAPARRA; DARNÉ, 1989.
Novapack [®] C ₁₈ Waters (150 x3,9 mm), 4 µm	gradiente	A: água/ácido fórmico, 90/10 v/v B: água/metanol/ácido fórmico, 45/45/10 v/v/v	0,7 mL/min t ambiente	530 nm	MONAGAS <i>et al.</i> , 2006a

Outra classe de compostos polifenólicos com prevalência considerável nas folhas compreende os taninos. Três elagitaninos foram isolados das folhas de *V. vinifera* e identificados como brevilagina-1, vitilagina e isovitolagina (BOMBARDELLI e MORAZZONI, 1995). As proantocianidinas poliméricas isoladas e purificadas a partir das folhas da videira da variedade Carignan são principalmente constituídas de unidades 2,3-*cis*. As proantocianidinas são constituídas por unidades de procianidina e prodelfinidina não esterificadas (desprovidas de grupamentos galoi). A razão entre procianidinas/prodelfinidinas aumenta quando as folhas passam da coloração verde para o vermelho no outono. Este fenômeno coincide com a formação nas folhas, no outono, dos pigmentos antocianicos derivados da malvidina (BOUKHARTA *et al.*, 1990).

Vitis vinifera contém ainda outros grupos fenólicos pertencentes ao grupo estilbeno, as fitoalexinas, compostos produzidos pelas plantas em resposta ao ataque microbiano. Sua produção é reconhecida como sendo um mecanismo de resistência a doenças. Entre os mesmos, resveratrol e viniferinas (oligômeros de resveratrol) são sintetizados nas folhas de *Vitis vinifera* durante infecções por *Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola*, *Uncinola necator* e devido à radiação ultravioleta (PRYCE e LANGCAKE, 1977). *Trans*-pterostilbeno (3,5-dimetoxi-4'-hidroxistilbeno) é um composto antifúngico induzido, produzido durante infecção por *Plasmopara viticola*, que pode ser encontrado nas folhas do cultivar Carbenet sauvignon (LANGCAKE *et al.*, 1979).

Até a presente data foram encontrados na literatura poucos relatos de estudos quanto à presença de flavonóides nas folhas de variedades de videiras da espécie *Vitis vinifera* ou híbridas e apenas um estudo da composição das folhas de videiras cultivadas no Brasil da espécie *Vitis vinifera* realizada por FELÍCIO *et al.* (2001), com ênfase aos estilbenos, cuja variedade ou cultivar não foi designado.

1.3 Aspectos etnofarmacológicos e farmacológicos

Das principais partes da planta derivaram numerosos remédios, utilizados na medicina popular desde os tempos antigos (BOMBARDELLI e MORAZZONI, 1995).

As folhas jovens e tenras de *Vitis vinifera* são um importante alimento, em virtude de serem fontes ricas em vitaminas e minerais, utilizadas em diversas

preparações na culinária de diversos países como Turquia, Grécia e países do Mediterrâneo (SAT; SENGUL; KELES, 2002). No Irã, além das folhas de uva serem utilizadas na culinária (*Vine leaf dolma*), remédios à base de folha de videira são utilizados tradicionalmente para diarreia, hepatites e estomatites (ORHAN *et al.*, 2007).

Preparações à base de folha da videira são utilizadas tradicionalmente (via oral e tópica) no tratamento sintomático de transtornos funcionais da fragilidade capilar cutânea, tais como equimoses e petéquias, bem como nas manifestações subjetivas da insuficiência venosa, como pernas cansadas (BRUNETON, 2001). Devido às propriedades adstringentes e hemostáticas, são utilizadas no tratamento da diarreia, hemorragias (GHARIB-NASERI; ZAREI; AMIRI, 2006; ORHAN *et al.*, 2006) e hemorróidas (BOMBARDELLI; MORAZZONI, 1995; VANACLOCHA; FOLCARA, 2003). Na Anatólia, além da infusão de variedades de folhas vermelhas serem utilizadas como hemostáticas e no tratamento de diarreias, as folhas frescas são empregadas externamente para cicatrização de feridas. Na Turquia é utilizada na medicina popular para reduzir os níveis de glicose sanguíneo e como tônico (ORHAN *et al.*, 2006).

Por via tópica as folhas são utilizadas tradicionalmente nos casos de transtornos oculares devido a diversas causas, como ambiente com fumaça, esforço visual continuado, banhos de mar ou de piscina (BOMBARDELLI e MORAZZONI, 1995; BRUNETON, 2001) e blefarites (VANACLOCHA e FOLCARA, 2003). Também são utilizados como coadjuvantes, por via tópica, no tratamento de varizes (VANACLOCHA; FOLCARA, 2003).

A folha da videira *Vitis vinifera* da variedade tinta, denominada *Vigne rouge*, caracterizada por apresentar frutos de bagas vermelhas e casca preta, é utilizada na medicina tradicional européia no tratamento de insuficiência venosa (LAPARRA e DARNÉ, 1989), sendo empregada na França na terapêutica na forma de infusão, extrato seco e em outras formas farmacêuticas (DIAS LANZA *et al.*, 1989; LAPARRA e DARNÉ, 1989), além do tratamento de doenças cardíacas (HMAMOUCHE *et al.*, 1996). O amplo uso popular despertou interesse em investigar seus constituintes e propriedades farmacológicas, sendo desta forma incluída na 10^a edição da Farmacopéia Francesa. Posteriormente, alguns estudos confirmaram a eficácia no

tratamento de insuficiência venosa do extrato padronizado administrado por via oral (KIESEWETTER, 2000; NEES *et al.*, 2003; KALUS *et al.*, 2004). O referido extrato padronizado e comercializado como suplemento alimentar, em formas farmacêuticas, cuja patente encontra-se depositada em diversos países (ESPERESTER, 2007), em cujo texto há a menção de que amplitude das suas ações farmacológicas ainda não foram completamente elucidadas. Contudo, consideram como substâncias ativas a quercetina-3-O-beta-D-glicuronídeo e isoquercetrina (quercetina-3-O-beta-glicosídeo), sendo que estudos *in vitro* indicaram que possui atividade antioxidante e antiinflamatória e pode inibir a agregação plaquetária e hialuronidase e reduzir o edema, possivelmente por reduzir a permeabilidade capilar. Estudos pré-clínicos *in vivo* demonstraram efeito antiinflamatório e sobre a parede capilar.

Outro estudo relata a atividade de extratos de folhas da videira vermelha (*Vitis vinifera*), contra o herpes vírus simples HSV-1 *in vitro* (GIRRE *et al.*, 1990), onde também foi verificada a importância da extração aquosa sob baixas temperaturas.

Recentemente, diversos trabalhos têm sido publicados por um grupo de pesquisadores pertencentes à Universidade de Ciências Médicas Jondi Shapour Ahwaz, no Irã, cujo centro da investigação consiste na avaliação de diversas atividades farmacológicas relatadas a seguir de um extrato hidroalcoólico de folha de uva *Vitis vinifera*, variedade Askari. O extrato é obtido por maceração com etanol a 70 % (10 g de folha seca e moída: 46 mL solvente) por 72 horas, à temperatura ambiente. Segundo os autores, as atividades relacionadas são atribuídas à quercetina, contudo, não há investigação acerca de outros constituintes.

Em 2004, GHARIB-NASERI e VAKILZADEH observaram que um extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera*, cuja variedade não foi designada, apresentou efeito relaxante sobre a traquéia de ratos pré-contráida por acetilcolina ou cloreto de potássio. Posteriormente, outra atividade, a broncodilatadora foi avaliada através de contrações induzidas por KCl (60 mM) e acetilcolina (55 µM) em traquéia isolada de ratos. Os resultados demonstraram que o extrato nas concentrações de 0,5; 1; 2; 4 e 8 mg/mL reduziu significativamente as contrações induzidas por KCl de forma concentração-dependente. O efeito não foi revertido por inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME, 100 µM) nem tampouco pelo antagonista de receptor beta-

adrenérgico (propranolol 1 μ M). As mesmas concentrações de extrato atenuaram as contrações induzidas por acetilcolina (ACh). Estes resultados sugerem que o efeito broncodilatador é mediado via canais de cálcio voltagem-dependentes e que os receptores beta-adrenérgicos e de noradrenalina não estariam envolvidos (GHARIB-NASERI; HEIDARI, 2006a).

O efeito espasmolítico foi investigado através do ensaio em contrações de cólon de ratos induzidas por alguns espasmógenos, utilizando concentrações de 0,5 a 4 mg/mL de extrato. Nesta faixa verificou-se potente atividade relaxante que reduziu contrações induzidas por diferentes agentes reconhecidamente contratores como KCl (60 mM), BaCl₂ (4 mM) e acetilcolina (1 μ M) de forma concentração-dependente. Os resultados sugerem que o efeito espasmolítico pode ser atribuído ao bloqueio de canais de cálcio voltagem-dependentes e ativação de canais de potássio regulados por Ca⁺² (GHARIB-NASERI; ZAREI; AMIRI, 2006).

Em um estudo realizado por ORHAN e colaboradores (2006), foi avaliada pela primeira vez a atividade antidiabética de extratos aquosos de folhas de *Vitis vinifera* administrados oralmente (250 mg/kg e 500 mg/kg) a ratos previamente induzidos à diabete, quando observou-se um resultado mais pronunciado das folhas da uva em relação à substância de referência (tolbutamida), para os extratos na dose de 250 mg/kg. A posterior extração dos extratos aquosos com solventes orgânicos revelou que a fração acetato de etila (50 mg/kg) produziu o mesmo efeito do fármaco de referência. Esta fração foi a mais rica dos extratos orgânicos em flavonóides e taninos após análise por CCD (cromatografia em camada delgada). Os autores chegaram à conclusão que a atividade antidiabética estava relacionada com a atividade antioxidante *in vivo* desses extratos.

1.4 MATERIAIS E MÉTODOS

1.4.1 Obtenção e Caracterização da Matéria-Prima Vegetal

1.4.1.2 Material vegetal

A matéria-prima vegetal para estudo foi constituída de folhas avermelhadas das variedades Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*), cujo sistema de condução era disposto em espaldeira, e Couderc - híbrida de *Vitis vinifera* x (*Vitis rupestris* x *Vitis linsecumii*) - disposta em latada (pergola), coletadas na região vinícola serrana do Rio Grande do Sul, cidade de Cotiporã, na propriedade pertencente à Vinícola Marson, nos meses de maio de 2005 e 2007, época em que ocorre a queda das mesmas.

O material vegetal foi coletado manualmente e, após a seleção, seco em ambiente arejado ao abrigo da luz, em temperatura entre 10 e 25 °C. Após a secagem, as folhas de cada variedade foram classificadas em “ótimas”, “médias” e “ruins”, cujos critérios para classificação foram a homogeneidade de coloração e a ausência de partes danificadas, sendo estas últimas descartadas e as médias reservadas para experimentos que necessitassem de maior quantidade. Retirou-se o pecíolo de cada folha e, posteriormente, o material vegetal seco foi pulverizado com o auxílio de um moinho de facas IKA A11 *basic* (IKA-WERKE) e submetido à tamisação em tamis com abertura nominal de malha 355 µm. O pó seco, pulverizado e tamisado foi armazenado em embalagem de vidro âmbar, sob a proteção da luz com auxílio de papel alumínio, e em ambiente seco.

1.4.1.3 Caracterização da matéria-prima vegetal

Determinação da perda por dessecação (FARMACOPEIA, 1988)

Para realização deste ensaio, utilizou-se o método gravimétrico descrito para a determinação de perda por dessecação presente na Farmacopéia Brasileira 4. ed. (1988). Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, através da média de três determinações.

Determinação do teor de polifenóis totais

A determinação do teor de polifenóis totais foi realizada segundo método preconizado pela monografia para *Vigne rouge* (PHARMACOPÉE, 1996) e comparou-se com a técnica mais recente introduzida na Farmacopéia Européia, integrante da técnica geral para doseamento de taninos (EUROPEAN, 2002). Os resultados foram expressos em pirogalol.

Determinação do teor de antocianos

A determinação de antocianos foi efetuada conforme método estabelecido para monografia de *Vigne rouge* (PHARMACOPÉE, 1996). Os resultados foram expressos em glicosídeo de cianidol.

1.4.2 Avaliação Preliminar das Condições de Extração e Desenvolvimento de Método Analítico para Análise de Antocianos e Flavonóides

1.4.2.1 Procedimentos Gerais

Preparação dos extratos

A matéria-prima vegetal seca e moída foi pesada em balança analítica e submetida à extração por maceração dinâmica num copo de béquer com capacidade de 50 mL agitando com barra magnética, em placa de agitação na velocidade 6, em temperatura ambiente, durante 15 min, utilizando 25 mL do solvente selecionado. Primeiramente adicionou-se metade do volume do solvente e incorporou-se lentamente o pó seco e moído até dispersão completa sob agitação, adicionando-se então o restante do solvente. As amostras foram filtradas em papel filtro Whatmann nº 1, em kitazato, com auxílio de funil de büchner de 6,5 cm de diâmetro. O volume foi retomado em balão volumétrico de 25 mL e completado até 25 mL.

Avaliação preliminar das condições de extração

As folhas secas e moídas foram submetidas a diferentes solventes extratores como água ultrapura (Milli-Q® - Millipore) em diferentes pH (1 a 7), etanol (grau P.A.

Synth[®]) e metanol (grau P.A. Synth[®]). As soluções aquosas tiveram seu pH corrigido com ácido cítrico, ácido clorídrico ou hidróxido de sódio quando necessário, medindo-se o pH em potenciômetro digital Digimed[®] DM-20. A avaliação preliminar foi realizada através de varredura em espectrofotômetro e, posteriormente, os extratos foram submetidos à análise por CLAE.

Para auxiliar na identificação preliminar dos compostos, os mesmos foram comparados com padrões disponíveis no laboratório, com cromatogramas da literatura e com os espectros no ultravioleta e visível.

Análises cromatográficas por CLAE

As fases móveis utilizadas no decorrer deste trabalho foram sempre filtradas previamente às análises, através de membrana filtrante (HPLV 047 Millipore[®]) e desaeradas por 15 minutos em banho de ultrassom.

Todas as soluções-amostra foram filtradas antes da injeção em CLAE. Quando as soluções continham metanol ou acetonitrila, empregou-se membrana de PVDF (Millipore[®]). Quando o solvente foi predominantemente aquoso, como no caso das soluções extrativas e suas respectivas diluições, utilizou-se membrana de ésteres de celulose¹ (HAW PO 4700 - Millipore[®]), ambas com diâmetro nominal de poro 0,45 µm e 13 mm de diâmetro.

O cálculo das áreas dos picos cromatográficos de interesse foi efetuado através da integração dos mesmos pelo programa *Empower*[®].

¹ Encontrou-se extrema dificuldade em filtrar soluções extrativas aquosas em membrana de fluoreto de polivilideno (PVDF; Millipore[®]; 0,45 µm; 13 mm) para posterior análise em CLAE. Após diversos testes com membranas de filtração com especificações distintas, foi substituída por membrana de ésteres de celulose. Presume-se que esta dificuldade possa ser atribuída a alguma interação ou falta da mesma entre componentes do extrato e o material da membrana.

1.4.2.2 Desenvolvimento de método para análise de antocianos e flavonóides

Análise cromatográfica

Para o desenvolvimento do método para análise de antocianos, baseou-se em metodologia previamente desenvolvida por RAMIREZ e ABOY², cujas condições cromatográficas estão descritas na tabela 1.4 e o sistema gradiente na tabela 1.5. O desenvolvimento em CLAE foi conduzido com a variedade Cabernet sauvignon, já que na literatura foram encontrados cromatogramas com perfis cromatográficos que poderiam ser comparados com os dados experimentais obtidos.

Tabela 1.4: Parâmetros para análise cromatográfica preliminar da variedade Cabernet sauvignon.

Características	Descrição
Cromatógrafo	Waters Alliance 2695
Detector	Waters 996
Coluna	Symmetry [®] C ₁₈ Waters ^a
Pré-coluna	Lichrospher [®] Merck ^b
Sistema de eluição	Gradiente
Composição da fase móvel	A) Água ^c :TFA (100:0,08; v/v) e B) ACN ^d :TFA ^e (100:0,08; v/v)
Fluxo	0,7 mL/min
Volume de injeção	10 µL
Comprimento de onda	520 nm e varredura
Sensibilidade de detecção	0,05 AUFS

^a Dimensões da coluna / Tamanho de partícula: 4,6 x 250 mm / 5 µm

^b Dimensões da pré-coluna / Preenchimento: 10 x 4 mm / Bondapak[®] Waters C₁₈ (37-55 µm)

^c Água ultrapura (MilliQ[®] MILLIPORE)

^d ACN – Acetonitrila (grau analítico CLAE / MERCK)

^e TFA – Ácido Trifluoroacético (NUCLEAR)

² método incluído em Tese de Doutorado em andamento neste PPGCF intitulado: "Avaliação farmacológica de extratos vegetais contendo antocianos sobre o aprendizado e memória em diferentes modelos animais" - dados não publicados.

Tabela 1.5: Sistema gradiente utilizado para análise cromatográfica preliminar de antocianos da variedade Cabernet sauvignon.

tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	88	12
4	88	12
6	86	14
18	83	17
25	78	22
30	78	22
35	75	25
45	50	50
50	0	100
55	0	100

Curva de alteração da proporção de solvente : 6.

1.5 VALIDAÇÃO

1.5.1 Validação de Método para Análise de Antocianos

1.5.1.1 Condições Cromatográficas

Tabela 1.6 : Parâmetros para análise cromatográfica da variedade Cabernet sauvignon.

Características	Descrição
Cromatógrafo	Waters Alliance 2695
Detector	Waters UV/vis 2487
Coluna	Symmetry [®] C ₁₈ Waters ^a
Pré-coluna	Lichrospher [®] Merck ^b
Sistema de eluição	Gradiente
Composição da fase móvel	A) Água ^c :TFA (100:0,08; v/v) e B) ACN ^d :TFA ^e (100:0,08; v/v)
Fluxo	0,7 mL/min
Volume de injeção	10 µL
Comprimento de onda	520 nm
Sensibilidade de detecção	0,05 AUFS

^a Dimensões da coluna / Tamanho de partícula: 4,6 x 250 mm / 5 µm

^b Dimensões da pré-coluna / Preenchimento: 10 x 4 mm / Bondapak[®] Waters C₁₈ (37-55 µm)

^c Água ultrapura (MilliQ[®] MILLIPORE)

^d ACN – Acetonitrila (grau analítico CLAE / MERCK)

^e Ácido Trifluoroacético (NUCLEAR)

Tabela 1.7: Sistema gradiente utilizado para análise cromatográfica de antocianos da variedade Cabernet sauvignon.

tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	91	9
4	88	12
6	86	14
18	84	16
24	84	16
26	82	18
50	73	27
55	0	100
60	0	100

Curva de alteração da proporção de solvente : 6.

1.5.1.2 Parâmetros de validação

Especificidade

A especificidade foi determinada após a injeção de diluições da solução extrativa da variedade Cabernet sauvignon, com concentração teórica final de 30 mg/mL, em cromatógrafo Waters Alliance 2695 com detector de fotodiodos Waters PDA 996, com a finalidade de verificar a pureza do pico 2 selecionado como marcador químico, utilizado para cálculo nos doseamentos.

Linearidade

A avaliação da linearidade do método foi realizada pela construção de curvas-padrão obtidas tanto para o cloridrato de cianidina quanto para o extrato aquoso da variedade Cabernet sauvignon.

As curvas-padrão de cloridrato de cianidina (ChromaDex[®]) foram construídas empregando sete concentrações diferentes, a partir de uma solução de referência na

concentração de 0,96 mg/mL em metanol/HCl, que foi sucessivamente diluída com ACN/TFA 0,08 %³, a fim de se obter concentrações teóricas de 240,180, 120, 60, 30, 15 e 6 µg/mL.

A curva de linearidade das amostras foi construída empregando sete concentrações diferentes, a partir de uma solução extrativa da variedade Cabernet sauvignon, preparada conforme descrito no item 1.4.2.1 cuja concentração final foi de 60 mg de droga/mL. A partir desta solução foram obtidas sucessivas diluições obtendo-se concentrações teóricas de 50,4; 40,2; 30; 20,4; 10,2 e 5,1 mg/mL. Avaliou-se o 2º pico do cromatograma selecionado como marcador, que se refere à cianidina-3-O- glicosídeo.

Cada ponto foi injetado em triplicata, sendo o resultado expresso como a média das três determinações. Foram determinadas a equação da reta e o coeficiente de correlação pelo método dos mínimos quadrados.

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de análise da variância (ANOVA fator único), com um nível de significância de 95 % ($p < 0,05$) através do programa estatístico SPSS versão 13.0[®] (*Statistical Package for the Social Sciences Inc.*, Chicago, IL), verificando-se previamente a homogeneidade de variância através do teste de Levene.

Precisão

A precisão do método foi avaliada pelos ensaios de repetibilidade (intra-dia) e de precisão intermediária (inter-dias).

³ Na maior parte dos artigos citados na literatura consultada utiliza-se ácido clorídrico (HCl) nas soluções utilizadas para solubilização e diluição dos padrões de antocianos. Entretanto, a substituição de HCl por outro ácido é fortemente recomendado, independente da concentração utilizada, pelo fabricante do cromatógrafo líquido empregado no presente trabalho. Dessa forma, optou-se por solubilizar a solução padrão em MEOH/HCl e realizar as diluições com ACN/TFA 0,08 %, averiguando se ocorreu alguma alteração na área ou espectro do pico do cloridrato de cianidina, a fim de colaborar com a manutenção do equipamento.

A verificação da repetibilidade foi realizada mediante a análise da solução extrativa aquosa da variedade Cabernet sauvignon com concentração teórica de 60 mg de droga/mL e com diluições da mesma para 30 e 5,1 mg/mL, injetadas em triplicata, situadas na faixa de concentração da curva-padrão da substância de referência e na curva de linearidade da amostra, representando os níveis alto, médio e baixo. Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR%).

Para avaliação da precisão intermediária, o procedimento descrito acima foi realizado por três dias diferentes, sendo nova extração preparada a cada dia. No terceiro dia todos os procedimentos foram conduzidos por analista diferente.

Exatidão

A exatidão foi avaliada empregando-se o ensaio de adição de padrão, sendo realizado em triplicata, com base na faixa de linearidade do método.

Em vista disso, foram preparadas diluições a partir da solução extrativa com concentrações teóricas finais de 10, 2 mg/mL. Nestas foram adicionadas alíquotas de uma solução de 120 µg/mL de cloridrato de cianidina em ACN/TFA 0,08 %, de modo a obter três níveis de concentração - alto, médio e baixo. Concomitantemente, foram injetadas as soluções denominadas de controle, tanto para o padrão, quanto para amostra, conforme apresentado no protocolo (Tabela 1.8).

A exatidão foi determinada pela relação entre a concentração média recuperada e a concentração sem adição do padrão correspondente. Os resultados foram expressos em percentual de recuperação.

Tabela 1.8: Protocolo de diluições para ensaio de exatidão na determinação de antocianos por CLAE.

Nível	Designação	Volume (µL)				Concentração final	
		Solução extrativa (10,2 mg ¹ /mL)	Água ² pH 5,5	Solução padrão (120 µg/mL)	Solvente do padrão ³	amostra	padrão
						(mg/mL)	(µg/mL)
Alto	Controle amostra	100	-	-	100	5,1	-
	Controle padrão	-	100	100	-	-	60
	SR1	100	-	100	-	5,1	60
Médio	Controle amostra	100	-	-	100	5,1	-
	Controle padrão	-	100	50	50	-	30
	SR2	100	-	50	50	5,1	30
Baixo	Controle amostra	100	-	-	100	5,1	-
	Controle padrão	-	100	25	75	-	15
	SR3	100	-	25	75	5,1	15

¹ de droga; ² ultrapura (Milli-Q® - Millipore); ³ ACN/TFA 0,08 %; SR: solução de recuperação.

Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados a partir das curvas de linearidade da amostra e calculados segundo as equações presentes na RE 899 (BRASIL, 2003).

$$LD = (DPa \times 3)/IC$$

$$LQ = (DPa \times 10)/IC$$

Onde DPa é o desvio padrão médio do intercepto com o eixo y de três curvas de linearidade e IC é a inclinação média das curvas de calibração.

Robustez

A robustez do método foi avaliada mediante observação do seu desempenho após sofrer pequenas alterações na composição e no fluxo da fase móvel, bem

como a utilização de outras colunas, de acordo com a tabela 1.9. Os parâmetros avaliados para constatar a suscetibilidade do método frente a variações nas condições cromatográficas sobre a determinação quantitativa do pico 2 foram a área e o tempo de retenção. Tanto o padrão quanto a amostra foram submetidos às alterações.

Tabela 1.9: Especificações das colunas cromatográficas comparadas no ensaio de robustez.

Designação/ Fabricante	Dimensões (mm)	Tamanho de partícula (μm)	Forma da partícula	Tamanho do poro	carga de carbono(%)	<i>Endocapped</i>
(a) Symmetry [®] / Waters	250 x 4,6	5	esférica	100 A ^o	19	Sim*
(b) Luna C ₁₈ (2) [®] / Phenomenex	250 x 4,6	5	esférica	100 A ^o	17,5	Sim*
(c) Luna C ₁₈ (2) [®] / Phenomenex	150 x 4,6	5	esférica	100 A ^o	17,5	Sim*

* ao consultar as informações técnicas relativas a cada coluna, todas possuem trimetilsiloxano.

1.6 Validação de Método para Análise de Flavonóides

1.6.1 Condições cromatográficas

Tabela 1.10: Parâmetros para análise cromatográfica de flavonóides da variedade Cabernet sauvignon.

Características	Descrição
Cromatógrafo	Waters Alliance 2695
Detector	Waters UV/Vis 2487
Coluna	X-Terra [®] RP18 Waters ^a
Pré-coluna	Lichrospher [®] Merck ^b
Sistema de eluição	Gradiente
Composição da fase móvel	A) Água ^c :TFA (100:0,08; v/v) e B) ACN ^d :TFA ^e (100:0,08; v/v)
Fluxo	0,8 mL/min
Volume de injeção	10 μL
Comprimento de onda	356 nm
Sensibilidade de detecção	0,05 AUFS

^a Dimensões da coluna / Tamanho de partícula: 4,6 x 150 mm / 5 μm

^b Dimensões da pré-coluna / Preenchimento: 10 x 4 mm / Bondapak[®] Waters C₁₈ (37-55 μm)

^c Água ultrapura (MilliQ[®] MILLIPORE)

^d ACN – Acetonitrila (grau analítico CLAE / MERCK)

^e Ácido Trifluoroacético (NUCLEAR)

Tabela 1.11: Sistema gradiente utilizado para análise cromatográfica de flavonóides da variedade Cabernet sauvignon.

tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	90	10
4	88	12
6	86	14
14	84	16
24	82	18
30	78	22
45	75	25
46	0	100
50	0	100

Curva de alteração da proporção de solventes: 6.

1.6.2 Parâmetros de Validação

Especificidade

Normalmente a especificidade é realizada através da verificação da pureza do pico de interesse majoritário, referente à quercetina-3-O-glicuronídeo, selecionado como marcador químico, utilizado para cálculo nos doseamentos. Entretanto, a especificidade do método pode ser comprometida já que o flavonóide adjacente também possui o mesmo espectro UV. No presente trabalho não foi possível utilizar outra técnica como CLAE acoplada a espectrômetro de massas ou ressonância magnética nuclear (RMN).

Linearidade

A avaliação da linearidade do método foi realizada pela construção de curvas-padrão obtidas tanto para a rotina quanto para o extrato aquoso da variedade Cabernet sauvignon.

As curvas-padrão de rotina (Merck®) foram construídas empregando sete concentrações diferentes, a partir de uma solução de referência na concentração de 1 mg/mL em metanol, que foi sucessivamente diluída com metanol a fim de se obter concentrações teóricas de 0,750; 0,500; 0,250, 0,125; 0,625; 0,3125 e 0,15625 mg/mL.

A curva de linearidade das amostras foi construída empregando sete concentrações diferentes, a partir de uma solução extrativa da variedade Cabernet sauvignon, preparada conforme descrito no item 1.4.2.1, cuja concentração final foi de 60 mg de droga/mL. A partir desta solução foram obtidas sucessivas diluições obtendo-se concentrações teóricas de 50,4; 40,2; 30; 20,4; 10,2 e 5,1 mg/mL. Avaliou-se o pico majoritário do cromatograma selecionado como marcador.

Cada ponto foi injetado em triplicata, sendo o resultado expresso como a média das três determinações. Foram determinados a equação da reta e o coeficiente de correlação pelo método dos mínimos quadrados.

Os dados foram analisados estatisticamente por meio de análise da variância (ANOVA fator único), com um nível de significância de 95 % ($p < 0,05$) através do programa estatístico SPSS versão 13.0[®] (*Statistical Package for the Social Sciences Inc.*, Chicago, IL), verificando-se previamente a homogeneidade de variância através do teste de Levene.

Precisão

A precisão do método foi avaliada pelos ensaios de repetibilidade (intra-dia) e de precisão intermediária (inter-dias).

A verificação da repetibilidade foi realizada mediante a análise da solução extrativa aquosa da variedade Cabernet sauvignon com concentração teórica de 60 mg de droga/mL e com diluições da mesma para 30 e 5,1 mg/mL, injetadas em triplicata, situadas na faixa de concentração da curva-padrão da substância de referência e na curva de linearidade da amostra, representando os níveis alto, médio e baixo. Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR%).

Para avaliação da precisão intermediária, o procedimento descrito acima foi realizado por três dias diferentes, sendo nova extração preparada a cada dia. No terceiro dia todos os procedimentos foram conduzidos por analista diferente.

Exatidão

A exatidão foi avaliada empregando-se o ensaio de adição de padrão, sendo realizado em triplicata, com base na faixa de linearidade do método.

Foram preparadas diluições a partir da solução extrativa com concentrações teóricas finais de 10,2 mg/mL. Nestas foram adicionadas alíquotas de uma solução de 0,5 mg/mL (passar todas as unidades para µg) de rutina em metanol, em três níveis de concentração (alto, médio e baixo). Concomitantemente foram injetadas as soluções extrativas diluídas com o mesmo volume utilizado de solução de padrão, sem a presença de rutina, a fim de obter os dados necessários para a realização dos cálculos de percentual de recuperação, segundo o protocolo apresentado na tabela 1.12.

Tabela 1.12: Volume (µL) utilizados de solução de rutina e da solução extrativa para cada ponto da exatidão.

Nível	Designação	Solução de rutina (500 µg/mL)	Água ¹ pH 5,5	Solução extrativa (10,2 mg/mL)	Solvente (MeOH)
Alto	padrão 1	500	500	-	-
Médio	padrão 2	250	500	-	250
Baixo	padrão 3	125	500	-	375
Branco	amostra + solvente	-	-	500	500
Alto	amostra + padrão 1	500	-	500	-
Médio	amostra + padrão 2	250	-	500	250
Baixo	amostra + padrão 3	125	-	500	375

¹ ultrapura (Milli Q[®] - Millipore)

Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados a partir das curvas de linearidade da amostra e calculados segundo as equações presentes na RE 899 (BRASIL, 2003).

$$LD = (DPa \times 3)/IC$$

$$LQ = (DPa \times 10)/IC$$

Onde DPa é o desvio padrão médio do intercepto com o eixo y de três curvas de linearidade e IC é a inclinação média das curvas de calibração.

Robustez

A robustez do método foi avaliada mediante observação do seu desempenho após sofrer pequenas alterações na composição e no fluxo da fase móvel, bem como a utilização de outra coluna. Os parâmetros avaliados para constatar a

suscetibilidade do método frente a variações nas condições cromatográficas sobre a determinação quantitativa do pico majoritário foram o fluxo (0,7 mL/min) e o percentual de 0,06 % de acidificante TFA adicionado às fases móveis A e B. Tanto o padrão quanto as amostras foram submetidas às condições alteradas.

1.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.7.1 Material vegetal

Padronizou-se o tamanho de partícula (abertura nominal de malha inferior a 355 μm). Com esta faixa foi possível obter um pó com características mais homogêneas, já que se observou principalmente a diminuição da presença de pêlos, nervuras ou constituintes que não foram triturados. A seleção da abertura nominal de malha foi baseada em testes preliminares após utilização de tamises com abertura nominal de malha entre 500 e 180 μm e baseando-se na granulometria indicada pela Farmacopéia Francesa (1996).

1.7.2 Caracterização da matéria-prima vegetal

Perda por dessecação

A perda por dessecação é utilizada para avaliar o teor de umidade residual da droga após o processo de secagem, constituindo-se num parâmetro de estabilidade, uma vez que o excesso de água em drogas vegetais pode ser responsável pelo crescimento de bactérias e fungos, assim como pela hidrólise de constituintes, podendo acarretar na sua degradação (WHO, 1998). A matéria prima-vegetal constituída de folhas das variedades Cabernet sauvignon e Couderc apresentaram valores de umidade residual abaixo do limite farmacopêico máximo preconizado de 12,0 % para a espécie *Vitis vinifera* (*Vigne rouge*) pela Farmacopéia Francesa (1996). A variação observada entre ambas as variedades podem estar relacionados ao intenso período de chuvas anterior à coleta realizada no ano de 2007 (tabela 1.13).

Tabela 1.13: Teor de umidade de amostras de Cabernet sauvignon e Couderc coletadas em 2 anos diferentes.

Variedade	Ano de coleta	
	2005	2007
	Teor médio * (%; m/m) ± DP	Teor médio* (%; m/m) ± DP
Cabernet sauvignon	8,45 ± 0,015	10,25 ± 0,102
Couderc	9,27 ± 0,030	11,35 ± 0,799

* média de três determinações; DP: desvio padrão.

Determinação do teor de polifenóis totais

Os resultados obtidos a partir da determinação do teor de polifenóis totais estão apresentados na Tabela 1.14. A comparação com a técnica da Farmacopéia Européia justifica-se pelo fato de se verificar uma tendência em substituir o reagente de Folin-Denis pelo Folin-Ciocalteu⁴, que apresenta diversas vantagens em relação ao anterior, porém obtêm-se valores diferentes de teores de polifenóis para a mesma amostra. Ambas as variedades, oriundas de anos diferentes de coletas, apresentaram teores superiores ao preconizado pela Farmacopéia Francesa, cuja especificação é de no mínimo 4,0 % expresso em pirogalol. Em adição, apesar da utilização de reagentes diferentes, evidencia-se maior teor de polifenóis na variedade Couderc em relação à variedade Cabernet .

Tabela 1.14: Teor de polifenóis totais.

Variedade	Ano de coleta	Método da Farm. Francesa	Método da Farm. Européia
		Teor* (%; m/m) ± DP	Teor* (%; m/m) ± DP
Cabernet	2005	7,20 ± 0,085	3,75 ± 0,023
	2007	7,78 ± 0,015	3,89 ± 0,019
Couderc	2005	9,95 ± 0,053	4,56 ± 0,011
	2007	10,78 ± 0,032	5,21 ± 0,078

* média de três determinações; DP: desvio padrão.

⁴ O reagente de Folin-Ciocalteu (FC) consiste na modificação do reagente de Folin-Denis pela adição de sulfato de lítio ao mesmo para evitar a ocasional formação de turvação ou precipitação. Além disso, o reagente FC é mais sensível e específico.

Determinação do teor de antocianos

Os resultados obtidos a partir da determinação do teor de antocianos estão apresentados na Tabela 1.15. Ambas as variedades, oriundas de coletas de anos diferentes, apresentaram teores superiores ao preconizado pela Farmacopéia Francesa, cuja especificação é, de no mínimo, 0,2 % expresso em glicosídeo de cianidol.

Tabela 1.15: Teor de antocianos.

Variedade	Ano de coleta	Teor *(%; m/m) ± DP
Cabernet	2005	0,788 ± 0,016
	2007	0,851 ± 0,0031
Couderc	2005	0,347 ± 0,0029
	2007	0,375 ± 0,0012

* média de três determinações; DP:desvio padrão.

Considerações gerais relacionadas à caracterização das matérias-primas vegetais

Mesmo não se tratando da variedade elencada na Farmacopéia Francesa, as duas variedades estudadas atenderiam às exigências estabelecidas na monografia da *Vigne rouge*.

1.7.3 Avaliação preliminar das condições de extração e desenvolvimento de método para análise de antocianos e flavonóides

A realização de extrações sob diferentes condições de pH visou avaliar o comportamento dos antocianos extraídos frente a variações de pH e compará-los ao comportamento de antocianos descritos na literatura, além de averiguar a possibilidade de otimizar a quantidade de antocianos extraídos. Neste sentido, observou-se diferença de coloração dos extratos obtidos com solventes em diferentes pH (Tabela A3 - anexos). Entretanto, cabe salientar que as diferenças de

comportamento relatadas na literatura, como por exemplo, apresentado por He (2004) (Figura A1 - anexos) basicamente referem-se às agliconas, já os antocianos presentes no extrato estão provavelmente na forma de heterosídeos, além do possível envolvimento do fenômeno da co-pigmentação, que altera seu comportamento, tornando-os menos vulneráveis frente a modificações, como alterações de pH (BROUILLARD, 1988). Após a preparação dos extratos, com relação droga-solvente estabelecida em 40mg/mL, os mesmos foram submetidos às condições cromatográficas previamente desenvolvidas (Tabelas 1.4 e 1.5), cujos cromatogramas podem ser observados na figura 1.1.

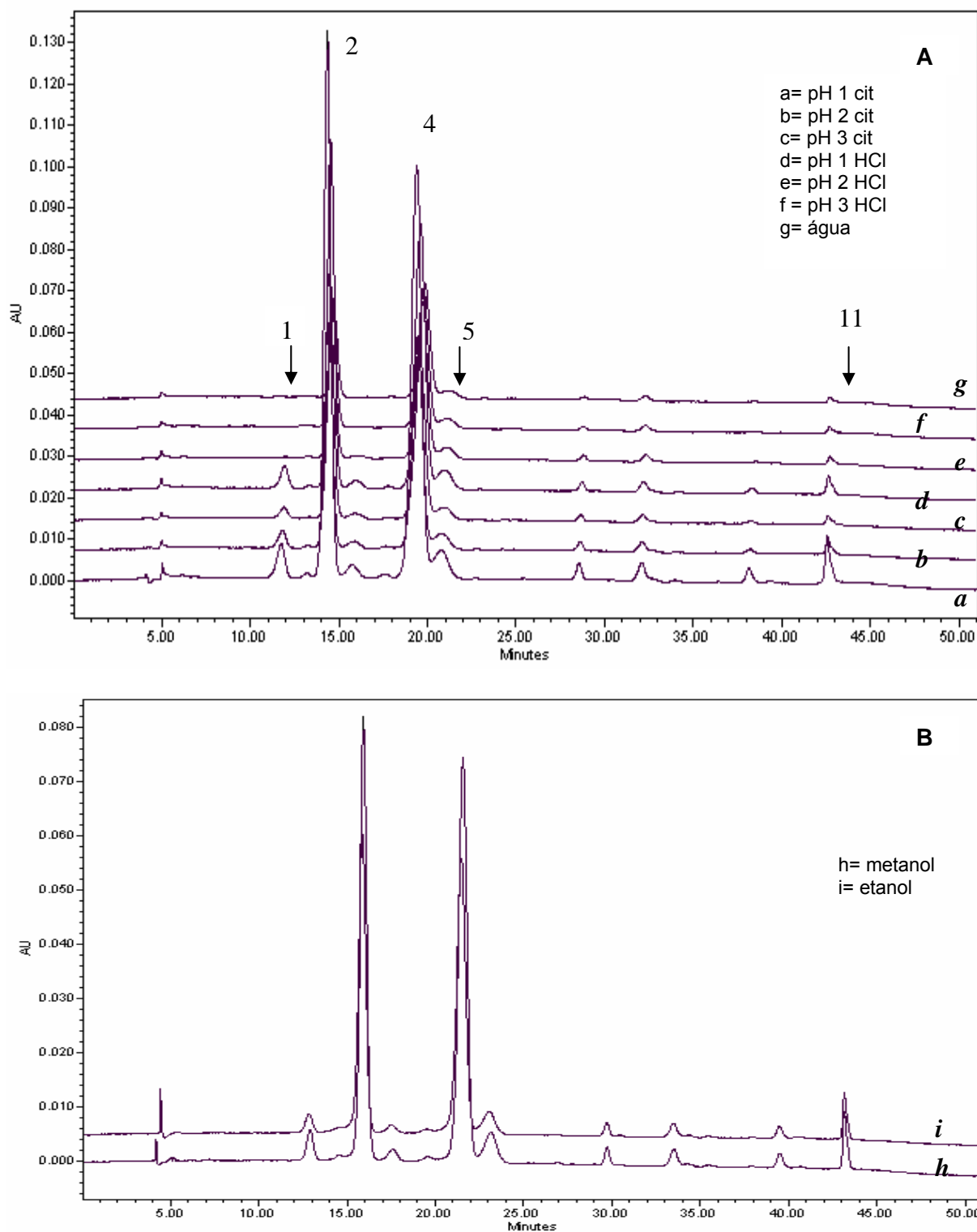


Figura 1.1: **(A)** Sobreposição dos perfis cromatográficos de antocianos de extratos aquosos das folhas da variedade Cabernet sauvignon com a adição de diferentes acidificantes em diferentes pHs, designados como. cit: soluções acidificadas com ácido cítrico; HCL: soluções acidificadas com ácido clorídrico⁵. Condições cromatográficas segundo método descrito nas tabelas 1.4 e 1.5. $\lambda = 520$ nm. **(B)** Extrações realizadas com etanol 100 % e metanol 100 %.

⁵ A utilização de HCl foi posteriormente banida no laboratório para análises em CLAE, em virtude dos danos que este ácido pode causar ao equipamento.

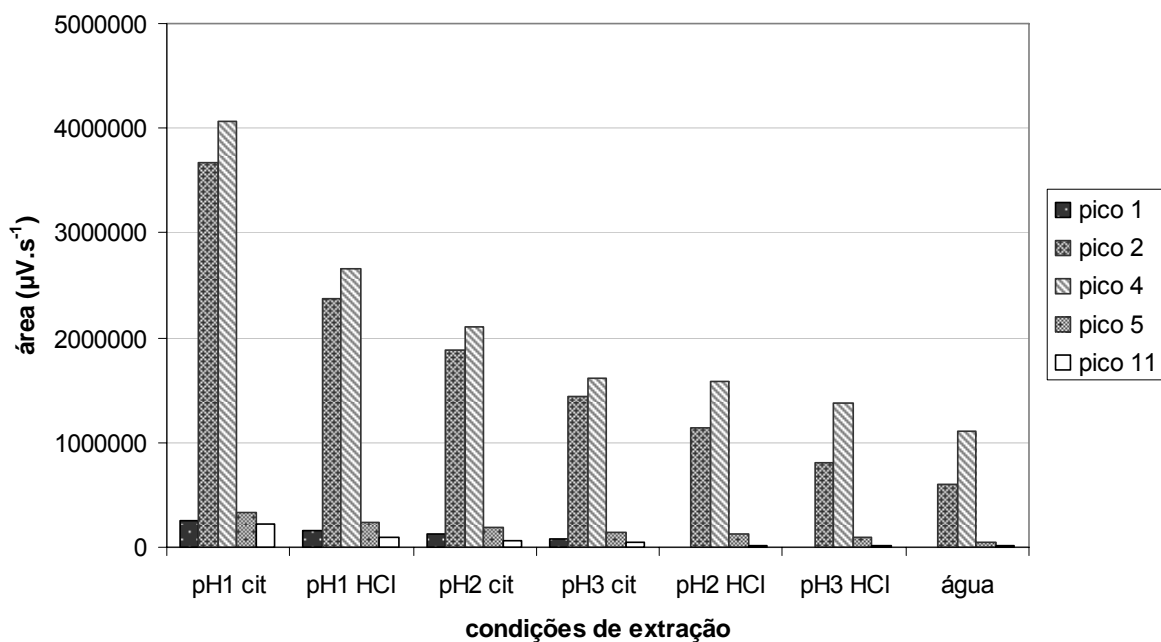


Figura 1.1: (C) Áreas correspondentes aos picos 1, 2, 4, 5 e 11 dos perfis cromatográficos mostrados em A. A partir do pH 4 não houve diferença significativa em relação ao extrato aquoso nas áreas até pH 7; $p < 0,05$ comparado com o teste de Tukey.

Nesta fase preliminar, verificou-se, quanto à avaliação das substâncias majoritárias pertencentes aos antocianos, que o solvente e as condições alteraram predominantemente de forma quantitativa, mas não qualitativa, a presença de compostos majoritários. Em adição, no mesmo pH, comportaram-se de maneira diferente frente ao acidificante distinto. Supõe-se que esse comportamento possa ocorrer devido a uma possível complexação com ácido cítrico e clorídrico, de forma a obter citratos ou cloridratos, respectivamente, bem como a formação de outros subprodutos. Entretanto, na presença de ácido cítrico observou-se principalmente a manutenção dos antocianos acilados (a partir de 28 min), já referido em literatura nestas condições de extração (DEY; HARBORNE, 1989). Esta pode ser uma informação interessante para extrações futuras visando a obtenção de antocianos esterificados. Por outro lado, na tentativa de se corrigir as soluções extrativas para pH mais alto (5,5 a 7,0), observou-se a formação de turvação. Quanto à análise dos cromatogramas relativos aos flavonóides, não foi observada diferença significativa em relação às áreas dos picos majoritários, nos diferentes pH testados, na presença dos dois agentes acidificantes.

1.7.4 Desenvolvimento de método para análise de antocianos e flavonóides ⁶

O emprego de cromatografia líquida de alta eficiência combinada com detecção com arranjo de fotodiodos (CLAE- DAD) é considerada uma das técnicas mais adequadas e utilizadas para analisar os compostos fenólicos e polifenólicos da uva, sendo freqüentemente empregado para determinar a composição de produtos padronizados (MONAGAS *et al.*, 2006a).

Nesta fase preliminar, não eram disponíveis colunas cromatográficas idênticas, em termos de especificação, àquelas utilizadas para avaliação de antocianos em folhas de videira, conforme literatura referenciada. Entretanto, o sistema previamente desenvolvido por Ramirez e Aboy, como citado no item 1.4.2.2 (Tabelas 1.4 e 1.5), atendeu aos requisitos principais indicados para análise por cromatografia líquida desta classe, como a utilização de coluna de fase reversa C₁₈, sistema de eluição em gradiente e a adição de acidificante na fase móvel, baseando-se nas condições relatadas na literatura (Tabela 1.3), sendo adequado para analisar os diferentes extratos elencados no item anterior. Os testes subseqüentes foram conduzidos com extratos aquosos da variedade Cabernet sauvignon, em temperatura ambiente, pois as atividades relatadas poderiam ser atribuídas também à presença dos antocianos, os quais são sensíveis ao calor. Além disso, um dos produtos de referência Antistax[®], segundo consta no texto da patente (ESPERESTER *et al.*, 2007), é obtido através de extração somente com água destilada. Em adição, apenas após desenvolvimento e validação seria possível realizar com segurança a futura comparação com outras condições de extração.

Ao comparar-se com os perfis cromatográficos obtidos experimentalmente com alguns cromatogramas apresentados na literatura, observou-se extrema semelhança com o perfil apresentado por DARNÉ e GLORIES (1988) como apresentado na figura 1.2.

⁶ Os antocianos são uma classe pertencente aos flavonóides. Entretanto, para fins didáticos não foi utilizado "antocianos e outros flavonóides".

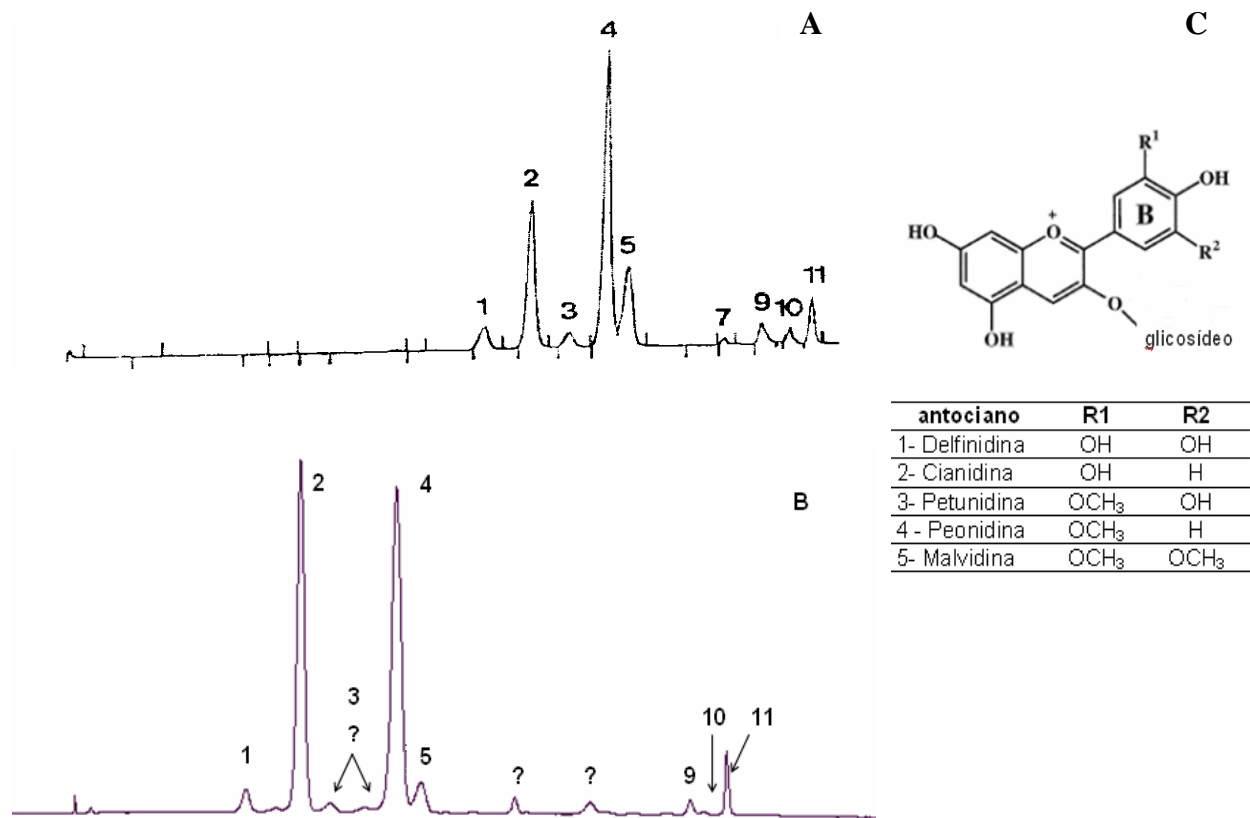


Figura 1.2: Perfis cromatográficos de antocianos de folhas da variedade de Cabernet sauvignon em 520 nm. **(A)** Segundo Darné e Glories (1988): 1- delfinidina 3-MG; 2- cianidina 3-MG; 3- petunidina 3-MG; 4- peonidina 3-MG; 5- malvidina 3-MG; 6- delfinidina MG acetato; 7- cianidina MG acetato; 8 e 9- misturas 10- peonidina MG cumarato; 11- malvidina 3 MG cumarato; **MG** = monoglicosídeo (glicose). Tempo de análise: 30 min. **(B)** Obtido experimentalmente segundo condições estabelecidas nas tabelas 1.4 e 1.5. Tempo de análise: 55 min. A semelhança sugere que os picos cromatográficos correspondam à numeração justaposta. **(C)** Estrutura dos principais antocianos mencionados (1 a 5).

Ao se observar a estrutura química dos antocianos, a seqüência de eluição também obedece à diferença de polaridade influenciada pelos radicais R1 e R2. Outros estudos com antocianos em condições semelhantes também apontam para a seguinte seqüência de eluição: delfinidina < cianidina < petunidina < peonidina < malvidina, mesmo utilizando condições cromatográficas diferenciadas (ICHIYANAGI *et al.*, 2004; MONAGAS *et al.*, 2006a). Da mesma forma, após a injeção dos padrões na forma de cloridrato, observou-se a mesma seqüência de eluição ao compararmos os tempos de retenção. Por outro lado, ao se comparar os antocianos com a mesma aglicona em sua estrutura, a seqüência do tempo de retenção tende a ser a seguinte: galactosídeo < glicosídeo < arabinosídeo (ICHIYANAGI *et al.*, 2004).

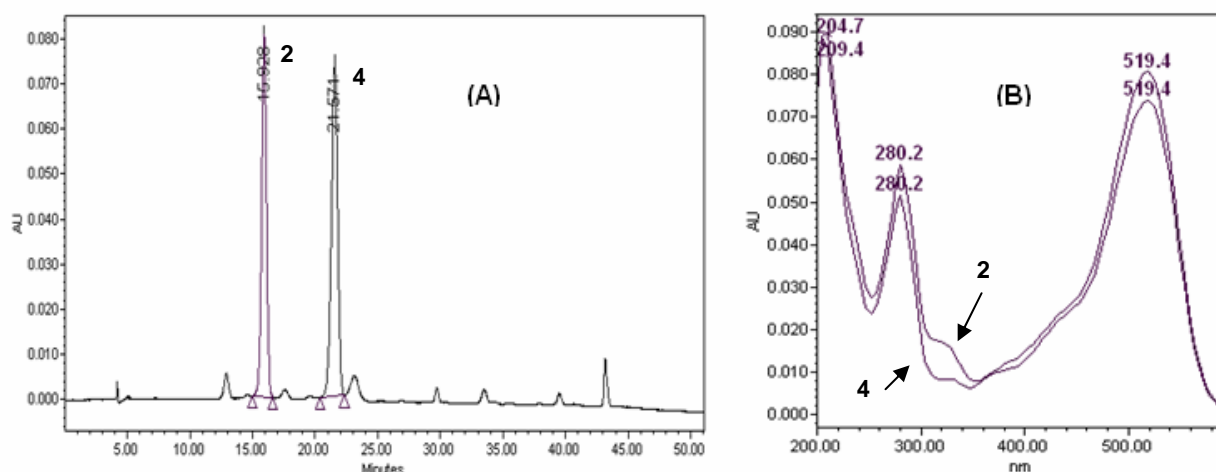


Figura 1.3: **(A)** Cromatograma de extrato aquoso da variedade Cabernet sauvignon. **(B)** Espectros dos picos majoritários 2 e 4.

Tabela 1.16: Tempos de retenção e absorvâncias obtidas com CLAE/DAD dos padrões de antocianos disponíveis, na forma de cloridrato. Condições cromatográficas segundo tabelas 1.4 e 1.5, $\lambda=520$ nm.

Antocianidina	Absorvâncias (nm)			Tempo de retenção (min)
Delfinidina	209,4	275,5	346,9	534,1
Cianidina	209,4	275,5		529,2
Pelargonidina	209,4	266,0	327,8 e 422,4	514,6
Peonidina	209,4	275,5		529,2
Malvidina	209, 4	275,5	351,7	538,9

Baseando-se na semelhança entre o perfil cromatográfico obtido experimentalmente com o apresentado na literatura (Figura 1.2), nos espectros idênticos relatados para cianidina e peonidina (Figura 1.3 B e Tabela 1.16), cujos máximos de absorvância são idênticos (ZHANG *et al.*, 2004), também observado para os padrões utilizados, bem como nos diversos estudos que apontam para a prevalência e predominância destes dois antocianos em folhas avermelhadas, pode-se inferir que os picos 2 e 4 tratam-se de cianidina-3-O-glicosídeo e peonidina-3-O-glicosídeo, respectivamente.

Pela disponibilidade de utilização do cromatógrafo líquido com detector com arranjo de fotodiodos investigou-se a hipótese de realizar avaliação de perfil cromatográfico e doseamento de antocianos e flavonóides na mesma análise cromatográfica, já que se observavam regiões distintas para o aparecimento dos mesmos, conforme perfil observado na figura 1.4, que podem ser denominadas

regiões correspondente aos ácidos fenólicos (R1), e posteriormente aos antocianos glicosilados (R2), flavonóides (R3) e antocianos acilados (R4). Esta possibilidade reduziria o tempo necessário para validação, bem como diminuição do tempo de uso da lâmpada do detector e economia de solventes.

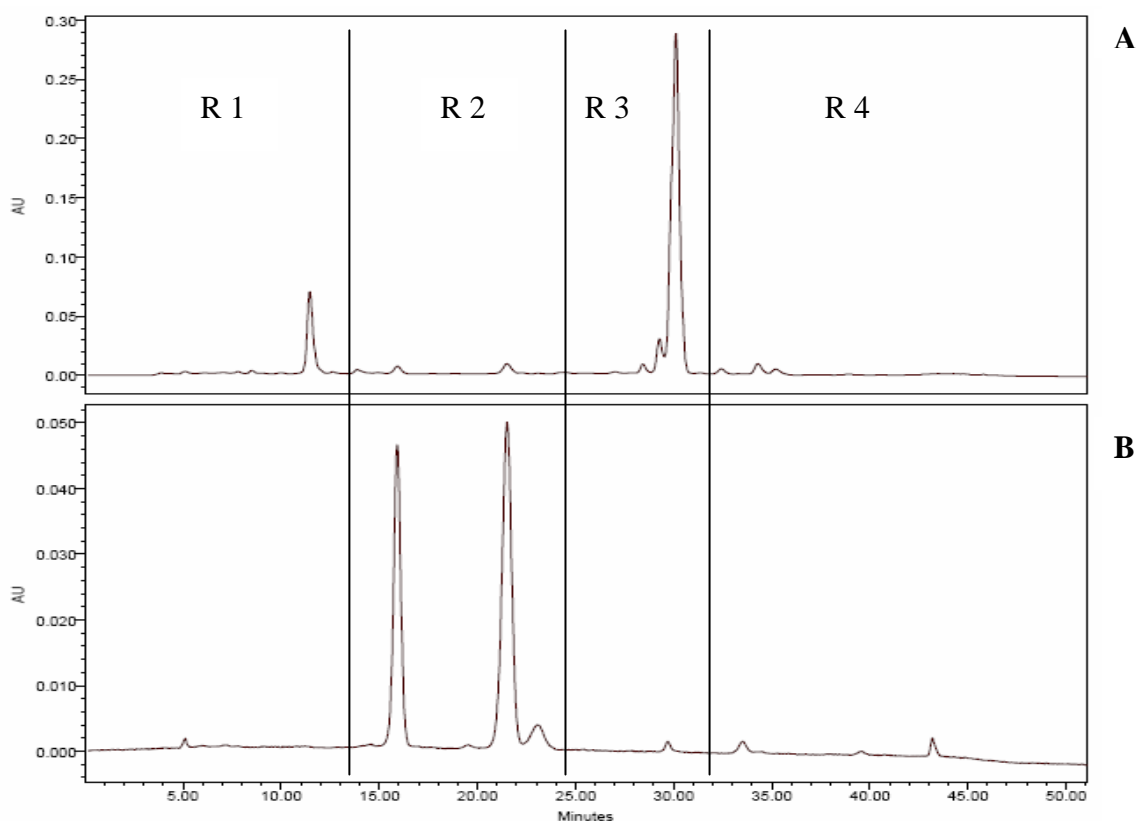


Figura 1.4: Cromatograma de extrato aquoso de Cabernet sauvignon. **A**: perfil cromatográfico de ácidos fenólicos e flavonóides, $\lambda = 356$ nm; em **B**: perfil cromatográfico de antocianos, $\lambda = 520$ nm. **R**= regiões.

Ao selecionar o pico majoritário dos flavonóides, pela análise através do detector de arranjo de fotodíodos (DAD), observou-se que o mesmo apresentava-se aparentemente puro. Entretanto, ao realizar as co-injeções com isoquercitrina e hiperosídeo neste método, observou-se que ambos flavonóides se sobrepunham. Em adição, ao realizarem-se pequenas variações no gradiente antes de se iniciar a validação (ensaios preliminares de robustez) observou-se que o pico majoritário não foi único e que outros flavonóides poderiam estar sendo co-eluídos, como apresentado na figura 1.5, porém todos possuíam os mesmos espectros no UV. Sendo assim, fez-se necessário desenvolver um outro método para análise dos flavonóides.

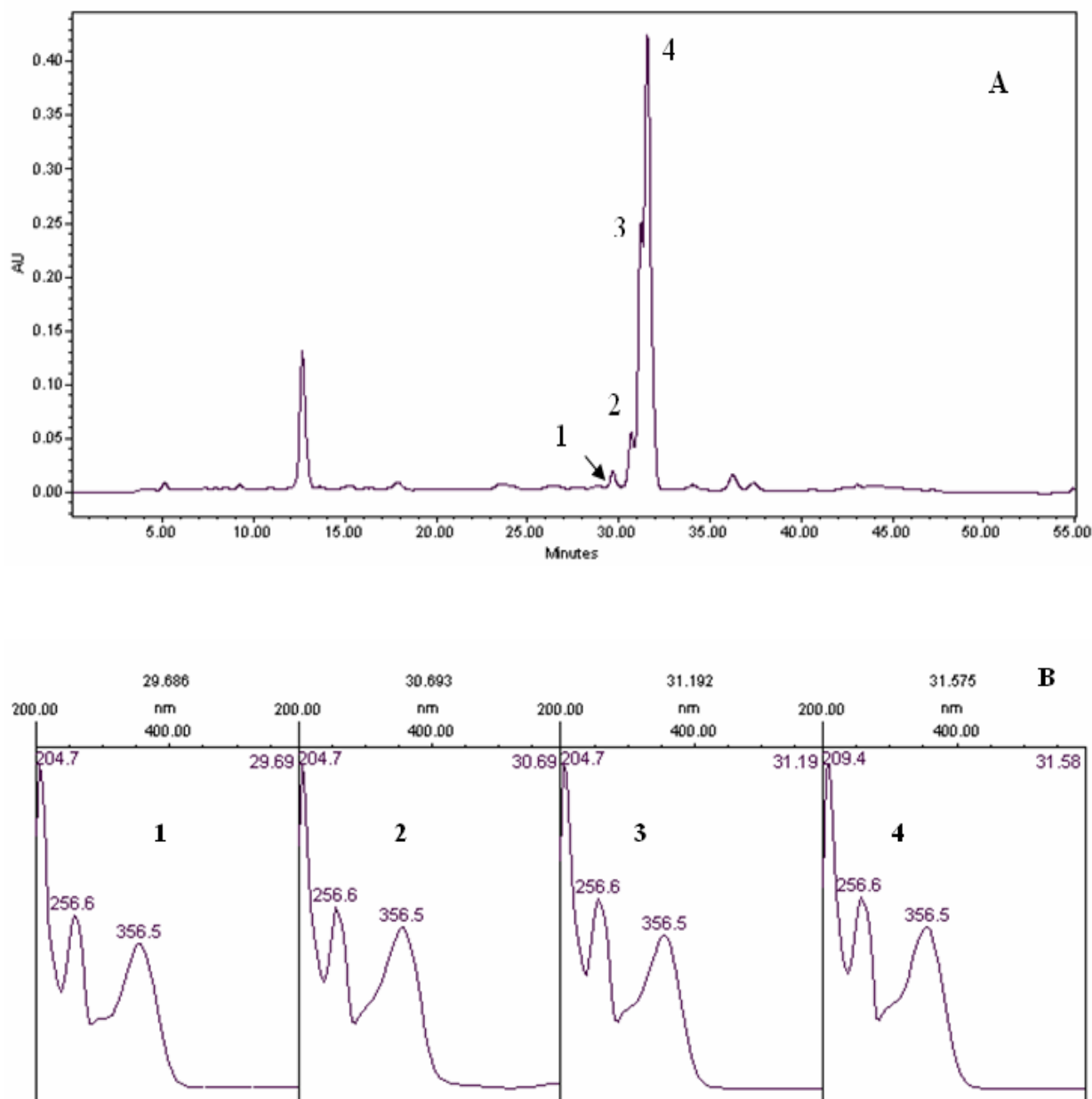


Figura 1.5: **(A)** Perfil cromatográfico de extrato aquoso de Cabernet sauvignon em 356 nm frente a sutis alterações no sistema de eluição em gradiente proposto na tabela 1.5. **(B)** Espectros UVs correspondentes aos picos assinalados em A.

A dificuldade na separação cromatográfica pode ser atribuída ao fato de que todos os flavonóides em questão são derivados glicosilados da quercetina, cujo núcleo flavan é o cromóforo, sendo que o hiperosídeo e isoquercetrina possuem os açúcares β -D-galactose e β -D-glicose, respectivamente, na posição 3 do anel B, que diferem somente na orientação espacial da hidroxila em C3 (Figura 1.6). Em

consulta à literatura a respeito de análise por CLAE de outras plantas que possuem hiperosídeo e isoquercetrina, como *Malus domestica* (maçã) (TIBERTI *et al.*, 2007) e *Hipericum perforatum* (hipérico) (BROLIS *et al.*, 1998), evidenciou-se também esta dificuldade através da análise dos cromatogramas apresentados.

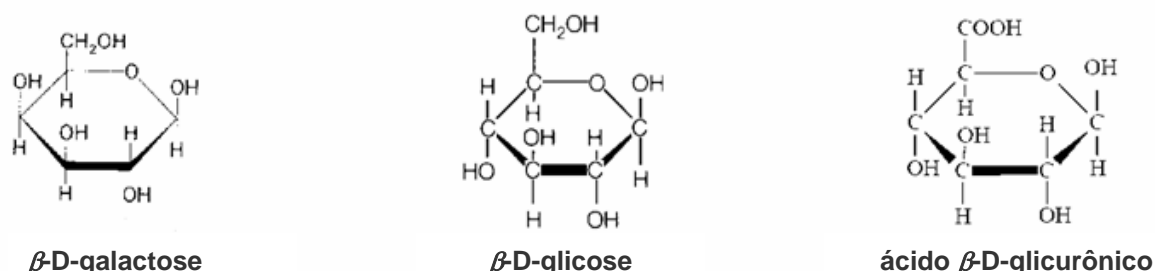


Figura 1.6: Estruturas de açúcares ligados à aglicona dos flavonóides.

1.7.5 Desenvolvimento de método para análise de flavonóides em folhas de videira

No desenvolvimento do método para análise quali e quantitativa dos flavonóides presentes, foram realizadas inicialmente diversas alterações no gradiente e na composição da fase móvel do método inicialmente proposto nas tabelas 1.4 e 1.5 e comparação com outros métodos relatados para a análise de flavonóides em folhas de videira, com o intuito de separar os flavonóides, sobretudo no intuito de separar o composto majoritário dos restantes. Em suma, foram efetuadas diversas tentativas, alterando-se proporções de gradiente, constituição de fase móvel, acidificante das fases móveis, colunas, curvas de alteração de proporção de solvente, além do intuito de se diminuir o tempo de análise. A figura 1.7 apresenta exemplo de um cromatograma em que se obteve uma boa separação. Cabe ressaltar que após cada modificação o perfil cromatográfico foi monitorado através da análise de cada pico quanto aos seus espectros, resolução e tempo necessário para análise.

De uma forma geral foi observado que é necessário um longo período de fase predominantemente aquosa, pois ao se alterar a proporção para maior percentual de

eluente B (acetonitrila) no intuito de diminuir o tempo de análise, observou-se a sobreposição de picos, situação evidenciada através da análise espectral.

Cabe ressaltar que somente em uma referência na literatura relacionada ao tema encontrou-se cromatogramas relativos ao perfil cromatográfico por CLAE de flavonóides em folhas de uva (MONAGAS *et al.*, 2006a). Não foram encontrados na literatura registros de cromatogramas de amostras que contenham isoquercetrina, hiperosídeo e quercetina-3-O-glicuronídeo, os quais possibilitem separá-los com resolução considerada adequada.

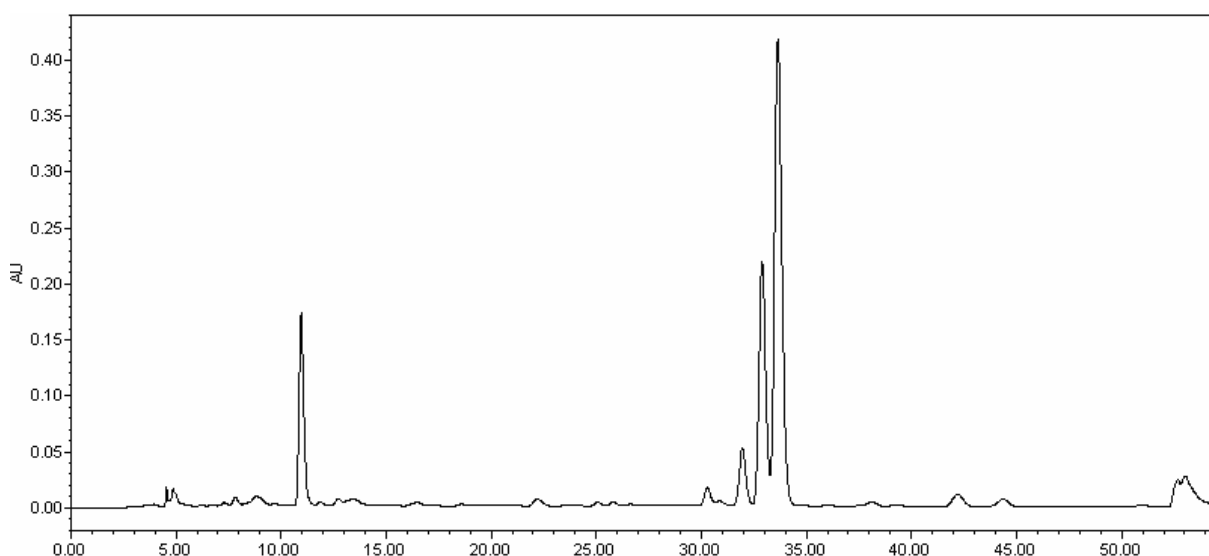


Figura 1.7: Perfil cromatográfico de ácidos fenólicos e flavonóides presentes em extrato aquoso da folha da variedade Cabernet sauvignon durante desenvolvimento do método para determinação de flavonóides. Condições cromatográficas : Coluna Phenomenex Luna C₁₈ (2)[®], 150 x 4,6 mm, 5 µm. Sistema de eluição em gradiente 88 % de A a 100 % do B em 55 min. Constituição das fases móveis: A : água 100: ácido fosfórico pH 2,0 (equivalente a 0,16 % de ac fosfórico puro) e B: ACN 100:ácido fosfórico 0,16 %; fluxo; 0,5 mL/min; λ=356 nm.

A separação efetiva do composto majoritário (figura 1.8) dos outros flavonóides foi alcançada mediante utilização da coluna X-Terra[®] (Waters), empregando-se fase móvel e gradiente semelhante à utilizada para análise dos antocianos, cujas condições cromatográficas encontram-se na tabela 1.10 e o gradiente na tabela 1.11, as quais foram submetidas à validação.

Contudo, para fins futuros de controle de qualidade, diversas condições cromatográficas desenvolvidas seriam adequadas.

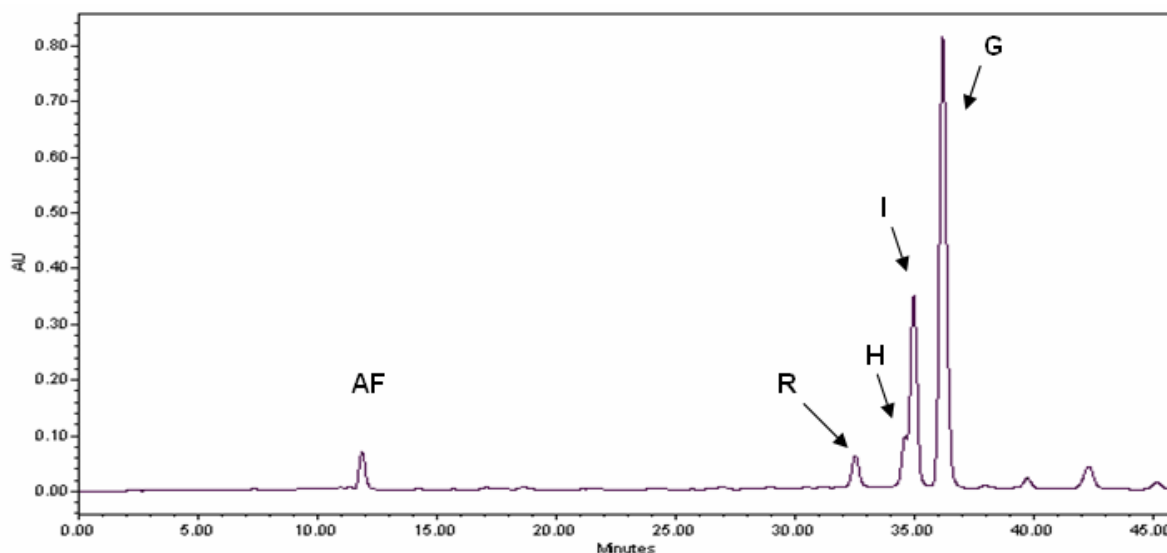


Figura 1.8: Perfil cromatográfico de ácidos fenólicos e flavonóides presentes em extrato aquoso da folha da variedade Cabernet sauvignon durante desenvolvimento do método para determinação de flavonóides com utilização da coluna X-Terra[®]. Condições cromatográficas: de acordo com tabelas 1.10 e 1.11: $\lambda=356$ nm. Os picos assinalados tratam-se provavelmente de: **AF**: ácido fenólico; **R**:rutina; **H**: hiperosídeo; **I**: isoquercitrina; **G**- quercetina-3-O-glicurônio.

As evidências de que o pico majoritário pode tratar-se do flavonóide na forma de glicurônio, reside em duas hipóteses: primeira, o fato de se alcançar a separação do composto na coluna X-Terra[®], cuja característica difere totalmente das colunas usuais, por ser uma coluna híbrida, contendo polietoxisilano (WYNDHAM *et al.*, 2003) e provavelmente por interagir de forma diferenciada com o grupo carboxílico do ácido glicurônico. A segunda baseia-se no fato de que ao empregar fase móvel contendo ácido fosfórico, o espectro UV do pico majoritário apresentou perfil diferenciado em relação ao hiperosídeo e à isoquercitrina. Este comportamento também foi evidenciado com os compostos isolados citados na literatura, em que em todas as soluções utilizadas para avaliar os deslocamentos batocrômicos e hipsocrômicos dos flavonóides, apenas o hiperosídeo e a isoquercitrina, em todos os casos, apresentaram exatamente os mesmos máximos de absorvância nos espectros de ultravioleta (DIAZ LANZA *et al.*, 1989; PROLIAC *et al.*, 1990).

A identificação preliminar dos compostos flavonóidicos foi efetuada através da comparação entre os tempos de retenção e os espectros obtidos no sistema cromatográfico inicial (tabelas 1.4 e 1.5), conforme tabela 1.17 apresentada a seguir. No sistema desenvolvido para a coluna X-Terra[®] os UVs permaneceram os mesmos,

modificando-se apenas os tempos de retenção. Para confirmação da identidade dos compostos foram efetuadas co-injeções com as substâncias de referência, apresentadas nos anexos.

Tabela 1.17: Tempos de retenção e absorvâncias obtidas com CLAE/DAD das substâncias de referência como ácidos fenólicos e flavonóides disponíveis. Condições cromatográficas segundo tabelas 1.4 e 1.5.

Substância de referência	Absorvâncias (nm)			Tempo de retenção (min)
Ácido caféico	218,8	-	323,1	36,90
Ácido clorogênico	218,8	242,4	327,8	24,41
Ácido elágico	-	256,6	369,4	30,90
Rutina	204,7	256,6	356,5	29,62
Hiperosídeo	204,7	256,6	356,5	28,95
Isoquercitrina	204,7	256,6	356,5	29,64
Quercetina	204,7	256,6	369,9	47,22
Quercetrina	204,7	256,6	351,7	34,20
Vitexina	214,1	270,8	337,4	28,71
Luteolina	209,4	251,8	346,9	46,91
Canferol	204,7	266,0	364,6	50,07

Considerando os resultados obtidos através de co-injeções, avaliação dos espectros em UV, correlação com dados os compostos majoritários apontados na literatura e comparação com amostras de referência, pode-se inferir que os compostos flavonoídicos majoritários correspondem ao hiperosídeo, isoquercitrina e provavelmente, à quercetina-3-O-glicuronídeo.

Quanto ao ácido fenólico observado em aproximadamente doze minutos, o mesmo possui espectro no UV (218,8; 242,4 e 332,6) diferente das substâncias de referência disponíveis inseridas na tabela acima. Baseando-se no estudo de MONAGAS e colaboradores (2006a), pode-se sugerir que se trata, provavelmente, do ácido *trans*-caftárico (cafeoiltartárico).

Durante o desenvolvimento dos métodos se averiguou a adequação dos métodos aos extratos aquosos das duas variedades. Assim, para a análise dos antocianos, o método inicialmente utilizado sofreu pequenas alterações no gradiente, sendo estabelecido conforme as tabelas 1.6 e 1.7.

Através da análise dos cromatogramas apresentados na figura 1.9, verificou-se que as duas variedades não diferiram entre si de forma qualitativa em relação aos compostos majoritários, entretanto, a partir de 26 minutos a variedade Couderc apresentou maior diversidade estrutural, provavelmente tratando-se de antocianos com outros açúcares e/ou presença de compostos acilados.

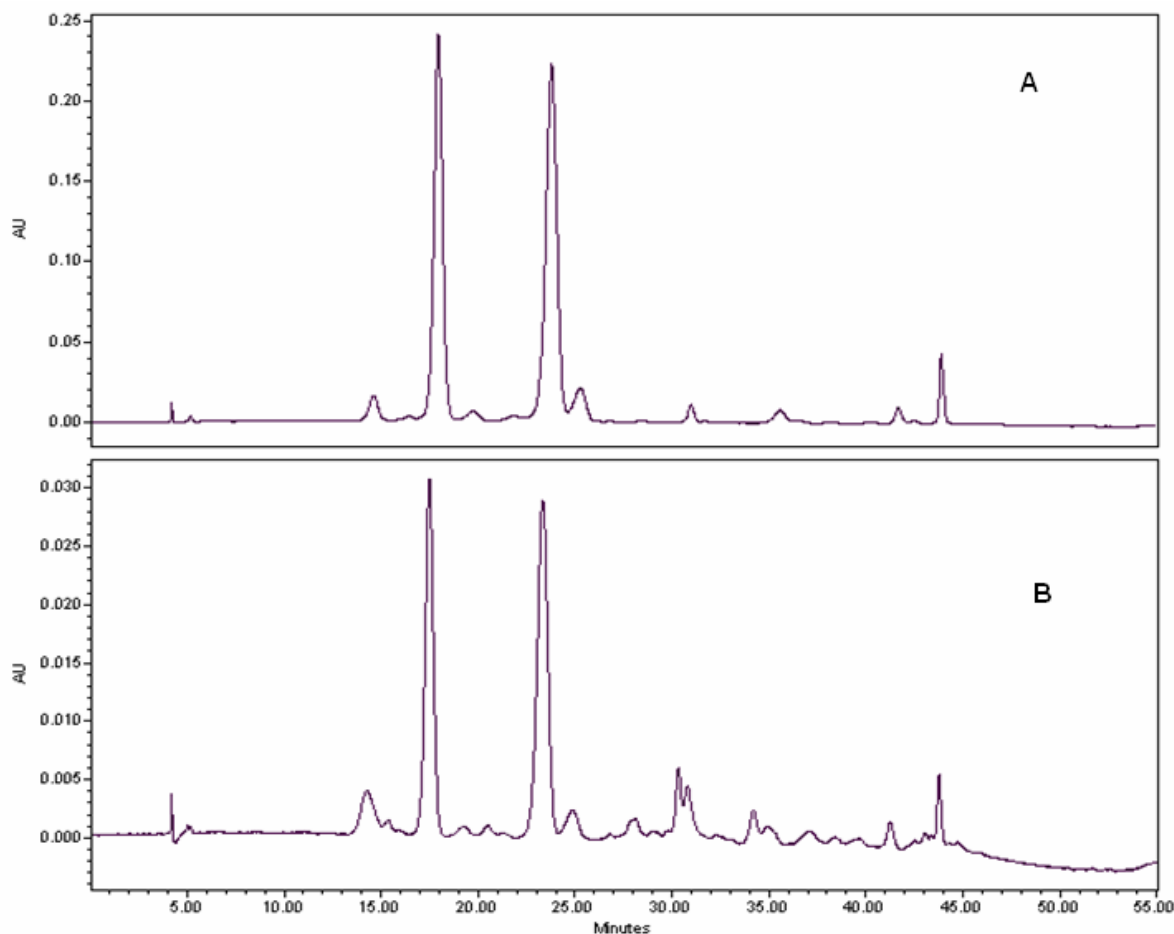


Figura 1.9: Cromatogramas referentes aos antocianos obtidos de soluções extrativas aquosas das variedades Cabernet sauvignon (**A**) e Couderc (**B**). Detecção em 520 nm.

Por outro lado, ao se analisar o perfil cromatográfico dos flavonóides, não se observou diferença qualitativa em relação aos picos dos compostos presentes, como observado na figura 1.10.

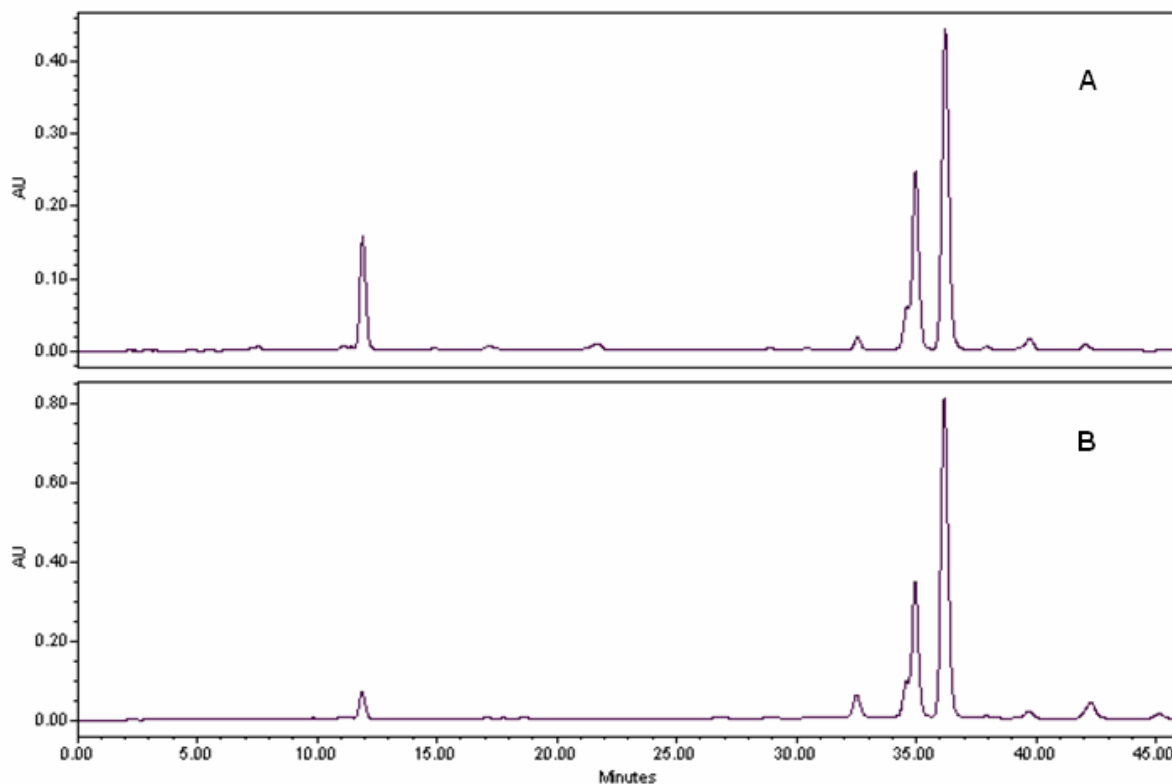


Figura 1.10: Cromatogramas referentes aos perfis dos flavonóides obtidos a partir de soluções extrativas aquosas das variedades Cabernet sauvignon **(A)** e Couderc **(B)**. Condições cromatográficas: conforme tabelas 1.10 e 1.11. Detecção em 356 nm.

Tendo em vista que as duas variedades apresentaram os mesmos picos majoritários tanto na análise dos antocianos, quanto dos flavonóides, optou-se por conduzir a validação com a variedade Cabernet sauvignon.

Nesta fase de desenvolvimento, também se avaliou a concentração a partir da qual seriam realizadas as diluições para a preparação da curva de linearidade da amostra, através da comparação entre quantidade de droga *versus* volume de solvente utilizado.

O gráfico a seguir (Figura 1.11) mostra a concentração de droga e a área obtida dos picos majoritários 2 e 4 no perfil cromatográfico de antocianos.

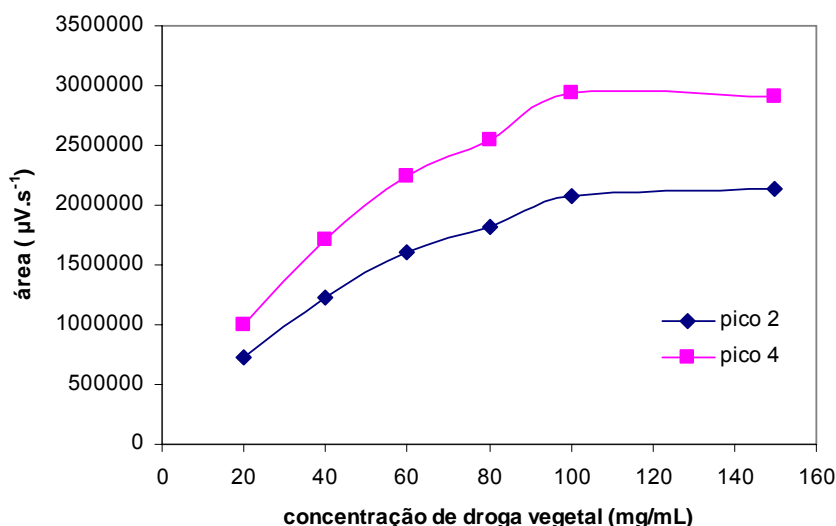


Figura 1.11: Relação droga:solvente para a variedade Cabernet sauvignon considerando os dois picos majoritários dos antocianos. Avaliação das áreas médias (n=3) em triplicata. Condições cromatográficas de acordo com as tabelas 1.6 e 1.7, $\lambda=520$ nm.

Tabela 1.18: Coeficiente de correlação para diferentes faixas avaliadas de relação droga *versus* volume de solvente.

Pico	Faixa de concentração (relação droga/solvente) em mg/mL		
	20-60	20-80	20-100
2	0,9966	0,9856	0,9870
4	0,9966	0,9836	0,9846

Observou-se uma relação linear entre massa de droga e solvente até 60 mg/mL (Tabela 1.18). A partir desta concentração a relação de linearidade diminui gradativamente até atingir um platô a partir de 100 mg/mL, indicando uma saturação do solvente aquoso em relação à quantidade de droga adicionada nas condições de extração estabelecidas. A avaliação de extrações sucessivas com água com o intuito de esgotar a droga também foi realizada, porém as soluções subseqüentes obtidas apresentaram-se mais viscosas, de caráter xaroposo e coloração amarelada, dificultando a posterior filtração, provavelmente devido à extração de pectina e outros polissacarídeos.

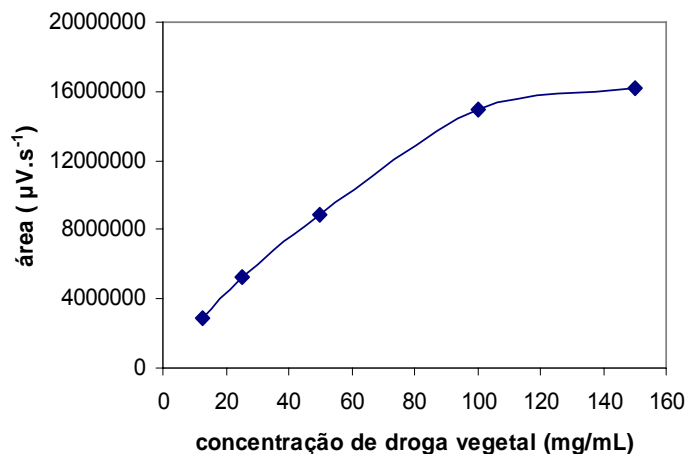


Figura 1.12: Relação droga:solvente para a variedade Cabernet sauvignon, considerando o pico majoritário dos flavonóides. Avaliação das áreas médias (n=3) em triplicata. Condições cromatográficas de acordo com as tabelas 1.10 e 1.11, $\lambda=356$ nm.

Já para o pico majoritário dos flavonóides, a relação linear ($r=0,9966$) se mantém até 100 mg/mL, após esta concentração, se atinge um platô até 150 mg/mL, como observado na figura 1.12, assim como na relação droga/solvente para os antocianos.

1.7.6 VALIDAÇÃO

Os parâmetros utilizados para as validações dos métodos desenvolvidos para a análise por cromatografia líquida de alta eficiência de antocianos e flavonóides foram fundamentados nas normas estabelecidas pela Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2005), THE UNITED (2005) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução de nº 899 (BRASIL, 2003) abrangendo especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

1.7.6.1 Validação de Método para Análise de Antocianos

Especificidade

Uma vez que as amostras são consideradas matrizes complexas por possuírem inúmeros constituintes, a especificidade do método foi determinada pela análise da pureza do pico 2 verificado nos cromatogramas obtidos utilizando CLAE/DAD (cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos). O cromatograma está apresentado na Figura 1.13, sendo observados também os espectros do pico na região do visível (520 nm) e ausência de interferentes no pico 2 em três regiões diferentes no seu máximo de absorvância.

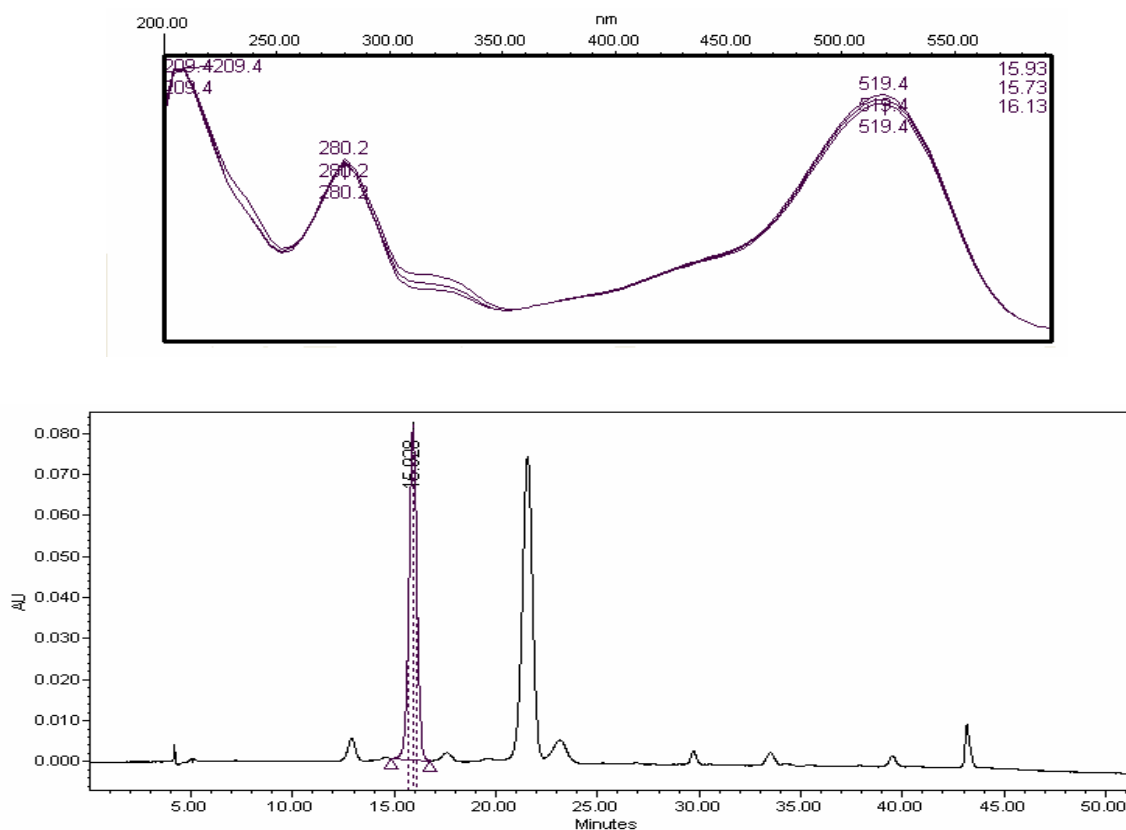


Figura 1.13: Cromatograma relativo à pureza do pico 2 da amostra de Cabernet sauvignon.

Linearidade

Segundo a RE 899 (BRASIL, 2003), a linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos com seu emprego são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. É recomendado que seja determinada pela análise de, no

mínimo, cinco concentrações diferentes (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Para tanto, foram construídas e analisadas três curvas diárias repetidas por três dias. O tempo de retenção médio para o cloridrato de cianidina foi de 38 minutos (Figura 1.14). A área média destas curvas foi plotada em função das concentrações (Figura 1.15), obtendo-se uma curva-padrão média, a partir da qual foi determinada a equação da reta e o coeficiente de correlação.

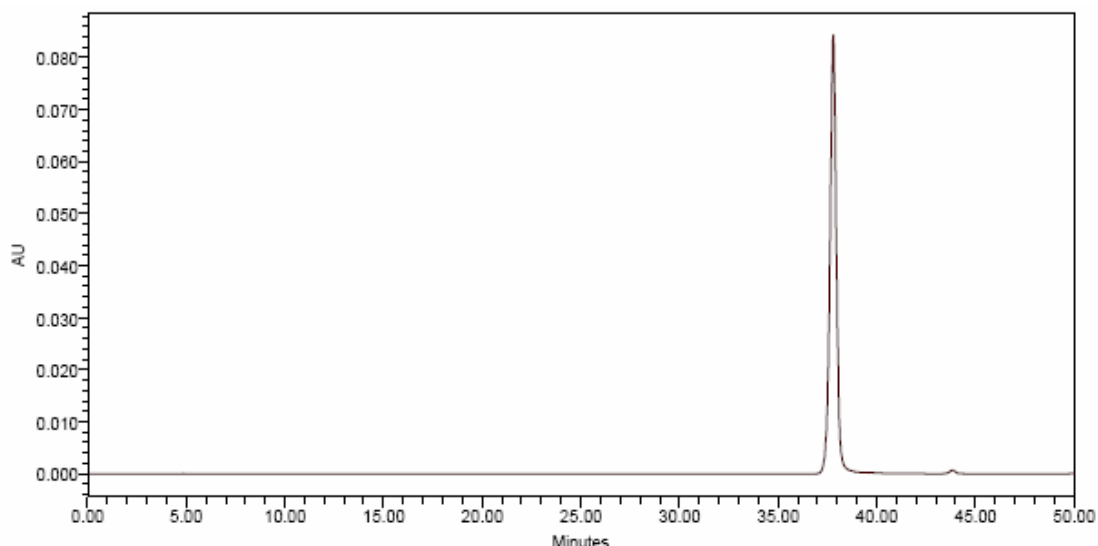


Figura 1.14: Perfil cromatográfico do padrão cloridrato de cianidina obtido por CLAE, tempo de retenção = 38 min. Sistema de eluição em gradiente, fase A constituída por água:TFA 0,08 % e B por ACN:TFA 0,08 %, fluxo 0,7 mL/min, detecção em 520 nm.

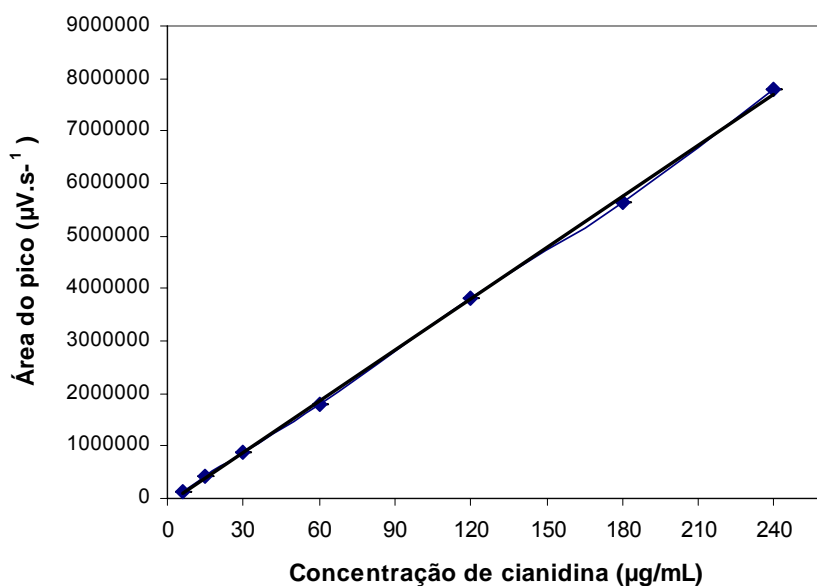


Figura 1.15: Curva-padrão do cloridrato de cianidina obtida por CLAE. Resultados expressos como média \pm EPM (erro padrão da média). Coeficiente de correlação (r) = 0,9997; $y = 3,03 \cdot 10^7 x - 103014$ (y = Área do pico e x = concentração de cloridrato de cianidina em mg/mL).

A realização de curva de linearidade da amostra, apresentada na figura 1.16, fez-se necessária devido ao fato de que os antocianos presentes na amostra se apresentam em forma diferenciada do padrão (padrão na forma cloridrato e amostra na forma glicosilada). Assim, fez-se necessário averiguar quais as concentrações e respectivas áreas de extrato se enquadravam na curva de linearidade do padrão. Também pelo fato de trabalhar-se com duas variedades que diferiam na quantidade de antocianos e visando a futura utilização deste método para avaliar o teor em épocas de coleta, espécies, variedades ou cultivares diferentes, que poderão apresentar diferenças, sobretudo, de forma quantitativa.

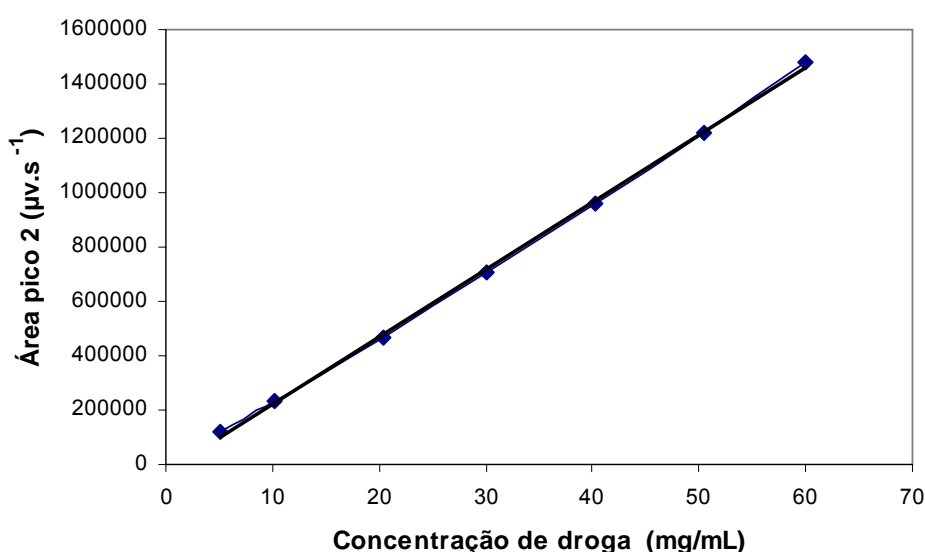


Figura 1.16: Curva de linearidade para amostra. Resultados expressos como média \pm EPM. Coeficiente de correlação (r) = 0,9997; $y = 24729x - 23467$ (y = Área do pico 2 e x = concentração de droga da variedade Cabernet sauvignon em mg/mL). Concentração de droga: refere-se à concentração teórica de droga contida na solução extrativa.

A avaliação estatística dos valores obtidos na curva padrão e amostra foram realizadas por análise de variância (ANOVA). Os resultados obtidos (tabelas 1.19 e 1.20) permitiram afirmar que a linearidade é estatisticamente válida, uma vez que ambas as curvas apresentaram regressão linear significativa ($p < 0,05$), com ausência de desvios da linearidade ($p > 0,05$). Em suma, o método apresentou linearidade de resposta para o padrão cloridrato de cianidina na faixa de 240 a 6 $\mu\text{g/mL}$ e para a amostra na faixa de 60 a 5,1 mg/mL de droga/mL.

Tabela 1.19: Análise da variância (ANOVA) para os dados de linearidade da curva padrão do cloridrato de cianidina.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F calc.	F crít.
Entre	6	$1,56 \times 10^{14}$	$2,59 \times 10^{13}$	5,73*	2,85
a) regressão	1	$1,43 \times 10^{14}$	$1,43 \times 10^{14}$	31,64*	4,60
b) desvio da linearidade	5	$1,26 \times 10^{13}$	$2,52 \times 10^{12}$	0,56	2,96
Dentro	14	$6,34 \times 10^9$	$4,52 \times 10^{12}$		
Total	20	$1,56 \times 10^{14}$			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F calc.: F calculado; F crít.: F crítico; * significativo para $p < 0,05$.

Tabela 1.20: Análise da variância (ANOVA) para os dados de linearidade da curva amostra.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F calc.	F crít.
Entre	6	$3,39 \times 10^{12}$	$6,79 \times 10^{11}$	16560,98*	2,85
a) regressão	1	$3,39 \times 10^{12}$	$3,39 \times 10^{12}$	82682,93*	4,60
b) desvio da linearidade	5	$3,47 \times 10^8$	$8,67 \times 10^7$	2,11	2,96
Dentro	14	$4,93 \times 10^8$	$4,10 \times 10^7$		
Total	20	$3,39 \times 10^{12}$			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F calc.: F calculado; F crít.: F crítico; * significativo para $p < 0,05$.

Precisão

A precisão é o grau de concordância entre os resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas alíquotas de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). É considerada em três níveis (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade), sendo que a reprodutibilidade não é um critério exigido quando não se tratam de ensaios para avaliar de forma interlaboratorial (quando a precisão intermediária é estabelecida (BRASIL, 2003)). A repetibilidade é a precisão intracorrída ou intradia, ou seja, é a concordância entre os resultados em um curto espaço de tempo, com o mesmo analista e a mesma instrumentação. Deve ser verificada por no mínimo, seis determinações na mesma concentração, ou no mínimo nove concentrações contemplando o intervalo linear do método (concentrações baixa, média e alta). A precisão intermediária é a

concordância dos resultados obtidos em dias diferentes, ou seja, precisão intercorridas ou interdias.

O método proposto apresentou resultados satisfatórios, como podem ser observados nas Tabelas 1.21 e 1.22, respectivamente, tanto para a repetibilidade quanto para a precisão intermediária, visto que os valores de DPR são inferiores a 5 %, limite máximo estabelecido pela legislação (BRASIL, 2003).

Tabela 1.21: Resultados obtidos no ensaio de repetibilidade (precisão intra-dia) para o extrato aquoso da variedade Cabernet sauvignon por CLAE.

Nível	Concentração (mg/mL)	Área média do pico 2 ($\mu\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$) \pm DP (DPR%)		
		Dia 1	Dia 2	Dia 3
Alto	60	1477058,67 \pm 9370 (0,63)	1485903,67 \pm 3713 (0,25)	1505703,33 \pm 1243 (0,08)
Médio	30	705291,33 \pm 3548 (0,50)	709205,33 \pm 5290 (0,74)	723538,67 \pm 5136 (0,71)
Baixo	5,1	1653,83 \pm 1654 (1,40)	122163,67 \pm 1044 (0,85)	112163,67 \pm 1044 (0,93)

DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo (destacado em negrito); n=3 para cada nível de concentração em cada dia.

Tabela 1.22: Resultados obtidos no ensaio de precisão intermediária (precisão inter-dias) para o extrato aquoso da variedade Cabernet sauvignon por CLAE .

Nível	Concentração (mg/mL)	Área média do pico 2 ($\mu\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$)	DP	DPR
Alto	60	1489555,22	13679,66	0,91
Médio	30	712678,44	9271,26	1,30
Baixo	5,1	117471,22	4493,55	3,83

DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo; n=3 para cada nível de concentração em cada dia.

Exatidão

A exatidão expressa a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo com o valor verdadeiro. Assim, a exatidão do método foi medida em termos de concentrações conhecidas da solução padrão adicionadas à amostra. A tabela 1.23 apresenta as taxas de recuperação obtidas.

Tabela 1.23: Resultados obtidos no ensaio de exatidão para o extrato aquoso de Cabernet sauvignon por CLAE.

Nível	Concentração média* adicionada (µg/mL)	Concentração média* recuperada (µg/mL)	Taxa de recuperação (%)	Taxa de recuperação média (%) ± DP	DPR (%)
Alto	60	57,55	95,91		
Médio	30	28,92	96,40	97,23 ± 1,87	1,93
Baixo	15	14,91	99,38		

* média de injeções em triplicata; P: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo.

Tendo em vista os resultados obtidos, considera-se que o método proposto apresenta exatidão adequada, uma vez que as taxas de recuperação situaram-se dentro dos limites de 95-105 % preconizados pelo ICH (2005).

Cabe destacar que foi observada a necessidade de se adicionar o padrão à amostra com injeção imediata, pois ao prepararmos as diluições e adições e deixarmos em repouso por determinado período no carrossel do sistema de injeção, foi observada uma taxa de recuperação inferior à preconizada, verificando-se também aumento das áreas dos picos 2 e 4, indicando que uma possível complexação entre o cloridrato de cianidina e os antocianos majoritários presentes na amostra. Assim, além de injetarmos imediatamente após a preparação, as áreas dos picos 2 e 4 também foram monitoradas, não apresentando diferença significativa em relação às áreas das soluções de amostra isentas de padrão. A preparação de um branco para o padrão justificou-se pela necessidade de se avaliar a influência da adição da água ultrapura (Milli-Q® - Millipore) em pH 5,5 na área do mesmo, já que os antocianos podem sofrer alterações em virtude do pH do meio, o que não foi observado nestas condições de experimento.

Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção é definido como a menor concentração absoluta do analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições de análise determinadas. A menor concentração de cloridrato de cianidina detectável pelo método desenvolvido neste trabalho foi de 0,20 µg/mL.

O limite de quantificação corresponde à concentração mais baixa do analito na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sendo

que a concentração mínima de cloridrato de cianidina quantificável pelo método presente foi de 0,68 µg/mL.

Robustez

A robustez de um método analítico demonstra a capacidade deste em resistir a pequenas variações em seus parâmetros. Neste sentido empregaram-se pequenas alterações no fluxo e na composição da fase móvel para avaliar a robustez do método em estudo, bem como a utilização de colunas diferentes.

Observando-se os resultados apresentados na tabela 1.24, verificou-se que há uma pequena alteração nos tempos de retenção quando comparados às condições originais, principalmente ao se aumentar o fluxo para 0,8 mL. No entanto, o teor de antocianos na amostra analisada não sofreu alterações significativas quanto às alterações no fluxo e pequena alteração, porém não significativa, na percentagem de TFA. O teor médio obtido nas soluções foi de 0,0955 % (m/m), com um DPR de no máximo 0,57 %, demonstrando a pequena variação observada. Além disso, o perfil cromatográfico permaneceu idêntico mesmo frente às alterações impostas.

Tabela 1.24: Avaliação do parâmetro robustez para as soluções extrativas de Cabernet sauvignon, considerando alterações no fluxo e fase móvel.

Parâmetros	Tempo de retenção (min) ± DP	Teor médio (%; m/m) expresso em cloridrato de cianidina ± DP (DPR %)	DPR (%) entre os teores *
Fluxo 0,8 mL/min	Padrão: 36,33 ± 0,051 Amostra: 16,81 ± 0,024	0,096 ± 0,001 (1,04)	0,00
% de TFA adicionado às fases móveis A e B: 0,06 %	Padrão: 37,963 ± 0,008 Amostra: 18,25 ± 0,052	0,095 ± 0,002 (2,1)	0,57
Originais: Fluxo 0,7 mL/min e TFA 0,08 %	Padrão: 37,92 ± 0,032 Amostra: 18,20 ± 0,025	0,096 ± 0,001 (1,04)	-

TFA: ácido trifluoroacético; Termo "originais" refere-se às condições submetidas à validação; P: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo. * comparado com o valor obtido através da análise nas condições originais.

Tabela 1.25: Resultados obtidos para o teste de robustez, aplicado ao método desenvolvido por CLAE, para a análise quantitativa de antocianos em extrato de Cabernet sauvignon, considerando colunas diferentes.

Coluna	amostra (pico 2)		padrão	
	área ($\mu\text{v.s}^{-1}$)	TR (min)	área ($\mu\text{v.s}^{-1}$)	TR (min)
(a)	1471772	18,20	2099884	37,9
(b)	1465418	18,85	2133874	38,1
(c)	1478971	14,78	2403623	32,5

*média de três determinações, TR: tempo de retenção.

Ao comparar-se diversas colunas, conforme Tabela 1.25, ao utilizar a coluna **(b)** que possui as mesmas especificações que a coluna **(a)** empregada para validação, a área dos picos da amostra e do padrão permaneceram semelhantes, sem diferença estatística significativa, enquanto que com a utilização da coluna **(c)**, com especificação diferente no comprimento, verificou-se diminuição em ambos os tempos de retenção, porém com aumento de área e alargamento do pico do padrão, o que acarretaria diferença no cálculo do teor, sugerindo a necessidade de se adequar o fluxo, uma vez que o perfil cromatográfico permaneceu semelhante.

Tendo em vista os resultados observados considerou-se que o método desenvolvido atendeu ao critério de robustez sob condições específicas.

A grande vantagem do teste de robustez foi que o mesmo permitiu avaliar a possibilidade de utilização de coluna com custo inferior à utilizada para a validação.

1.7.6.2 Validação de Método para Análise dos Flavonóides

Tendo em vista que já há uma validação neste trabalho, a fim de evitarmos incorrer em repetições, algumas discussões relacionadas a definições não serão abordadas.

Linearidade

Para avaliação da linearidade do método, foram construídas e analisadas três curvas diárias repetidas por três dias. O tempo de retenção médio para o padrão rotina foi de 32 minutos (Figura 1.17). A área média destas curvas foi plotada em

função das concentrações (Figura 1.18), obtendo-se uma curva padrão média, a partir da qual foi determinada a equação da reta e o coeficiente de correlação .

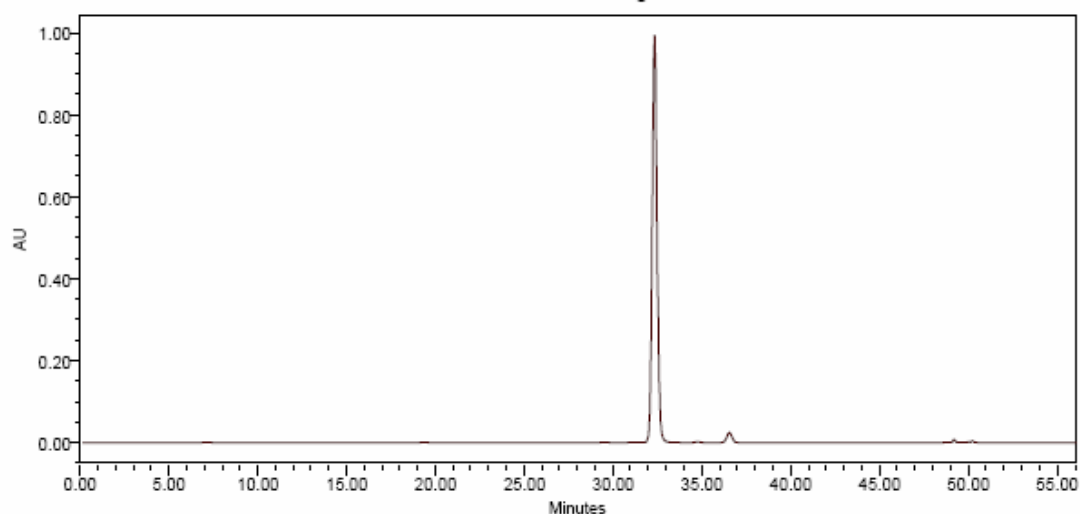


Figura 1.17: Perfil cromatográfico do padrão rutina obtido por CLAE, tempo de retenção = 32,13 min. Sistema de eluição em gradiente, fase A constituída por água:TFA 0,08 % e B por ACN:TFA 0,08 %, fluxo 0,8 mL/min, detecção em $\lambda=356$ nm.

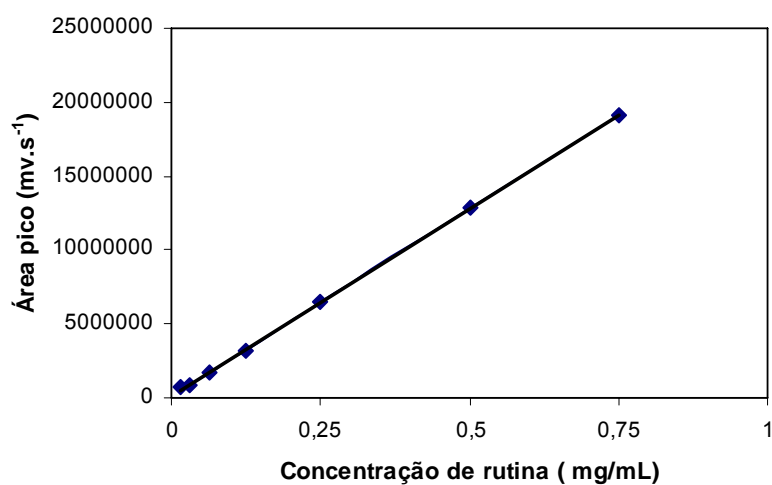


Figura 1.18: Curva-padrão de rutina por CLAE. Resultados expressos como média \pm EPM. Coeficiente de correlação (r) = 0,9997; $y = 25357121 x + 134920$ (y = Área do pico e x = concentração de rutina em mg/mL).

A realização de curva de linearidade para a amostra (Figura 1.19) fez-se necessária devido ao fato de que o padrão utilizado e o composto majoritário estão em forma diferenciada. Assim, as justificativas são as mesmas relacionadas no item relacionado à curva de linearidade para a amostra de antocianos (item 1.7.6.1).

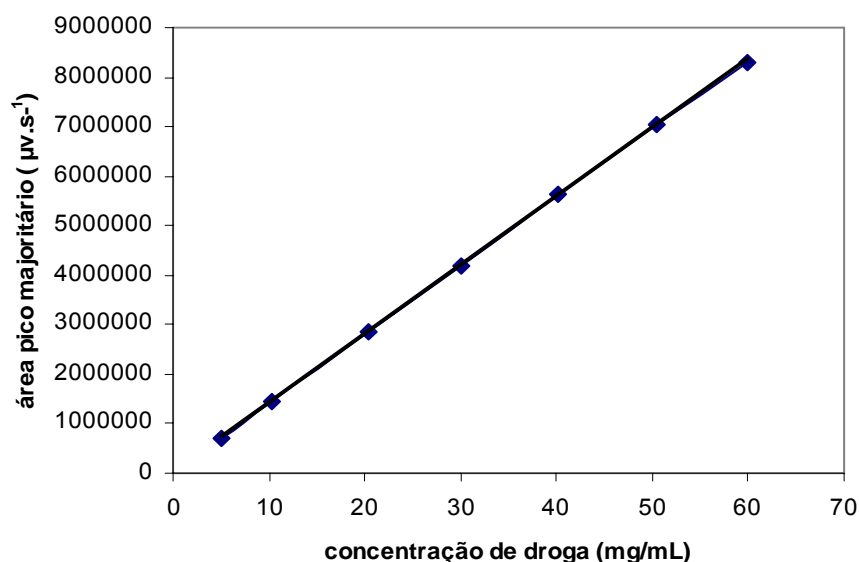


Figura 1.19: Curva de linearidade para amostra. Resultados expressos como média \pm EPM. Coeficiente de correlação (r) = 0,9999; $y = 138722x + 34399$ (y = Área do pico majoritário e x = concentração de droga da variedade Cabernet sauvignon em mg/mL). Concentração de droga: refere-se à concentração teórica de droga contida na solução extrativa

A avaliação estatística dos valores obtidos na curva padrão e de linearidade da amostra foi realizada por análise de variância (ANOVA). Os resultados obtidos (tabelas 1.26 e 1.27) permitiram afirmar que a linearidade é estatisticamente válida, uma vez que ambas as curvas apresentaram regressão linear significativa ($p < 0,05$), com ausência de desvios da linearidade ($p > 0,05$). Em suma, o método apresentou linearidade de resposta para o padrão na faixa de a 0,750 a 0,16 mg/mL e para a amostra na faixa de 60 a 5,1 mg de droga/mL.

Tabela 1.26: Análise da variância (ANOVA) para os dados de linearidade da curva padrão de rotina.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F calc.	F crít.
Entre	6	$8,99 \times 10^{14}$	$1,49 \times 10^{14}$	10,88*	2,85
a) regressão	1	$7,56 \times 10^{14}$	$7,56 \times 10^{14}$	55,18*	4,60
b) desvio da linearidade	5	$1,42 \times 10^{13}$	$2,85 \times 10^{13}$	2,08	2,96
Dentro	14	$1,92 \times 10^{11}$	$1,37 \times 10^{13}$		
Total	20	$8,99 \times 10^{14}$			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F calc.: F calculado; F crít.: F crítico; * significativo para $p < 0,05$.

Tabela 1.27: Análise da variância (ANOVA) para os dados de linearidade da curva amostra.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F calc.	F crít.
Entre	6	$1,45 \times 10^{14}$	$2,42 \times 10^{13}$	520,43*	2,85
a) regressão	1	$1,45 \times 10^{14}$	$1,45 \times 10^{14}$	3118,28*	4,60
b) desvio da linearidade	5	$6,17 \times 10^{11}$	$1,23 \times 10^{11}$	2,65	2,96
Dentro	14	$6,53 \times 10^9$	$4,65 \times 10^{10}$		
Total	20	$1,45 \times 10^{14}$			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F calc.: F calculado; F crít.: F crítico; * significativo para $p < 0,05$.

Precisão

O método proposto apresentou resultados satisfatórios, como podem ser observados nas tabelas 1.28 e 1.29, respectivamente, tanto para a repetibilidade quanto para a precisão intermediária, visto que os valores de DPR são inferiores a 5 %, limite máximo estabelecido pela legislação (BRASIL, 2003).

Tabela 1.28: Resultados obtidos no ensaio de repetibilidade (precisão intra-dia) para o extrato aquoso da variedade Cabernet sauvignon por CLAE.

Nível	Concentração (mg/mL)	Área média do pico majoritário ($\mu\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$) \pm DP (DPR%)		
		Dia 1	Dia 2	Dia 3
Alto	60	8307647,67 \pm 19690,39 (0,24)	8628069,33 \pm 18353,81 (0,21)	8264676 \pm 9983,02 (0,12)
Médio	30	4197293,33 \pm 34509,70 (0,82)	4250888 \pm 9657,15 (0,23)	4084836,67 \pm 5694,77 (0,63)
Baixo	5,1	701529 \pm 7105,09 (1,01)	673102,33 \pm 11341,90 (1,69)	674353 \pm 1515,89 (0,22)

DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo (destacado em negrito); n=3 para cada nível de concentração em cada dia.

Tabela 1.29: Resultados obtidos no ensaio de precisão intermediária (precisão inter-dias) para o extrato aquoso da variedade Cabernet sauvignon por CLAE.

Nível	Concentração (mg/mL)	Área média do pico majoritário ($\mu\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$)	DP	DPR (%)
Alto	60	8400131	172561,51	2,05
Médio	30	4177672,67	76632,84	1,83
Baixo	5,1	682994,78	15455,63	2,26

DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo; n=3 para cada nível de concentração em cada dia.

Exatidão

O método por CLAE mostrou ser exato quanto ao teor de substância de referência recuperado exibindo um valor médio de 95,76 % para a análise realizada com a variedade Cabernet sauvignon (Tabela 1.30).

Tabela 1.30: Resultados obtidos no ensaio de exatidão para o extrato aquoso de Cabernet sauvignon por CLAE para análise dos flavonóides.

Nível	Concentração média* adicionada ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Concentração média* recuperada ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Taxa de recuperação (%)	Taxa de recuperação média (%) \pm DP	DPR (%)
Alto	250	229,17	91,67		
Médio	125	118,90	95,12	95,76 \pm 1,87	1,93
Baixo	62,50	62,81	100,50		

* média de injeções em triplicata; P: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo.

Limite de detecção e quantificação

O limites de detecção e de quantificação para a rotina foram de 1,48 µg/mL e de 4,47 µg/mL, respectivamente.

Robustez

Os resultados do teste de robustez constam na tabela 1.31.

Tabela 1.31: Avaliação do parâmetro de robustez por CLAE para análise de flavonóides.

Parâmetros	Tempo de retenção (min) ± DP	Teor médio (%; m/m) expresso em rotina ± DP (DPR %)	DPR (%) entre os teores
Fluxo 0,7 mL/min	Padrão: 32,36 ± 0,041 Amostra: 36,10 ± 0,2121	0,7006 ± 0,001 (0,3668)	2,1104
% de TFA adicionado às fases móveis A e B: 0,06 %	Padrão: 34,25 ± 0,012 Amostra: 37,43 ± 0,067	0,6835 ± 0,014 (2,073)	1,5196
Originalis: Fluxo 0,8 mL/min e TFA 0,08 %	Padrão: 30,47 ± 0,1433 Amostra: 33,88 ± 0,018	0,6743 ± 0,0015 (0,2221)	

TFA: ácido trifluoroacético; O termo "originalis" refere-se às condições submetidas à validação; P: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo; * comparado com o valor obtido através da análise nas condições originais.

As modificações estabelecidas neste teste de robustez não alteraram de forma significativa o perfil cromatográfico da amostra. Variações ocorreram somente no tempo de retenção do pico de interesse e do padrão, assim como diferenças na área em ambos os casos, as quais não acarretaram diferenças significativas entre os teores.

Visto que os parâmetros de eficiência analítica como linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez, foram avaliados e os resultados obtidos apresentaram-se em conformidade com o exigido pela legislação vigente (BRASIL, 2003), consideram-se os métodos desenvolvidos para análise de antocianos e flavonóides validados.

CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

2. REFERENCIAL TEÓRICO

O interesse acerca dos mecanismos de geração de radicais livres e espécies reativas, principalmente de oxigênio, aumentou significativamente a partir da década de 80, quando da demonstração de que os mesmos poderiam estar relacionados à fisiopatologia de várias doenças crônicas e às complicações de inúmeros processos inflamatórios, doenças neurodegenerativas e câncer, além de serem considerados um dos principais fatores no processo de envelhecimento (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).

Em quantidades moderadas, as espécies reativas desempenham importantes funções tais como mediadores na transdução de sinais moleculares, importantes na regulação celular (PODDA e GRUNDMANN-KOLLMANN, 2001). O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, inclusive podendo resultar em morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). Este tipo de lesão oxidativa é definida como estresse oxidativo, designada como uma condição na qual ocorre um desequilíbrio entre as concentrações de espécies pró e antioxidantes (MOSKAUG *et al*, 2004).

Como as espécies reativas de oxigênio (ERO) são continuamente formadas em pequenas quantidades pelos processos normais do metabolismo, todas as células possuem mecanismos para mitigar seus efeitos agressores. O sistema de defesa antioxidante está dividido em enzimático e não enzimático. O primeiro inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). Tanto a CAT quanto a GPx evitam o acúmulo de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio para que não haja produção de radical hidroxila, contra o qual não existe sistema enzimático de defesa (PODDA e GRUNDMANN-KOLLMANN, 2001).

Já o sistema não enzimático inclui compostos sintetizados pelo organismo humano como ubiquinona (coenzima Q), e outros, além dos ingeridos através da dieta regular ou via suplementação como ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol

(vitamina E), β -caroteno (precursor de vitamina A) (SHINDO *et al.*, 1994) e compostos fenólicos de plantas.

Neste contexto, a utilização de antioxidantes naturais na profilaxia e no tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo tem recebido considerável interesse nos últimos anos (F'GUYER *et al.*, 2003). Muitas pesquisas têm focado no potencial de compostos fenólicos e flavonóides, amplamente distribuídos como metabólitos secundários no reino vegetal, representando uma das mais importantes classes de substâncias naturais biologicamente ativas (BONINA *et al.*, 1996; CAO *et al.*, 1997; HARBORNE e WILLIAMS, 2000; HEIM *et al.*, 2002). Diversos efeitos biológicos são atribuídos às propriedades antioxidantes destes compostos, a citar: antilipoperoxidante, antitumoral, antiplaquetário, antiisquêmico, antialérgico, antiinflamatório, antiviral, dentre outros. Também há evidências de que flavonóides podem inibir uma ampla gama de enzimas incluindo lipoxigenase, cicloxigenase e monoxigenase (RICE-EVANS *et al.*, 1996; CAO *et al.*, 1997; DI CARLO *et al.*, 1999).

Para um polifenol ser considerado como um antioxidante deve atender a duas condições básicas: primeira, quando presente em baixas concentrações relativa ao substrato a ser oxidado, deve adiar, retardar ou prevenir a auto-oxidação ou a oxidação mediada por radicais livres (HALLIWELL, 1990) ou espécies reativas de oxigênio; segunda, o radical resultante formado após a captura deve ser estável e menos reativo (SHAHIDI e WANASUNDARA, 1992).

A propensão dos flavonóides em inibir eventos mediados por radicais livres e espécies reativas é governada pela sua estrutura química. Pelo fato dos compostos estarem baseados no núcleo flavan, o número, posições e tipos de substituições influenciam as atividades *scavenger* de radicais e quelante (HEIM *et al.*, 2002).

Entretanto, existe um relativo consenso em relação a algumas características estruturais consideradas fundamentais para atividade antioxidante dos flavonóides (vide figura associada à Tabela 1.1):

- presença do grupo catecol (*o*-dihidroxi) no anel B, devido ao favorável potencial de redução (ACKER *et al.*, 1996; HARBORNE e WILLIAMS, 2000; PIETA, 2000; PANNALA *et al.*, 2001);

- ligação dupla entre C2 e C3 do anel C em conjugação com uma função carbonila em C4 por conferir um radical mais estável através da conjugação e pela deslocalização eletrônica (PIETTA, 2000; PANNALA *et al.*, 2001; HEIM *et al.*, 2002);
- configuração e o número total de hidroxilas conferem à molécula considerável atividade antioxidante (ARORA *et al.*, 1998; FUKUMOTO e MAZZA, 2000; HEIM *et al.*, 2002) e quelante, mas também pró-oxidante (HEIM *et al.*, 2002). A presença de OH em C3 aumenta atividade *scavenger* de radical, podendo atuar como sítio de quelação e também ser oxidada (ACKER *et al.*, 1996; PIETA, 2000; PANNALA *et al.*, 2001), sendo que em combinação com ligação dupla entre C2 e C3 aumenta a atividade *scavenger* (ACKER *et al.*, 1996). Por outro lado, substituição por grupos metoxila em C3 diminui a atividade antioxidante (ARORA *et al.*, 1998);
- em geral, a glicosilação dos flavonóides reduz sua atividade quando comparada à sua aglicona correspondente (FUKUMOTO e MAZZA, 2000; PIETA, 2000) provavelmente devido ao efeito estérico. Em geral, quanto menor o número de unidades açúcar, maior atividade antioxidante (FUKUMOTO e MAZZA, 2000).

Devido ao seu baixo potencial redox ($0,23 < E7 < 0,75$), os flavonóides são termodinamicamente capazes de reduzir radicais livres altamente oxidantes com potenciais redox na faixa de 2,1-1,0 V como os radicais superóxido, peroxila e hidroxila por doação de átomo de hidrogênio ($FI-OH + R^{\bullet} \rightarrow FI-O^{\bullet} + RH$, onde R^{\bullet} representa ânion superóxido e radicais como peroxila e hidroxila, ao passo que $FI-O^{\bullet}$ representa o radical aroxila).

O radical aroxila pode reagir com um segundo radical, adquirindo uma estrutura de quinona estável (figura 2.1). Os radicais aroxila podem interagir com oxigênio, gerando quinonas e ânions superóxidos desta forma então terminando a reação em cadeia. A última reação pode ocorrer na presença de altas concentrações de íons metálicos e isto seria responsável pelo efeito pró-oxidante indesejável dos flavonóides (PIETTA, 2000).

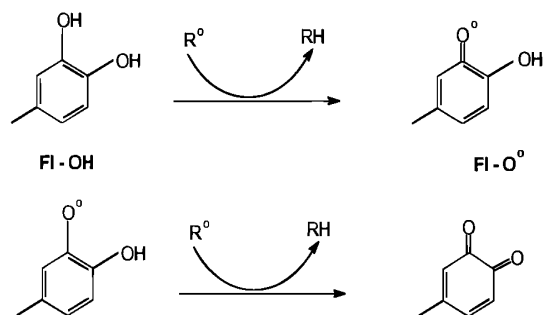


Figura 2.1: Scavenging de ERO (R°) pelos flavonóides (PIETTA, 2000).

Por outro lado, os antocianos também apresentam atividade antioxidante. São caracterizados quimicamente pelo grupo flavílio (núcleo fundamental), sendo que a $\text{pH} < 3,0$ se encontram na forma protonada (figura 2.2) (LAPIDOT *et al.*, 1999; KÄHKÖNEN; HEINONEN, 2003).

A relação estrutura-atividade é semelhante a dos flavonóides. Uma atividade antioxidante ótima se relaciona com a presença de grupamentos hidroxila nas posições 4' e 5' do anel B, conferindo elevada estabilidade ao radical formado (KUSKOSKI *et al.*, 2004). Dessa maneira, ocorre inibição da formação de radicais hidroxila por quelação de metais (como ferro) e por impedir a lipoperoxidação induzida por ferro (WANG *et al.*, 1999; NODA *et al.*, 2000).

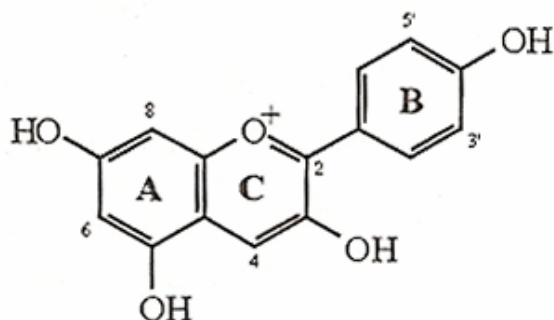


Figura 2.2: Estrutura básica dos antocianos.

Os mecanismos de ação antioxidante dos compostos polifenólicos ainda não foram completamente elucidados, sendo tema de consideráveis debates (ARORA *et al.*, 2000). Entretanto, numerosos estudos têm demonstrado que *in vitro* os polifenóis

agem como quelantes de metais (RICE-EVANS *et al.*, 1996; ACKER *et al.*, 1996), *scavengers* de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, incluindo radical superóxido, radicais peroxila e peroxinitrito. Também podem agir como *quenchers* de oxigênio singlete (HARBORNE e WILLIAMS, 2000). Segundo RICE-EVANS *et al.* (1996), a habilidade dos polifenóis em agir como antioxidantes *in vitro* deve-se à sua capacidade de doar átomos de hidrogênio. Os polifenóis também podem inibir a formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio através da inibição de enzimas pró-oxidantes *in vitro* (ACKER *et al.*, 1996) ou, ainda, reagir com radicais livres gerados no sítio ativo das enzimas (CAO *et al.*, 1997).

Por outro lado, diversos estudos sugerem que, além das propriedades estruturais, outros fatores contribuem para a eficácia de certos compostos fenólicos em atuarem como antioxidantes como o grau de incorporação, uniformidade de distribuição e orientação na bicamada da membrana (ARORA *et al.*, 2000).

Para o gênero *Vitis*, fonte abundante de compostos fenólicos e polifenólicos, a atividade antioxidante de extratos ou substâncias purificadas tem sido recentemente relatada. Desde as primeiras observações do “paradoxo francês”, numerosos estudos têm demonstrado os efeitos antioxidantes e sobre a promoção da saúde de compostos fenólicos presentes na uva e no vinho, particularmente em relação às doenças cardiovasculares. Estas descobertas levaram a um considerável interesse na avaliação de sub-produtos oriundos dos processos de vinificação e fabricação de sucos como potenciais fontes de compostos fenólicos para serem utilizados principalmente como ingredientes alimentícios funcionais. Além destes subprodutos, folhas de *Vitis vinifera* L. também são freqüentemente empregadas para produzir suplementos alimentares com atividade antioxidante (MONAGAS *et al.*, 2006b).

2.1 Atividade Antioxidante de Extratos de Folhas de Videira

A capacidade antioxidante *in vitro* de suplementos alimentares à base de folhas de *Vitis vinifera* L., comercialmente disponíveis na Espanha, foi avaliada pela primeira vez por MONAGAS e colaboradores (2006b), cujas variedades não foram designadas. Foram avaliados suplementos de três origens e vários lotes de cada um, através do método ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*- capacidade de

absorção do radical oxigênio) cujos valores obtidos variaram de 1,52 a 2,55 μmol de equivalentes de Trolox/mg, sendo que o maior valor foi exibido pelo suplemento cujo solvente utilizado para extração foi aquoso.

Diversas investigações acerca da atividade antioxidante estão relacionadas aos possíveis efeitos terapêuticos, como exemplificado no estudo no qual foi avaliada a atividade antidiabética. Neste ensaio, a atividade antioxidante *in vivo* foi investigada, no qual ratos machos Wistar receberam por via oral tratamento agudo e sub-agudo de extrato aquoso de folhas de *Vitis vinifera* (250 e 500 mg/kg), bem como frações acetato de etila (25 mg/kg), n-butanol (80 mg/kg) e fração remanescente aquosa (375 mg/kg). A atividade antioxidante foi avaliada em ratos diabéticos através da medida do malondialdeído (MDA) e dos níveis de glutathiona (GSH) em fígado, rins e tecido cardíaco. Os resultados demonstraram que a fração acetato de etila, a qual era a mais rica em polifénóis, exibiu significativa atividade antioxidante em ratos diabéticos. A quantidade de GSH aumentou pronunciadamente no fígado (68,8 %) pela administração de extrato aquoso de *Vitis vinifera* na dose de 500 mg/kg, enquanto nenhum aumento foi observado nos rins e tecido cardíaco. Em contrapartida, ambas as doses do extrato aquoso reduziram significativamente os níveis de MDA no tecido renal, enquanto a influência no fígado e tecido cardíaco foi negligenciável. Na administração aguda, frações de folhas da uva foram inativas contra o nível de GSH. Enquanto os níveis de MDA no tecido cardíaco foi significativamente diminuída por todas as frações, somente a fração acetato de etila (fração mais rica em taninos condensados e flavonóides) demonstrou proteção significativa nos níveis de MDA hepático. Os resultados sugerem que o consumo a longo prazo pode ser benéfico para pessoas que sofrem de doenças crônicas associadas ao estresse oxidativo, especialmente diabetes, falência hepática, doenças cardíacas e renais.

Em estudo realizado por ORHAN e colaboradores (2007), o efeito do extrato de folhas de *Vitis vinifera* L., cujos frutos são avermelhados, preparado com etanol a 80 % e administrado em três diferentes doses (62,5, 125 e 250 mg/kg) e de subfrações deste foi avaliado quanto aos parâmetros bioquímicos de ratos intoxicados por tetracloreto de carbono (CCl_4). Resultados demonstraram que os níveis de peroxidação lipídica no plasma e no fígado determinado através do método que avalia as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico reduziram significativamente,

45,7 e 14 % respectivamente, com a dose de 125 mg/kg. Por outro lado, os conteúdos de GSH pela determinação do grupamento sulfidril não-protéico no tecido hepático aumentou significativamente pela administração de 250 (27,8 %) e 125 mg/kg (22,4 %) do extrato, enquanto que a administração de 62,5 mg apresentou alguns efeitos tóxicos. Entretanto, não foi evidenciada correlação entre o teor de fenólicos totais e atividade antioxidante das frações.

Por outro lado, a maior parte dos estudos em relação aos fenóis presentes em cultivares de *Vitis vinifera* avaliam derivados de quercetina, como quercetina-3-O-glicuronídeo e quercetina-3-O-galactosídeo e foram realizados com sementes da uva e no vinho, como citado por BEER *et al.* (2006), em que foi constatada atividade antioxidante pelo ensaio ABTS^{•+} (2,2'-azino-di(ácido3-etilbenzo-tialozino-sulfônico) de quercetina-3-O-glicuronídeo em vinhos Pinotage sul africanos. Contudo, subprodutos do processamento, como casca, bagaço, folhas e pecíolo, ainda carecem de investigação, principalmente no que se refere aos produtos isolados. Há relatos na literatura demonstrando a atividade antioxidante de frações de flavonóides de subprodutos da uva, mas sem identificação química propriamente dita (TORRES *et al.*, 2002). Em cultivares de *Vitis vinifera* do Chile foi encontrado quercetina-3-O-galactosídeo nas cascas do fruto (PEÑA-NEIRA *et al.*, 2007), em cultivares da Itália foram identificados quercetina-3-O-glicuronídeo no bagaço (AMICO *et al.*, 2004) e na Espanha foram isolados ambos os metabólitos nos frutos (CASTILLO-MUÑOZ *et al.*, 2007), mas sem estudos das propriedades biológicas dos compostos isolados.

Contudo, diversas informações a respeito das atividades biológicas, sobretudo antioxidante, dos flavonóides majoritários relatados como hiperosídeo, isoquercetrina e quercetina 3-O-glicuronídeo, presentes nas folhas da uva, são oriundas de investigações relacionadas a diversos estudos acerca dos metabólitos da quercetina, já que a quercetina – 3- O- beta glicuronídeo, composto flavonoídico majoritário relatado em diversos estudos das folhas da uva, figura também entre os principais metabólitos da quercetina presentes *in vivo* após a administração oral de quercetina e derivados.

A hipótese que a quercetina e seus glicosídeos, após administração oral, são metabolizados no intestino, ocorrendo conjugação dos grupos hidroxila com sulfatos e ácido glicurônico e, que nesta forma, seriam responsáveis pelos efeitos biológicos,

foi evidenciada em diversos estudos que avaliaram a administração oral de quercetina e seus glicosídeos em plasma de ratos (YAMAMOTO *et al.*, 1999; DAY, *et al.*, 2000; MOON *et al.*, 2001, CHANG *et al.*, 2005). A glicuronidação ocorre rapidamente devido ao abundante suplemento de UDP-ácido glicurônico nos tecidos e é particularmente importante para aumentar a massa molecular, condição necessária para excreção biliar (DAY, *et al.*, 2000).

MOON e colaboradores (2001) verificaram que a administração oral de quercetina (250 mg/kg) a ratos levou à formação de metabólitos, como quercetina-3-O-glicuronídeo. O seu isolamento e posterior avaliação sobre a lipoperoxidação *in vitro* de LDL de plasma humano revelou que esse composto retardou significativamente o acúmulo de produtos de oxidação na concentração final de 5 μ M. Além disso, os autores estudaram a atividade antioxidante *in vitro* da quercetina-3-O-glicuronídeo (testada nas concentrações de 10-350 μ M) frente ao DPPH, encontrando uma atividade radical-scavenging de 4,15 mols de DPPH/mol de glicuronídeo.

A quercetina-3-O-glicuronídeo também é produto do metabolismo vegetal, como constatado por DAY *et al.* (2000) em feijão verde. Após seu isolamento, este composto levou à inibição *in vitro* da xantina oxidase e da lipoxigenase numa proporção 800 e 20 vezes superior à quercetina, respectivamente.

Por outro lado, há descrição ampla na literatura sobre a atividade antioxidante dos antocianos. KUSKOSKI *et al.* (2004) determinaram a atividade antioxidante dos pigmentos antociânicos utilizando o radical ABTS⁺ formado pela reação do ABTS com persulfato de potássio, em temperatura ambiente por 16 horas. Avaliou-se a capacidade antioxidante de cinco antocianinas: delphinidina, cianidina, peonidina, pelargonidina e malvidina. Das antocianinas determinadas, a delphinidina e cianidina-3-glicosídeo apresentaram maior atividade antioxidante, duas vezes superior ao Trolox. As demais antocianinas apresentaram menor atividade, porém com potencial equiparável ao Trolox.

Wang *et al.* (1997) registraram a atividade antioxidante de antocianinas pelo ensaio do ORAC, constatando que a cianidina, malvidina e delphinidina apresentavam a maior atividade. Por sua vez, STINTZING e colaboradores (2002) realizaram o

ensaio ORAC frente a extratos de plantas contendo antocianos derivados da cianidina e em relação aos produtos isolados, verificando que os pigmentos isolados apresentaram uma atividade antioxidante inferior em comparação aos extratos, demonstrando, portanto, sinergismo. Já KÄHKÖNEN e HEINONEN (2003) constataram que delfinidina e delfinidina-3-glicosídeo tinham, pelo ensaio de DPPH, a maior atividade antioxidante, e que pela atividade frente a LDL humana, os melhores resultados foram obtidos para cianidina, delfinidina, delfinidina-3-O-rutinosídeo, cianidina-3-O-arabinosídeo e malvidina-3-O-galactosídeo.

Com relação à uva, a maioria dos trabalhos relata a atividade antioxidante total dos extratos, mencionando que somente parte da atividade antioxidante é devida aos antocianos (GÓMEZ-PLAZA *et al.*, 2006; ORAK, 2007; RUBERTO *et al.*, 2007).

2.2 Potencial antioxidante reativo total não enzimático (TRAP) e reatividade antioxidante total (TAR)

Dentre os métodos utilizados para a avaliação da capacidade antioxidante total do tipo não enzimática, um dos mais empregados é o potencial antioxidante total (TRAP), cuja determinação baseia-se na medida da intensidade de quimiluminescência produzida por um sistema gerador de radicais livres. Na metodologia descrita por LISSI e colaboradores (1992), a termólise do 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano), ou ABAP, é empregada como fonte de radicais livres indutores da luminescência do luminol, composto que quando oxidado pelas espécies reativas emite luminescência. Nesse caso, a habilidade de determinado agente poder modular a luminescência produzida pelo luminol pode estar relacionada com a capacidade deste produto de seqüestrar radicais livres gerados pelo ABAP ou pelo luminol (LISSI *et al.*, 1992).

Entretanto, pode ser considerada não apenas a quantidade de antioxidantes capazes de modular a quimiluminescência expressa pelo TRAP, mas também a qualidade desta modulação, dada pela reatividade do produto em questão e expresso como a reatividade total antioxidante, ou TAR. Assim, a instantânea redução da intensidade de emissão do luminol, causada pela adição de determinado

agente com propriedade antioxidante, pode ser considerada como uma medida da capacidade TAR desta substância, com o emprego de uma substância de referência que produza tempos de indução (t_i) proporcionais à sua concentração para fins de comparação (LISSI *et al.*, 1995).

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos para avaliação do potencial antioxidante foram realizados no Centro de Estudos de Estresse Oxidativo do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a supervisão do Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira.

2.3.1 Preparação e análise dos extratos

Os extratos aquosos das variedades Cabernet sauvignon e Couderc foram preparados de acordo com o item 1.4.2.1 do cap. I, e posteriormente diluídos com água ultrapura (Milli-Q®- Millipore) pH 5,5 para obtenção de cinco concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1 mg de droga seca/mL, cujas concentrações finais nos tubos foram de 0,219; 0,547; 1,095; 1,64 e 2,19 µg/mL, respectivamente.

Os extratos foram analisados em CLAE segundo metodologia validada no capítulo I, avaliando-se o pico 2 relativo aos antocianos e o pico majoritário dos flavonóides.

2.3.2 Avaliação do potencial antioxidante total (TRAP)

A mistura reacional (4 mL) foi constituída por uma solução contendo a fonte de radical livre [2,2' – azobis (2-metilpropionamidina dicloridrato) - AAPH10 mM] em tampão glicina (0,1 M) pH 8,6 e luminol 4 mM [5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinediona], preparada em NaOH 0,1M e diluída com tampão glicina pH 8,6, utilizada como amplificador do sinal de luminescência. Os tubos utilizados para o ensaio permaneceram vazios e no escuro por pelo menos 30 minutos antes do experimento. A medida da quimioluminescência foi realizada em cintilador a líquido Wallac 1409[®] (Perkin Elmer), no modo *coincidence of mode*. O experimento foi padronizado para ser realizado em temperatura 20 ± 2 °C, já que o equipamento não possui controlador de temperatura, sendo esta monitorada com termômetro digital, cujo sensor foi inserido no interior do equipamento. Após a contagem basal da luminescência dos tubos vazios por 3 ciclos, adicionou-se a fonte de radical livre AAPH e realizou-se novamente contagem por 3 ciclos (com contagem a cada 10 segundos). Adicionou-se 10 µL da solução de luminol, monitorando-se as 3

primeiras contagens e deixou-se este sistema em repouso por 2 horas ao abrigo da luz. Após este período, realizou-se nova leitura de 3 ciclos, sendo a última leitura considerada 100 %. Foram testadas 5 concentrações das soluções extrativas (volume pipetado de 50 μL^1) de cada variedade a ser investigada (Cabernet sauvignon e Couderc) e uma concentração da solução de referência (volume pipetado de 10 μL), Trolox[®], 200 nM, um análogo hidrossolúvel da vitamina E, sendo as leituras monitoradas em cada tubo por 1 h (3600s). Todas as concentrações testadas foram avaliadas em triplicata. Os resultados foram plotados e expressos da seguinte forma:

a) perfil da inibição da quimioluminescência expresso como percentual de quimioluminescência \pm erro padrão da média (EPM);

b) avaliação da área sob a curva (AUC) utilizando o Programa GraphPad Prism 4.0, expresso como AUC \pm EPM;

c) cálculo da razão entre intensidade da quimioluminescência antes da adição da amostra (I₀) e após adição da mesma (I), expresso com I₀/I, também denominado de TAR. Detalhes sobre a otimização e validação da técnica estão apresentados no artigo a ser submetido ao periódico *Analytical Biochemistry*, intitulado: "A new method to evaluate Total Radical Antioxidant Potential (TRAP): optimization, validation and application in plant extracts."

Análise estatística

Os resultados foram expressos por média \pm erro padrão da média. Os dados foram analisados estatisticamente por meio de análise da variância (ANOVA fator único), seguida do teste de Tukey quando o valor de F foi significativo, com um nível de significância de 95 % ($p < 0,05$), ou do teste t, quando aplicável, através do programa estatístico SPSS versão 13.0[®] (*Statistical Package for the Social Sciences Inc.*, Chicago, IL), verificando-se previamente a homogeneidade de variância através do teste de Levene.

¹ Foi realizado ensaio prévio para avaliar se a adição de volume maior no sistema estabilizado não interferia no resultado, já que para pipetagem de 10 μL dispúnhamos de pipeta digital, entretanto, para as amostras era necessário pipeta automática comum. O volume de 50 μL foi selecionado para diminuir o erro relacionado ao volume empregado; este ajuste foi considerado no cálculo da concentração final.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A intensidade da quimioluminescência dos radicais luminol formados foi empregada para monitorar o potencial antioxidante total *in vitro* de extratos aquosos das duas variedades do gênero *Vitis*, utilizando Trolox como substância de referência. Esta técnica apresenta vantagens quanto à sua alta sensibilidade e tem sido amplamente utilizada para avaliar a atividade antioxidante de misturas complexas como extratos vegetais (LISSI *et al.* 1995; DESMACHELIER *et al.*, 1997; DESMACHELIER, 1998).

Nos estudos preliminares, nos quais se objetivava testar o método e estabelecer a faixa de concentração adequada de amostra, a adição dos extratos promoveu a diminuição da quimioluminescência. Embora os perfis observados apresentassem semelhança, não era possível obter um tempo de indução através da extrapolação ao eixo x. Além disso, encontrava-se dificuldade também na obtenção de valores com desvios padrão relativos aceitáveis após as análises efetuadas com a substância de referência (Trolox).

Face às variações observadas, foi realizada revisão do método na literatura quanto às condições experimentais originalmente propostas por LISSI e colaboradores (1992) e suas variantes. Em adição, foi acompanhada a cinética do sistema, verificando-se se o perfil observado condizia com perfis reportados na literatura. A partir disso foram avaliadas as condições de ensaio que permitissem a obtenção de menores coeficientes de variação entre as análises. Em diversas publicações há a menção de que a mistura reacional produziria uma intensidade constante de luz (DESMACHELIER *et al.*, 1997; KRASOWSKA *et al.*, 2000), o que era verificada no sistema experimental somente após determinado período, cujo perfil nas condições experimentais situava-se a partir de aproximadamente 2 horas. Ainda, fazia-se necessário um método de avaliação que permitisse calcular o TRAP com maior precisão, já que em análises preliminares os perfis foram distintos aos apresentados pelo Trolox e, somente a análise do perfil, constituía-se numa análise arbitrária. Igualmente, não há consenso na literatura em relação à determinação do tempo de indução, por vezes denominado de fase *lag* ou fase de propagação. Igualmente, diversos autores atribuem uma das limitações do TRAP à dificuldade na determinação deste parâmetro.

A constatação destas discrepâncias, bem como a revisão de outros métodos para avaliar atividade antioxidante, os quais utilizavam o mesmo princípio e que usavam o cálculo da área sob a curva, tornou possível empregar este recurso para análise das amostras que não apresentavam fase *lag*. Aliado a estas considerações, embora o método seja amplamente utilizado, não foi encontrado registro de sua validação. Face ao exposto, o método foi otimizado e validado, cujos detalhes estão apresentados no artigo a ser submetido ao periódico *Analytical Biochemistry*.

Por outro lado, quando se adiciona amostra em um sistema que não esteja estabilizado, há a necessidade de se utilizar outro sistema com quantidades diferentes de luminol ou de amostra, como observado, por exemplo, no ensaio realizado por DESMACHELIER e colaboradores (1998) para avaliação do TAR. Dessa forma, a alteração proposta permitiu avaliar tanto o TRAP quanto o TAR² utilizando o mesmo experimento.

Foram efetuados ensaios preliminares para avaliar as concentrações adequadas, observando-se que pelo menos duas concentrações retornassem à leitura em contagens por minuto (CPM) semelhante à leitura anterior à adição da amostra.

Neste ensaio a diminuição da quimioluminescência está relacionada com a capacidade antioxidante da amostra de forma inversa, sendo assim, quanto menor a intensidade, maior a capacidade antioxidante.

Como é possível verificar na figura 2.3, o decaimento da quimioluminescência após a adição de ambos extratos mostraram-se idênticas, porém qualitativamente diferente do decaimento obtido empregando-se Trolox. Esse comportamento pode ser provavelmente atribuído à presença de mais de um componente antioxidante nos extratos.

² Devido à amplitude do artigo a ser submetido e à necessidade de se comparar com os protocolos normalmente utilizados, a questão relacionada ao TAR não foi abordada no mesmo e será objeto de outra publicação.

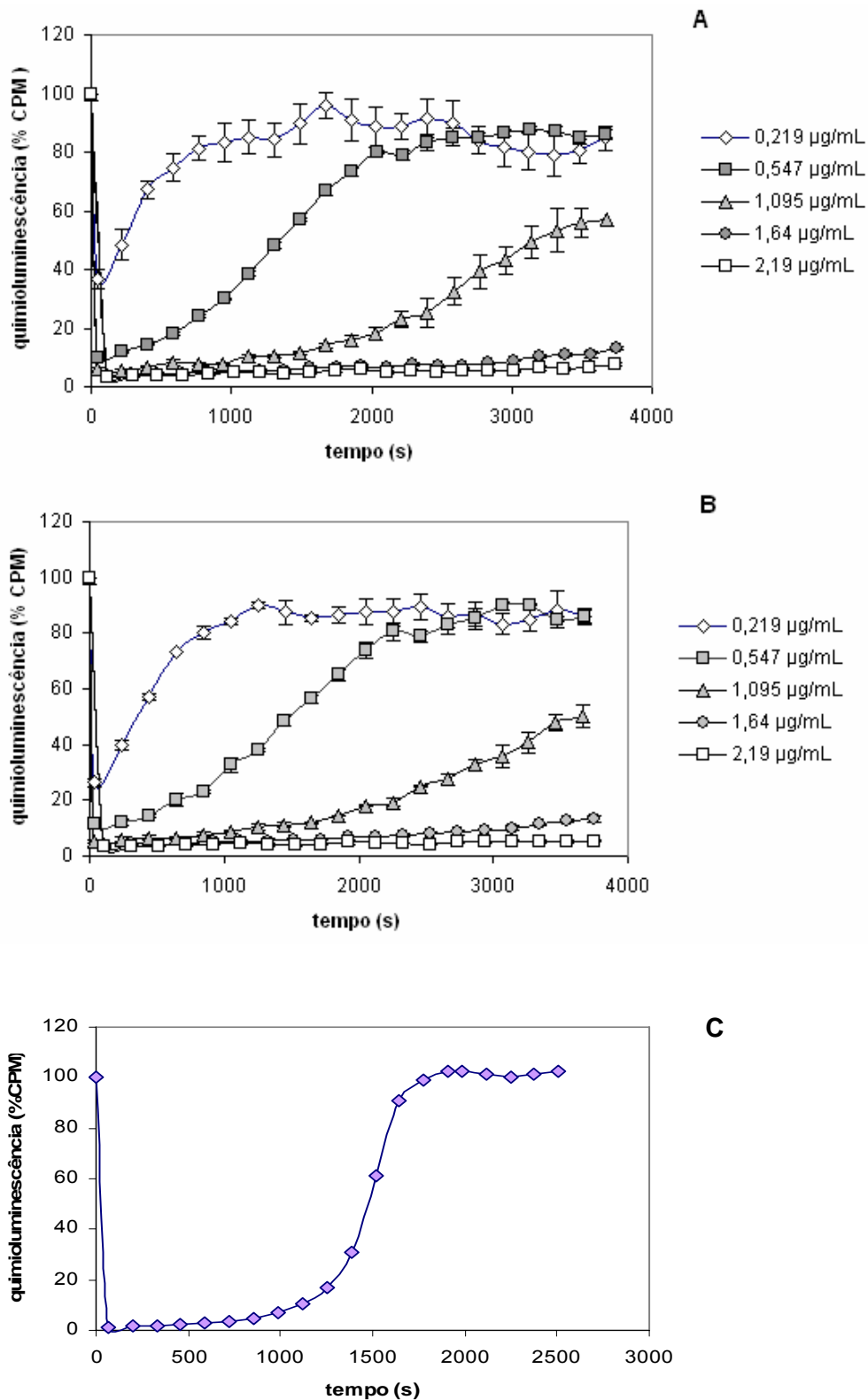


Figura 2.3: Percentual da intensidade de quimioluminescência (contagens por minuto) medida após a adição de concentrações crescentes dos extratos aquosos de **(A)** var. Cabernet sauvignon, **(B)** var. Couderc e **(C)** Trolox 200 nM. Resultados expressos como média \pm EPM.

Como não foi possível calcular o tempo de indução através da extrapolação ao eixo x, a utilização da área sob a curva tornou-se uma importante ferramenta para fins de comparação, com a possibilidade da realização de análise estatística, por meio da comparação entre as concentrações testadas e substância de referência. Sendo assim, pode-se interpretar da seguinte forma: quanto menor a área, maior a atividade antioxidante. Como pode ser observado nas figuras 2.4 e 2.5, em ambos os casos, a atividade antioxidante da menor concentração testada equiparou-se à do Trolox 200 nM, enquanto que as concentrações restantes apresentaram atividade superior. Através do teste t (Tabela 2.1) foi possível afirmar que não houve diferença significativa entre todas as concentrações testadas entre ambas as variedades, sendo uma constatação interessante, já que as duas variedades também se assemelham ao teor do pico majoritário dos flavonóides.

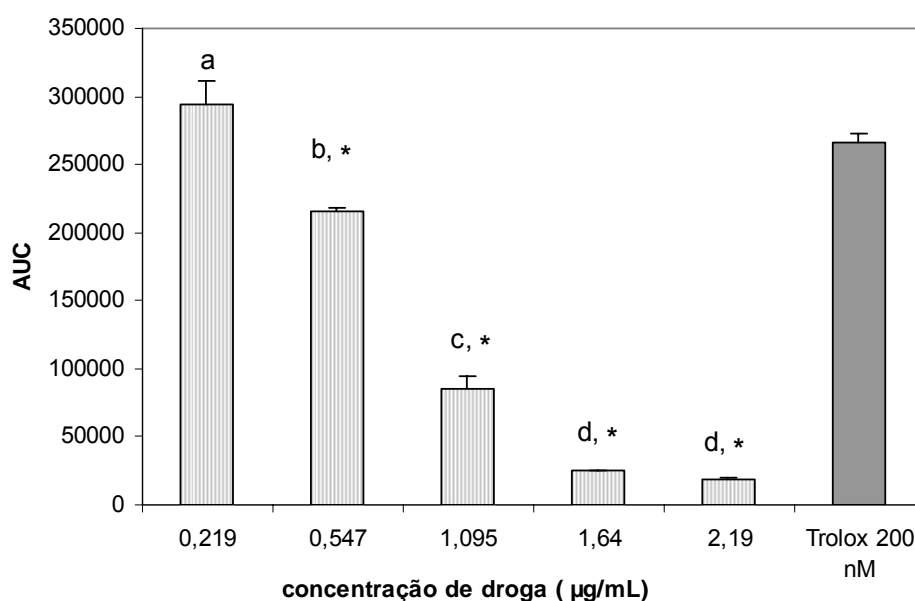


Figura 2.4: Análise do TRAP através da AUC para o extrato aquoso da variedade Cabernet sauvignon. Os dados representam a média \pm EPM. ^{a,b,c,d} Letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes; * estatisticamente diferente em relação à substância de referência (Trolox). ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$.

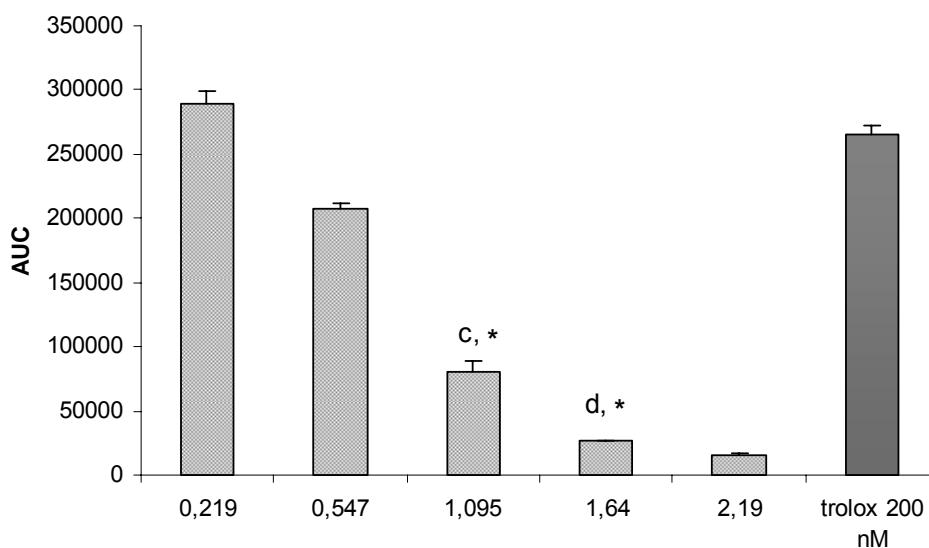


Figura 2.5: Análise do TRAP através da AUC para o extrato aquoso da variedade Couderc. Os dados representam a média \pm EPM. ^{a,b,c,d} Letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes; * estatisticamente diferente em relação à substância de referência (Trolox). ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$.

Tabela 2.1: Comparação estatística (teste t) dos resultados obtidos a partir do cálculo da AUC entre mesmas concentrações de droga seca ($\mu\text{g/mL}$) das variedades Cabernet sauvignon e Couderc.

Concentração de droga seca ($\mu\text{g/mL}$) das variedades C.sauvignon e Couderc	p
0,219	0,805351
0,547	0,203124
1,095	0,711236
1,64	0,158673
2,19	0,160306

p: nível de significância; *significativo para $p < 0,05$.

Também foi possível constatar que atividade antioxidante é concentração dependente, mas não de forma linear, assemelhando-se a uma relação logarítmica para ambos os casos, como pode ser observado na figura 2.6.

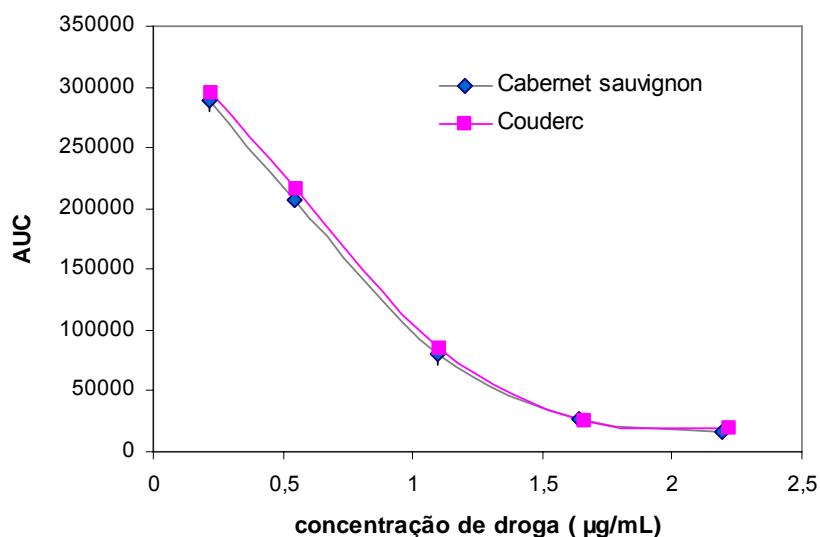


Figura 2.6: Gráfico representativo da relação entre concentração de droga seca/mL e a AUC para cada concentração avaliada dos extratos aquosos das variedades Cabernet sauvignon e Couderc.

Por outro lado, avaliando-se a reatividade inicial, em ambos os casos (Figura 2.7), o Trolox 200nM apresentou maior reatividade, representada pela relação I_0/I em relação a todas as concentrações de amostra testadas. O Trolox, por se tratar de uma substância única, interage mais rapidamente com os radicais formados (LÓPEZ *et al.*, 2003), enquanto que no extrato há a presença de substâncias com maior complexidade estrutural. No entanto, ao longo das reações o comportamento se inverte. Enquanto o Trolox vai sendo consumido e chega a um ponto em que o sistema retorna abruptamente ao seu nível de quimioluminescência inicial, na presença de extratos, esse comportamento não é observado, verificando-se um efeito sustentado.

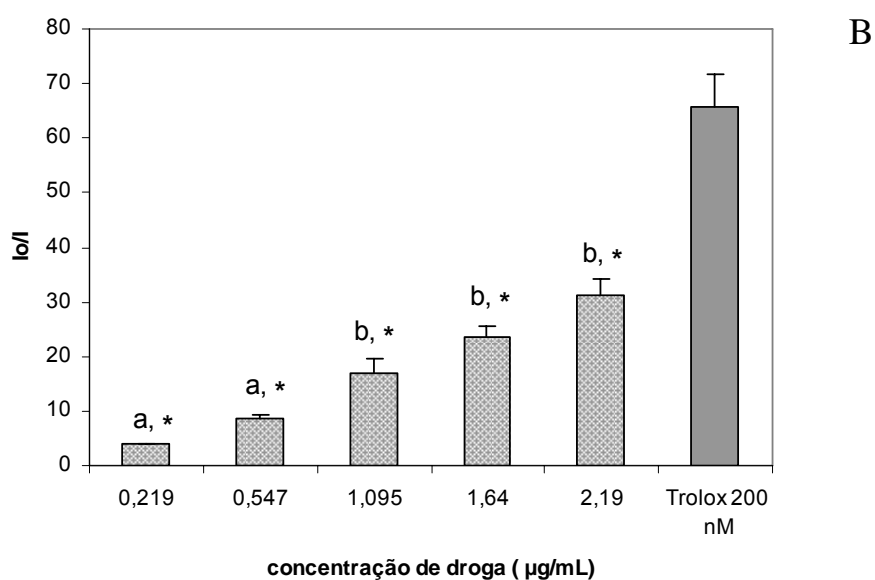
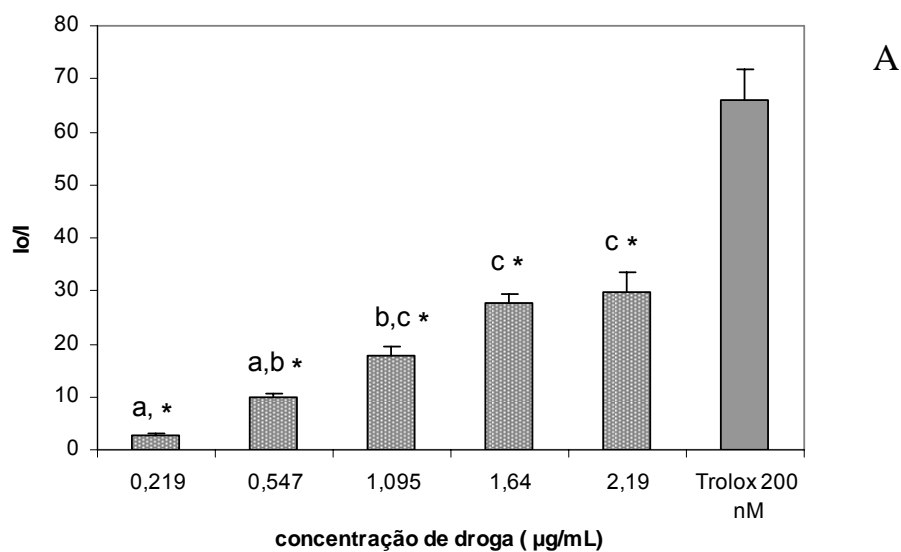


Figura 2.7: Avaliação da relação I_o/I (TAR) dos extratos aquosos das variedades Cabernet sauvignon **(A)** e Couderc **(B)**. Os dados representam a média \pm EPM. ^{a,b,c} Letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes; * estatisticamente diferente em relação à substância de referência (Trolox). ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$.

Os dois extratos apresentaram diferenças entre si quanto à avaliação da reatividade (TAR), conforme figura 2.8, porém não de forma significativa (Tabela 2.2), sendo que se pode observar uma relação mais linear para o extrato da

variedade Couderc ($r = 0,99$) em relação ao extrato da variedade Cabernet sauvignon ($r = 0,96$) (Figura 2.7).

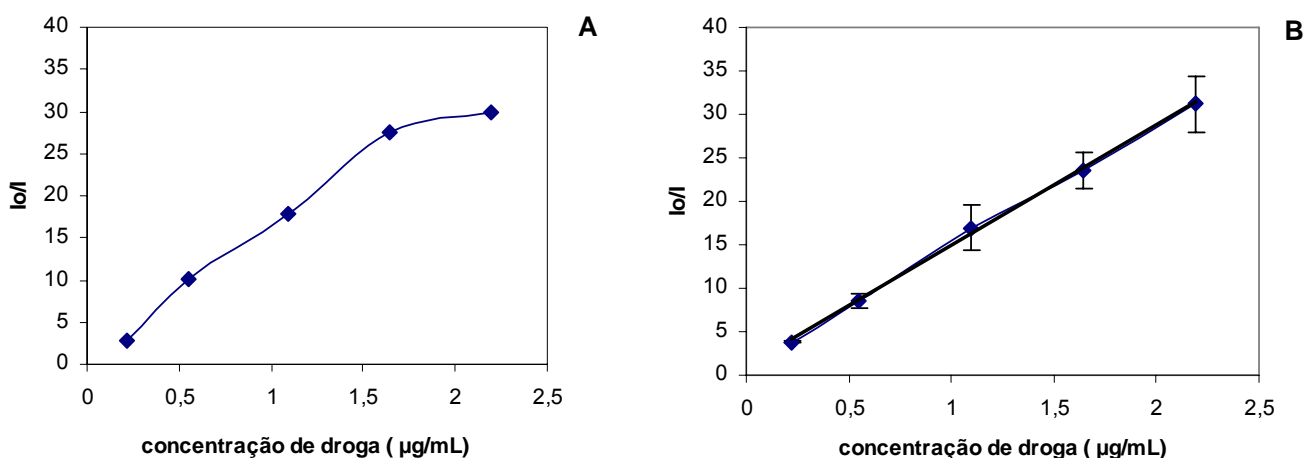


Figura 2.8: Diminuição instantânea da quimioluminescência avaliada quanto ao TAR, expressa pela relação entre lo/I: em (A) var. Cabernet sauvignon e (B) var. Couderc.

Tabela 2.2: Comparação estatística (teste t) dos resultados obtidos a partir do cálculo da relação lo/I entre mesmas concentrações de droga seca (µg/mL) das variedades Cabernet sauvignon e Couderc.

Concentração de droga seca (µg/mL) das variedades C. sauvignon e Couderc	p
0,219	0,2271
0,547	0,2313
1,095	0,8084
1,64	0,2267
2,19	0,7968

p: nível de significância; *significativo para $p < 0,05$.

As duas variedades, possuindo teores semelhantes de flavonóides, porém diferentes de antocianos (Tabela 2.3), apresentaram os mesmos perfis (figura 2.3 A e B), indicando que nestas condições do experimento os antocianos parecem colaborar em menor intensidade ou não interferir na atividade. No entanto, cabe ressaltar que no pH do experimento, 8,6, os antocianos podem estar em uma forma

diferenciada (quinoidal), pH no qual, segundo a literatura, os mesmos poderiam provavelmente se comportar como pró-oxidantes (FRANCIS, 1989). Entretanto, pelo fato destes compostos estarem baseados no núcleo flavan, o número, posições e tipos de substituições influenciam a reatividade frente aos radicais formados (HEIM *et al.*, 2002).

Tabela 2.3: Áreas correspondentes à análise cromatográfica por CLAE para os extratos aquosos na concentração de 50 mg de droga/mL, submetidos ao método TRAP.

Variedade	Antocianos	Flavonóides
	área* pico 2	área* pico majoritário
Cabernet sauvignon	1363426	9196183
Couderc	464809	10764024
Diferença (%)	66,0	14,5

* área relativa à média de três determinações.

Baseando-se no método utilizado, os resultados obtidos indicam que o potencial antioxidante deve-se principalmente à presença dos compostos flavonoídicos. Porém outros métodos para avaliar a atividade antioxidante devem ser empregados para análise dos antocianos, uma vez que este grupo já foi estudado e apresentou resultados muito promissores como antioxidantes.

Contudo, para que a atividade antioxidante seja realmente confirmada, deve-se correlacionar, futuramente, os resultados obtidos com outros ensaios, a fim de comprovar a atividade frente a outros radicais e, principalmente, realizar ensaios com frações separadas de flavonóides e antocianos. Igualmente, os ácidos fenólicos e outras classes de compostos presentes nas folhas deverão ser investigados, relacionando a participação destes na atividade total dos extratos.

Muitas pesquisas têm focado no potencial dos flavonóides, incluindo os antocianos, na prevenção ou tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo, tanto em formulações de uso sistêmico quanto tópico, com finalidade dermatológica ou cosmética.

Os compostos majoritários relatados neste trabalho enquadram-se nos quesitos indispensáveis para atuarem como antioxidantes, conforme já mencionado na relação estrutura x atividade abordada no capítulo II, cuja atividade neste trabalho também foi evidenciada para os extratos aquosos das duas variedades estudadas em ensaio *in vitro*.

Quanto à utilização em formulações para uso sistêmico, o fato de haver disponível diversos produtos no mercado internacional, sendo um deles com estudos clínicos comprovando a eficácia no tratamento de desordens venosas (ESPERESTER *et al.*, 2007), aliado a estudos relacionados à possível atividade antidiabética *in vivo* em ratos (ORHAN *et al.*, 2006) que foi correlacionada com o efeito antioxidante, e outras atividades, como broncodilatadora (GHARIB-NASERI; HEIDARI, 2006a) e espasmolítica (GHARIB-NASERI; ZAREI; AMIRI, 2006), fazem dos extratos de folhas de videira promissoras para futura utilização terapêutica.

Igualmente, na última década, antioxidantes têm sido propostos como ingredientes funcionais para formulações anti-envelhecimento e para prevenir e modular danos à pele (VERTUANI *et al.*, 2003). A pele é um tecido com atividade metabólica altamente expressiva, a qual possui a maior área superficial do corpo humano (VERTUANI *et al.*, 2003), sendo também alvo de fontes endógenas e principalmente exógenas, desencadeadoras de radicais livres (RL) e espécies reativas de oxigênio (ERO) como ozônio, radiação ionizante, compostos químicos tóxicos e especialmente, pela radiação ultravioleta (SAIJA *et al.*, 1998; PODDA; GRUNDMANN-KOLLMANN, 2001). Em vista disso, a administração tópica de antioxidantes representa uma estratégia efetiva da proteção da pele contra danos oxidativos, principalmente por UV. Nesse sentido, o desenvolvimento de formulações fotoprotetoras contendo extratos de folhas de videira, bem como de seus produtos isolados, como flavonóides e antocianos, é um potencial a ser explorado.

Neste contexto vislumbram-se perspectivas quanto à avaliação da aplicação tópica, a qual ainda não foi explorada, principalmente no que concerne a penetração cutânea.

Os métodos desenvolvidos e validados foram úteis para avaliar duas variedades de videiras cultivadas no RS, apresentando folhas avermelhadas, bem como correlacionar os resultados obtidos com relatos da literatura, cujas substâncias majoritárias assemelharam-se de forma qualitativa aos compostos pertencentes à classe dos flavonóides e antocianos.

Não foi encontrado até a presente data relato da utilização da coluna X-Terra® para análise de flavonóides, em particular, visando à análise do composto quercetina-3-O-glicuronídeo.

A otimização e validação do método para avaliar a atividade antioxidante TRAP, assim como a proposta de utilização da área sob a curva, constituem uma importante contribuição para a ampliação da utilização deste método, além da possibilidade de avaliar os dois extratos aquosos em diferentes concentrações e que apresentaram atividade antioxidante.

Considerando que o Rio Grande do Sul destaca-se na produção de uvas, bem como relatos de diversas atividades farmacológicas de extratos e de compostos isolados, fazem de espécies do gênero *Vitis* uma promissora fonte para produção de fitoterápico ou fitoderivados, além da agregação de valor e contribuição para o desenvolvimento econômico a partir desta parte da planta que atualmente é totalmente descartada em nosso país.

- Isolamento e identificação dos compostos majoritários pertencentes à classe dos antocianos, especialmente os glicosídeos de cianidina e peonidina;
- isolamento e identificação dos compostos majoritários pertencentes à classe dos flavonóides, principalmente da quercetina-3-O-glicuronídeo;
- avaliação da atividade antioxidante através do método TRAP com frações e substâncias isoladas a fim de averiguar quais as substâncias responsáveis pela atividade. Avaliação da atividade por outros métodos antioxidantes, primeiro *in vitro*, posteriormente *ex vivo* e *in vivo*. Também avaliação da atividade pró-oxidante;
- caracterização detalhada das soluções extrativas, visando utilização de diversos métodos de secagem dos mesmos, como por exemplo, por liofilização ou secagem por aspersão);
- estudo de estabilidade térmica e à luz, bem como estabilidade frente à diferentes pH;
- acompanhamento do teor dos compostos de interesse em diversos estágios do desenvolvimento das folhas;
- obtenção futura de matéria-prima vegetal ou composto(s) isolado(s) para produção de fitoterápico à base de folha de uva;
- avaliação da permeação cutânea e da atividade fotoprotetora, já que em geral os flavonóides também possuem esta capacidade e, além disso, foi encontrado um artigo que relata a quercetina 3-O-glicuronídeo é produzida em função da radiação ultravioleta.

ACKER, S. A. B. E. van; BERG, D.-J. van den; TROMP, M. N. J. L.; GRIFFIOEN, D. H.; BENNEKOM, W. P. van; VIJGH, W. J. F. van der; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 331-342, 1996.

ALONSO, J. La uva (*Vitis vinifera*). **Fitociência**. Publicación Oficial de la Asociación Argentina de Fitomedicina. 1998. Disponível em <<http://webs.sinectis.com.ar/fitomedicina/RevMonografiaSolotxt.html>>. Acesso em: 21 abr. 2005.

AMICO, V.; NAPOLI, E. M.; RENDA, A.; RUBERTO, G.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C. Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar *Nerello Mascalese*. **Food Chemistry**, v. 88, p. 599-607, 2004.

ARORA, A.; BYREM, T. M.; NAIR, M. G., STRASBURG, G. M. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 373, n. 1, p. 102-109, 2000.

ARORA, A.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 9, p. 1335-1363, 1998.

BEER, D. de; JOUBERT, E.; MARAIS, J.; MANLEY, M. Unravelling the Total Antioxidant Capacity of Pinotage Wines: Contribution of Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2897-2905, 2006.

BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. *Vitis vinifera* L. **Fitoterapia**, v. 66, n. 4, p. 291-317, 1995.

BONINA, F.; LANZA, M.; MONTENEGRO, L.; PUGLISI, C.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SAIJA, A. Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 145, p. 87-94, 1996.

BOUKHARTA, M.; GIRARDIN, M.; METCHE, M. Etude comparative des proanthocyanidines polymeres des sarments et des feuilles de vigne (*Vitis vinifera*). **Bulletin de Liaison du Groupe Polyphenols**, n. 15, p. 41-44, 1990.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RE nº 899, 02 de junho de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word>>. Acesso em: 03 fev. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Classificação da uva para fins industriais**. Portaria nº 270, 17 de novembro de 1988.

BROLIS, M.; GABETTA, B.; FUZZATI, N.; PACE, R.; PANZERI, F.; PETERLONGO, F. Identification by high-performance liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry and quantification by highperformance liquid chromatography–UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*. **Journal of Chromatography A**, v. 825, p. 9-16, 1998.

BROUILLARD, R. Flavonoids and flower color. In: HARBORNE, J. B. **The flavonoids: advances in research since 1980**. London: Chapman & Hall, 1988. p. 525-538.

BRUNETON, J. **Farmacognosia**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 2001.

BUTTERWECK, V.; NAHRSTEDT, A.; EVANS, J.; HUFSEIN, S.; RAUSER, L.; SAVAGE, J.; POPADAK, B.; ERNSBERGER, P.; ROTH, B. L. *In vitro* receptor screening of pure constituents of St. John's wort reveals novel interactions with a number of GPCRs. **Psychopharmacology**, v. 162, p. 193–202, 2002.

CAO, G., SOFIC, E., PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, p. 749-760, 1997.

CASTILLO-MUÑOZ, N.; GOMEZ-ALONSO, S.; GARCIA-ROMERO, E.; HERMOSIN-GUTIERREZ, I. Flavonol Profiles of *Vitis vinifera* Red Grapes and Their Single-Cultivar Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 992-1002, 2007.

CHANG, Q.; ZUO, Z.; CHOW, M. S. S.; WALTER, K. K. H. Difference in absorption of the two structurally similar flavonoid glycosides, hyperoside and isoquercitrin, in rats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, p. 549-555, 2005.

CHEMICAL Entities of Biological Interest (ChEBI). Disponível em < [http://www.ebi-ac.uk/chebi/init.do](http://www.ebi.ac.uk/chebi/init.do)>. Acesso em 05.jan 2008.

DARNÉ, G.; GLORIES, Y. Les anthocyanes des feuilles de différentes variétés de *Vitis vinifera* L. entre la véraison des raisins et la chute des feuilles. **Vitis**, v. 27, p. 71-78, 1988.

DAY, A. J.; BAO, Y.; MORGAN, M. R. A.; WILLIAMSON, G. Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, p. 1234-1243, 2000.

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. ("marcela"). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.31, p.1163-1170, 1998.

DESMARCHELIER, C.; REPETTO, M.; COUSSIO, J.; LLESUY, S.; CICCIA, G. Total Reactive Antioxidant Potencial (TRAP) and Total Antioxidant Reactivity (TAR) of Medicinal Plants Used in Southwest Amazonia (Bolivia and Peru). **International Journal of Pharmacognosy**, v. 35, n. 4, p. 288-296, 1997.

DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Methods in Plant Biochemistry – Plant Phenolics**. London: Academic Press, 1989. v. 1. 552 p.

DI CARLO, G., MASCOLO, N., IZZO, A. A., CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

DIAZ LANZA, A. M.; ELIAS, R.; MAILLARD, C.; FAURE, R.; DE SOTTO, M.; BALANSARD, G. Mise au point sur les dérivés flavoniques des feuilles de trois cultivars de Vigne *Vitis vinifera* L. var. *tinctoria* (Alicante, Carignan, Grand noir). Intérêt dans le contrôle chimique. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 47, n. 4, p. 229-234, 1989.

ESPERESTER, A.; FREY, H. W.; VIX, J.-M. **Composition for treating chronic venous insufficiencies using an extract of red vine leaves**. Int. Cl. A61K 36/87. U.S. n. 7.270.838 B2. 18 sep. 2007.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 4th ed. France: EDQM, 2002. p. 187.

F'GUYER, S.; AFAG F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 19, n. 2, p. 56-72, 2003.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu , 1988.

FELÍCIO, J. D.; SANTOS, R. S.; GONÇALEZ, E. Chemical constituents from *Vitis vinifera* (Vitaceae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 1, p. 47-50, 2001.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**, v. 475, p. 89-111, 2001.

FRANCIS, F. J. Food colorants: anthocyanins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 28, p. 273-314, 1989.

FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3597-3604, 2000.

GHARIB-NASERI, M. K.; HEIDARI, A. Bronchodilatory activity of *Vitis vinifera* leaf hydroalcoholic extract in rat. **Iranian Biomedical Journal**, v. 10, p. 79-83, 2006a.

GHARIB-NASERI, M. K.; HEIDARI, A. Relaxatory effect of *Vitis vinifera* leaf extract on rat isolated trachea. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, suppl. 2, p. 53-54, 2004.

GHARIB-NASERI, M. K.; HEIDARI, A. Study on mechanism of vasorelaxatory effect of *Vitis vinifera* leaf extract in rat aorta. **Physiology and Pharmacology**, v. 10, p. 71-77, 2006.

GHARIB-NASERI, M. K.; ZAREI, M.; AMIRI, O. Spasmolytic effect of *Vitis vinifera* leaf extract on rat colon, **Daru**, v. 14, p. 203-207, 2006.

GIOVANNINI, E. **Produção de Uvas para Vinho, Suco e Mesa**. Porto Alegre: Renascença, 1999.

GIRRE, L.; AMOROS, M.; KAIJ-A-KAMB, M.; BARIL, F.; SIMÕES, C. M. O. Le pouvoir antiherpétique *in vitro* des feuilles de vigne rouge (*Vitis vinifera*). **Fitoterapia**, v. 56, n. 3, p. 201-205, 1990.

GÓMEZ-PLAZA, E.; MIÑANO, A.; LÓPEZ-ROCA, J. M. Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. **Food Chemistry**, v. 97, p. 87-94, 2006.

HALLIWELL, B. How to characterise a biological antioxidant. **Free radical Research Communication**, v. 9, n. 1, p. 1-35, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 3rd ed. Oxford: Oxford University, 2000.

HARBORNE, J. B., WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HE, JIAN. **Absorption, excretion, and transformation of individual anthocyanins in rats**. 2004. 107 f. Thesis (Master of Science) - Faculty of the Graduate School, Department of Food Science, University of Maryland. Maryland, 2004. Disponível em: < <https://drum.umd.edu/dspace/handle/1903/1765> > Acesso em 05.out 2005.

HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, A.R., BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants:chemistry,metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.

HMAMOUCHE, M.; ES-SAFI, N.; LAHRICHI, M.; FRUCHIER, A.; ESSASSI, E. M. Flavones and flavonols in leaves of some Moroccan *Vitis vinifera* cultivars. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 47, n. 2, p. 186-192, 1996.

IBRAVIN - Instituto Brasileiro do Vinho. **Imigrantes italianos impulsionaram a vitivinicultura brasileira**. Disponível em <<http://www.ibravin.org.br/>>. Acesso em: 18 jun. 2005.

ICH - Validation on Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). In: ICH Harmonised Tripartite Guideline. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.

ICHIYANAGI, T.; HATANO, Y.; MATSUGO, S.; KONISHI, T. Structural dependence of HPLC separation pattern of anthocyanins from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, p. 628-630, 2004.

JEONG, S. T.; GOTO-YAMAMOTO, N.; HASHIZUME, K.; ESAKA, M. Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*). **Plant Science**, v. 170, p. 61-69, 2006.

KAHKONEN, M.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 628-633, 2003.

KALUS, U.; KOSCIELNY, J.; GRIGOROV, A.; SCHAEFER, E.; PEIL, H.; KIESEWETTER, H. Improvement of cutaneous microcirculation and oxygen supply in patients with chronic venous insufficiency by orally administered extract of red vine leaves AS 195: a randomised, double-blind, placebo-controlled, crossover study. **Drugs Research and Development**, v. 5, n. 2, p. 63-71, 2004.

KIESEWETTER, H.; KOSCIELNY, J.; KALUS, U.; VIX, J. M., PEIL, H.; PETRINI, O.; VAN TOOR, B. S.; DE MEY, C. Efficacy of orally administered extract of red vine leaf AS 195 (folia *Vitis viniferae*) in chronic venous insufficiency (stages I-II). A randomized, double-blind, placebo-trial. **Arzneimittelforschung**, v. 50, n. 2, p. 109-117, 2000.

KRASOWSKA, A; ROSIAK, D.; SPKAPIAK, K.; LUKASZEWICZ, M. Chemiluminescence detection of Peroxyl Radicals and Comparison of antioxidant activity of Phenolic Compounds. **Current Topics in Biophysics**, v. 24, p. 89-95, 2000.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; GARCÍA-PARRILA, M. C.; TRONCOSO, A. M.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 691-693, 2004.

LABELL, F. **The Vine of Life**. Nutra.Solutions.com, 2003. Disponível em <http://www.nutrasolutions.com/CDA/ArticleInformation/features/BNP__Features__It em/0,1269,113098,00.html>. Acesso em: 17 mai. 2005.

LANGCAKE, P.; CORNFORD, C. A.; PRYCE, J. R. Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. **Phytochemistry**, v. 18, p. 1025-1027, 1979.

LAPARRA, J.; DARNÉ, G. La feuille de vigne rouge en phytothérapie: étude des composés anthocyaniques de quelques présentations pharmaceutiques. **Plantes Médicinales et Phytothérapie**, v. 23, n. 2, p. 129-135, 1989.

LAPIDOT, T.; HAREL, S.; AKIRI, B.; GRANIT, R.; KANNER, J. pH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 67-70, 1999.

LISSI, E.; PASCUAL, C.; DELCASTILLO, M. D. Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. **Free Radical Research Communications**, v. 17, n. 5, p. 299-311, 1992.

LISSI, E.; SALIM-HANNA, M.; PASCUAL, C.; DELCASTILLO, M. D. Evaluation of total antioxidant potencial (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 2, p. 153-158, 1995.

LÓPEZ, M.; MARTÍNEZ, C.; DEL VALLE, M.; FERRIT, M.; LUQUE, R. Study of phenolic compounds as natural antioxidants by a fluorescence method. **Talanta**, v.60, 609-616, 2003.

MATAIX, J. J.; REVILLA, E.; CARPENA, O. Flavonols in leaves of *Vitis vinifera* L., cvs. Airen and Cencibel, during fructification. **Bulletin de Liaison du Groupe Polyphenols**, n. 11, p. 437-441, 1982.

MELLO, L. M. R. **Evolução da área vitícola do Rio Grande do Sul no decênio 1995-2004**. Embrapa Uva e Vinho. Disponível em <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/evolucao95_05.pdf>. Acesso em: 23 ago. 2005.

MELLO, L. M. R.; PROTAS, J. F. S. **Produção e mercado de uvas viníferas**. Embrapa Uva e Vinho. Sistema de Produção, 4. Versão eletrônica, julho, 2003. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/mercado.htm>>. Acesso em: 23 ago. 2005.

MONAGAS, M.; GARRIDO, I.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. Chemical characterization of commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 401-410, 2006a.

MONAGAS, M.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Commercial Dietary Ingredients from *Vitis vinifera* L. Leaves and Grape Skins: Antioxidant and Chemical Characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 319-327, 2006b.

MOON, J.-H.; TSUSHIDA, T.; NAKAHARA, K.; TERAQ, J. Identification of quercetin 3-O- β -D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, p. 1274-1285, 2001.

MOORE, M. O.; GIANNASI, D. E. Foliar flavonoids of eastern North American *Vitis* (*Vitaceae*) north of Mexico. **Plant Systematics and Evolution**, v. 193, p. 21-36, 1994.

MOSKAUG, J. O.; CARLSEN, H.; MYHRSTAD, M.; BLOMHOFF, R. Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, p. 315-324, 2004.

NEES, S.; WEISS, D. R.; REICHENBACH-KLINKE, E.; RAMPP, F.; HEILMEIER, B.; KANBACH, J.; ESPERESTER, A. Protective effects of flavonoids contained in the red vine leaf on venular endothelium against the attack of activated blood components *in vitro*. **Arzneimittelforschung**, v. 53, n.5, p. 330-341, 2003.

NODA, Y.; KNEYUKI, T.; IGARASHI, K.; MORI, A.; PACKER, L. Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant peels. **Toxicology**, v. 148, p. 119-123, 2000.

ORAK, H. H. Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations. **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 235-241, 2007.

ORHAN, N.; ASLAN, M.; ORHAN, D. D.; ERGUN, F.; YESILADA, E. *In-vivo* assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (*Vitis vinifera*) in diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 280-286, 2006.

PANNALA, A. S., CHAN, T. S., O'BRIEN, P. J., RICE-EVANS, C. A. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, p. 1161-1168, 2001.

PELZER, E. L.; GUARDIA, T.; JUAREZ, O.; GUERREIRO, E. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **Farmaco**, v. 53, p. 421-424, 1998.

PEÑA-NEIRA, A.; CÁCERES, A.; PASTENES, C.; Low Molecular Weight Phenolic and Anthocyanin Composition of Grape Skins from cv. Syrah (*Vitis vinifera* L.) in the Maipo Valley (Chile): Effect of Clusters Thinning and Vineyard Yield. **Food Science and Technology International**, v. 13, p. 153-158, 2007.

PHARMACOPÉE Française. 10th ed. Paris :Ministère de la Santé, 1996. v. 2.

PIETTA, P-G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PL THOMAS & Co. **Nutritional Ingredient List**. Disponível em <http://www.plthomas.com/nutritional_list.htm>. Acesso em: 23 jul. 2005.

PODDA, M.; GRUNDMANN-KOLLMANN, M. Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 26, p. 578-582, 2001.

PROLIAC, A.; CHABOUD, A.; RAYNAUD, J. Deux mono-O-glycosyl flavonoids des feuilles de Vigne Rouge (*Vitis vinifera* L.) (Ampélidacées). **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v. 65, n. 4, p. 127-128, 1990.

PRYCE, R. J.; LANGCAKE, P. α -viniferin: an antifungal resveratrol trimer from grapevines. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1452-1454, 1977.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. S. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RUBERTO, G.; RENDA, A.; DAQUINO, C.; AMICO, V.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C.; TOMMASI, N. de. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. **Food Chemistry**, v. 100, p. 203-210, 2007.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; GIACCHI, M.; DE PASQUALE, A.; BONINA, F. Influence of different penetration enhancers on *in vitro* skin permeation and *in vivo* photoprotective effect of flavonoids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 175, n. 1, p. 85-94, 1998.

SAT, I. G.; SENGUL, M.; KELES, F. Use of grape leaves in canned food. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.1, p. 257-262, 2002.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. K. J. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, p. 67-103, 1992.

SHYNDO, Y.; WITT, E.; HAN, D.; EPSTEIN, W.; PAKER, L. Enzymic and non enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 1, p. 122-124, 1994.

STINTZING, F.; STINTZING, A.; CARLE, R.; FREI, B.; WROLSTAD, R. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 6172-6181, 2002.

THE UNITED States Pharmacopeia. 30th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, Easton: Mack, 2007.

TIBERTI, L. A.; YARIWAKE, J. H.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-line LC/UV/MS analysis of flavonols in three apple varieties most widely cultivated in Brazil. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 100-105, 2007.

TORRES, J. L.; VARELA, B.; GARCIA, M. T.; CARILLA, J.; MATITO, C.; CENTELLES, J. P.; CASCANTE, M.; SORT, X.; BOBET, R. Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7548-7555, 2002.

UVIBRA - União Brasileira de Vitivinicultura. **Produção de uvas, elaboração de vinhos e derivados 1998-2007**. Disponível em <http://www.uvibra.com.br/pdf/safra_uva1998-2007.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2008.

VANACLOCHA, B. V.; FOLCARA, S. C. **Fitoterapia- Vademécum de Prescripción**. 4th ed. Barcelona: Masson, 2003.

VERTUANI, S.; ZIOSI, P.; SOLAROLI, N.; BUZZONI, V.; CARLI, M.; LUCCI, E.; VALGIMIGLI, L.; BARATTO, G.; MANFREDINI, S. Determination of antioxidant efficacy of cosmetic formulations by non-invasive measurements. **Skin Research and Technology**, v. 9, n. 3, p. 245-253, 2003.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.45, p. 304-309, 1997.

WANG, H.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M.; CHANG, Y.; BOOREN, A. M.; GRAY, J. I.; DEWITT, D. L. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 294-296, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality Control Methods for medicinal plant materials**. Genève, 1998. 122 p.

WYNDHAM, K. D.; O'GARA, J. E.; WALTER, T. H.; GLOSE, K. H.; LAWRENCE, N. L.; ALDEN, B. A.; IZZO, G. S.; HUDALLA, C. J.; IRANETA, P. C. Characterization and evaluation of C₁₈ HPLC stationary phases based on ethyl-Bridged hybrid organic/inorganic particles. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 6781-6788, 2003.

YAMAMOTO, N.; MOON, J.-H.; TSUSHIDA, T.; NAGAO, A.; TERAOKA, J. Inhibitory effect of quercetin metabolites and their related derivatives on copper ion-induced lipid peroxidation in human low-density lipoprotein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 372, p. 347-354, 1999.

ZHANG, Z.; KOU, X.; FUGAL, K.; McLAUGHLIN, J. Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanins and anthocyanidins in bilberry extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 688-691, 2004.

Tabela A1: Classificação da uva para fins industriais segundo o Ministério da Agricultura (BRASIL, 1988).

GRUPOS	TINTAS		BRANCAS	
	I	II	I	II
Grupo I: Viníferas nobres	<i>Carbenet Franc</i>	Garnay Beaujolais	Chardonnay	Flora
	<i>Cabernet Sauvignon</i>	Malbec	Chenin Blanc	Muller Thurgau
	Merlot	Petite Syrah	Gewurztraminer	Sémillon
	Pinot Noir		Pinot Blanc	
			Riesling Itálico	
			Riesling Renano	
			Sauignon Blanc	
Grupo II: Viníferas superiores	Barbera Piemonte	Aramon	Cheselas Doré	Aligoté
	Barbera D`Asti	Carignan	Malvasia Bianca	Clairette
	Carmeneré	Calitor (Sira Falsa)	Prosecco	Malvsia
	Canaiolo	Cinsaut	Tocay Friulano	Amarela
	Grenache	Bonarda	Trebbiano	Malvasia Di
	Marzemina	Fraisa	Vernaccia	Candia
	Nebbiolo	Gamay St. Romain		Malvasia Verde
	Sangiovesse	Grand Noir		Moscato
	Tannat	Lambrusco		Palomino
				Peveralla
				Verdea
				Verdisso
Grupo III: Comum	Concord	Cliton	Baco Blanc	Goehte
	Herbemont	IAC 138-22 (Máximo)	Couderc 13	Martha
	Isabel	Jacquez	IAC 116-31 (Rainha)	Seibel 13680
	Seibel 2	Landot 244 ou 304	Niágara Branca	
	Seibel 1077 (Couderc)	Oberlin 595	Niágara Rosada	
	Seibel 5455	Othello	Seyve Villard 5276 (Seyval)	
	Seibel10096	Zeperina (Cynthiana Santiago)	Seyve Villard 12375	
	Yves (Bordô Fl. De Figo)			

Tabela A2: Exemplos de produtos comercialmente disponíveis contendo folhas de videira.

Ref.	Nome	Fabricante	País	Composição	Apresentação
1	Grape Bath Tonic®	L'Occitane	França	Associação	Emulsão bifásica
1	Grape Beauty Milk®	L'Occitane	França	Associação	Loção
2	Vigne Rouge Concentré®	Michel Pierre	França	Extrato de folhas da uva	Solução
3	Vein-Vine®	Healthspan	Estados Unidos	Extrato aquoso de folhas da uva	Comprimido
4	Vigne Rouge Bio®	Super Diet	NE	Extrato de folhas da uva	Ampola
4	Vigne Rouge Orange Amère®	Yves Ponroy	NE	Associação	Comprimido
4	Vigne Rouge®	Feuille	NE	Folhas da uva	Cápsula
4	Vigne rouge®	Ephyto	NE	Extrato de folhas da uva	Cápsula
4	Vigne Rouge/Cassis/Raisin®	Juvamine	NE	Associação	Cápsula
5	ANTISTAX®	Pharmaton	Alemanha e outros países europeus	Extrato de folhas da uva	Comprimido, gel, creme e solução
6	3 Chênes Circulation®	3 Chênes	NE	Folhas de uva	Ampola
7	3 Chênes Articulations®	3 Chênes	NE	Associação	Gel
8	V-nal® Xtra®	Bional	Holanda	Associação	Cápsula
9	Vigne Rouge®	Sevene	França	Folhas de uva	Folhas secas para infusão e decocção
10	Vigne Rouge Hamamelis®	Biotechnie	NE	Associação	Ampola
11	Vigne Rouge®	Ortis	Bélgica	Associação	Cápsula
12	Vigne Rouge®	Bio Gelule	NE	Folhas de uva	Cápsula
13	Vigne Rouge Aromatisé au Ginkgo®	Dietaroma	França	Associação	Solução
13	Renfort Veineux®	Naturègè	França	Associação	Comprimido
13	Vigne Rouge®	Naturègè	França	Associação	Cápsula
14	Vigne Rouge®	Romon Nature	França	Folhas de uva	Cápsula
15	Vigne Rouge®	Boiron	França, EUA, Rússia	Folhas de uva	Cápsula
16	Bioviva - Vigne Rouge®	Pierre Caron	NE	Pó de folhas de uva	Cápsula
17	Les Infus'Océanes®	Thalgo	Distribuída em vários países nos 5 continentes (não tem no Brasil)	Associação	Sachê

NE: não encontrado

Referências

Os sites foram acessados no período de dezembro de 2007 a janeiro de 2008.

- 1) <http://www.drugstore.com/products/prod.asp?pid=181702&catid=25239&trx=PLST-0-CAT&trxp1=25239&trxp2=181702&trxp3=1&trxp4=0&btrx=BUY-PLST-0-CAT>
- 2) <http://www.herboristerie.com/herboristerie-fiche-produit.php?ID=2639&VID=>
- 3) http://www.healthspan.co.uk/anti_ageing/vein_vine_red_vine_leaf_extract_tablets_improve_our_circulation-c156p423.html
- 4) <http://www.twenga.fr/dir-Beaute-Sante,Phytotherapie,Phytotherapie-vigne-rouge>
- 5) <http://www.antistax.de/de/homepage.jsp>
- 6) http://www.nutrinow.net/advanced_search_result.php?keywords=3+Ch%EAnes+Circulation+&x=26&y=7
- 7) http://www.nutrinow.net/product_info.php?products_id=1197
- 8) http://www.limenatural.co.uk/prod6.asp?prod_id=8107&id=194&sub_cat=563&grpid=8107&msg=&offset=
- 9) <http://www.sevene.fr/infusions/produit.php?tis=26&lg=FR>
- 10) <http://www.precos.iol.pt/product/799741/>
- 11) <http://www.complement-naturel.com/vigne-rouge-regles-abondantes-ortis-0.htm>
- 12) http://www.biogelules.com/VIGNE_ROUGE.htm
- 13) http://www.sedubio.com/nutriment_vignette_vigne-rouge.php
- 14) <http://www.naturalia.fr/boutique/produit.asp?id=884&rayon=6&srayon=525>
- 15) <http://www.boiron.fr/htm/public/hemorroides-vigne-rouge.asp>
- 16) <http://www.pierre-caron.com/prod.php?pg=806&sessionv=GypGgH6Od3o0LpR0>
- 17) <http://www.skin-one.com/thalgo-light-legs-infusion.html>

Tabela A3: Colorações observadas para extratos das variedades Cabernet sauvignon e Couderc obtidos a partir de extração com diferentes solventes extratores aquosos em distintos pH.

Variedade	pH	acidificante *	
		ácido clorídrico	ácido cítrico
Cabernet sauvignon	1	vermelho intenso	vermelho intenso
	2	vermelho à rósea	vermelho intenso
	3	alaranjado escuro	Rósea
	4 a 7	alaranjado escuro	alaranjado escuro
Couderc	1	vermelho intenso	alaranjado/vermelho
	2	vermelho	alaranjado/vermelho claro
	3	alaranjado/vermelho	alaranjado claro
	4 a 7	alaranjado escuro	alaranjado

* adicionado em água ultrapura (Milli-Q® - Millipore), quando necessário, antes do procedimento de extração.

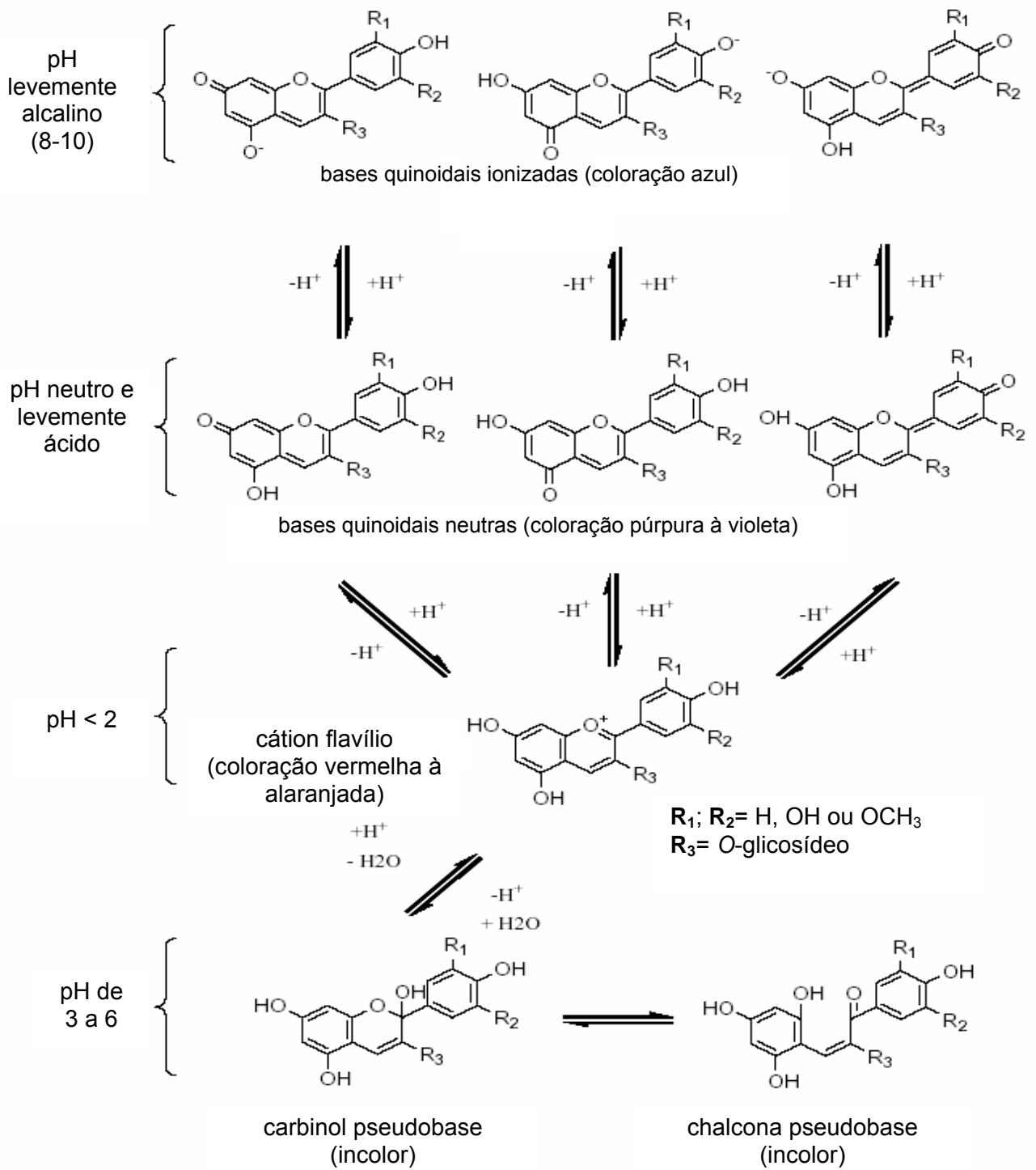
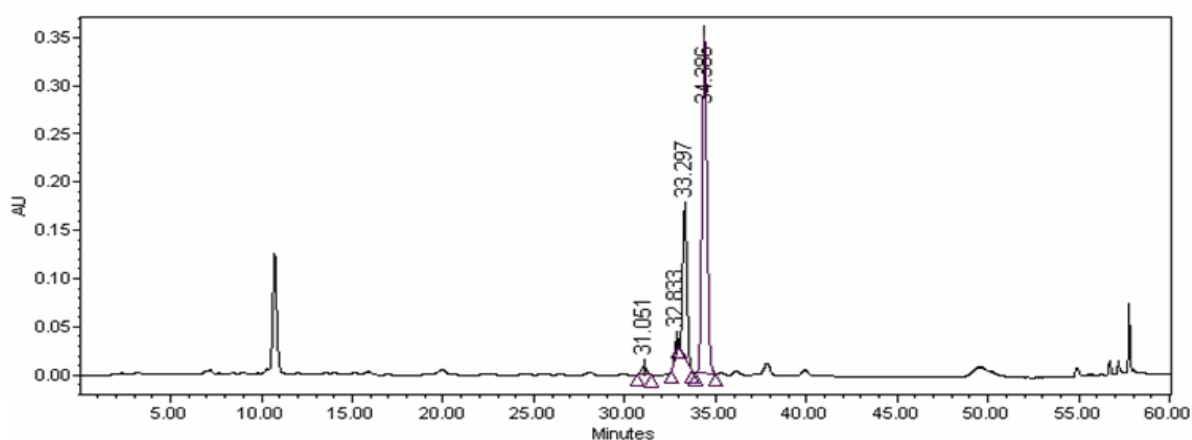


Figura A1: Conformações dos antocianos em solução aquosa sob variação de pH (Adaptado de Brouillard (1988) por He (2004)).

Co-injeções para análise dos flavonóides

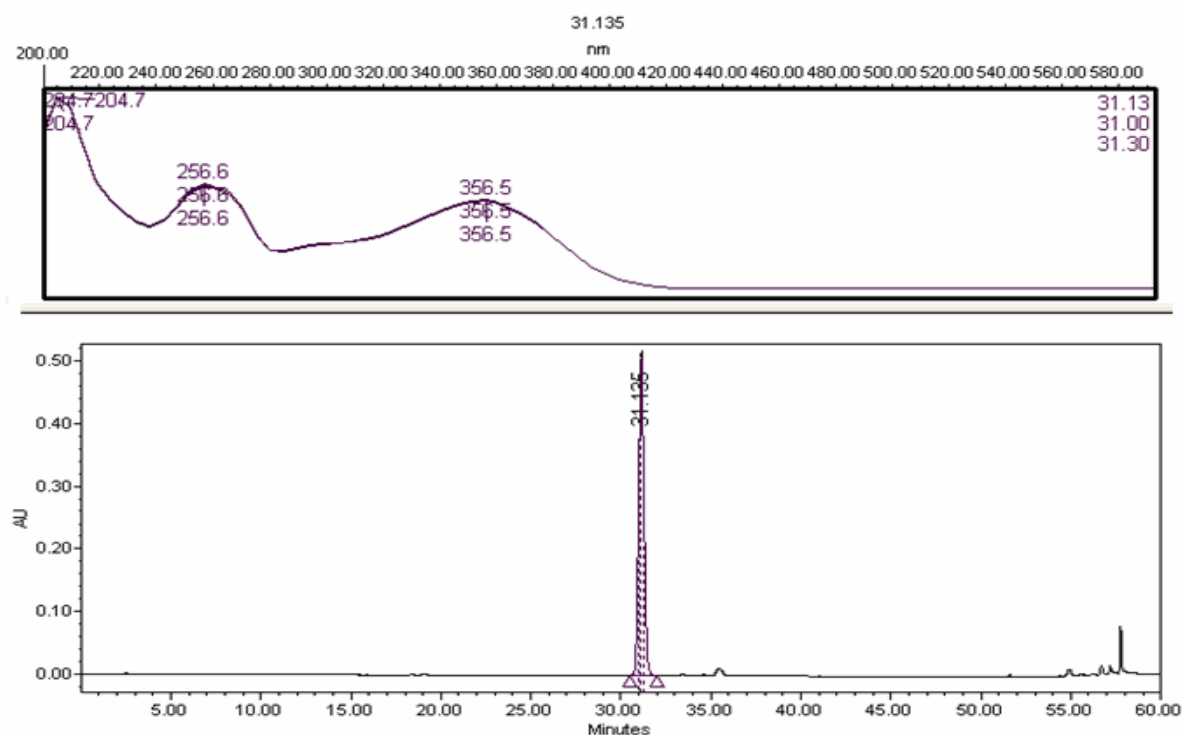
Para realização das co-injeções foram injetadas previamente somente a amostra e os padrões rutina, hiperosídeo e isoquercitrina, verificando-se as áreas e calculando-se as diluições para que amostra e padrões tivessem áreas aproximadas no caso do hiperosídeo e isoquercitrina, a fim de verificar a sobreposição dos picos, monitoraram-se também os tempos de retenção e análise dos espectros.

Amostra:

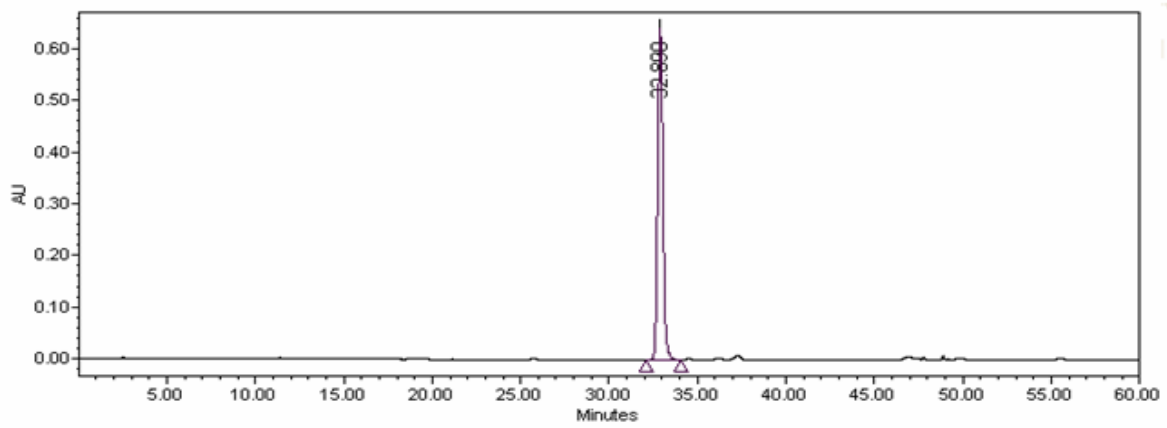
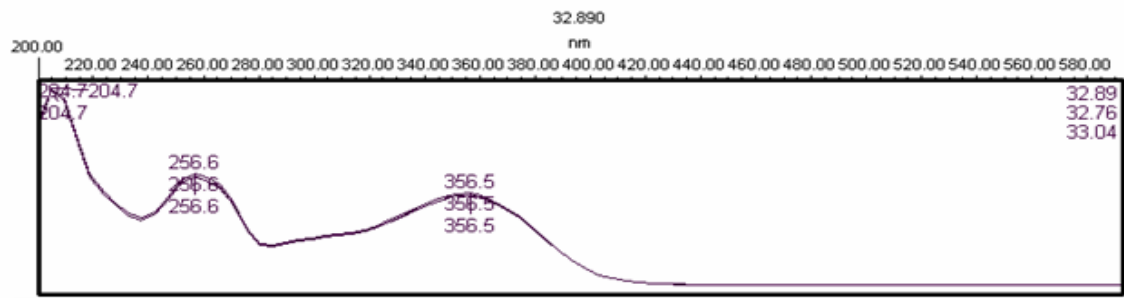


Padrões:

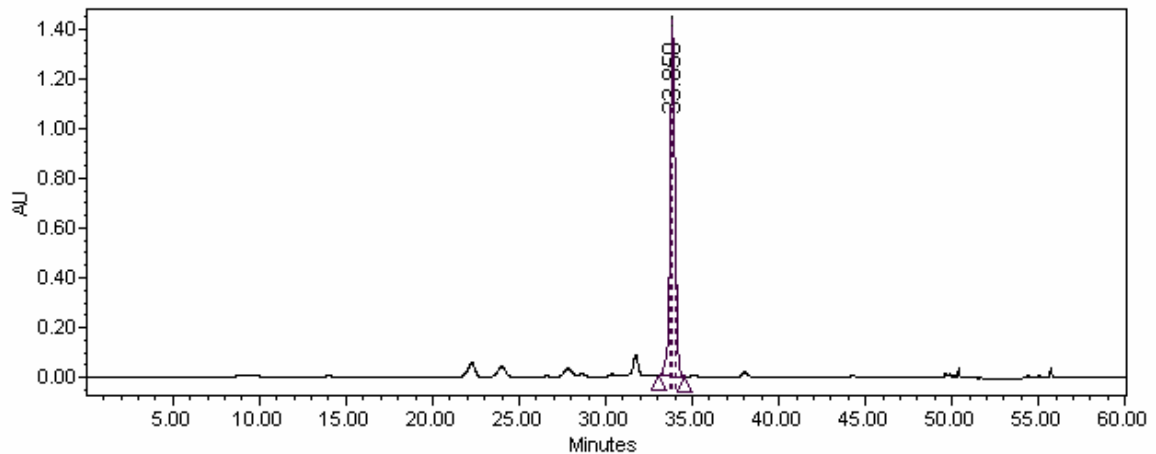
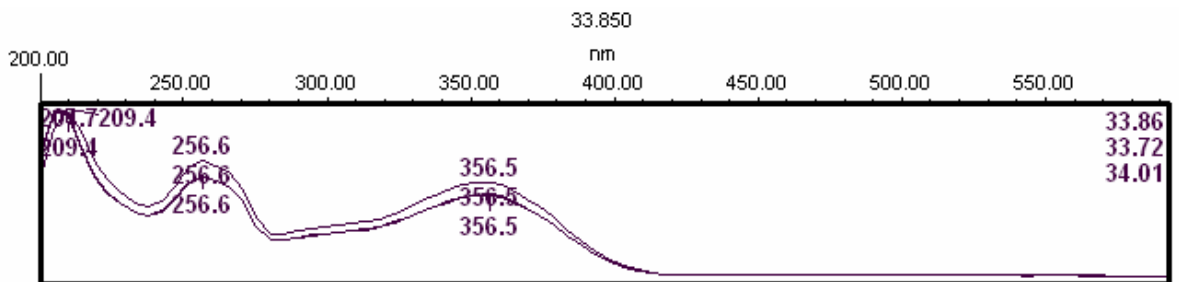
Rutina



Hiperosídeo

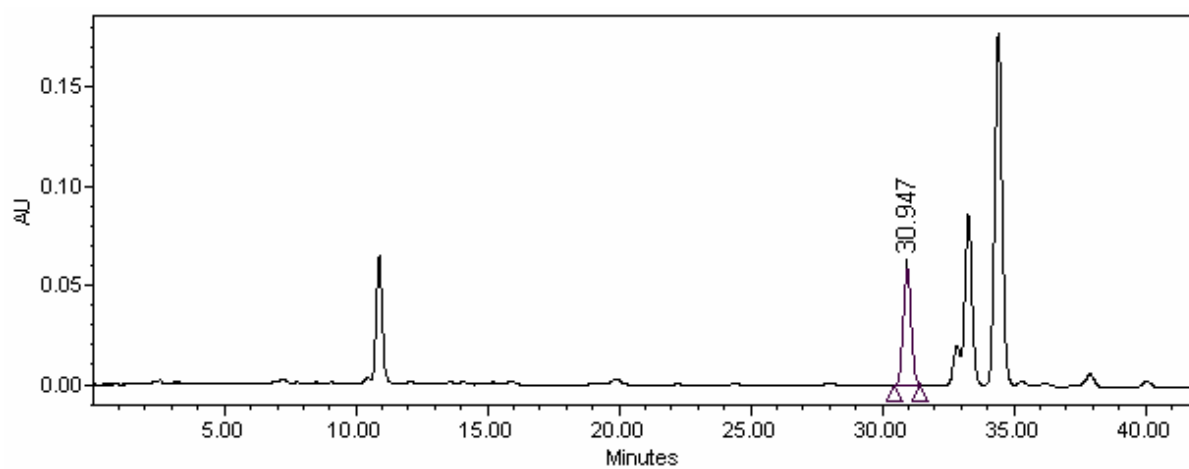


Isoquercitrina

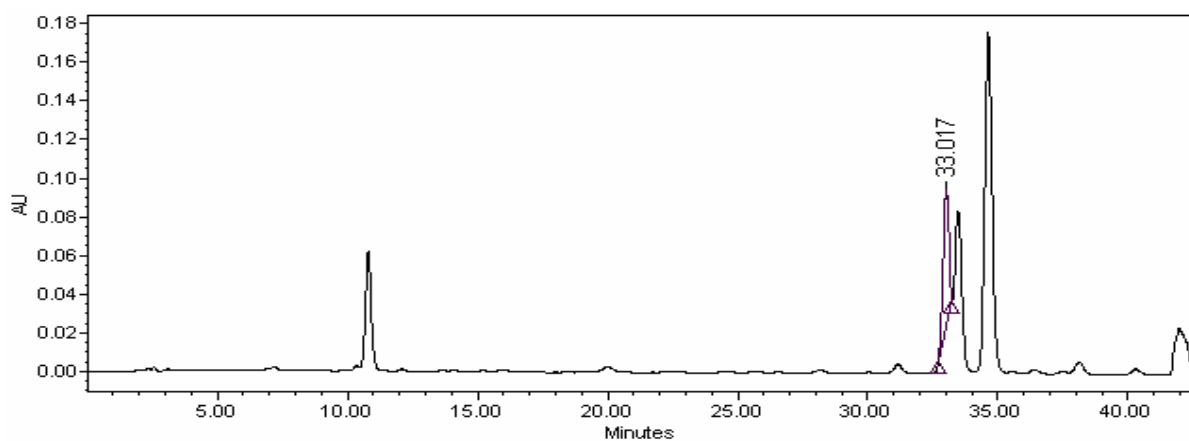


Co-injeções, em 356 nm:

Amostra + rutina



Amostra + hiperosídeo



Amostra + isoquercitrina

