

EUGÊNIA ABRANTES DE FIGUEIREDO

**APLICAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA O ESTUDO
QUÍMICO DA FRAÇÃO ACETATO DO VINHO TINTO SYRAH DO VALE DO
SÃO FRANCISCO E ESTUDO DA SUA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-
HIPERTENSIVA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

JOÃO PESSOA

2017

EUGÊNIA ABRANTES DE FIGUEIREDO

**APLICAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA O ESTUDO
QUÍMICO DA FRAÇÃO ACETATO DO VINHO TINTO SYRAH DO VALE DO
SÃO FRANCISCO E ESTUDO DA SUA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-
HIPERTENSIVA**

Tese apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do Grau de Doutor.

Área de concentração: Farmacoquímica

Orientador: Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

Co-Orientador: Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga

JOÃO PESSOA

2017

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F475a Figueiredo, Eugenia Abrantes de.

APLICAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA O ESTUDO QUÍMICO DA FRAÇÃO ACETATO DO VINHO TINTO SYRAH DO VALE DO SÃO FRANCISCO E ESTUDO DA SUA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-HIPERTENSIVA / Eugenia Abrantes de Figueiredo. - João Pessoa, 2018.

151 f. : il.

Orientação: Eduardo de Jesus Oliveira.

Coorientação: Valdir de Andrade Braga.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. vinho, fenólicos, hipertensão. I. Oliveira, Eduardo de Jesus. II. Braga, Valdir de Andrade. III. Título.

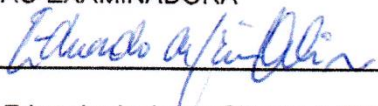
UFPB/BC

EUGÊNIA ABRANTES DE FIGUEIREDO

**APLICAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA O ESTUDO
QUÍMICO DA FRAÇÃO ACETATO DO VINHO TINTO SYRAH DO VALE DO
SÃO FRANCISCO E ESTUDO DA SUA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-
HIPERTENSIVA**

Aprovada em: 20 / 02 / 2017

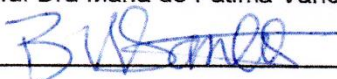
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira (UFPB - Orientador)

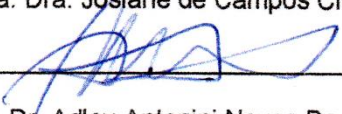
Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga (UFPB – Coorientador)

Profa. Dra Maria de Fátima Vanderlei de Souza (UFPB – Avaliador interno)



Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos (UFPB – Avaliador interno)

Profa. Dra. Josiane de Campos Cruz (UFPB – Avaliador externo)



Prof. Dr. Adley Antonini Neves De Lima (UFRN – Avaliador externo)

Aos meus pais Afonso Eugênio de Figueiredo e Francisca das Chagas Abrantes de Figueiredo que me deram a vida, ensinaram a vivê-la com dignidade, sempre incentivando minha educação e formação profissional.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Em princípio agradeço a Deus, por guiar meus passos e abençoar essa longa jornada, jamais permitindo o desestímulo perante os obstáculos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pelos ensinamentos recebidos e pela oportunidade de me tornar uma profissional habilitada, aumentando minhas perspectivas profissionais.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira pela confiança, competência, atenção e disponibilidade, me ajudando a aprimorar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga pela co-orientação e auxílio na realização deste trabalho.

A Coordenação da Pós-Graduação pela execução da parte burocrática deste trabalho e pela prestatividade.

Aos funcionários, pelo apoio técnico e colaboração com seus conhecimentos e experiências instrumentais. Em especial Nonato, Crispim e Clênia que não mediram esforços para auxiliar a execução deste trabalho.

A todos os colegas do laboratório Laconcha pela convivência, troca de experiências e ensinamentos. Principalmente a Naiane e Matheus pela participação direta no desenvolvimento deste trabalho.

A Karliene por sua ajuda durante a fase inicial desse estudo.

A Prof^a. Dr^a Tânia Sarmento pela colaboração na realização de alguns experimentos.

A Telma Guedes pela disponibilidade e prontidão em ajudar com os experimentos de Espectrometria de Massas.

A todos os meus colegas da pós-graduação e a todos aqueles que cruzaram o meu caminho durante essa jornada, amigos, que de alguma forma colaboraram para essa conquista, pelo companheirismo, pela solidariedade nas horas difíceis, e momentos de descontração.

A Natália, Kívia e Priscila pela amizade e ajuda nos momentos mais críticos.

As minhas irmãs Inara e Mariana pelo afeto, carinho e apoio para vencer as dificuldades encontradas.

A todos os meus familiares pelo amor e incentivo.

A Ayala, Lídia, Aline e Ingrid pela amizade construída, pela companhia e colaboração durante as longas jornadas de trabalho, pelo apoio e torcida mesmo depois de distantes.

A Israel pelo companheirismo, cumplicidade e paciência, me auxiliando nos momentos mais difíceis.

*“A leitura é uma fonte inesgotável de
prazer, mas por incrível que pareça, a
quase totalidade, não sente esta sede”.*

(Carlos Drummond de Andrade)

RESUMO

O vinho, bebida obtida a partir do processo de fermentação da uva, apresenta altos níveis de polifenóis que incluem os flavonoides, e os não flavonoides. Estudos epidemiológicos têm demonstrado a associação entre o consumo de alimentos e bebidas ricos em compostos fenólicos e a redução do risco de doenças cardiovasculares. A hipertensão é o maior fator de risco para doenças cardiovasculares. Dentre os fatores associados ao desenvolvimento da hipertensão, uma questão extremamente importante e atual é a participação de espécies reativas de oxigênio (ERO) em sua patogênese. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi investigar o efeito antioxidante e anti-hipertensivo de uma fração oriunda de vinho tinto Syrah da região do Vale do São Francisco, com composição química definida e elevado teor de polifenóis, em ratos espontaneamente hipertensos. O vinho foi particionado com AcOEt em diferentes pHs obtendo-se três frações. O teor de fenólicos totais no vinho e frações foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e expresso como miligramas de equivalente de ácido gálico por litro ou grama de extrato (mg EAG/L; mg EAG/g). A atividade antiradicalar foi avaliada utilizando o radical DPPH (com ácido ascórbico como controle positivo) e Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (CAET) ou teste do ABTS^{•+} (com Trolox como controle positivo). Utilizou-se o método do pH diferencial para determinação de antocianinas monoméricas. A análise do perfil cromatográfico e quantificação de quercetina e *trans*-resveratrol foi realizada através de CLAE-UV e UPLC-MS/MS foi utilizada para identificação dos compostos presentes na fração acetato pH 7 (FrAcOEt SyVSF). Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (n=32) foram divididos em 4 grupos: SHR+ salina (n=8); SHR + FrAcOEt pH 7 SyRe VSF (50 mg/Kg) (n=8); SHR+ salina (n=8); SHR + FrAcOEt pH 7 SyRe VSF (100 mg/Kg) (n=8) e tratados com as respectivas doses diárias v.o. por gavagem, durante quinze dias. Um dia após a canulação a pressão sanguínea e a frequência cardíaca foram registradas e o barorreflexo estimulado. O estresse oxidativo foi mensurado via peroxidação lipídica (TBARS). Foram realizados experimentos em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato normotenso para avaliar o efeito vasorelaxante da FrAcOEt pH 7 SyRe VSF. A FrAcOEt pH 7 SyRe VSF revelou o maior teor de fenólicos totais (58,45±0,01 mg EAG/g) e antocianinas monoméricas (4,99±0,019 mg/L) em relação a outras frações, além disso apresentou a melhor atividade antioxidante frente aos radicais DPPH e ABTS. Os teores de quercetina e *trans*-resveratrol na FrAcOEt pH 7 SyRe VSF foram respectivamente: 8,56±0,078 e 1,11±0,009 µg/mL. A análise por UPLC/MS da FrAcOEt pH 7 SyRe VSF permitiu a identificação de 13 compostos, entre eles ácidos fenólicos e flavonoides de diversas classes. O tratamento dos animais com a FrAcOEt pH 7 SyRe VSF em ambas as doses 50 mg/Kg e 100 mg/Kg reduziu significativamente a pressão arterial quando comparado ao grupo controle (146,1 ± 4.062 n=7 vs 159,0 ± 3,891 n=7, respectivamente) e (126,5 ± 5,322 n=8 vs 150.0 ± 3.039 n=7, respectivamente) para as doses de 50 e 100mg/Kg respectivamente. Apenas a dose de 100 mg/Kg foi capaz de diminuir significativamente a frequência cardíaca comparando com o grupo controle (314,6 ± 9,507 n=8 vs 358,6 ± 15,00 n=7, respectivamente) e a peroxidação lipídica (0,9250 nmol/L ± 0,1750 n=4 vs 2,180 nmol/L ± 0,3891 n=5, respectivamente). Não foi observado melhora na sensibilidade do barorreflexo em nenhuma das doses. A adição cumulativa da FrAcOEt pH 7 SyRe VSF foi capaz de induzir vasorelaxamento independente de endotélio, uma vez que apresentou E_{max}= 103,7 ± 9,9 % n=7 na presença do endotélio e E_{max}= 105,6 ± 5,9% n=6 na ausência do mesmo. Desse modo, tais resultados ressaltam a eficácia do processo de extração e sugerem que a FrAcOEt pH 7 SyRe VSF induz um efeito anti-hipertensivo *in vivo* e que este efeito pode estar relacionado com o conteúdo de compostos fenólicos presentes na fração; mesmo que, provavelmente alguns polifenóis presentes no vinho e importantes para o efeitos biológicos verificados tenham ficado concentrados nas outras frações não avaliadas neste estudo. Além disso a atividade *in vitro* observada para a FrAcOEt pH 7 SyRe VSF, induzindo efeito vasorelaxante independente do endotélio vascular, provavelmente envolve o bloqueio de canais para cálcio e abertura de canais para potássio. Palavras – chaves: vinho, fenólicos, hipertensão

ABSTRACT

Wine has high levels of polyphenols which include both flavonoids and non-flavonoids. Epidemiological studies have demonstrated an association between the consumption of phenolics rich food and beverages and reduce risk of cardiovascular diseases. Hypertension is a major risk factor for cardiovascular disease. Among the factors associated with the development of hypertension, an extremely important and current issue is the participation of reactive oxygen species (ROS) in its pathogenesis. Thus, the aim of this study was to investigate the antioxidant and anti-hypertensive effect of a rich phenolic fraction derived from red wine (Syrah from the São Francisco Valley region), in spontaneously hypertensive rats. The wine was partitioned with EtOAc at different pHs yielding three fractions. The total phenolic content of wine and fractions was determined by the Folin-Ciocalteu method and expressed as milligrams of gallic acid equivalent per liter or per extract gram of extract (mg GAE/L; mg GAE/g). The antiradicalar activity was determined using the DPPH (with ascorbic acid as positive control), the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) or the ABTS^{•+} test (with Trolox as a positive control). The determination of monomeric anthocyanins was carried out by the differential pH method. The chromatographic profile and the determination and quantification of quercetin and *trans*-resveratrol was performed by HPLC-UV. Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled with Electrospray Ionization High resolution Time of Flight Mass Spectrometry (UPLC-ESI-TOF) was used to identify the compounds present in pH 7 acetate fraction (FrAcOEt SyRe VSF). Spontaneously hypertensive rats (SHR) were divided into 4 groups (n=32): SHR + saline (n = 8); SHR + FrAcOEt pH 7 Syre ESV (50 mg/kg) (n = 8); SHR + saline (n = 8); SHR + FrAcOEt pH 7 Syre ESV (100 mg/kg) (n = 8) and treated with the respective daily doses V.O. by gavage for two weeks. 24h after cannulation blood pressure, heart rate were recorded and baroreflex stimulated. Oxidative stress was measured via lipid peroxidation (TBARS). Superior mesenteric artery rings isolated from normotensive rats were used to evaluate the vasorelaxant effect of FrAcOEt pH 7 SyRe VSF. The FrAcOEt pH 7 SyRe VSF had the largest total phenolic content (58.45 ± 0.01 mg GAE/g) and monomeric anthocyanins (4.99 ± 0.019 mg/L) compared to other fractions. In addition it showed the best antioxidant activity against the DPPH and ABTS radical. The quercetin content and *trans*-resveratrol in FrAcOEt pH 7 SyRe VSF were respectively: 8.56 ± 0.078 and 1.11 ± 0.009 mg/mL. The UPLC/MS analysis of FrAcOEt pH 7 SyRe VSF allowed the identification of 13 compounds, including phenolic acids and flavonoids of various classes. Treatment of animals with FrAcOEt pH 7 SyRe VSF at 50 mg/kg and 100 mg/kg significantly reduced blood pressure when compared to the control group (146.1 ± 4.062 n = 7 vs 159.0 ± 3.891 n = 7, respectively) and (126.5 ± 5.322 n = 8 3.039 ± 150.0 vs. n = 7, respectively). Only at 100 mg/kg the fraction was able to significantly decrease the heart rate compared to the control group (314.6 ± 9.507 n = 8, 358.6 ± 15.00 n = 7, respectively) and to decrease lipid peroxidation (0.9250 nmol/L ± 0.1750 n = 4 vs. 2.180 nmol/L ± 0.3891 n = 5, respectively). There was no improvement in baroreflex sensitivity in neither dose. The cumulative addition of FrAcOEt pH 7 SyRe VSF caused vasorelaxation independent on the presence of vascular endothelium, with $E_{max} = 103.7 \pm 9.9\%$ n = 7 in the presence of endothelium and $E_{max} = 105.6 \pm 5.9\%$ n = 6 in the absence of endothelium. Thus, such results highlight the efficacy of the extraction process and suggest that FrAcOEt pH 7 SyRe VSF induces an *in vivo* antihypertensive effect and that this effect may be related to the content of phenolic compounds present in the fraction, even though probably some polyphenols present in wine and important for the biological effects observed here were concentrated in the other fractions not evaluated in this study. In addition, the *in vitro* activity observed for FrAcOEt pH 7 SyRe VSF, inducing vasorelaxant effect independent of vascular endothelium, probably involves calcium channel blockade and potassium channel opening. Key - words: wine, phenolics, hypertension

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Uva Syrah	25
Figura 2: Região Vitivinícola do Vale do São Francisco	26
Figura 3: Rota biossintética dos compostos fenólicos	28
Figura 4: Estrutura química dos principais compostos fenólicos presentes nos vinhos	30
Figura 5: Estruturas da Forma do Oxônio (Colorido) e da Forma do Hemicetal (Descolorido) para as antocianinas	58
Figura 6: Condição de eluição para determinação do perfil cromatográfico do vinho tinto SyRe e da FrAcOEt pH7 VSF	62
Figura 7: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do vasorrelaxamento induzido pela FrAcOEt pH7 VSF em artéria mesentérica superior de rato.....	67
Figura 8: Perfil Cromatográfico do vinho tinto SyRe VFS	96
Figura 9: Perfil Cromatográfico da FrAcOEt pH 7 obtida do fracionamento do vinho tinto Syrah Rendeiras do Vale do São Francisco	96
Figura 10: Cromatograma representativo da injeção do vinho tinto SyRe VSF eluídos em modo isocrático com ACN:H ₂ O + ácido fórmico (35:65%) em 12 minutos (A). Região dos picos dos padrões ampliada (B)	97
Figura 11: Cromatograma representativo da análise por LC/MS, 320 nm da FrAcOEt pH 7 SyRe VSF em modo negativo	100
Figura 12: Espectro de massas (UPLC/MS) dos íons m/z 169,0144 (A); 163,0399 (B) – ácido gálico e ácido p-cumárico.....	103
Figura 13: Espectro de massas (UPLC/MS) do íon 179,0346 – ácido cafeico (A). Proposta de fragmentação para o ácido cafeico (B)	104
Figura 14: Espectro de massas (UPLC/MS) dos íons 289,0706 (A) e 289,0710 (B) – catequina e epicatequina.....	105
Figura 15: Proposta de fragmentação para a (±)-catequina ou (±)-epicatequina	105
Figura 16: Espectro de massas (UPLC/MS) do íon 739,1648 – cianidina 3-glicosídeo (epi)catequina (A) e proposta de fragmentação para a cianidina 3-glicosídeo (epi)catequina (B).....	107

Figura 17: Espectro de massas (UPLC/MS) do íon m/z 479,0822 – miricetina-3-O-β-Dgalactopiranosídeo.	108
Figura 18: Espectro de massas (UPLC/MS) dos íons 463,0852 (A) e 449,1067 (B) – quercetina 3-o-glicosídeo e astilbina.	109
Figura 19: Proposta de fragmentação da quercetina 3-o-glicosídeo (A) e astilbina (B).	110
Figura 20: Espectro de massas (UPLC/MS) dos íons 301,0344 (A) e 285,0403 (B) – quercetina e luteolina.	111
Figura 21: Proposta de fragmentação para a quercetina Retro Diels Alder (RDA) (A) e por retrociclização da clivagem do anel-C (B).	112
Figura 22: Espectro de massas (UPLC/MS) dos íons 197,0453 e 191,0714 – ácido sirínigico e ácido quínico.	113
Figura 23: Traçado Representativo de um animal de cada grupo, ilustrando os níveis de Pressão Arterial Pulsátil (PAP, mmHg), Pressão Arterial Média (PAM, mmHg) e Frequência Cardíaca (FC, bpm), 50 mg/Kg (A) e 100 mg/Kg (B)	115
Figura 24: Efeito da FrAcOEt pH 7 SyRe VSF na PAM 50 mg/Kg (A) e 100 mg/Kg (B) e na FC 50 mg/Kg (C) e 100 mg/Kg (D)	116
Figura 25: Traçado representativo de um animal de cada grupo, ilustrando as mudanças na Pressão Arterial de Pulso (PAP, mmHg), Pressão Arterial Média (PAM, mmHg), e frequência cardíaca (FC, bpm) em resposta da fenilefrina (FEN 8 µg/kg – setas vazadas) e nitropussiato de sódio (NPS, 25 µg/kg – setas preenchidas), 50 mg/Kg (A) e 100 mg/Kg (B)	119
Figura 26: Ganho barorreflexo utilizando drogas vasoativas SHR + FrAcOEt SyRe VSF 50 mg/Kg(A) e SHR + FrAcOEt SyRe VSF 100 mg/Kg (B)	119
Figura 27: Peroxidação lipídica sérica dos grupos estudados.	121
Figura 28: Registros originais da resposta relaxante da FrAcOEt pH 7 SyRe VSF (0,01 – 1000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na presença (A) ou na ausência (B) do endotélio vascular.	123
Figura 29: Curvas concentração resposta da FrAcOEt pH 7 SyRe VSF (0,01- 1000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraindidos com fenilefrina (10 µM) na presença (●) e ausência de endotélio funcional (◻). Resultados estão expressos como média ± e.p.m.	124

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Representação esquemática do fracionamento do vinho tinto Syrah Rendeiras do Vale do São Francisco	54
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela1: Vinhos tintos analisados na triagem para determinação do teor de fenólicos.....	52
Tabela 2: Condições cromatográficas finais do método desenvolvido para quantificação do resveratrol (isômeros <i>cis</i> e <i>trans</i>) e quercetina	62
Tabela 3: Programa de eluição usado na análise por LC-MS	64
Tabela 4: Teor de Fenólicos totais dos vinhos analisados expressos em mg EAG/L	70
Tabela 5: Teor de fenólicos totais das frações do vinho tinto SyRe VSF expressos em mg EAG/100mg	72
Tabela 6: Teor de flavonois e flavonas totais dos vinhos analisados expressos em µg Eq QCT/mL	75
Tabela 7: Reação entre o Teor de flavonois e flavonas totais e o teor de fenólicos totais dos vinhos analisados	76
Tabela 8: Teor de flavonois totais para as frações do vinho SyRe VSF expressos em µg Eq QCT/100mg	77
Tabela 9: Teor de antocianinas monoméricas nas amostras de vinhos inteiros (mg/L)	78
Tabela 10: Teor de antocianinas monoméricas nas frações do vinho tinto SyRe VSF estudadas (mg/L)	79
Tabela 11: Atividade sequestradora de radical DPPH· para os vinhos analisados.....	80
Tabela 12: Atividade sequestradora de radical DPPH· para as frações do vinho SyRe VSF	83
Tabela 13: Atividade sequestradora de radical ABTS para os vinhos analisados	86
Tabela 14: Atividade sequestradora do radical ABTS para as frações do vinho SyRe VSF	88
Tabela 15: Análise fitoquímica do vinho tinto SyRe VSF e suas frações	93
Tabela 16: Teor de <i>trans</i> -resveratrol e quercetina	98
Tabela 17: Compostos fenólicos identificados na FrAcOEt pH 7 SyRe VSF. Análise por UPLC/MS	101

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Teor de Fenólicos totais dos vinhos analisados expressos em mg EAG/L.	71
Gráfico 2: Teor de fenólicos totais das frações do vinho tinto SyRe VSF expressos em mg EAG/100mg.	74
Gráfico 3: Teor de flavonóis e flavonas dos vinhos analisados expressos em μg Eq QCT/mL.	75
Gráfico 4: Teor de flavonóis totais nas frações analisados expressos em μg Eq QCT/mL.	77
Gráfico 5: Atividade sequestradora de radical DPPH $\cdot$ para os vinhos analisados.....	81
Gráfico 6: Correlação entre Fenólicos totais dos vinhos analisados e a CE_{50} obtida pelo método com DPPH como radical	82
Gráfico 7: Atividade sequestradora de radical DPPH $\cdot$ para as frações do vinho SyRe VSF	84
Gráfico 8: Correlação entre Fenólicos totais das frações do vinho SyRe VSF e a CE_{50} obtida pelo método com DPPH como radical	85
Gráfico 9: Atividade sequestradora de radical ABTS para os vinhos analisados	87
Gráfico 10: Correlação entre Fenólicos totais dos vinhos analisados e a CE_{50} obtida pelo método com ABTS como radical.....	88
Gráfico 11: Atividade sequestradora de radical ABTS para as frações do vinho SyRe VSF	89
Gráfico 12: Correlação entre Fenólicos totais da fração do vinho SyRe VSF e a CE_{50} obtida pelo método com ABTS como radical.....	90
Gráfico 13: Correlação entre a CE_{50} obtida pelo método com DPPH e ABTS como radical para os vinhos analisados.....	91
Gráfico 14: Correlação entre a CE_{50} obtida pelo método com DPPH e ABTS como radical para fração do vinho SyRe VSF	92

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS: 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
ACh: Acetilcolina
ACN: Acetonitrila
CAET: Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
CS SG: Vinho tinto Cabernet Sauvignon Serra Gaúcha
CS VSF: Vinho tinto Cabernet Sauvignon Vale do São Francisco
DAD: Detector com Arranjo de Diodos
DP: Desvio Padrão
DPPH·: 1,1-difenil-2-picril-hidrazila
EM: Espectrometria de massas
E.P.M.: Erro Padrão da Média
EAG: Equivalente de ácido gálico
Emáx: Efeito máximo
E⁺: Presença de Endotélio funcional
E⁻: Ausência de Endotélio funcional
EROs: Espécies reativas de oxigênio
FC: Frequência cardíaca
FEN: Fenilefrina
Fração Aquosa SyRe VSF: Fração Aquosa do Vinho tinto Syrah Rendeiras Vale do São Francisco
FrAcOEt pH 2 SyRe VSF: Fração acetato pH 2 do Vinho tinto Syrah Rendeiras Vale do São Francisco
FrAcOEt pH 7 SyRe VSF: Fração acetato pH 7 do Vinho tinto Syrah Rendeiras Vale do São Francisco
LC: Cromatografia Líquida
MDA: Malonaldeído
MeOH: Metanol
NPS: nitroprussiato de sódio
PAM: Pressão arterial média

qTOF: quadrupole/time of flight (analisador de massas por tempo de voo do tipo quadrupolo)

SG: Serra Gaúcha

SHR: Ratos espontaneamente hipertensos

Sy Chile: Vinho tinto Syrah Chile

SyRe VSF: Vinho tinto Syrah Rendeiras Vale do São Francisco

SyRS VSF: Vinho tinto Syrah Rio Sol Vale do São Francisco

Ta SG: Vinho tinto Tannat Serra Gaúcha

Trolox: Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

UV-Vis: Ultravioleta-Visível

VSF: Vale do São Francisco

λ : comprimento de onda

Sumário

1	INTRODUÇÃO	21
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
2.1	Uva.....	24
2.2	Vinhos do Vale do São Francisco	25
2.3	Compostos fenólicos	28
2.4	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas	33
2.5	Estresse Oxidativo e Hipertensão.....	37
2.6	Antioxidantes	42
2.7	Efeitos dos compostos fenólicos do vinho tinto sobre o sistema cardiovascular	44
3	OBJETIVOS	50
3.1	Objetivo Geral.....	50
3.2	Objetivos Específicos	50
4	METODOLOGIA	52
4.1	Caracterização Química	52
4.1.1	Aquisição e Preparação das amostras de vinho	52
4.1.2	Triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários ...	55
4.1.2.1	Pesquisa de alcaloides.....	55
4.1.2.2	Pesquisa de esteroides	55
4.1.2.3	Pesquisa de taninos	55
4.1.2.4	Pesquisa de flavonoides	56
4.1.2.5	Pesquisa de saponinas	56
4.1.3	Análises dos fenólicos totais dos vinhos e de suas frações.....	56
4.1.4	Análise dos flavonois e flavonas totais dos vinhos e de suas frações	57
4.1.5	Quantificação de Antocianinas Monoméricas	58
4.1.6	Avaliação da Atividade Sequestradora do Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH·)	59
4.1.7	Avaliação da Atividade Sequestradora do Radical ABTS·+.....	60

4.1.8 Estudo do perfil cromatográfico dos vinho tinto SyRe e FrAcOEt pH7 VSF utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Detector de Ultravioleta (CLAE-UV)	61
4.1.9 Processo de quantificação do resveratrol (isômero <i>trans</i>) e quercetina empregando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Detector de Ultravioleta (CLAE-UV)	62
4.1.10 Identificação de compostos fenólicos na FrAcOEt pH 7 SyRe VSF utilizando a técnica CL/EM	63
4.2 Ensaios Farmacológicos	64
4.2.1 Animais e Tratamento	64
4.2.3 Avaliação dos parâmetros cardiovasculares: pressão sanguínea e frequência cardíaca.....	65
4.2.4 Avaliação da Sensibilidade do Barorreflexo	66
4.2.5 Ensaios Farmacológicos in vitro	66
4.2.6 Avaliação das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	68
4.2.7 Análise Estatística	68
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1 Análises dos fenólicos totais dos vinhos e de suas frações	70
5.2 Análise dos flavonóis e flavonas totais dos vinhos e de suas frações	74
5.3 Quantificação de Antocianinas Monoméricas	78
5.4 Avaliação da Atividade Sequestradora do Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH·)	80
5.5 Avaliação da Atividade Sequestradora do Radical ABTS·+	85
5.6 Triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários...	92
5.7 Perfil cromatográfico do vinho tinto SyRe VSF e fração FrAcOEt pH 7 utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Detector de Ultravioleta (CLAE-UV)	94
5.8 Quantificação do resveratrol (isômero <i>trans</i>) e quercetina empregando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Detector de Ultravioleta (CLAE-UV)	97
5.9 Identificação de compostos fenólicos na FrAcOEt pH 7 SyRe VSF utilizando a técnica LC/MS	99
5.10 Avaliação dos parâmetros cardiovasculares: pressão sanguínea e frequência cardíaca.....	114

5.11	Avaliação da Sensibilidade do Barorreflexo	118
5.12	Avaliação das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	120
5.13	Ensaio Farmacológico in vitro	122
6	CONCLUSÕES	128
7	PERSPECTIVAS	131
8	REFERÊNCIAS	133

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O vinho, presente na história da humanidade desde seus primórdios, além de bebida tradicional, tem despertado a curiosidade científica em todo o mundo. O interesse crescente em estudar bebidas derivadas da uva, como o vinho tinto, por exemplo, é sobretudo devido a presença de componentes que exercem efeitos benéficos para a saúde do consumidor desde que ingeridos em doses fisiologicamente equilibradas. Um desses efeitos benéficos é a capacidade de neutralização de espécies químicas consideradas oxidantes, ou seja, a atividade antioxidante, além das propriedades: cardioprotetora, antiinflamatória, anticancerígena, antiviral e antibacteriana (RODRIGUES, 2011).

Dentre os diversos constituintes do vinho tinto, os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela sua coloração, sabor e atividades biológicas. Esses compostos incluem as antocianinas, os flavonoides, os ácidos fenólicos e os taninos. Os elementos constituintes do vinho são o resultado das substâncias presentes na uva, bem como da fermentação alcoólica. As características de um vinho estão, portanto, dependentes da casta utilizada na elaboração, da qualidade da vindima, condições ambientais e também, em menor grau, das técnicas de vinificação ou estágio, aplicadas na transformação do mosto em vinho (LINS & SARTORI, 2014).

Desde seu início até meados da década de 80, a vitivinicultura no Brasil, se concentrava na região Sul do país, porém outras regiões vêm se desenvolvendo nos últimos anos. O Vale do São Francisco representa atualmente a segunda maior região produtora de vinhos finos do Brasil, representando 15% do mercado nacional; e este processo de expansão está ligado a fatores determinantes peculiares da localização geográfica do Vale, com clima e temperatura que favorecem a colheita de duas a três safras anualmente. Essas características contribuem para produção de vinhos diferenciados em relação ao restante do país e mundo em termos de cor, sabor, aroma e composição química (PEREIRA, 2016).

O nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo da composição em polifenóis dos vinhos desta região. Nascimento (Nascimento, 2010) analisou e comparou o teor de fenólicos totais dos vinhos brasileiros das

regiões Sul e do Vale do São Francisco com vinhos importados e observou que os valores encontrados nos teores de fenólicos totais para os vinhos brasileiros foram similares ou superiores aos importados, sendo o vinho (variedade Syrah) oriundo da região do Vale São Francisco o que apresentou maior teor de fenólicos totais. Em outro estudo do nosso grupo, Lucena, 2008 avaliou a atividade antioxidante e a composição em compostos fenólicos de vinhos tintos da região do Vale do São Francisco e observou que as frações obtidas do extrato acetato de etila em pH 7 de todas as amostras estudadas, especialmente as variedades Tannat e Syrah, foram as mais ricas em compostos fenólicos e também foram as que apresentaram maiores atividades antioxidantes tanto frente ao radical livre DPPH· quanto frente ao radical livre ABTS·+ (LUCENA, 2008).

O oxigênio molecular e seus radicais são os reagentes mais importantes na bioquímica dos radicais livres das células aeróbicas. Um desequilíbrio na geração desses radicais, seja pelo excesso de sua produção ou por uma falha nos mecanismos de defesa antioxidantes endógenos, leva ao estresse oxidativo. Existem fortes indícios de que o estresse oxidativo possui implicações relevantes em muitas patologias, incluindo inflamação crônica, problemas respiratórios, carcinogênese, *Diabetes mellitus*, arteriosclerose e doenças cardiovasculares (BARBOSA *et al.*, 2010).

A hipertensão arterial é considerada um dos principais fatores de risco para a morbidade e mortalidade cardiovascular. Uma questão extremamente importante, complexa e atual é a participação do estresse oxidativo em sua patogênese (PARAVACINI & TOUYZ, 2008). Neste ponto, a busca por avanços no conhecimento da doença tem provido novos caminhos como estratégias terapêuticas, sendo assim a identificação de fontes com alta capacidade antioxidante é de extrema importância. Antioxidantes naturais, incluindo compostos fenólicos do vinho tinto, podem ser substâncias promissoras na prevenção, tratamento e/ou controle da doença.

Dessa forma, esta pesquisa visou caracterizar quimicamente uma fração retirada de um vinho tinto com elevada capacidade antioxidante e teor de fenólicos totais e ao mesmo tempo investigar seu possível efeito vasorelaxante e anti-hipertensivo.

Fundamentação Teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Uva

A uva é o fruto da videira (*Vitis sp.*), que é uma espécie vegetal bastante conhecida desde a antiguidade e pertencente a família *Vitaceae*, constituída de 12 gêneros e cerca de 800 espécies e habitam nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (JACKSON, 2008; SOUZA & LORENZI, 2005).

Algumas dessas espécies são utilizadas no paisagismo como as pertencentes ao gênero *Cissus*, *Parthenocissus* e *Vitis*, sendo apenas o gênero *Cissus* nativo do Brasil, com aproximadamente 42 espécies (NAVARRO, 2009). Entretanto, o principal representante dessa família, é o gênero *Vitis* cuja espécie mais cultivada é a *Vitis vinifera* originária da Europa. Sua importância reside na utilização da uva na produção de sucos, vinhos, uvas passas, geléias, podendo ainda ser consumida *in natura* (GRIS, 2010; SILVA, 2010).

A uva (*Vitis vinifera* L.) caracteriza-se por ser uma espécie vegetal trepadeira lenhosa e de porte arbustivo, com gavinhas, folhas alternas e pecioladas, cordiformes, com cinco lóbulos sinuados dentados, glabras na parte superior e tomentosas na parte inferior. Suas flores são pequenas e de cor branco esverdeada, dispostas em ráculos. Os frutos são bagas reunidas em cachos, contendo sementes, que variam de cor de acordo com o tipo de uva (RAVEN *et al.*, 2001).

No mundo há milhares de variedades de uva. As primeiras variedades foram introduzidas no Brasil pelos portugueses, especialmente variedades destinadas à elaboração de vinhos. No que se refere à produção, as uvas são classificadas em:

- 1) uvas de mesa, destinadas ao consumo *in natura* ou elaboração de sucos, como por exemplo: uva Isabel, Bordô, Niágara (brancas e rosadas)
- 2) *Vitis vinífera* direcionadas a vinicultura. Exemplos: *Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, *Tannat*, *Syrah*

A variedade Syrah (figura 1) se destaca, visto que é uma das mais antigas castas cultivadas e por ser atualmente uma das variedades tintas mais plantadas no mundo. É uma casta muito vigorosa e produtiva, porém possui

alta sensibilidade a podridões do cacho, dificultando assim o cultivo nas condições ambientais da Serra Gaúcha. Contudo, tem mostrado ótimo desempenho na região nas condições semiáridas do Nordeste (RITSCHER *et al.*, 2010; SILVA, 2010).

Figura 1: Uva Syrah



Fonte: vinhodobom.com.br

2.2 Vinhos do Vale do São Francisco

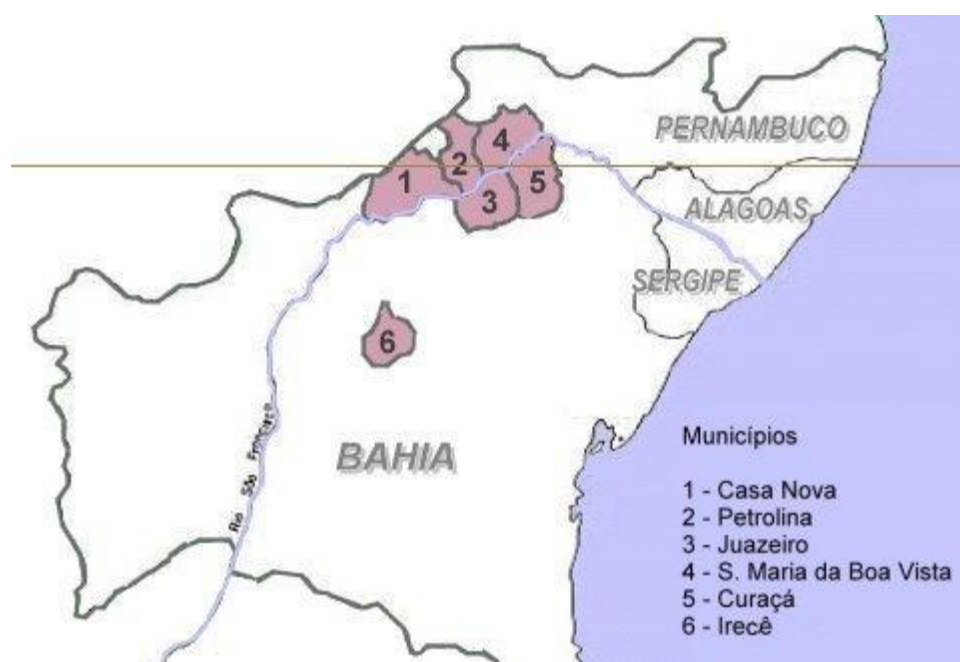
O vinho é legalmente definido como uma “bebida obtida a partir do processo de fermentação alcoólica completa ou parcial da uva fresca, esmagada ou não, ou do mosto simples ou virgem, com um conteúdo alcoólico adquirido mínimo de 7% (v/v a 20 °C)” (BRASIL, 1988). Estima-se que 80% da produção mundial de uvas sejam destinadas ao processamento para a obtenção de vinhos, sucos e derivados (KAMERER *et al.*, 2004).

Não é possível estabelecer com exatidão a época e o local que o vinho foi feito pela primeira vez, contudo há registros arqueológicos que datam de 7.500 anos a.C. Evidências encontradas na Geórgia datadas da idade da pedra sugerem que esses são os primeiros indícios de viticultura (JOHNSON, 1989; JACKSON, 2008). De acordo com especialistas em vinho, o surgimento da bebida foi uma casualidade, após o esquecimento de uvas amassadas em um recipiente que sofreram fermentação depois de certo tempo (ARSEGO, 2004; DANTAS, 2016).

No Brasil, a produção de vinhos se desenvolveu com a chegada dos imigrantes italianos no século XIX que iniciaram a fabricação da bebida (LIMA, 2012). Durante muitos anos a produção vitivinícola no país se concentrou no estado do Rio Grande do Sul tendo como principal polo produtor a “Serra Gaúcha”. Há algum tempo, porém, outras regiões vitivinícolas se desenvolveram, entre estas, a região do Vale do São Francisco (LUCENA, 2008).

Situado no nordeste brasileiro entre os estados de Pernambuco e Bahia, numa latitude até então impensável para o mundo do vinho (8 a 9°S) e longitude 40° W, o Vale do São Francisco (VSF) caminha para ser um dos importantes produtores vitivinícolas do país e desperta a curiosidade mundial (LIMA *et al.*, 2014) (figura 2). Das sete empresas do polo vitivinícola do Vale do São Francisco, a Vinícola Vinibrasil, situada em Lagoa Grande, destaca-se por participar do polo produtor desde 2002. As marcas Paralelo 8, e os espumantes Rio Sol são carro-chefe entre os rótulos da indústria. A empresa disponibiliza ainda para o mercado as marcas Adega do Vale, Vinhamaria, o frisante Bliss e o tinto Rendeiras, sendo este objeto de estudo deste trabalho (CODEVASF, 2014).

Figura 2. Região Vitivinícola do Vale do São Francisco.



Fonte: academiadovinho.com.br

Uma importante diferença entre a viticultura praticada no VSF e de outras regiões tradicionais do mundo é que no VSF cada videira pode produzir duas safras por ano. Isto porque, essa região possui um clima semiárido tropical com temperaturas elevadas (média anual 26 ° C), alta luminosidade, água abundante para irrigação garantida por um sistema controlado de irrigação por gotejamento, a partir da água canalizada do próprio rio São Francisco, terreno sílico-argiloso e precipitação anual de 300 a 800 mm (LIMA *et al.*, 2014; OLIVEIRA, 2011) .

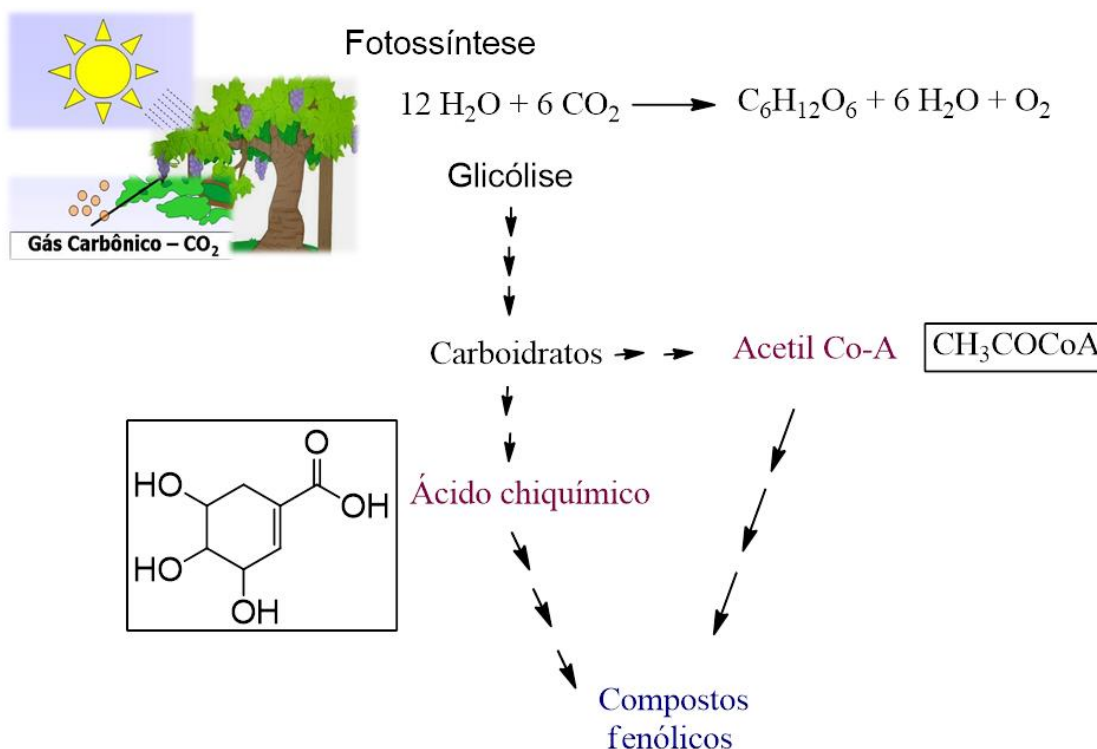
Elementos meteorológicos como temperatura, umidade e radiação solar exercem grande influência sobre o desenvolvimento, produção e qualidade da uva e por consequência do vinho (GUERRA *et al.*, 2009). Os compostos presentes no vinho compreendem uma grande variedade de metabólitos primários (açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos) e secundários (polifenóis, incluindo flavonoides e antocianinas). Estes compostos exercem importantes influências, não só na caracterização organoléptica (cor, sabor, adstringência, amargor) e diferenciação dos vinhos, como também nas atividades biológicas (DIMITROVSKA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2011). Dessa forma, as condições climáticas, associadas a uma boa infraestrutura de irrigação e produção, têm permitido o VSF se consolidar no mercado vinícola. Além disso, essas características conferem aos vinhos produzidos nessa região uma composição química peculiar quando comparados aos vinhos de outras regiões do país e do mundo, uma vez que as particularidades ambientais da região intervêm diretamente no conteúdo dos compostos fenólicos (NASCIMENTO, 2010).

Após a identificação do fenômeno conhecido como “Paradoxo Francês”, houve um aumento nas pesquisas com o propósito de identificar e quantificar os compostos contidos no vinho responsáveis pelos benefícios à saúde, bem como o seu modo de ação (MARINOVA *et al.*, 2005). Esse termo faz referência ao aparente paradoxo existente entre a alimentação dos franceses, que é bastante elevada em gordura, e a baixa mortalidade por doenças cardíacas. A principal e mais aceita hipótese para explicar esta inconsistência aparente seria o alto consumo de vinho por esta população (PENNA & HECKTHEUER, 2004).

2.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são um grupo de compostos caracterizados quimicamente por possuírem um ou mais (polifenóis) grupos hidroxílicos ligados a um anel benzênico e biosintetizados a partir da via do ácido chiquímico (principal) e da via do acetato (acetil co-A) (figura 3). São metabólitos secundários presentes nos vegetais, principalmente em raízes e frutas, alguns dos quais são indispensáveis para suas funções fisiológicas e além de atuar na defesa contra organismos patogênicos ou raios ultravioleta e regulação do crescimento celular, intervêm diretamente na coloração (GRIS, 2010; VACCARI *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2003).

Figura 3. Rota biossintética dos compostos fenólicos.



Entre as frutas, as uvas (*Vitis vinifera* L.) são consideradas uma das maiores fontes de compostos fenólicos (VACCARI *et al.*, 2009, ABE *et al.*, 2007), que podem ser encontrados principalmente nas suas cascas e semente (GRIS, 2010,). Por ser a matéria-prima para a produção de vinhos é importante conhecer os teores de compostos fenólicos das uvas, pois estes podem influenciar a qualidade dos produtos finais. O conteúdo e o perfil desses compostos, certamente estão associados à grande diversidade entre as

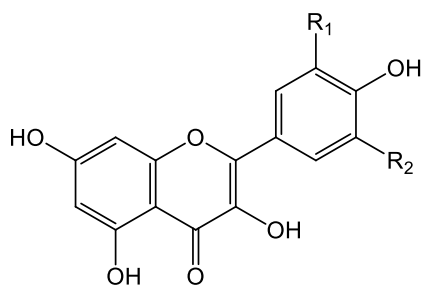
cultivares, fatores do ambiente e processamento, o que resulta em uvas e vinhos com diferentes características, tanto de sabor quanto de coloração (BURIN *et al.*, 2010).

Na década de 80 diversos polifenóis foram encontrados nas uvas e nos vinhos, principalmente nos tintos, uma vez que são fermentados juntos com as cascas (ROCHA & GUERRA, 2008). De fato, a quantidade de fenólicos totais no vinho tinto (1018 a 4059 mg/L EAG) é bem mais elevada que em vinhos brancos (165 a 1465 mg/L EAG) (SILVA *et al.*, 2014, MAMEDE & PASTORE, 2004), essa diferença está relacionada não só às variáveis cultivares e ambientais, mas também com o processo de fabricação dos vinhos. Durante a maturação e envelhecimento do vinho os compostos fenólicos participam de numerosas reações químicas (BURIN *et al.*, 2010). Segundo Gómez-Plaza e colaboradores (2000) as técnicas de vinificação e a duração do tempo de armazenamento são os principais fatores que influenciam no teor de compostos fenólicos e na coloração do vinho.

Os principais fenólicos presentes nas uvas e no vinho podem ser subdivididos, com base na similaridade de suas cadeias de átomos de carbono, em duas classes: flavonoides e não flavonoides. Os flavonoides que se destacam nos vinhos são: as antocianinas, flavan-3-óis e os flavonóis. Ao segundo grupo pertencem os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos), os estilbenos (resveratrol), e uma larga variedade de taninos (ARCHELLA & ANTONIA, 2013, IVANOVA *et al.*, 2010). As estruturas químicas dos principais compostos citados são apresentadas na Figura 4.

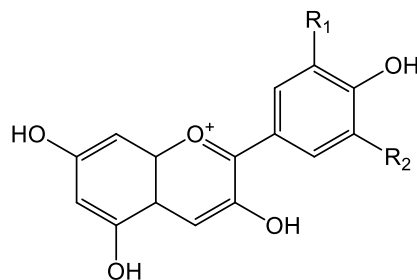
Figura 4: Estrutura química dos principais compostos fenólicos presentes nos vinhos

Flavonois



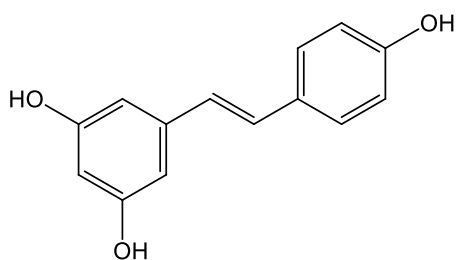
R1 = R2 = H - canferol
 R1 = OH; R2 = H - quercetina
 R1 = R2 = OH - miricetina

Antocianinas

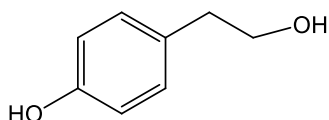


R1 = H; R2 = OH - cianidina
 R1 = R2 = OH - delphinidina
 R1 = OCH₃; R2 = H - peonidina
 R1 = R2 = OCH₃ - malvidina
 R1 = OCH₃; R2 = OH - petunidina

Estilbenos

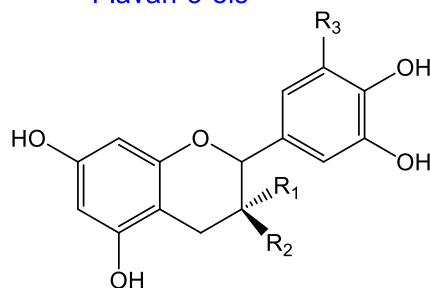


trans-resveratrol



tirosol

Flavan-3-óis



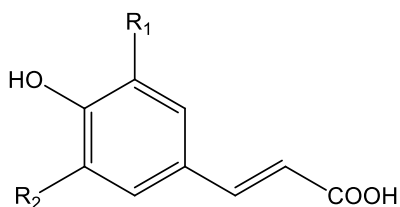
Procianidinas

R1 = OH; R2 = R3 = H - (+) - catequina
 R1 = R3 = H; R2 = OH - (-) - epicatequina

Prodelfinidinas

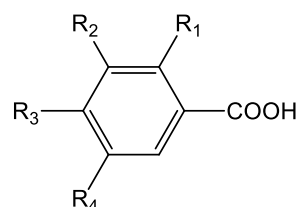
R1 = R3 = OH; R2 = H - (+) - galocatequina
 R1 = H; R2 = R3 = OH - (-) - galocatequina

Ácidos hidroxicinâmicos



R1 = R2 = H - Ác. *p*-cumárico
 R1 = OH, R2 = H - Ác. cafeico
 R1 = OCH₃, R2 = H - Ác. ferúlico

Ácidos hidroxibenzoicos



R1 = R2 = R4 = H; R3 = OH - Ác. *p*-hidroxibenzoico
 R1 = R4 = H; R2 = R3 = OH - Ác. protocateico
 R1 = H; R2 = R3 = R4 = OH - Ác. gálico
 R1 = H; R2 = R4 = OCH₃; R3 = OH - Ác. siríngico
 R1 = R4 = H; R2 = OCH₃; R3 = OH - Ác. vanílico

Os flavonoides compreendem a maioria dos fenóis no vinho tinto e são obtidos pelo processo de fermentação da casca e sementes de uvas (LUCENA, 2008). A estrutura base dos flavonoides consiste de um esqueleto de 15 carbonos dispostos em dois anéis aromáticos (A e B) ligados por um anel pirano (C) cuja representação é C6-C3-C6; e a distinção das subclasses se dá a partir do grau de oxidação do anel heterocíclico (MAGALHÃES *et al.*, 2012).

As antocianinas são compostos hidrossolúveis e termosensíveis, nas uvas estão concentradas principalmente nos vacúolos de células da casca. São um importante grupo de pigmentos responsáveis pelas tonalidades de vermelho e roxo características de uvas e vinhos. Os pigmentos antociânicos majoritários em uvas são a malvidina-3-glicosídeo, petunidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-glicosídeo, peonidina-3-glicosídeo (FALCÃO *et al.*, 2007).

Os flavonóis são compostos caracterizados pela presença de uma insaturação no anel heterocíclico e um grupamento hidroxila na posição 3, e estão presentes nas cascas de uvas brancas e tintas. Os principais flavonóis da uva são a quercetina, canferol e a miricetina e podem ser encontradas na forma livre ou conjugada. Dentre os flavanóis salientam-se os flavan-3-ol e as proantocianidinas. Os flavan-3-ol caracterizam-se por possuírem um anel heterocíclico saturado. Os carbonos 2 e 3 são os centros assimétricos da molécula. Os principais flavan-3-ol que se encontram nas uvas e nos vinhos são a (+)-catequina e a (-)-epicatequina, que são epímeros no carbono 3. Ao contrário de outros flavonoides encontram-se nas uvas no estado livre, encontrando-se pequenas quantidades de galato de epicatequina. Nas películas das uvas a (+)-catequina é o flavan-3-ol mais representativo e a (-)-epicatequina aparece em menores quantidades (VACCARI *et al.*, 2009).

Os ácidos fenólicos encontram-se nos vacúolos das células da casca e da polpa da uva e seus teores diminuem com o amadurecimento e também durante a fermentação do vinho (MAMEDE & PASTORE, 2004). Os ácidos hidroxicinâmicos são os principais ácidos fenólicos das uvas, e se encontram nos vacúolos das células das cascas e polpas, sob a forma de ésteres tartáricos, exercendo um papel fundamental nas oxidações que conduzem ao acastanhamento dos mostos e dos vinhos. Os ácidos derivados do ácido benzóico sofrem substituições nas posições *meta* e *para* dando origem, por

exemplo, ao ácido gálico. Alguns vinhos que sofrem envelhecimento em barril apresentam altos níveis de ácido gálico (JACKSON, 2008).

Quanto aos estilbenos, fitoalexinas sintetizadas por diversas plantas, dentre elas a uva (principalmente na semente e na película), seu principal representante no vinho é o resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno) em duas formas isoméricas *trans* e *cis*. O *cis*-resveratrol é formado pela fotoisomerização do *trans*-resveratrol (BRAVO, 2008). O resveratrol tem sido alvo de inúmeras pesquisas nas últimas décadas, em decorrência dos efeitos biológicos já comprovados (TOMAYKO *et al.*, 2012; AGGARWAL *et al.*, 2004; FRÉMONT, 2000). Entre os efeitos mais significativos, destaca-se a atividade cardioprotetora, que por sua vez envolve a modulação do metabolismo dos lipídeos e a diminuição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (FRÉMONT, BELGUENDOUZ, DELPAL, 1999), ação vasorelaxante dependente e independente do endotélio (NOVAKOVIC *et al.*, 2006) e inibição da agregação plaquetária (PACE-ASCIAC *et al.*, 1995).

Os taninos por sua vez, podem ser classificados em hidrolisáveis e não hidrolisáveis ou taninos condensados. Os primeiros, não estão naturalmente presente nas uvas, eles encontram-se na madeira e por isso podem aparecer em vinhos armazenados ou envelhecidos em barricas. Os taninos condensados já aparecem nas uvas e são formados por moléculas de flavonoides. Recebem o nome de procianidinas e não são facilmente hidrolisáveis (SERGHEI, 2013).

Nos últimos anos uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos compostos fenólicos presente nas uvas e nos vinhos, especialmente o tinto, como os responsáveis pelos efeitos benéficos a saúde, que incluem atividade antioxidante (SERAFINI, 1998), anti-inflamatória (NORATTO *et al.*, 2011), anticancerígena (BIANCHINI & VAINIO, 2003), antimicrobiana (VAQUERO *et al.*, 2007), neuroprotetora (BASTIANETTO & ZHENG, 2000), vasorelaxante (LUCIANO *et al.*, 2011 e cardioprotetora (DIEBOLT *et al.*, 2001).

2.4 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE/EM)

A técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (CL/EM) é o método preferido para determinar metabólitos naturais devido à sua sensibilidade e informação estrutural obtida através da fragmentação de íons moleculares que em muitos casos permite a identificação estrutural (BASKARAN, PULLENCHERI, SOMASUNDARAM, 2016).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação bem estabelecida, com alta versatilidade, capaz de analisar substâncias com características bem distintas, desde pequenas moléculas polares altamente solúveis em água, à moléculas apolares insolúveis em água. Essa técnica emprega colunas empacotadas com fases estacionárias de diferentes seletividades químicas e uma fase móvel, eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de separar misturas que contêm um grande número de compostos similares, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006). Desde o início da cromatografia líquida na década de 50, até os dias atuais muitas melhorias vêm sendo incorporadas a esta técnica direcionadas à necessidade de análises mais rápidas. Para isso, a redução do tamanho das partículas da fase estacionária e das colunas mostrou-se como a alternativa mais atrativa.

A cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) desenvolveu-se a partir da introdução das partículas de fase estacionária porosas $\leq 2 \mu\text{m}$ e fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da CLAE, tendo como principais diferenças as colunas cromatográficas empregadas que são de dimensões reduzidas (5-10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1-2,1 mm), e o uso de partículas menores que $2 \mu\text{m}$, além de economia de solvente, diminuição do tempo de retenção, maior resolução (grau de separação entre os picos) e uma maior sensibilidade de detecção dos compostos presentes nas amostras. Todas estas vantagens vieram contribuir para uma redução do tempo de análise, uma das principais dificuldades aplicadas à cromatografia líquida de alta eficiência (MALDANER, JARDIM, 2009; MALDANER, JARDIM, 2012; NOGUEIRA *et al.*, 2011).

A cromatografia líquida de ultra eficiência quando acoplada à espectrometria de massas origina uma técnica com poder ainda maior de caracterização e quantificação de substâncias devido às suas características de sensibilidade e seletividade. Isso ocorre pela associação da alta capacidade de separação do UPLC e da capacidade de detecção e identificação dos analitos pelo EM através da razão massa/carga (m/z) dos íons originados pelo analito.

Espectrometria de massas (MS- mass spectrometry) é uma técnica analítica extremamente valiosa em que moléculas em uma amostra são convertidas em íons em fase gasosa, que são subsequentemente separados no espectrômetro de massas de acordo com sua razão massa (m) sobre a carga (z), m/z e o número de íons correspondente a cada unidade de massa/carga é registrado na forma de um espectro. A obtenção do espectro de massas depende basicamente de três etapas. A formação dos íons, a separação destes e a sua detecção/quantificação. Existem diversos tipos de espectrômetros de massas, cada qual com suas vantagens e limitações. Porém, todos apresentam os mesmos componentes básicos: sistema de introdução de amostra, fonte de ionização, analisador de massas, detector e registrador. (KOPPENAAL *et al.*, 2005).

Na fonte de íons, os componentes de uma amostra são convertidos em íons e os íons positivos ou negativos são imediatamente acelerados em direção ao analisador de massas. As fontes de íons podem ser classificadas de acordo com suas características de operação e a forma de obtenção de íons em fase gasosa. As fontes de ionização, inicialmente investigadas para o acoplamento cromatografia líquida-espectrometria de massas, foram baseadas no impacto eletrônico (EI) e na ionização química (CI). A fonte EI submete a amostra em fase gasosa a um feixe de elétrons com energia de 70 eV, em geral. Essa energia é suficientemente grande para “arrancar” um elétron de uma molécula, formando um íon positivo M^+ de alta energia. Esse íon, chamado molecular, se fragmenta rapidamente na fonte devido à sua alta energia. Já a CI é utilizada quando não se deseja uma fragmentação tão extensa. Entretanto, para a aplicação destes tipos de ionização necessita-se que o composto seja volatilizado primeiramente, e posteriormente, ionizado,

limitando o uso desta técnica a compostos voláteis, termolábeis e que possuem baixas massas moleculares (LANÇAS, 2009).

O surgimento de novas fontes de ionização as quais são capazes de combinar duas características em um mesmo sistema: facilitar a transferência da amostra que sai da coluna para a fase gasosa (interface coluna-MS) e a ionização da amostra permitiu a extensão da aplicação da ionização por dessorção a laser assistida por matriz EM para praticamente todas as classes de moléculas. As fontes que mostraram melhor desempenho no acoplamento LC-MS produzem a ionização em pressão atmosférica, como a MALDI e a ionização por electrospray (ESI). No MALDI, a ionização e a dessorção são realizadas por um laser. Uma matriz contendo uma substância cromófora ao laser tem de ser adicionada a amostra. A matriz absorve a energia do laser, formando um plasma que ioniza e vaporiza os componentes da amostra. A ionização pelo processo Electrospray (ESI) é, de longe, a forma de ionização mais empregada no acoplamento LC-MS. A análise de fenólicos por LC-MS é feita geralmente em ESI. Neste processo, a amostra é dissolvida em um solvente, usualmente não polar, e pressurizada em um tubo capilar feito de aço inox, ao qual é aplicada uma voltagem tipicamente entre 3.000 e 5.000 V. Como resultado, o líquido emerge do capilar à pressão atmosférica, na forma de um aerossol. As gotículas formadas perdem sucessivamente o solvente (são dessolvatadas) e os íons fluem para o espectrômetro de massas induzidos pelos efeitos da atração eletrostática e pelo vácuo. A ESI pode ser aplicada no modo positivo ou negativo para analitos que formam cátions ou anions respectivamente, durante o processo de ionização. A energia utilizada para ionização por electrospray não é, em muitos casos, suficiente para gerar fragmentações na molécula. Desta forma, a ESI gera íons protonados $[M+H]^+$ e íons desprotonados $[M-H]^-$ no modo positivo e negativo respectivamente (LANÇAS, 2009; PETROVIC, 2005; BASKARAN, PULLENCHERI, SOMASUNDARAM, 2016). A fragmentação pode ser induzida aumentando-se a voltagem no cone de admissão dos ions ou através do uso de uma câmara de colisão na qual os íons moleculares colidem com moléculas de um gás inerte, como o argônio.

O analisador é a parte do espectrômetro de massas responsável pela separação dos íons, de acordo com sua relação m/z , o que efetivamente

caracteriza cada espécie. Os analisadores mais utilizados em análises biológicas são o quadrupolo (Q), a armadilha de íons, ou "TRAP", termo em Inglês, e o tempo de voo (TOF). Os quadrupolos possuem altíssima sensibilidade quando monitorando especificamente um ou mais íons previamente selecionados. Os TRAPs se apresentam de vários tipos: os convencionais "Ion Traps", os Traps lineares (QTrap), Orbitraps e ressonância ciclônica de íons (ICR). Os TOFs são analisadores que fornecem dados em alta resolução, e diferentemente dos Q não operam com varredura linear dos íons entre uma determinada faixa de razão m/z , mas sim com transientes de detecção de massa através de pulsos de voltagem de aceleração dos íons ao tubo de deriva, e, por conseguinte apresentam maior sensibilidade que os Q quando a análise visa à detecção total dos íons de uma amostra (NIESEN, 1999). Dessa forma, possuem um poder muito maior de identificação, além de oferecerem mais informações sobre a amostra analisada. A separação das massas em um TOF consiste no tempo que os íons de diferentes massas levam para migrar distâncias definidas após terem sido acelerados por um mesmo impulso em direção a um tubo de deriva, região livre da influência de campos eletromagnéticos. Atualmente, a maioria dos TOFs operam com massa exata, que é a capacidade de fornecer dados de m/z muito próximos ao valor real do analito, possibilitando a dedução de sua fórmula molecular. É possível utilizar um Q acoplado a um TOF (QTOF), isso permite associar a alta seletividade do Q à alta resolução do TOF, aumentando-se a confiabilidade do resultado (GRIMALT *et al.*, 2010).

O detector tem a função de detectar e amplificar o sinal da corrente de íons que vem do analisador e transferir o sinal para o sistema de processamento de dados. Os três principais tipos de detectores são:

- Fotomultiplicador: dinodo de conversão de alta voltagem que converte íons positivos ou negativos em elétrons, que são em seguida convertidos em luz (fótons).
- Multiplicador de elétrons: Funcionam pela emissão de elétrons secundários produzidos por dinodos quando os íons provenientes dos analisadores chocam-se a eles.
- Microchannel plate (MCP): são multiplicadores de elétrons e consistem de capilares de vidro fundidos e cortados em uma placa fina.

O detector a ser utilizado depende do tipo de analisador presente no espectrômetro de massas; o fotomultiplicador e o multiplicador de elétrons são utilizados com analisadores do tipo quadrupolo e íon traps e apresentam faixa dinâmica ampla (10^5 - 10^8), enquanto que o MCP é utilizado com analisadores TOF e apresentam resposta extremamente rápida, com alta sensibilidade (SCHALLEY, 2000).

Dessa forma, a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas tem sido utilizada para identificar a composição química de extratos de vinhos em diversos estudos. Arraki e colaboradores (2017) identificaram sete estilbenos em vinhos tintos da Tunísia, entre eles o resveratrol, usando esta técnica. Analisando concentrações do sotolon, considerado um dos compostos responsáveis pelo atípico envelhecimento e saborização oxidativa em vinhos brancos secos, Gabrielli e colaboradores (2015) destacaram a melhor sensibilidade do método CLUE/EM em relação a CLAE/UV e também a outros métodos anteriormente utilizados para quantificação deste composto em vinhos, uma vez que a concentração do mesmo é baixa nessa bebida.

2.5 Estresse oxidativo e hipertensão

Ao se tratar de estresse oxidativo dois conceitos são pertinentes, o de radicais livres e das espécies reativas de oxigênio (ERO). Os radicais livres são qualquer espécie química produzida naturalmente no organismo que contém um ou mais elétrons desemparelhados, desse modo são altamente reativos e capazes de atacar qualquer biomolécula. Fatores ambientais como radiação, poluição e tabagismo, podem levar a formação aumentada de radicais livres (VARGAS *et al.*, 2008).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são moléculas derivadas do oxigênio e não são, necessariamente, um radical livre. Uma ERO pode reagir com biomoléculas e iniciar uma reação em cadeia de formação de radicais livres (JÚNIOR, 2005). As EROs ocorrem quando, em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$),

hidroperoxila ($\text{HO}_2^\bullet$) e hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), podendo resultar em lesões oxidativas em macromoléculas como proteínas, lipídeos e DNA, que se não forem reparadas, irão alterar a funcionalidade celular, tecidual e dos órgãos (HALLIWELL, 1991; BARREIROS & DAVID, 2006). Dois mecanismos estão envolvidos na defesa do organismo contra o efeito das ERO. Um deles é um sistema de origem endógena, que envolve a participação de enzimas como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT). A outra é a utilização de compostos antioxidantes dos alimentos (SOUZA *et al.*, 2007).

Dessa forma, o estresse oxidativo é estabelecido quando há um desequilíbrio entre as espécies pró-oxidantes e os antioxidantes, favorecendo o acúmulo dos elementos pró-oxidantes, promovendo um dano potencial (BARBOSA *et al.*, 2010). Há evidências de que o estresse oxidativo está envolvido em diversos eventos e patologias como o envelhecimento (ENGERS *et al.*, 2011), arteriosclerose (SILVA, CERCHIARO, HONORIO, 2011) câncer (SILVA, JASIULIONIS, 2014), doenças pulmonares (CAVALCANTE & BRUIN, 2009), disfunções cerebrais (BARBOSA, MEDEIROS, AUGUSTO, 2006), diabetes (REIS *et al.*, 2008), hipertensão (VASCONCELOS *et al.*, 2007) e doenças cardiovasculares (PINHO *et al.*, 2010).

As doenças cardiovasculares são a causa número 1 de morte em todo o mundo: mais pessoas morrem anualmente de doenças cardiovasculares do que de qualquer outra causa. Das 38 milhões de mortes ocorridas no mundo no ano de 2012 devido a doenças crônicas não transmissíveis, estima-se que 17,5 milhões morreram em decorrência de doenças cardiovasculares, representando 31% de todas as mortes globais (WHO, 2014). A elevação da pressão arterial representa um fator de risco independente, linear e contínuo para a doença cardiovascular, com custos socioeconômicos elevados devido às complicações associadas como doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica (NOBRE *et al.*, 2013). Nesse contexto, a hipertensão, que é um problema de saúde pública, é uma síndrome qualificada pela elevação sustentada da pressão arterial sistêmica (sistólica e/ou diastólica), acima ou igual a 140 e/ou 90 mmHg na pressão sistólica e diastólica respectivamente e pode ser produzida pelo

aumento de duas variáveis: o débito cardíaco e a resistência vascular periférica. O débito cardíaco depende do volume sistólico final, contratilidade miocárdica e frequência cardíaca; enquanto a resistência vascular periférica é estabelecida pelo tônus vascular (NOBRE *et al.*, 2013; GANONG, 2006). A pré-disposição genética, o sedentarismo e dietas inadequadas, podem desencadeá-la. A compreensão dos fatores associados ao seu desenvolvimento reveste-se de grande importância, para que se possa atuar de forma preventiva adequada (BRASIL, 2013). Dessa forma, a hipertensão tem sido alvo de muitas pesquisas em função de sua elevada prevalência e ao alto impacto na morbimortalidade da população.

Seu controle a curto e longo prazo não só na manutenção como na variação momento a momento da pressão arterial, regulando o calibre e a reatividade vascular, a distribuição de fluido dentro e fora dos vasos e o débito cardíaco envolve uma atuação conjunta e complexa dos sistemas cardiovascular, neural, renal, respiratório e endócrino (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Entre eles, o sistema nervoso autônomo se destaca na participação dos barorreceptores, que são terminações nervosas livres localizadas no interior de algumas das grandes artérias, como a aorta e a carótida. O aumento da pressão arterial (PA) estira os barorreceptores, que por sua vez respondem causando uma bradicardia reflexa e diminuição da resistência vascular periférica, levando a redução da PA mediada pelo sistema nervoso autônomo parassimpático e pela inibição do sistema nervoso autônomo simpático (KRUEL, 1994; IRIGOYEN *et al.*, 2001). Admite-se, portanto, que modificações na pressão arterial resultam das alterações desses sistemas de controle.

Os mecanismos que levam ao desenvolvimento de hipertensão são complexos e ainda não foram completamente esclarecidos. No entanto, tem havido ao longo das últimas décadas evidência crescente, que sugere a participação das espécies reativas de oxigênio no desenvolvimento e manutenção dessa síndrome (BOTELHO-ONO *et al.*, 2011). Vários estudos mostram que o estresse oxidativo é uma possível causa da hipertensão, por diversos mecanismos (ROMERO AND RECKELHOFF, 1999, PEDRO-BOTET *et al.*, 2000, ZIMMERMAN *et al.*, 2004, VALKO *et al.*, 2007, LAZARTIGUES, 2010). Na hipertensão arterial, uma rede complexa de sistemas e substâncias vasoativas atua e favorece a produção intravascular de EROs, com

participação importante das enzimas NADPH oxidase, xantina oxidase (XO), lipoxigenase, cicloxigenase, óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). A presença de tais espécies reativas diminui a disponibilidade de NO e favorece maior atividade de endotelina de modo que no estresse oxidativo vascular da hipertensão, fatores vasoconstritores estariam em preponderância em relação aos fatores vasodilatadores (BARADARAN, NASRI, RAFIEIAN-KOPAEI, 2014).

Por exemplo, o aumento de $O_2^{\cdot -}$ inativa o vasodilatador óxido nítrico (NO), eleva a resistência vascular conduzindo a disfunção endotelial e a vasoconstrição, marca de muitas doenças cardiovasculares, inclusive a hipertensão (PARAVICINI & RHIAN, 2008). Adicionalmente, a nível renal, a redução da disponibilidade do NO, pode aumentar a resistência vascular renal, amplificar a reabsorção tubular de sódio e água e, desta forma, provocar uma expansão do volume extracelular, com consequente aumento da pressão. Enquanto a nível cerebral pode aumentar a atividade do sistema nervoso simpático com consequente aumento da pressão arterial (VAZIRI, 2008).

A relação do estresse oxidativo com essa doença é pertinente porque se destaca a atividade danosa deste em componentes do endotélio e uma forte relação com a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). A modificação oxidativa da LDL leva ao aumento de sua recaptação e degradação por macrófagos, resultando em depósito de colesterol e formação de células espumosas (DUARTE, 2013). As espécies reativas promovem ainda a remodelação vascular (com acumulação de matriz proteica, migração, transformação e proliferação de fibroblastos). Estas alterações da parede vascular permitem a manutenção da hipertensão e a progressiva arteriosclerose e trombose (CRAIGE, KANT, KEANEY JR, 2015).

Ainda, a disfunção endotelial pode ocorrer devido ao aumento de angiotensina II, que estimula a NOX (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase), esta, por sua vez, também produz grandes quantidades de $O_2^{\cdot -}$ (SCHIFFRIN; TOUYZ, 2003). O $O_2^{\cdot -}$ ao reagir com NO, além de reduzir a biodisponibilidade de NO, leva a formação de outras EROs, como peróxido de hidrogênio e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot -}$) que é altamente citotóxico (SALVEMINI *et al.*, 1998; VAZIRI, LIANG, DING, 1999). A NADPH oxidase, é uma enzima que catalisa a transferência de elétrons da NADPH para O_2 formando superóxido. A ativação do receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT_1R) aumenta a atividade da

enzima NADPH oxidase, aumentando assim a produção de ânion superóxido O_2^- , por conseguinte, ocorre disfunção na sensibilidade dos barorreceptores, desenvolvendo ou mantendo a hipertensão arterial. (BURMEISTER *et al.*, 2011; DE QUEIROZ; MONTEIRO; BRAGA, 2013).

De fato, tem sido demonstrado em vários modelos experimentais de hipertensão (hipertensão sensível ao sal, hipertensão mediada por Ang II, espontaneamente hipertensos) que o estresse oxidativo desempenha um papel na patogênese da hipertensão (SWEI *et al.*, 1997; LAURSEN *et al.*, 1997; SUZUKI *et al.*, 1995). Em microvasos mesentéricos de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), foi documentada uma atividade aumentada de xantina oxidase (SUZUKI, 1998). Kushiro e colaboradores (2005) avaliaram o estresse oxidativo em ratos Dahl sensíveis ao sal (Dahl-S) e ratos Dahl-resistentes ao sal (Dahl-R) após uma dieta durante 3 semanas com elevado teor de sal (NaCl 8%) e com baixo teor de sal (NaCl 3%) e observaram uma diferença significativa na pressão arterial e nos valores de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina urinária, que é um dos marcadores mais utilizados para avaliação do estresse oxidativo, apenas nos animais Dahl-S. Outro estudo realizado em animais com hipertensão mediada por Ang II, constatou que a apocinina, um inibidor da NADPH oxidase, reduziu a elevação da pressão arterial e preveniu a disfunção endotelial (VIRDIS *et al.*, 2004).

Em razão do crescente papel que o estresse oxidativo exerce na hipertensão diferentes estratégias terapêuticas vêm sendo investigadas com o objetivo de minimizá-lo. Vários estudos epidemiológicos demonstraram que o aumento da ingestão dietética de antioxidantes fenólicos naturais, tais como o vinho tinto, correlacionam-se com doença cardíaca coronária reduzida (SCHINI-KERTH *et al.*, 2011). Evidências experimentais sugerem que as ações benéficas incluem a diminuição da agregação plaquetária (FREEDMAN *et al.*, 2001), diminuição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (APOSTOLIDOU *et al.*, 2015), aumento do óxido nítrico endotelial. (LUCIANO *et al.*, 2011). Estas propriedades antioxidantes foram atribuídas à presença dos polifenóis.

2.6 Antioxidantes

Para minimizar os efeitos do desequilíbrio causado pelo estresse oxidativo, os organismos aeróbicos foram dotados, ao longo do tempo evolutivo, de vários mecanismos de defesa, isto é, potenciais de neutralização das ações do estresse oxidativo, chamados de antioxidantes. Sendo assim, antioxidantes são substâncias que em concentrações menores que a do substrato oxidável, que tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria das reações em cadeia da oxidação (BARBOSA *et al.*, 2010). Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de ação: impedindo a formação dos radicais livres ou espécies não radicais (sistemas de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores), complexação de metais, aumento da geração de antioxidantes endógenos ou mesmo a interação de mais de um mecanismo ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo). Quando o mecanismo de ação do antioxidante for através de sua reação com o radical livre, o novo radical formado deve ser estável e incapaz de propagar a reação (SHAHIDI *et al.*, 1992).

Um antioxidante efetivo tem como características: presença de substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio ao radical, em função de seu potencial de redução; capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura; capacidade de quelar metais de transição implicados no processo oxidativo; e acesso ao local de ação, dependendo de sua hidrofília e lipofília e de seu coeficiente de partição (MANACH *et al.*, 2004).

Os antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos, conforme a estrutura; em primários ou secundários quanto ao mecanismo de combate aos radicais livres e podem ainda ser classificados como sintéticos e naturais de acordo com a procedência (BARBOSA *et al.*, 2010; LIMA, 2008; DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

O sistema enzimático é o primeiro a agir, por meio de mecanismos de prevenção, evitando o acúmulo de ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. O sistema enzimático é formado por diversas enzimas, destacando-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). A SOD age transformando o radical superóxido em peróxido de

hidrogênio, enquanto a CAT e GPx agem impedindo o acúmulo de peróxido de hidrogênio (BARBOSA *et al.*, 2010)

O sistema de defesa não enzimático inclui compostos endógenos, como glutathiona reduzida (GSH), ácido úrico, ubiquinol 10, alguns hormônios; e os compostos exógenos, provenientes da dieta alimentar como as vitaminas E, C e A, carotenoides e compostos fenólicos (SOUSA *et al.*, 2007). Os compostos presentes nos alimentos podem reagir diretamente com os radicais livres, levando a formação de produtos muito menos reativos, a exemplo da vitamina C, que é um antioxidante hidrossolúvel e age diretamente sobre os radicais $O_2^{\cdot-}$ e $OH^{\cdot}$.

Os antioxidantes primários atuam como doadores de prótons, impedindo o processo de iniciação desencadeado pelos radicais livres, através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, transformando-os em produtos termodinamicamente estáveis ou reagem com radicais livres, produzindo o complexo lipídio-antioxidante que, por sua vez, poderá reagir com outro radical livre. Nesta classe de antioxidantes são encontrados os compostos fenólicos, aminoácidos, tocoferol. No que diz respeito aos antioxidantes secundários ou sinérgicos, eles diminuem a taxa de oxidação por diversas maneiras, atuam no bloqueio da decomposição dos peróxidos e hidroperóxidos, convertendo-os de forma inativa por ação de agentes redutores, podem quelar metais, absorver radiação ultravioleta, agir como sequestrante de oxigênio. Os compostos fenólicos e as vitaminas A, C e E são exemplos desta classe (LUZIA & JORGE, 2009; RAMALHO & JORGE, 2006).

Os antioxidantes sintéticos são frequentemente empregados na indústria cosmética, farmacêutica e inclusive alimentícia com a finalidade de prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos, especialmente àqueles que contêm lipídeos em sua composição. São exemplos de antioxidantes sintéticos: o butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA), propilgalato (PG), terciobutilhidroxiquinona (TBHQ) (LUZIA & JORGE, 2009; RAMALHO & JORGE, 2006). Todavia esses compostos têm sido associados ao desenvolvimento de câncer em experimentos com animais. Isso tem levado a substituição por antioxidantes naturais (RAMALHO & JORGE, 2006; BOTTERWECK *et al.*, 2000). Dentre os antioxidantes naturais destacam-se a

vitamina E, o ácido ascórbico, os carotenoides e principalmente os compostos fenólicos, que são os antioxidantes mais abundantes da dieta humana e pelo papel que possivelmente exercem na prevenção de diversas doenças associadas ao estresse oxidativo (LUZIA & JORGE, 2009; RAMALHO & JORGE, 2006; DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004).

Estudos têm comprovado as propriedades antioxidantes *in vivo* e *in vitro* dos compostos fenólicos presentes em produtos derivados da uva, especialmente o vinho tinto, sendo até mais eficazes que as vitaminas C e E. (BARTOLOMÉ *et al.*, 2004; BORBALÁN *et al.*, 2003). Acredita-se que a capacidade antioxidante aumentada no corpo após o consumo moderado de vinho tinto e seus compostos fenólicos seja a principal responsável pelos efeitos benéficos comprovados (Rodrigo *et al.*, 2005).

A atividade antioxidante pode ser medida, através da avaliação das concentrações de subprodutos ou dos promotores do dano oxidativo e ainda diretamente em sua capacidade de sequestrar radicais livres, ou indiretamente pelos efeitos do antioxidante no controle da oxidação. Numerosos métodos de mensuração são descritos na literatura, mas todos eles têm em comum a presença de um agente oxidante, um substrato adequado e uma estratégia de medida do ponto final (SUCUPIRA *et al.*, 2012; DOTAN, LICHTENBERG, PINCHUK, 2004).

2.7 Efeitos dos compostos fenólicos do vinho tinto sobre o sistema cardiovascular

As doenças cardiovasculares são aquelas que afetam o coração e as artérias. Esse problema é decorrente de muitos aspectos do estilo de vida, entre eles alimentação irregular, tabagismo, ingestão de bebidas alcoólicas em excesso, estresse cotidiano e sedentarismo (GOMES, 2011). Tradicionalmente, essas doenças foram tratadas através de intervenções farmacêuticas na sequência de um diagnóstico médico. Porém há algumas décadas, tem havido uma ênfase crescente sobre as mudanças do estilo de vida e modificações nutricionais para prevenir e auxiliar o tratamento dessas doenças. Neste cenário, o consumo de vinho tinto constitui-se uma alternativa muito atraente,

pois, é um produto acessível e, portanto, pode ser adotado por todas as classes sociais (RIQUE, SOARES, MEIRELLES, 2002; GIEHL *et al.*, 2007).

Numerosos estudos sugerem que o consumo de vinho tinto está associado à menor risco cardiovascular e os compostos fenólicos presentes no vinho tinto parecem ser os agentes principais responsáveis pelos efeitos benéficos; ainda mais que a fermentação da bebida leva ao enriquecimento do conteúdo total de polifenóis, e, melhor ainda, a solubilização dos mesmos resulta em sua maior biodisponibilidade (SOARES FILHO, CASTRO, STAHLSCHMIDT, 2011). Entre tais efeitos incluem-se: vasodilatação, ação antiplaquetária, ação antiaterogênica atuando como antioxidantes no colesterol LDL e redução da peroxidação lipídica. (HORT *et al.*, 2012; RECHNER, KRONER, 2005, GIEHL *et al.*, 2007).

Uma das principais características das doenças cardiovasculares é a presença da aterosclerose, acúmulo de placas de gorduras nas artérias ao longo dos anos que impede a passagem do sangue. Um aumento nas espécies reativas de oxigênio no organismo leva ao stress oxidativo com subsequente dano de muitas moléculas biológicas. E os lípidos da membrana celular são alvos significativos da lesão celular. As dislipidemias são distúrbios do metabolismo lipídico que podem contribuir para o desenvolvimento dessa patologia (AZEVEDO, 2011). A peroxidação lipídica pode estimular as células vasculares a produzir fatores monócitos-quimiotáticos e estimuladores de macrófagos, resultando na formação de placas ateroscleróticas. A lipoproteína de baixa densidade (LDL) tende a se depositar nas artérias e está associada ao início e à aceleração do processo aterosclerótico, pois desempenham um papel importante no desenvolvimento do trombo estimulando as atividades procoagulantes nas células endoteliais e nos monócitos e inibem a vasodilatação diminuindo a expressão da NO sintase endotelial (ZENEBE, PECHÁNOVÁ, BERNÁTOVÁ, 2001).

Muitos dos efeitos observados de polifenóis podem, portanto ser atribuídos às suas reconhecidas propriedades antioxidantes e de eliminação de radicais, o que pode atrasar o início da aterogênese através da redução de reações peroxidativas mediadas quimicamente e enzimaticamente. De acordo com o trabalho de Rice-Evans e Miller (1998), que contribuiu para a

compreensão da relação estrutura-atividade dos efeitos antioxidantes dos flavonóides, a quercetina, um flavonóide comum do vinho tinto, parece ser um sequestrador de radical extremamente eficiente. De fato, a redução do estresse oxidativo em ratos espontaneamente hipertensos após tratamento com quercetina foi demonstrada por Monteiro e colaboradores (2012).

A função endotelial não somente tem um papel fundamental na regulação do tônus vascular, como exerce importante função anti-aterosclerótica, impedindo a agregabilidade plaquetária, assim como a deposição de células inflamatórias na superfície vascular (WALSH, BILSBOROUGH, MAIORAMA, 2003). Uma série de estudos sugere que os polifenóis presentes no vinho tinto induzem vasorelaxamento. Esses estudos indicam que, além de suas propriedades antioxidantes, os polifenóis apresentam a capacidade de aumentar a disponibilidade de mediadores com atividade vasodilatadora, como o óxido nítrico (NO), o fator hiperpolarizante de endotélio (EDHF), a prostaciclina, e inibir a síntese de mediadores vasoconstritores, como a endotelina-1 em células endoteliais, a expressão de fatores proangiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a metaloproteinase do tipo II (MMP-2) (LUCIANO *et al.*, 2011, GRIS *et al.*, 2013, ANDRIAMBELOSON *et al.*, 1997, ORTEGA *et al.*, 2008, STOCLET *et al.*, 2004). Corder e colaboradores (2001) observaram que os fenóis do vinho tinto produzido a partir de uvas Cabernet Sauvignon elevaram a função endotelial através da inibição da secreção de endotelina-1 em cultura de células endoteliais aórticas de boi por supressão da transcrição do gene da endotelina-1. Tais achados são importantes, uma vez que para Jiménez e colaboradores (2007), a endotelina-1 pode contribuir para a patogênese da hipertensão sensível ao sal em animais e humanos.

A hipertensão causa um estresse sobre as paredes dos vasos sanguíneos e as estratégias para administrar essa doença são consideradas a chave no controle da mortalidade pelas doenças cardiovasculares. Dessa forma os mecanismos pelos quais os polifenóis do vinho tinto exercem o seu efeito anti-hipertensivo parecem ser importantes na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares. Os tratamentos com compostos fenólicos do vinho tinto e com o extrato da casca da uva reduziram a pressão arterial em diversos modelos experimentais de hipertensão, como os de L-NAME, Angiotensina II, e

de alta ingestão de sal (DOCA-sal), que foram relacionados a uma combinação de ações de vasodilatação e antioxidante (JIMENÉZ *et al.*, 2007), portanto, os benefícios à saúde do consumo moderado de vinho tinto são devidos a uma multiplicidade de ações (DELL'AGLI *et al.*, 2004).

Por outro lado, os mecanismos implicados nos efeitos vasorrelaxantes dos compostos fenólicos podem também incluir a inibição das fosfodiesterases de nucleótidos cíclicos e a ativação dos canais de K^+ ; ambos os caminhos estão ligados aos efeitos dos polifenóis nas células musculares lisas em vez do endotélio (ZENEBE, PECHÁNOVÁ, BERNÁTOVÁ, 2001). Um estudo realizado por Li e Förstermann (2009) mostrou que o tratamento oral com resveratrol relacionado com a disfunção endotelial resultou na melhora do relaxamento endotélio dependente estimulado por agonista (noradrenalina), em ratos hipertensivos e diabéticos e ainda em camundongos e coelhos hipercolesterolêmicos. O mecanismo proposto para a melhora da função vascular por resveratrol envolve tanto mecanismos endotélio-dependentes quanto endotélio-independentes. O vasorrelaxamento endotélio-dependente é largamente atribuído a efeitos nas células endoteliais, especificamente sobre o NO, aumentando sua síntese e reduzindo sua inativação. O relaxamento independente de endotélio é aparentemente mediado por algum canal de íon, incluindo canais de K^+ ativados por voltagem, canais de K^+ ativados por Ca^{2+} ou canais de Ca^{2+} ativados por voltagem (LI, FÖRSTERMANN, 2009).

Novakovic e colaboradores (2006) demonstraram que o resveratrol (1-100 μ M) induziu relaxamento dependente de concentração em artéria mamária interna humana na ausência do endotélio com $E_{m\acute{a}x}=83\pm 1\%$, $n=7$, além disso, constataram a participação relevante dos canais de potássio dependente de voltagem no efeito produzido por esse polifenol. Outra pesquisa realizada em anéis de aorta de ratos Wistar machos revelou que a presença do ácido elágico, composto fenólico com fortes propriedades antioxidantes que se desenvolve naturalmente nas uvas, foi capaz de promover a vasodilatação parcialmente independente do endotélio de uma maneira rápida e dose dependente por meio da inibição do influxo de cálcio do tipo L no músculo liso vascular (YILMAZ, USTA, 2013).

A atividade contrátil das células do músculo liso é determinante para a resistência vascular do fluxo sanguíneo na circulação e a regulação dessa

atividade depende do aumento da concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), uma vez que as células do músculo liso vascular utilizam o Ca^{2+} como iniciador da contração. O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} ocorre através do influxo desse íon pela membrana plasmática e por liberação de fontes internas de Ca^{2+} , como o retículo sarcoplasmático. O relaxamento, por sua vez, resulta da diminuição das concentrações de cálcio livre, provocado por uma hiperpolarização ou repolarização, que induz o fechamento dos canais de Ca^{2+} , o que leva a uma diminuição ou perda do estímulo contrátil (ANDRADE, 2016). Dessa maneira a atividade dos canais de K^+ exerce uma importante contribuição para a regulação do tônus vascular, uma vez que a abertura de um canal de potássio presente na membrana das células musculares lisas vasculares provoca um aumento da saída desses íons do meio intracelular para o meio extracelular, levando a uma hiperpolarização da membrana celular. Este estado de hiperpolarização conduz ao encerramento de canais de Ca^{2+} operados por voltagem e consequente diminuição da entrada dos íons Ca^{2+} para o interior da célula, causando vasodilatação (FARACI, HEISTAD, 1998; SOBEY, 2001).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Aplicar a espectrometria de massas para estudar a composição química da fração acetato de etila do vinho tinto Syrah da região do Vale do São Francisco e avaliar seu efeito, sob a pressão arterial, frequência cardíaca, sensibilidade do barorreflexo e peroxidação lipídica em ratos espontaneamente hipertensos.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a concentração de polifenóis e antocianinas monoméricas em vinhos tintos da região do Vale do São Francisco, do Sul e vinhos importados e em frações oriundas do vinho tinto com maior teor de fenólicos totais.
- Determinar o perfil cromatográfico do vinho tinto do Vale do São Francisco e suas frações.
- Quantificar o teor de *trans*-resveratrol e quercetina no vinho e nas subfrações pesquisadas.
- Investigar a composição química da fração com maior teor de fenólicos totais e atividade antioxidante por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) acoplada a Espectrometria de Massas.
- Avaliar a atividade antioxidante dos vinhos tintos e de suas frações.
- Estudar o efeito da fração mais rica em compostos fenólicos sobre a pressão sanguínea, frequência cardíaca e sensibilidade do barorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos.
- Determinar o efeito da fração mais rica em compostos fenólicos sobre a peroxidação lipídica em ratos espontaneamente hipertensos.

Metodologia

4 METODOLOGIA

4.1 Caracterização Química

4.1.1 Aquisição e Preparação das amostras de vinho

As amostras dos vinhos tintos foram adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de João Pessoa – PB.

A princípio realizou-se uma triagem para escolha do vinho tinto com o maior teor de fenólicos totais, onde foram investigados 06 vinhos tintos de diferentes tipos de uvas e regiões, de acordo com a tabela 1.

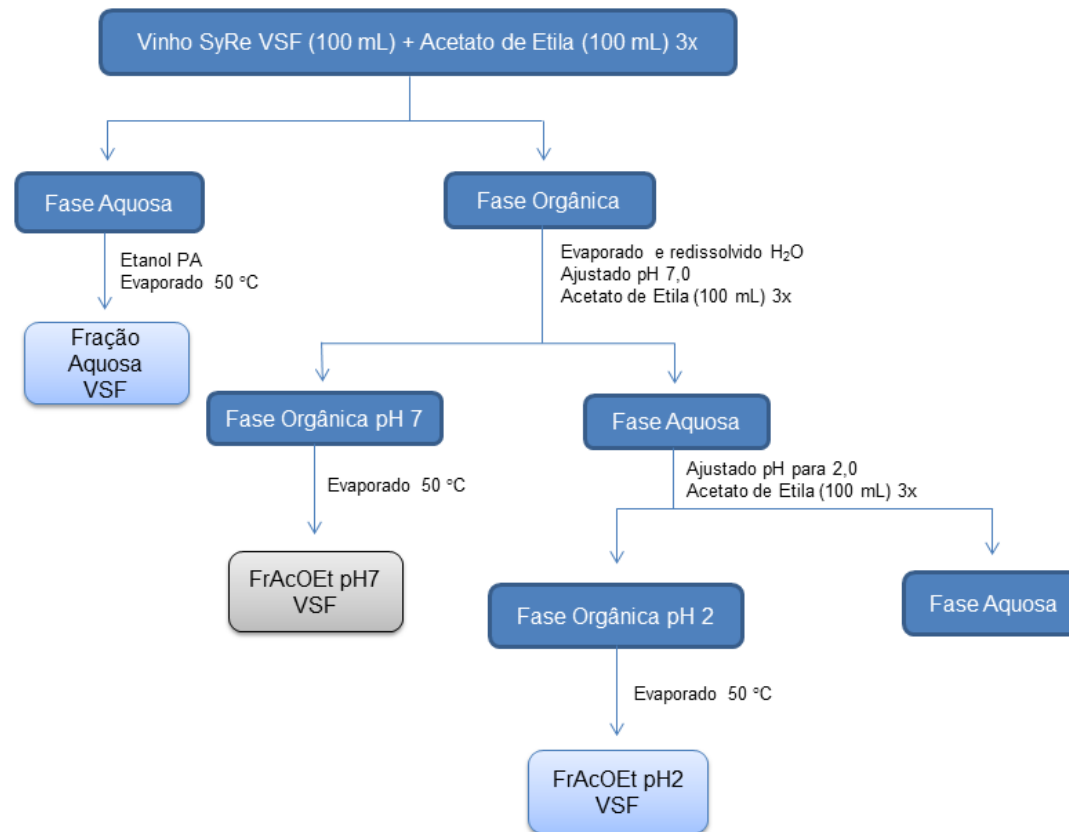
Tabela1: Vinhos tintos analisados na triagem preliminar para determinação do teor de fenólicos totais.

Sigla	Vinho tinto (nome comercial)	Tipo de uva	Região
SyRe VSF	Rendeiras	Syrah	Vale do São Francisco
SyRS VSF	Rio Sol	Syrah	Vale do São Francisco
Sy Chile	Tuniche	Syrah	Chile
CS VSF	Botticelli	Cabernet Sauvignon	Vale do São Francisco
CS SG	Salton	Cabernet Sauvignon	Serra Gaúcha
Ta SG	Macaw	Tannat	Serra Gaúcha

Utilizou-se alíquotas dos vinhos inteiros para a determinação do teor de fenólicos totais, flavonóis e flavonas e análise da atividade antioxidante. Após essas análises preliminares escolheu-se o vinho que apresentou o maior teor de fenólicos e melhor atividade antioxidante e foi realizado o fracionamento do mesmo, com diferentes solventes, em diferentes pHs, segundo metodologia adaptada proposta por Ghiselli *et al.*, 1998 e a partir de então todo o estudo deu-se com o vinho escolhido e suas frações.

Para o fracionamento do vinho tinto SyRe VSF (2013) inicialmente uma alíquota de 100 mL de vinho foi acidificada com ácido clorídrico 1 M até pH 2.0. Então foi feita a extração com 100 mL de Acetato de Etila (3 vezes) em funil de separação de 1000 mL. A fase aquosa ácida foi evaporada em evaporador rotatório sob pressão reduzida e temperatura a 50°C com auxílio de etanol PA, obtendo-se o Extrato Aquoso (Fração Aquosa VSF). A fase orgânica ácida foi evaporada em evaporador rotatório e posteriormente redissolvida com água destilada obtida através de um sistema de purificação de água MilliQ Academic (Millipore, Billerica, USA). O pH foi ajustado para 7.0 com hidróxido de amônio 3 M e então realizou-se extração com 100 mL de Acetato de Etila (3 vezes). A fase orgânica neutra desta extração foi evaporada para obter a fração AcOEt pH 7.0 (FrAcOEt pH7 VSF) e a fase aquosa teve o pH ajustado para 2.0 com ácido clorídrico 3M e extraída com 100 mL de Acetato de Etila (3 vezes). A fase orgânica ácida desta última extração foi evaporada da mesma forma que a anterior para obter a fração AcOEt pH 2.0 (FrAcOEt pH2 VSF) descartando-se a fase aquosa (esquema 1).

Esquema 1: Representação esquemática do fracionamento do vinho tinto Syrah Rendeiras do Vale do São Francisco



Fonte: Adaptado de Ghiselli *et al.*, 1998

4.1.2 Triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários

Os ensaios fitoquímicos foram realizados adotando-se as reações específicas para verificação da presença das classes de constituintes químicos na amostra de vinho e frações obtidas após o fracionamento (esquema 1, pág. 54).

4.1.2.1 Pesquisa de alcaloides

Uma alíquota de 25 mL dos extratos hidroalcóolicos das amostras foi evaporada até secura e em seguida alcalinizou-se com 6 gotas de NaOH 1% misturando bem. Colocou-se 6 mL de água destilada e a mesma quantidade de clorofórmio. Adicionou-se 6 mL de HCL 1% à camada clorofórmica, agitando e deixando decantar até ficar límpido. Distribuiu-se em quatro tubos de ensaio 1 mL da fase aquosa ácida e adicionou-se os reagentes a seguir: Bouchardat (3 a 5 gotas), Mayer (5 gotas), Dragendorff (3 a 5 gotas) e ácido sílico tungstico (5 gotas), observando-se a ocorrência ou não da reação positiva, indicada pela formação de precipitado respectivamente para cada reagente, marron, branco, laranja ou branco.

4.1.2.2 Pesquisa de esteroides

Uma alíquota de 10 mL do extrato hidroalcóolico das amostras foi evaporada até secura, e dissolvidos em 2,5 mL de clorofórmio e em seguida foram distribuídos em três tubos de ensaio: 0,12; 0,25 e 0,5 mL respectivamente. A cada tubo, adicionou-se 2 mL de clorofórmio e 1 mL de anidrido acético, agitando. Depois colocou-se 2 mL de ácido sulfúrico em cada tubo, agitando devagar. A coloração azul evanescente seguida de verde indica a positividade do teste. O resultado foi comparado ao do controle positivo que utilizou o padrão de colesterol.

4.1.2.3 Pesquisa de taninos

Um volume de 50 mL do extrato hidroalcóolico das amostras foi evaporado até secura e em seguida dissolvidos em 10 mL de água destilada e filtrado em funil com algodão. Distribui-se em 6 tubos de ensaio (1 mL em cada

tubo) da seguinte maneira: os três primeiros tubos para testar gelatina 0,5% e os outros 3, testou-se com FeCl_3 2 %, colocando 0,5; 1,0 e 2,0 mL deste último, respectivamente, e completando os dois primeiros com água destilada até 2 mL.

4.1.2.4 Pesquisa de flavonoides

Um volume de 15 mL do extrato alcoólico das amostras foi colocado em funil de separação, em seguida adicionou-se 15 mL de água destilada, agitando e deixando em repouso. Logo após adicionou-se 15 mL de clorofórmio e deixou-se em repouso por um período de tempo até separação das camadas. A camada clorofórmica (inferior) foi desprezada. Evaporou-se até secar e colocou-se 3 mL de metanol, dissolvendo, logo após distribuiu-se 2 mL em dois tubos de ensaios. Ao primeiro tubo, adicionou-se 0,5 mL de HCl a 10 % e uma fita de magnésio, deixando reagir até desaparecer a fita e observando se aparecia coloração rósea, em caso positivo. No segundo tubo, secou-se em banho-maria, colocou-se 5 gotas de acetona, 0,05 mg de ácido oxálico e o mesmo de ácido bórico e colocou-se novamente em banho-maria durante 5 minutos (sem deixar secar totalmente). Logo após, colocou-se 10 mL de éter etílico, observando em UV se havia fluorescência ou não.

4.1.2.5 Pesquisa de saponinas

Uma alíquota de 2 mL do extrato hidroalcoólico das amostras analisadas foram dissolvidas em 10 mL de H_2O em um tubo de ensaio de 20 mL, agitando por 1 minuto. Deixou-se em repouso por 10 minutos e observou-se o desaparecimento ou não da espuma, sendo a sua permanência indicativa de teste positivo.

4.1.3 Análises dos fenólicos totais dos vinhos e de suas frações

A determinação do teor de fenólicos totais presentes nas amostras dos vinhos inteiros bem como, nos extratos aquoso, AcOEt pH 7,0 e AcOEt pH 2,0 obtidos através do fracionamento do vinho tinto Shyrah do Vale do São Francisco, foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin–Ciocalteu

(WATERHOUSE, 2003) com modificações, utilizando ácido gálico como o composto fenólico padrão.

Inicialmente, alíquotas de 20 µL de cada vinho diluído (1:9) e de cada solução dos extratos Aquoso, AcOEt pH 7,0 e AcOEt pH 2,0 (1mg/mL) solubilizadas em EtOH foram transferidas para ependorffs de 2 mL, adicionando-se 1,58 mL de água destilada e 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu, e agitando-se por 1 min. Em seguida, 300 µL de uma solução de Na₂CO₃ (15%) foram acrescentados à mistura e agitados por 30 segundos. Após duas horas, a absorbância das amostras foi medida a 760 nm utilizando-se cubetas de plástico. As análises foram efetuadas em triplicata e o teor de Fenólicos Totais (FT) determinado pela equação da regressão linear a partir da curva de calibração construída com soluções padrão de ácido gálico (50 a 550 mg/L). Os resultados foram expressos como miligramas de equivalente de ácido gálico por 100 miligramas de extrato (mgEAG/100mg), para as frações; e, para as amostras de vinhos, em miligramas de equivalentes de ácido gálico por litro de vinho (mg EAG/L).

4.1.4 Análise dos flavonóis e flavonas totais dos vinhos e de suas frações

A determinação do teor de flavonóis totais foi definida segundo metodologia descrita anteriormente utilizando como reagente o cloreto de alumínio (MIHAI *et al.*, 2012).

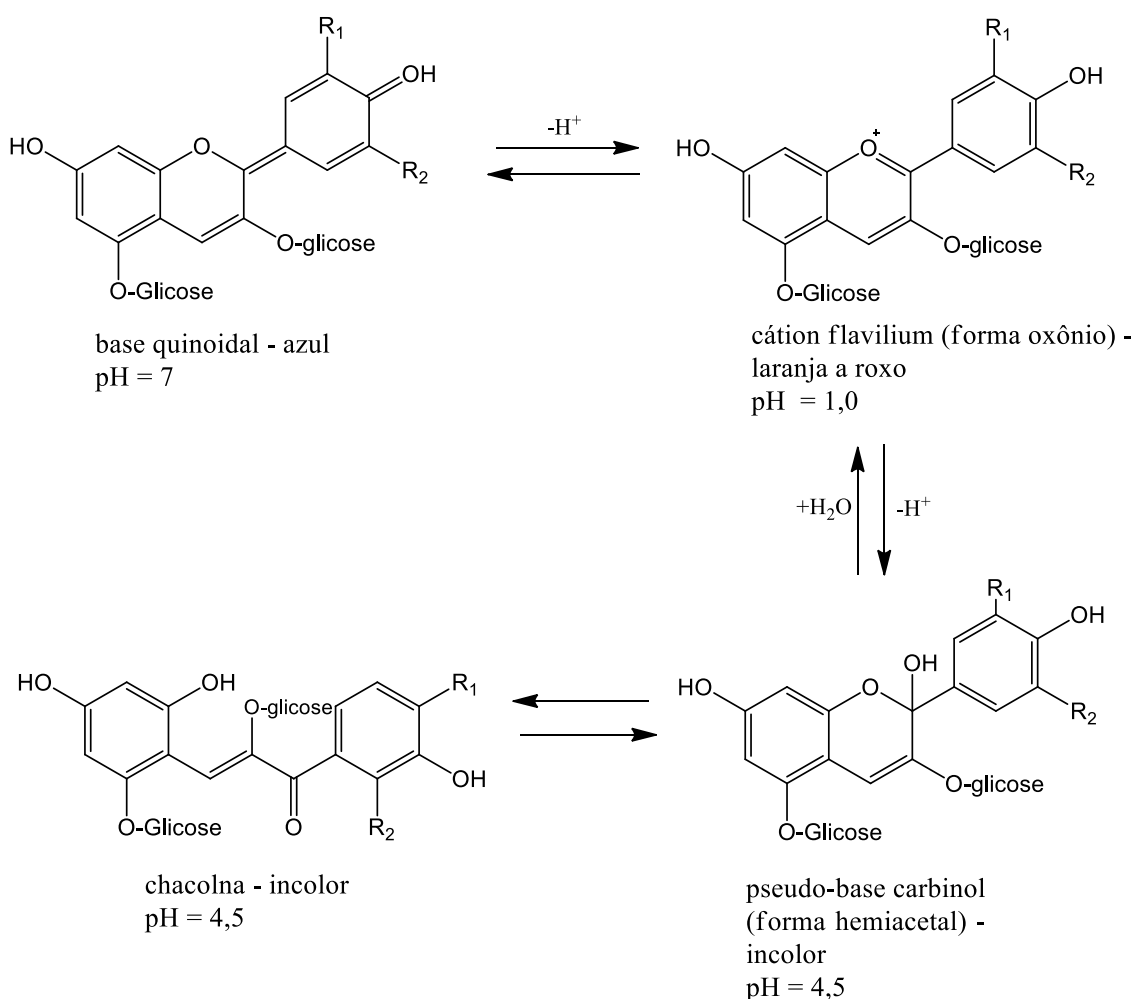
Misturou-se em um balão volumétrico contendo 5 mL de metanol uma alíquota de 400 µL das amostras (1,0 mg/mL) e 200 µL de solução metanólica de cloreto de alumínio 2%. Ajustou-se o volume para 10 mL com metanol e 30 minutos depois a absorbância foi medida a 425 nm.

O teor de flavonóis e flavonas nos vinhos e nas frações foram determinados por meio da equação da regressão linear a partir da curva de calibração estabelecida com soluções padrão de quercetina (20 a 200 µg/mL). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de quercetina por 100 mg de extrato para as frações e em mg de equivalentes de quercetina por mL para os vinhos.

4.1.5 Quantificação de Antocianinas Monoméricas

As antocianinas sofrem transformações estruturais reversíveis com mudanças de pH. Essas mudanças são evidenciadas através das diferenças nos valores de absorbância no espectrofotômetro. A forma do oxônio colorido predomina em pH 1.0 e o hemiacetal descolorido predomina em pH 4.5 (figura 5). O método do pH diferencial é baseado nesta reação e permite medidas rápidas e precisas das antocianinas totais.

Figura 5: Estruturas da Forma do Oxônio (Colorido) e da Forma do Hemiacetal (Descolorido) para as antocianinas.



Para quantificação de antocianinas monoméricas tanto para as amostras de vinhos inteiros quanto para as frações, primeiramente foi determinado o fator de diluição das amostras através da diluição com tampão cloreto de potássio, pH 1.0, até a absorbância da amostra no comprimento de onda (510 nm) estar na faixa de linearidade do espectrofotômetro (para a maioria dos

espectrofotômetros a absorbância deve ser menor que 1.2). Ao dividir o volume final da amostra pelo volume inicial obteve-se o fator de diluição (DF).

Para não exceder a capacidade do tampão a amostra não ultrapassou mais que 20% do volume total. Em seguida foram preparadas duas diluições da amostra, uma com o tampão cloreto de potássio 0,025M, pH 1.0 (ajustado com ácido clorídrico concentrado) e outra com o tampão acetato de sódio, 0,4M, pH 4.5 também ajustado com ácido clorídrico concentrado, diluindo cada uma pelo fator de diluição previamente determinado.

Deixou-se que essas diluições se equilibrassem por 15 minutos e então, a absorbância de cada diluição foi medida em 510 e 700 nm, contra um branco de água destilada. O espectrofotômetro foi zerado com água destilada em todos os comprimentos de onda que seriam utilizados (510 e 700 nm).

As absorbâncias das diluições foram calculadas através da seguinte equação:

$$A = (A_{500} - A_{700}) \text{ pH } 1.0 - (A_{500} - A_{700}) \text{ pH } 4.5$$

A concentração de antocianinas monoméricas na amostra original foi então calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg/L)} = (A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 1000) / (\epsilon \times 1)$$

Onde: PM é o peso molecular, FD é o fator de diluição, e ϵ é a absortividade molar.

4.1.6 Avaliação da Atividade Sequestradora do Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH•)

O teste foi realizado seguindo a metodologia descrita por Garcez *et al.*, 2009, com algumas modificações. Após uma triagem preliminar, as soluções das amostras foram preparadas em metanol em concentrações finais que variaram entre 3 a 30 µg/mL para os extratos e 10 a 300 µg/mL para os vinhos.

Posteriormente 100 µL das amostras foram transferidas para placas de 96 poços e em seguida, adicionou-se 100 µL da solução de DPPH (118,2 µg/mL em MeOH). Cada concentração foi testada em triplicata. As soluções foram agitadas e após 30 minutos de reação ao abrigo da luz à temperatura

ambiente, a quantidade de radicais DPPH· foi registrada em espectrofotômetro UV-Visível em comprimento de onda de 517 nm.

A porcentagem de atividade sequestradora (% AS) foi calculada pela equação:

$$\%AS = \frac{\{[Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100\}}{Abs_{controle}}$$

Onde $Abs_{controle}$ é a absorbância do controle negativo, uma solução que contém apenas o radical DPPH· e MeOH, e $Abs_{amostra}$ é a absorbância do radical na presença da amostra ou do controle positivo (ácido ascórbico), e Abs_{branco} é a absorbância da solução composta apenas pela amostra e MeOH.

A eficiência anti-radicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear com intervalo de confiança de 95 % ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0. Os resultados foram expressos através da $CE_{50} \pm D.P.$, que representa a concentração da amostra (em $\mu g/mL$) necessária para obter metade da atividade sequestradora máxima. Como controle positivo foi utilizado o ácido ascórbico nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 $\mu g/mL$.

4.1.7 Avaliação da Atividade Sequestradora do Radical ABTS^{•+}

Inicialmente foi preparada a solução do cátion radical ABTS^{•+} pela mistura de 2,5 mL de uma solução de ABTS (7,0 mM) com 44 μL de uma solução de persulfato de potássio (140,0 mM), ambas em água destilada. A solução foi mantida sob abrigo da luz à temperatura ambiente durante um período de 12-16 horas antes do uso. Em seguida a solução do radical ABTS^{•+} foi diluída com etanol (1:80 v/v, aproximadamente) obtendo uma absorbância (A) de $0,7 \pm 0,05$ no comprimento de onda de 734 nm, em UV-Visível. As soluções das amostras foram preparadas em EtOH nas concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/mL. Através de triagem preliminar quantidades apropriadas das soluções das amostras e da solução de ABTS^{•+} foram transferidos para eppendorfs, o volume foi completado para 500 μL com EtOH. As concentrações das amostras variaram entre 5 a 200 $\mu g/mL$. Como substância padrão foi utilizada o trolox nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 $\mu g/mL$.

Cada concentração foi testada em triplicata. As soluções foram agitadas e, após 6 minutos de reação, a absorbância das amostras e do padrão foram medidas em um espectrofotômetro de UV-Visível em comprimento de onda de 734 nm.

A porcentagem de atividade sequestradora (% AS) foi calculada pela equação:

$$\%AS = \frac{\{[Abs_{controle} - (Abs_{amostra})] \times 100\}}{Abs_{controle}}$$

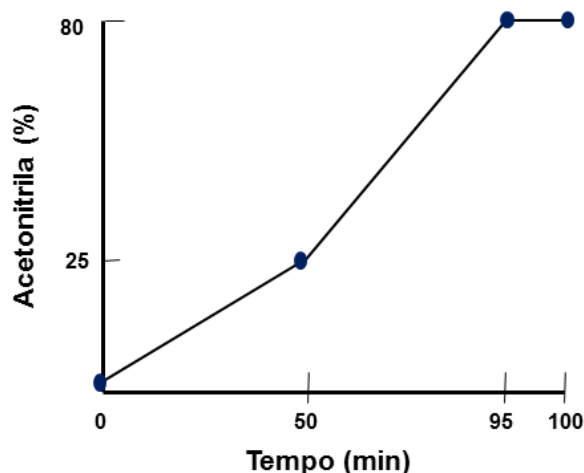
Onde $Abs_{controle}$ é a absorbância do controle, contendo apenas a solução alcoólica do radical $ABTS^{\cdot+}$, e $Abs_{amostra}$ é a absorbância do radical na presença da amostra ou do padrão (Trolox). A eficiência antirradicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0. Os resultados foram expressos através da CE_{50} (concentração efetiva para sequestrar 50% dos radicais livres) $\pm$ D.P. (desvio padrão) A realização deste ensaio foi feita em colaboração com a professora Tânia Maria Sarmiento da Universidade Federal Rural do Pernambuco.

4.1.8 Estudo do perfil cromatográfico dos vinho tinto SyRe e FrAcOEt pH7 VSF utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Detector de Ultravioleta (CLAE-UV)

Em princípio foi obtido o liofilizado do vinho como se segue: 15 mL de vinho foi adicionado em um balão volumétrico para remoção do álcool em rotaevaporador, o resíduo foi congelado e submetido posteriormente ao processo de liofilização, uma vez que foi observado em estudos preliminares que a presença do álcool interfere no formato dos picos. Em seguida foi produzida uma solução aquosa a partir do liofilizado do vinho a 1,0 mg/mL e da FrAcOEt pH7 VSF em etanol na mesma concentração e filtrada sob membrana filtrante de 0,45 μ m de diâmetro de poro, e logo após, realizou-se a separação cromatográfica conforme o método gradiente validado anteriormente (NASCIMENTO, 2010): 1,0% de acetonitrila (eluente orgânico) e 99% de solvente aquoso com ácido fórmico 0,5% (A) inicialmente, e 50 minutos depois

a concentração de B (eluente orgânico) passou para 25% e passados mais 45 minutos chegou a 80%, permanecendo por 5 minutos (figura 6). A corrida foi realizada empregando-se uma coluna C18 Phenomenex® (250 x 4,6 mm, 5 µm) acoplada a uma pré-coluna C18 (Phenomenex®), comprimento de onda de 250 nm, durante 100 minutos, sob fluxo de 1 mL/min.

Figura 6: Condição de eluição para determinação do perfil cromatográfico do vinho tinto SyRe e da FrAcOEt pH7 VSF.



4.1.9 Processo de quantificação do resveratrol (isômero *trans*) e quercetina empregando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Detector de Ultravioleta (CLAE-UV)

A quantificação dos compostos fenólicos foi conseguida utilizando o método validado por (NASCIMENTO, 2010) e de acordo com as condições cromatográficas listadas na tabela 2.

Tabela 2: Condições cromatográficas finais do método desenvolvido para quantificação do resveratrol (isômeros *cis* e *trans*) e quercetina

Sistema	Método Cromatográfico
Coluna	C18 Phenomenex® (250 x 4,6 mm), acoplada a uma pré-coluna C18
Detector	Ultravioleta (SPD 10AVvp)
Comprimento de onda	<i>Trans</i> -resveratrol: λ = 307 nm; Quercetina: λ = 370 nm

Fluxo	1 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Fase móvel	ACN:H2O miliQ + ácido fórmico 0,1% (35:65)
Tipo de eluição	isocrática
Cromatógrafo líquido	Cromatógrafo da marca Shimadzu configurado com os seguintes módulos: bomba LC – 10 ATvp, detector de comprimento de onda variável SPD 10AVvp, injetor manual Rheodyne (7725i) com <i>loop</i> de 20 µL, módulo controlador – SCL 10 Avp

Os analitos foram quantificados a partir da análise dos picos cromatográficos. Um volume de 20 µL de cada alíquota de vinho (1mL) e das frações (1 mg/mL) previamente filtradas foi injetado no cromatógrafo e uma vez obtidas as áreas relativas a cada analito, a concentração de cada componente de interesse foi calculada com base na equação da reta fornecida pela curva de calibração criada a partir de soluções dos padrões de resveratrol nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 1,5 µg/mL e de quercetina nas concentrações de 0,5; 0,7; 1,0; 1,5; 2,0 µg/mL.

4.1.10 Identificação de compostos fenólicos na FrAcOEt pH 7 SyRe VSF utilizando a técnica UPLC/MS

A separação cromatográfica dos compostos na amostra foi realizada em cromatógrafo líquido de ultra eficiência ACQUITY UPLC H- Class Class (Waters Corporation®, Milford, MA, EUA), acoplado a um espectrômetro de massa Quadupolo–Tof (Xevo G2-XS QToF, Waters) com ionização por eletrospray (ESI).

Utilizou-se uma coluna de fase reversa ACQUITY UPLC™ BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7µm, Waters, EUA) a 45 °C, com um volume de injeção de 5 µL. A

fase móvel consistiu numa mistura de bicarbonato de amônio (solvente A), acetonitrila acidificada com ácido fórmico a 0,01% (v/v) (solvente B) com um fluxo constante de 0,40 mL/min. O programa de eluição é apresentado na Tabela 3. O Detector de Arranjo de Fotodiodos (DAD) detectou as absorbâncias nos comprimentos de onda 210 a 500 nm.

O espectrômetro de massas foi operado em modo negativo de Ionização (ESI⁻). A detecção foi implementada no modo centróide MSE em uma faixa de massa de 50-1200 Da. A voltagem e a temperatura capilar foram mantidas a 4 kv e 120 °C respectivamente. O gás de dessolvatação (N₂) foi entregue em 800 L/h e 450 °C. A taxa de fluxo de gás do cone foi fixada em 50 L/h e a fonte de temperatura foi ajustada para 140 °C. A voltagem do capilar foi definida como 3V, a do cone 40V e para a energia de colisão foi utilizada uma rampa em relação à alta energia de 20 a 30 eV.

Essa análise foi realizada em colaboração com a professora Tânia Maria Sarmiento da Universidade Federal Rural do Pernambuco.

Tabela 3: Programa de eluição usado na análise por LC-MS

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	A%	B%
0,00	0,40	90,0	10,0
8,00	0,40	50,0	50,0
9,00	0,40	5,00	95,00
9,10	0,40	10,0	90,0
11,00	0,40	90,0	10,0

*A- solvente A

**B- solvente B

4.2 Ensaios Farmacológicos

4.2.1 Animais e Tratamento

Grupos de trinta e dois ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com peso entre 250–300 g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, foram ambientados em uma sala com controle de temperatura e em um ciclo de claro/escuro de 12:12 horas. Os animais tiveram acesso livre a uma ração padrão (Labina®, Purina, Paulinea, SP, Brazil) e água. Quando os animais completaram 12 semanas eles foram divididos em 4 grupos: SHR+ salina (n=8); SHR + fração acetato pH7 obtida do fracionamento do vinho Syrah

Rendeiras do Vale do São Francisco (50 mg/Kg) (n=8); SHR+ salina (n=8); SHR + fração acetato pH7 obtida do fracionamento do vinho Syrah Rendeiras do Vale do São Francisco (100 mg/Kg) (n=8). Cada grupo foi tratado com as respectivas doses diárias v.o. por gavagem, durante quinze dias. A escolha das doses e do tempo de duração do tratamento foi baseada nos resultados obtidos anteriormente com a quercetina (MONTEIRO *et al.*, 2012). Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia (CEUA-CBiotec) com certidão número 0601/13.

4.2.3 Avaliação dos parâmetros cardiovasculares: pressão sanguínea e frequência cardíaca

As medidas de pressão sanguínea e frequência cardíaca foram realizadas 24 horas após a implantação de cateteres de polietileno (PE) nos animais, por meio de procedimento cirúrgico. Inicialmente, um fragmento de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 - 0,61 mm, respectivamente) foi soldado a um segmento de cateter PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente) e então preenchidos com solução salina (0,9%) + 500 UI de heparina.

Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (75 e 10 mg/kg, ambos i.p., respectivamente) e em seguida foi realizada a canulação na artéria e veia femural, logo após a inserção e fixação, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados por uma incisão na região cervical posterior do animal. Posteriormente os mesmos foram alojados em gaiolas individuais e mantidos sob condições adequadas de temperatura e luminosidade e permaneceram recebendo água e ração *ad libidum*.

A pressão sanguínea e a frequência cardíaca foram então registradas no dia seguinte ao procedimento cirúrgico nos animais não anestesiados, pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão (MLT0380/D, ADInstruments, Sidney, Australia) conectado a um computador (Mikro-tip Blood pressure system, ADInstruments, Australia) executando o software

LabChart (ADInstruments, Australia). A frequência escolhida para amostragem dos dados foi de 500 Hz.

4.2.4 Avaliação da Sensibilidade do Barorreflexo

O índice de sensibilidade do barorreflexo é uma metodologia comum na literatura para se avaliar o ganho do barorreflexo, sendo determinado pela seguinte fórmula:

$$IS = \Delta FC / \Delta PAM$$

Em que : IS = Índice de Sensibilidade; ΔFC = Variação da frequência cardíaca [FC (batimento/min)]; ΔPAM = Variação da pressão arterial média [PAM (mmHg)].

Após o registro dos valores basais de pressão sanguínea e frequência cardíaca, o barorreflexo de cada grupo foi ativado administrando no cateter venoso dos animais as substâncias vasoativas: fenilefrina (8 µg/Kg) e nitroprussiato de sódio (25 µg/Kg), seguindo o método de Oxford modificado (BRAGA *et al.*, 2008), permitindo verificar as variações na frequência cardíaca em resposta a manipulações farmacológicas que aumentam ou diminuem a pressão arterial .

A fenilefrina foi utilizada para avaliar o componente parassimpático do barorreflexo cardíaco. Os dados de cada um dos grupos foram analisados por regressão linear utilizando o software GraphPad Prism Prism (v. 5.0, GraphPad Software Inc., San Jose, CA, EUA) e a inclinação da curva de regressão linear forneceu o ganho do barorreflexo em cada grupo.

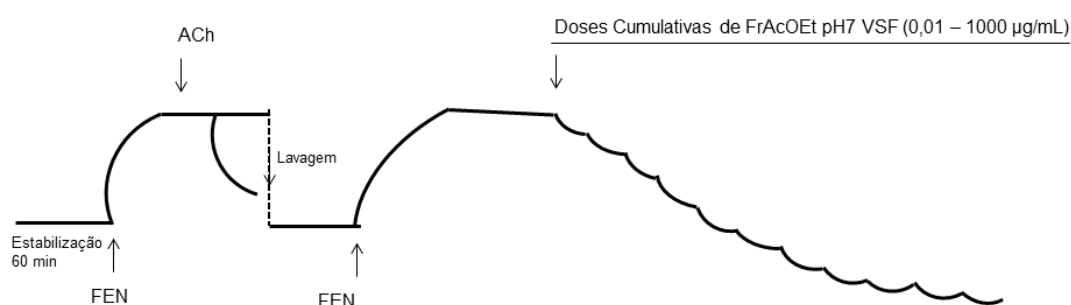
4.2.5 Ensaios Farmacológicos in vitro

Preliminarmente utilizando-se uma guilhotina, os animais foram eutanasiados por decapitação, a artéria mesentérica superior foi identificada, removida e, imediatamente, transferida para uma solução de Tyrode. Em seguida, o vaso foi dissecado e seccionado em anéis (1-2 mm de comprimento). O endotélio de alguns desses foi removido por meio de atrito mecânico entre as paredes internas do vaso e de uma haste de metal.

Cada anel foi imerso em cubas, contendo solução de Tyrode a 37°C, gaseificada com uma mistura carbogênica de 95% de O₂ e 5% de CO₂, na intenção de manter o pH relativamente constante entre 7,2 e 7,4. Logo após, os anéis foram suspensos verticalmente por linhas de algodão fixadas a um transdutor de força (DATAQ, 2008, Insigth, Brasil) e submetidos à tensão basal de aproximadamente 0,70g, durante 60 minutos para estabilização, substituindo a solução de Tyrode a cada 15 minutos, para prevenir a interferência de metabólitos. Os níveis de tensão isométrica foram captadas pelo sistema de aquisição (WinDaq/XL DI 148-U, Insight, Brasil).

Posteriormente a esses procedimentos a viabilidade do vaso, bem como a presença de endotélio funcional foram testadas. Para isso, os vasos foram pré-contraídos com fenilefrina (FEN, 10 µM) e, em seguida, foram adicionados 10 µM de Acetilcolina (Ach). Os anéis com relaxamento superior a 80% sobre a pré-contracção com FEN foram considerados com endotélio funcional (E+). Aqueles com relaxamento inferior a 10% foram considerados sem endotélio funcional (E-) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Prontamente, os anéis foram novamente contraídos com FEN (10 µM) e, após cerca de 30 minutos, foram administradas concentrações crescentes e cumulativas da fração acetato pH 7 do vinho Syrah Rendeiras (0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100; 300; e 1000 µg/mL), para obtenção de uma curva contração-resposta (figura 7). O relaxamento foi expresso como porcentagem reversa à contração com FEN e a eficácia do efeito vasorelaxante da amostra em teste foi avaliada utilizando-se os valores de E_{máx}. Em seguida, foram calculados os valores de CE₅₀ e efeito máximo (Emáx) das curvas individuais.

Figura 7: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do vasorrelaxamento induzido pela FrAcOEt pH7 VSF em artéria mesentérica superior de rato.



4.2.6 Avaliação das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Amostras de soro, fígado e rins foram coletadas em cada grupo. O nível de peroxidação lipídica nas amostras foi medido através da determinação do malondialdeído (MDA), que é um dos produtos finais do processo de peroxidação lipídica e reage com o ácido tiobarbitúrico como uma das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) para produzir um complexo vermelho colorido que tem um máximo de absorbância em 532 nm.

Os órgãos foram lavados com salina para minimizar a interferência da hemoglobina com radicais livres e para remover o sangue aderido aos tecidos e, então homogeneizados a 10% de tecido com tampão fosfato pH 7,4. Em seguida uma alíquota de 250 µL foi removida e armazenada a 37 °C por uma hora, 400 µL de ácido perclórico a 7% foi adicionado e a mistura centrifugada a 14.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e 400 µL de uma solução a 0,6% de ácido tiobarbitúrico foi adicionada e a mistura incubada a 60 °C por 1 hora. Após resfriamento, a absorbância a 532nm foi medida. A curva padrão foi gerada utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano. Os resultados foram expressos como nmol de MDA/mg de tecido para os órgãos e nmol de MDA/mL para o soro.

4.2.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Os dados foram analisados por teste t de Student ou ANOVA two-way seguido de pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o uso do software GraphPad Prism (v. 5.0, GraphPad Software Inc., San Jose, CA, EUA). O nível de significância estatística foi definido como 95% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises dos fenólicos totais dos vinhos e de suas frações

A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de técnicas, todavia, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu, adotando ácido gálico como padrão de referência figura entre as mais empregadas. O reagente é constituído por uma mistura de ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolibdico, que, ao oxidar os fenóis, é reduzida a uma mistura de óxidos azuis de tungstênio e de molibdênio cuja coloração tem o máximo de absorbância a 750 nm e é proporcional ao conteúdo de compostos fenólicos (SOUSA *et al.*, 2007; NEVES, ALENCAR, CARPES, 2009)

O teor de fenólicos totais foi analisado para amostras dos vinhos inteiros bem como, para extratos aquoso, AcOEt pH 7,0 e AcOEt pH 2,0 obtidos através do fracionamento do vinho tinto Shyrah do Vale do São Francisco. Para os vinhos inteiros, o teor de fenólicos totais variou entre $2163,44 \pm 0,01$ a $3945,33 \pm 0,03$ mg EAG/L (tabela 4).

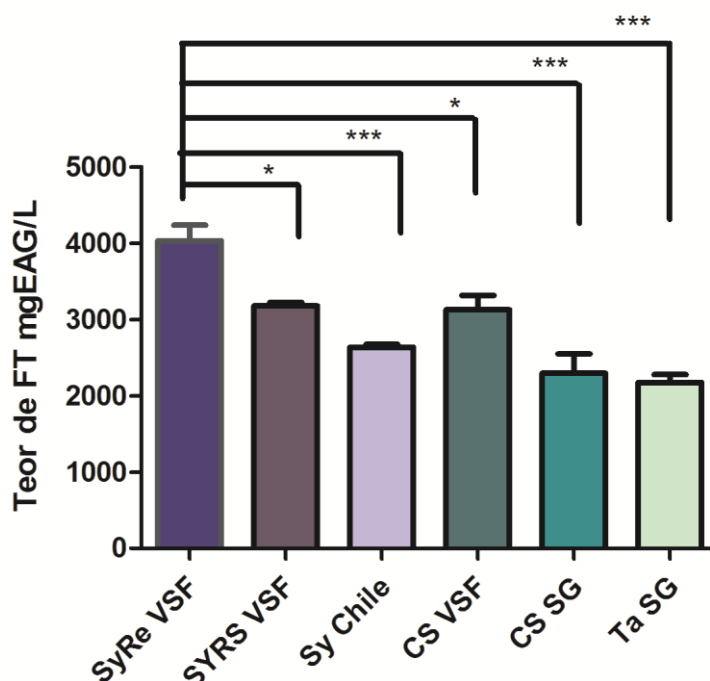
Tabela 4: Teor de Fenólicos totais dos vinhos analisados expressos em mg EAG/L

Amostras	Teor de Fenólicos Totais (mg EAG/L)
SyRe VSF	$3945,36 \pm 0,03$
SyRS VSF	$3125,27 \pm 0,01$
Sy Chile	$2605,55 \pm 0,01$
CS VSF	$3078,03 \pm 0,03$
CS SG	$2278,19 \pm 0,04$
Ta SG	$2163,44 \pm 0,01$

O vinho tinto Shyrah do Vale do São Francisco (SyRe VSF) foi a amostra que obteve o maior teor de fenólicos totais, conforme pode ser corroborado observando o gráfico 1, construído a partir da análise de variância (ANOVA)

“one-way” seguido do pós-teste de Tukey, e considerando significantes as diferenças entre as médias quando $p < 0,05$.

Gráfico 1: Teor de Fenólicos totais dos vinhos analisados expressos em mg EAG/L.



*** $p < 0,0001$ comparado com SyRe VFS.

Neste trabalho, as amostras de vinho da região do Vale do São Francisco apresentaram maior teor de fenólicos totais em relação aos vinhos das outras regiões. Esses dados estão de acordo com um estudo realizado por Nascimento, 2010 que analisou e comparou o teor de fenólicos totais dos vinhos brasileiros das regiões Sul e do Vale do São Francisco com vinhos importados, a partir do teste de Folin-Ciocalteu e observou que os valores encontrados nos teores de fenólicos totais para os vinhos brasileiros, especificamente os vinhos do VSF, foram similares ou superiores aos importados, sendo o da variedade Syrah o que apontou o maior teor de 4814 mgEAG/L.

Gris e colaboradores (2013) estudando o perfil fenólico através do método Folin-Ciocalteu de vinhos das variedades Cabernet Franc, Merlot, Sangiovese e Syrah, safras 2006 e 2007 produzidos em São Joaquim no Sul do

Brasil, encontraram teores de fenólicos totais que variaram de $2287,6 \pm 31,1$ a $2813,7 \pm 16,2$.

Dados semelhantes a este trabalho foram observados quando dez amostras de vinhos tintos comerciais, a partir das variedades de uva, Cabernet Sauvignon e Syrah, safra 2012, produzidos no Brasil (Vale do São Francisco e do Rio Grande do Sul), no Chile, na Austrália e na África do Sul foram avaliadas por Silva (2015). O resultado referente ao conteúdo de fenólicos totais apresentou uma superioridade nos vinhos do cultivar Syrah oriundos do VFS, ratificando os dados observados por Lucena (2010) que apresentou o maior teor de fenólicos dentre as amostras analisadas.

Esses dados podem ser explicados possivelmente por essa região brasileira exercer grande influência sobre o conteúdo fenólico nos vinhos devido à forte exposição solar, o que pode aumentar até dez vezes mais a concentração de compostos fenólicos (LINS & SARTORI, 2014).

Dessa forma com base nesse resultado, somado ao de atividade antioxidante que será apresentando posteriormente, decidiu-se escolher o vinho tinto SyRe VSF para a continuação do estudo.

Após o fracionamento do vinho SyRe VSF, verificou-se que nas frações o conteúdo de fenólicos totais variou de $5,57 \pm 0,01$ a $58,45 \pm 0,01$ mg EAG/100mg, conforme expresso na Tabela 5 e gráfico 2.

Tabela 5: Teor de fenólicos totais das frações do vinho tinto SyRe VSF expressos em mg EAG/100mg

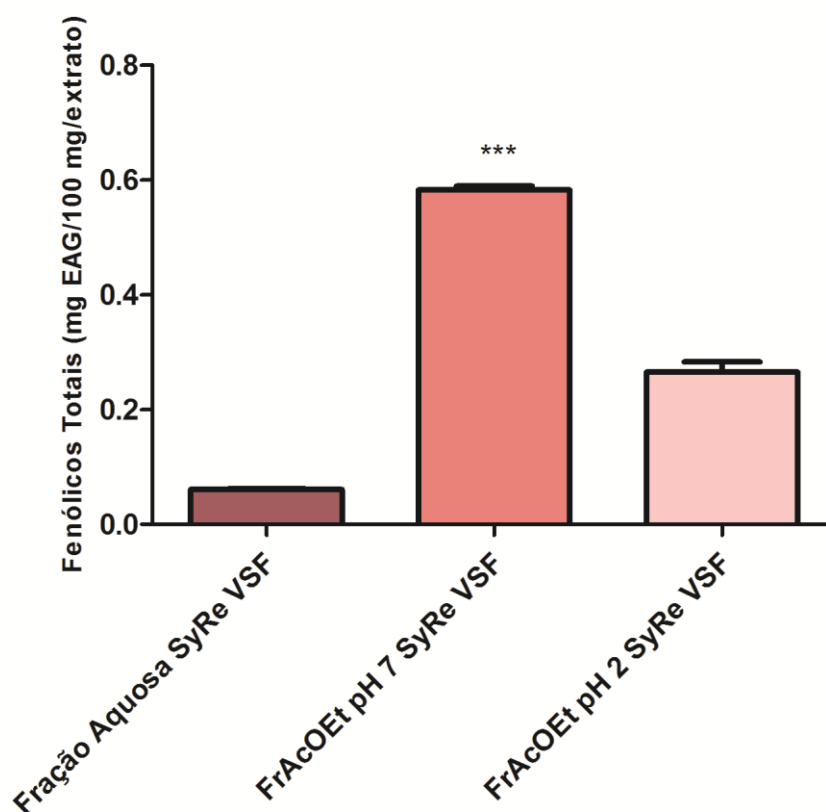
Amostras	Teor de Fenólicos Totais (mg EAG/100mg)
Fração Aquosa SyRe VSF	$5,57 \pm 0,01$
FrAcOEt pH 7 SyRe VSF	$58,45 \pm 0,01$
FrAcOEt pH 2 SyRe VSF	$26,29 \pm 0,03$

A FrAcOEt pH 7 SyRe VSF mostrou-se com o maior teor de fenólicos totais. Conforme Ghiselli *et al.* (1998), que investigaram a atividade antioxidante de diferentes classe de fenólicos separadas de um vinho italiano, a fração aquosa concentra as antocianinas; a fração acetato de etila pH 7.0 concentra as procianidinas, catequinas, epicatequinas, glicosídeos de

quercetina e flavonóis; e a fração acetato de etila pH 2.0 concentra os ácidos fenólicos e os glicuronídeos de quercetina.

Diferentemente deste trabalho Tenore, Basile e Novellino (2011), apesar de terem trabalhado com frações obtidas de um vinho tinto marroquino da variedade Syrah, expressaram os valores de fenólicos totais encontrados de maneira distinta, os mesmos variaram entre $61,0 \pm 0,8$ mg EAG/100mL vinho (fração aquosa) a $179,5 \pm 0,1$ mg EAG/100mL vinho (fração acetato pH 2), a fração acetato pH 7 apresentou $40,2 \pm 0,3$ mg EAG/100mL vinho. Outro estudo sobre diferentes frações obtidas por extração líquido-líquido de vinho tinto produzidos na Sérvia a partir da variedade Prokupac, apresentou teor de fenólicos totais de $4,82 \pm 2,03$ mg EAG/100mg de extrato para a fração aquosa, (MENKOVIĆ *et al.*, 2014) e de $28,91 \pm 5,05$ e $11,83 \pm 3,12$ mg EAG/100mg para as frações fração acetato pH 7 e acetato pH 2, respectivamente. Contudo, é interessante lembrar que a concentração final polifenólica no vinho depende de vários fatores como a variedade da uva, as condições climáticas, e técnicas de vinificação (LACHMAN *et al.*, 2009)

Gráfico 2: Teor de fenólicos totais das frações do vinho tinto SyRe VSF expressos em mg EAG/100mg.



*** $p < 0,0001$ (Fração aquosa SyRe VSF vs FrAcOEt pH 7 SyRe VSF); (FrAcOEt pH 2 SyRe VSF vs FrAcOEt pH 7 SyRe VSF)

5.2 Análise dos flavonóis e flavonas dos vinhos e de suas frações

A classe dos flavonoides é de grande interesse na enologia, uma vez que desempenha um papel importante na estabilidade e características do produto, além das vários benéficos a saúde atribuída a esta classe (MAGALHÃES *et al.*, 2012). Sugere-se que o conteúdo elevado de flavonóis seja o responsável pelo alto teor de compostos fenólicos encontrados em alguns estudos (LUCENA, 2010). Embora outros trabalhos relatem que os flavonóis sejam uma família minoritária nas uvas, exercem apesar disso um papel fundamental na evolução da cor dos vinhos tintos através de processos de co-pigmentação com as antocianinas (RIBÉREAU-GAYON, 2006).

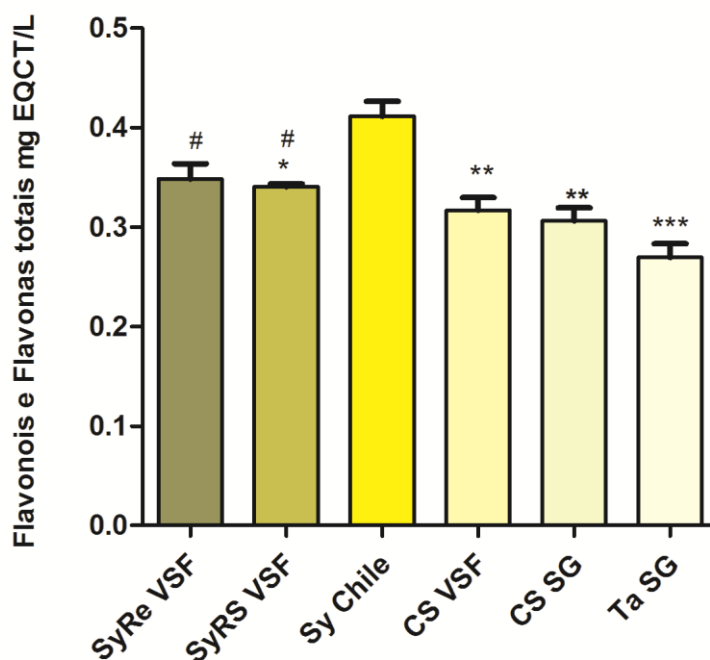
O teor de flavonóis e flavonas totais foi determinado para amostras dos vinhos inteiros e para os extratos aquoso, AcOEt pH 7,0 e AcOEt pH 2,0 obtidos através do fracionamento do vinho tinto SyREN VSF. Os valores

encontrados para os vinhos inteiros variaram entre $97,32 \pm 0,02$ a $125,04 \pm 0,03$ μg Eq QCT/mL, de acordo com a tabela 6 e melhor visualizado no gráfico 3.

Tabela 6: Teor de flavonóis e flavonas totais dos vinhos analisados expressos em μg Eq QCT/mL

Amostras	Teor de Flavonóis Totais (μg Eq QCT/mL)
SyRe VSF	$125,04 \pm 0,03$
SyRS VSF	$122,35 \pm 0,01$
Sy Chile	$138,26 \pm 0,03$
CS VSF	$113,93 \pm 0,02$
CS SG	$110,19 \pm 0,02$
Ta SG	$97,32 \pm 0,02$

Gráfico 3: Teor de flavonóis e flavonas totais dos vinhos analisados expressos em μg Eq QCT/mL.



*** $p < 0,0001$ quando comparados com Sy Chile; # $p < 0,05$ comparados com Ta SG.

Esse resultado demonstrou que menos de 6% do teor de fenólicos totais para cada um dos vinhos analisados corresponde aos flavonóis, conforme a tabela 7.

Tabela 7: Reação entre o Teor de flavonóis e flavonas totais e o teor de fenólicos totais dos vinhos analisados.

Amostras	Teor de Fenólicos Totais (mg EAG/L)	Teor de Flavonóis Totais (µg Eq QCT/mL)	% Teor Flavonóis/ Teor de fenólicos totais
SyRe VSF	3945,36±0,03	125,04±0,03	3,1
SyRS VSF	3125,27±0,01	122,35±0,01	3,9
Sy Chile	2605,55±0,01	138,26±0,03	5,3
CS VSF	3078,03±0,03	113,93±0,02	3,7
CS SG	2278,19±0,04	110,19±0,02	4,8
Ta SG	2163,44±0,01	97,32±0,02	4,5

Pode-se sugerir que outras classes de fenólicos estejam presentes em maior abundância nas amostras avaliadas, como por exemplo, antocianinas ou ainda compostos não flavonoides. Entretanto os valores aqui encontrados estão de acordo com a literatura, que relatam um teor desses compostos em torno de 100 mg/L em média (GAYON *et al.*, 2006). Um trabalho realizado por Hosu, Cristea e Cimpoiu (2014) que analisou entre outros dados o conteúdo de flavonóis totais para 27 vinhos romenos apresentou teores desses compostos que variaram entre 6.786 a 291.255 µg/mL.

Os flavonóis estão presentes nos vinhos tintos em forma de aglicona uma vez que os glicosídeos são hidrolisados durante a fermentação. Beer e colaboradores (2005) observaram que ocorreu diminuição significativa do conteúdo de flavonóis durante o período de armazenamento de 0 a 12 meses e atribuíram a redução desse grupo fenólico a possível hidrólise dos glicosídeos flavonoídicos e provável precipitação das agliconas.

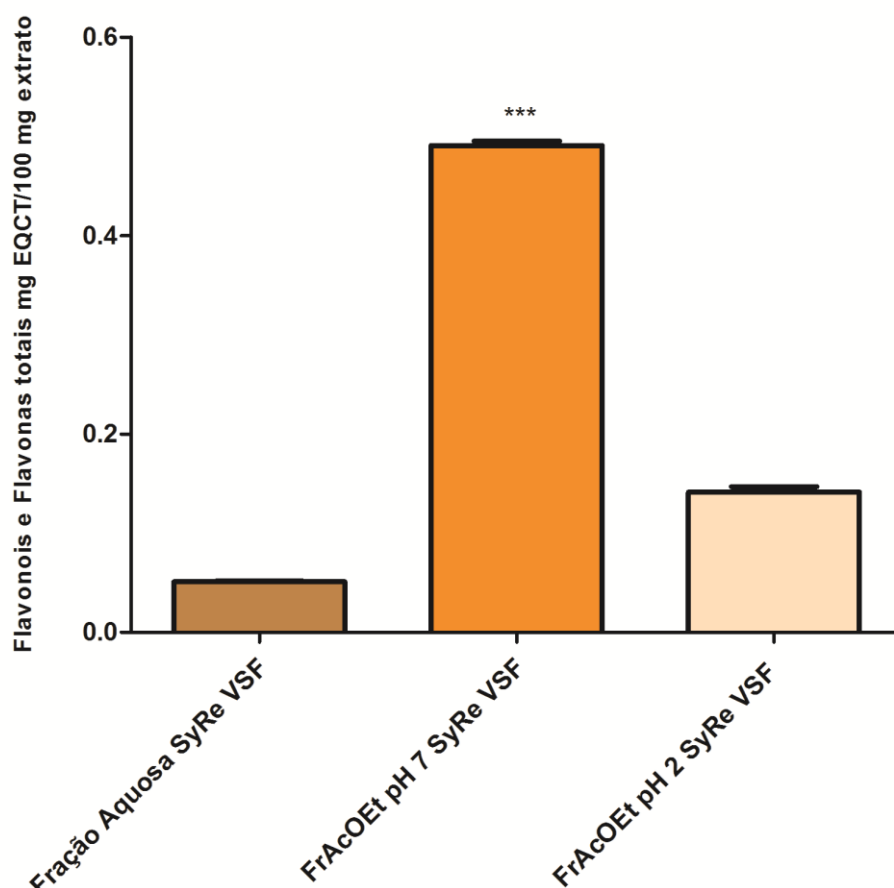
Além da variedade da fruta e condições climáticas, o armazenamento também exerce influencia na composição fenólica dos vinhos. Durante o período de envelhecimento do vinho podem ocorrer reações de oxidação, polimerização, condensação, incluindo reações diretas entre antocianinas e flavonóis, contribuindo assim para modificação desses compostos no produto (IVANOVA, STEFOVA, CHINNICI, 2010).

Com relação ao teor de flavonóis totais para as frações, os resultados encontram-se na Tabela 8 e Gráfico 4 seguintes.

Tabela 8: Teor de flavonóis totais para as frações do vinho SyRe VSF expressos em μg Eq QCT/100mg

Amostras	Teor de Flavonóis Totais (μg Eq QCT/100mg)
Fração Aquosa SyRe VSF	2,07 $\pm$ 0,01
FrAcOEt pH 7 SyRe VSF	17,50 $\pm$ 0,01
FrAcOEt pH 2 SyRe VSF	5,24 $\pm$ 0,01

Gráfico 4: Teor de flavonóis totais nas frações analisados expressos em μg Eq QCT/mL.



*** $p < 0,0001$ (Fração aquosa SyRe VSF vs FrAcOEt pH 7 SyRe VSF); (FrAcOEt pH 2 SyRe VSF vs FrAcOEt pH 7 SyRe VSF).

A FrAcOEt pH 7 SyRe VSF foi a que apresentou o maior conteúdo de flavonóis totais, correspondendo a aproximadamente 30% do teor de fenólicos totais. Nosso resultado está de acordo com a literatura, dado que há achados que frações orgânicas de vinhos tintos são ricas em constituintes químicos dessa classe de compostos: quercetina, campferol-3-glicosídeo, myricetina-3-glicosídeo, alguns flavan-3-ols. (MENKOVIĆ *et al.*, 2014; Ghiselli *et al.*, 1998).

5.3 Quantificação de Antocianinas Monoméricas

As antocianinas são o mais importante grupo de pigmentos responsáveis por inúmeras tonalidades de cores encontradas em flores, folhas, alimentos e bebidas, incluindo vinhos tintos. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que essa classe de compostos fenólicos são responsáveis por importantes propriedades como: antioxidante, anticarcinogênico e uma diminuição do risco de doenças cardiovasculares (BURIN *et al.*, 2011, LOPES *et al.*, 2007).

O Método de pH diferencial, é um procedimento rápido e fácil e tem sido amplamente utilizado para a quantificação de antocianinas, com base nas transformações estruturais sofridas pelas antocianinas em diferentes pHs (GIUSTI; WROLSTAD, 2001).

Os valores de antocianinas monoméricas para os vinhos tintos inteiros variaram de $126,55 \pm 0,007$ a $26,67 \pm 0,005$ mg/L (tabela 9), sendo o maior valor ($126,55 \pm 0,007$ mg/L) encontrado na amostra do Vinho SyRe VSF.

Tabela 9: Teor de antocianinas monoméricas nas amostras de vinhos inteiros (mg/L)

Amostras	Teor de antocianinas monoméricas (mg /L)
SyRe VSF	$126,55 \pm 0,007$
SyRS VSF	$103,97 \pm 0,0262$
Sy Chile	$27,86 \pm 0,009$
CS VSF	$26,67 \pm 0,005$
CS SG	$65,82 \pm 0,005$
Ta SG	$103,69 \pm 0,015$

Nota-se que o conteúdo de antocianinas entre os vinhos variou bastante com o lugar de origem e a variedade da uva; ainda assim os valores encontrados estão de acordo com os observados na literatura, embora, não tenha sido encontrado um padrão no teor desses compostos. Isto é provavelmente devido a diferenças climáticas entre as regiões, muitos autores relatam que a temperatura e a exposição solar exercem um efeito acentuado na síntese de antocianinas (JACKSON, 2008).

Gris e colaboradores (2011) analisando o teor de antocianinas de vinhos brasileiros e importados de diferentes variedades, encontraram valores que variaram entre 21,95 mg/L para um *Cabernet Sauvignon* francês a 46,95 mg/L para o vinho *Syrah* da região Sul do Brasil. Enquanto Poianã e colaboradores (2007) observaram teores entre 70,81 a 177,46 mg/L em vinhos tintos obtidos a partir da uva *Cabernet Sauvignon* processados em diferentes vinhedos da Romênia. Outro estudo investigou o teor de antocianinas monoméricas pelo método do pH diferencial em vinhos tintos de dez diferentes anos de safra, produzidos no município de Klosterneuburg e observou valores elevados (150 mg/L) em vinhos mais jovens e que esse conteúdo foi reduzido em mais de 50% em dois anos (EDER *et al.*, 2014).

Para as frações os valores encontrados foram entre $2,13 \pm 0,008$ mg/L a $4,99 \pm 0,019$ mg/L (tabela 10), sendo esse o maior valor corresponde a FrAcOEt pH 7 SyRe VSF. Esse maior teor encontrado na fase orgânica pH neutro, possivelmente deve-se ao processo de extração envolvendo diferentes pH's que favoreceu a ionização.

Tabela 10: Teor de antocianinas monoméricas nas frações do vinho tinto SyRe VSF estudadas (mg/L)

Amostras	Teor de antocianinas monoméricas (mg /L)
Fração Aquosa SyRe VSF	$2,82 \pm 0,004$
FrAcOEt pH 7 SyRe VSF	$4,99 \pm 0,019$
FrAcOEt pH 2 SyRe VSF	$2,13 \pm 0,008$

De forma semelhante a este trabalho, Lucena (2010) investigando frações aquosas e acetato de vinhos tintos da região do Vale do São Francisco, observou teores de antocianinas monoméricas que variaram de não

determinada a $2,156 \pm 0,084$ mg/L, sendo os valores mais baixos prevalentes na fração acetato pH 2.

5.4 Avaliação da Atividade Sequestradora do Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH•)

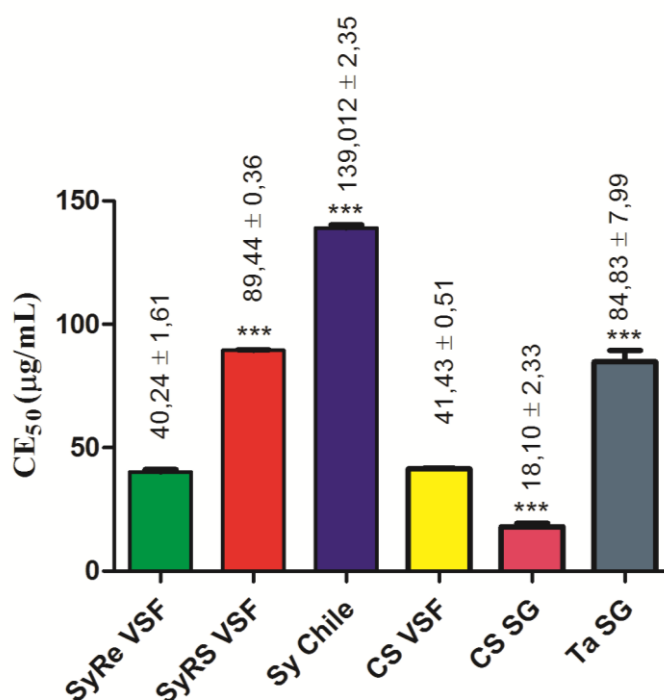
A atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH• 2,2-difenil-1-picril-hidrazila - DPPH•, que absorve radiação a 515 nm consiste na redução deste radical, de coloração púrpura, que, ao receber um elétron ou um radical hidrogênio, modifica sua coloração para amarelo (difenil-picril-hidrazina), ficando estável e com o desaparecimento da absorção que pode ser avaliada pelo decréscimo da absorbância (COSTA *et al.*, 2010). Alguns autores recomendam a utilização do método DPPH por ser um recurso fácil e preciso para a avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais (MOLYNEUX, 2004; KEDARE & SINGH, 2011).

A avaliação da atividade sequestradora do radical DPPH• foi determinada e expressa como CE₅₀ (que é a concentração da amostra necessária para inibir 50% da atividade do radical livre) (tabela 11 e gráfico 5).

Tabela 11: Atividade sequestradora de radical DPPH• para os vinhos analisados

Amostras	CE ₅₀ (µg/mL)
SyRe VSF	40,24±1,61
SyRS VSF	89,44±0,36
Sy Chile	139,02±2,35
CS VSF	41,43±0,51
CS SG	18,10±2,33
Ta SG	84,83±7,99
Ácido Ascórbico	4,25 ± 0,22

Gráfico 5: Atividade sequestradora de radical DPPH $\cdot$ para os vinhos analisados.



*** $p < 0,0001$ quando comparados ao vinho SyRe VSF.

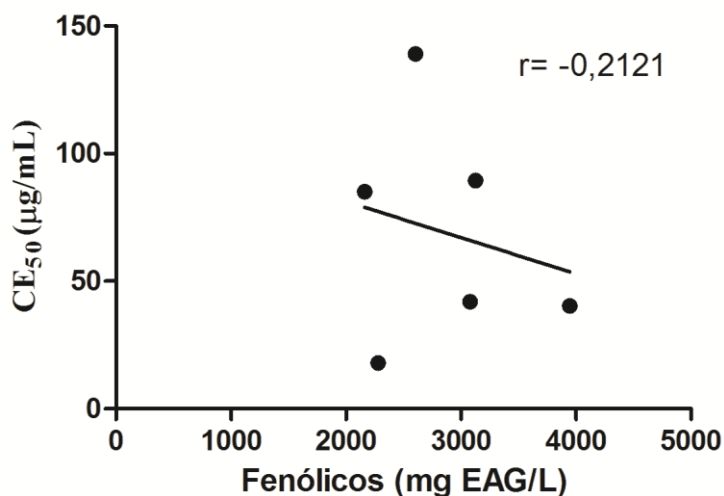
Os vinhos analisados neste trabalho demonstraram atividade antioxidante frente ao radical DPPH $\cdot$ uma vez que substâncias e extratos que possuem CE₅₀ < 500 µg/mL são considerados ativos (CAMPOS, 2003). Além disso, os dados mostraram-se semelhantes aos resultados obtidos por Nascimento (2010), que também avaliou a atividade anti-radicalar de vinhos brasileiros e importados, que variou naquele estudo entre 24,82 ± 0,72 µg/mL a 129,64 ± 4,80 µg/mL. Já, Ono (2014), observou vinhos com concentração efetiva necessária para sequestrar 50% dos radicais com valores entre 3,57 ± 0,06 a 275,95 ± 3,25 µg/mL.

Um estudo sobre a atividade antioxidante de bebidas alcoólicas comumente consumidas no Brasil, como: vinho tinto, vinho branco, cachaça envelhecida, tiquira, licor, uísques, e outros, utilizando o método espectrofotométrico baseado na redução da concentração do radical DPPH $\cdot$, concluiu que o vinho possui a maior atividade antioxidante e que essa atividade é influenciada pela intensidade da cor das bebidas (GOMES & VICENTE, 2009)

É interessante ressaltar que a maneira como a atividade antioxidante dos vinhos é expressa na literatura não possui uma padronização na unidade

que é expressa para indicar a atividade anti-radicalar, bem como se distingue quantos aos padrões utilizados, e o tempo de reação (SILVA *et al.*, 2014; JIANG & ZHAN, 2012).

Gráfico 6: Correlação entre Fenólicos totais dos vinhos analisados e a CE_{50} obtida pelo método com DPPH como radical.



Há evidências que o grande potencial antioxidante do vinho tinto é devido aos seus compostos fenólicos, os quais estão presentes em quantidades suficientes para garantir uma diminuição da atividade dos radicais (ZORZAN, 2006).

Neste estudo, verificou-se uma correlação fraca entre os fenólicos totais dos vinhos analisados e a CE_{50} , conforme mostrado no Gráfico 6, onde o coeficiente de correlação de Pearson $r = -0,2121$. Esse o valor sugere a força da relação entre as variáveis, que de acordo com Dancey e Reidy (2005) apontam para correlação fraca: $r = 0,10$ até $0,30$; um $r = 0,40$ até $0,6$ é considerado moderado e um valor de $r = 0,70$ até 1 é considerado como forte. E o sinal negativo significa que há uma relação inversa entre as variáveis, isto é, ao se aumentar a quantidade de fenólicos totais nas amostras ocorre uma diminuição da CE_{50} , o que mostra que esses compostos de fato estão envolvidos com a resposta antioxidante nas amostras (FILHO JUNIOR, 2009).

Outros trabalhos na literatura relatam coeficientes de correlação maiores entre os fenólicos e a atividade antioxidante mensurada pelo método do DPPH. Fernández-Pachón e colaboradores (2004) encontraram uma correlação forte entre o teor de fenólicos totais de vinhos tintos e o teste DPPH, $r = 0.8237$. Burin e colaboradores (2010) observaram um coeficiente de correlação

moderado, $r = 0,54$, ao analisar o teor de fenólicos e atividade antioxidante frente ao radical DPPH em vinhos da região do Vale do Rio do Peixe. A maioria dos estudos assume a correlação positiva entre a atividade anti-radicalar e o conteúdo de fenólicos, no entanto, recentemente esta correlação tem sido um assunto de debate e investigação, uma vez que já relatos de amostras que possuem um alto teor de fenólicos e mesmo assim não se mostram tão eficientes em sequestrar radicais, enquanto outras são mais eficientes mesmo não possuindo um conteúdo tão elevado de compostos fenólicos (XANTHOPOULOU *et al.*, 2010).

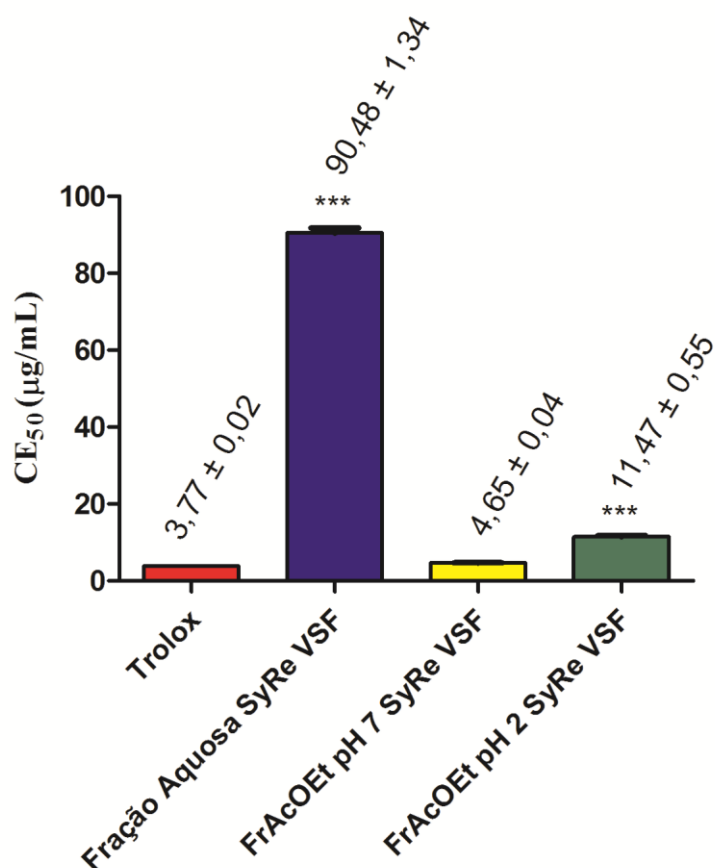
Os dados acima apoiam a ideia de que um elevado teor de fenólicos totais em uma amostra não é necessariamente indicativo de elevada atividade anti-radicalar, entretanto ainda assim, a mesma contribui para a atividade antioxidante, visto que, diferenças nas características dos polifenóis, podem determinar uma diferente capacidade antioxidante (MANFROI, 2007).

Em se tratando das frações, a FrAcOEt pH 7 SyRe VSF foi a que apresentou melhor atividade antioxidante (tabela 12 e gráfico 7), uma vez que, quanto menor o valor de CE_{50} apresentado pelo extrato, menor quantidade de extrato foi necessária para reduzir 50% do radical DPPH•, e conseqüentemente maior foi sua atividade antioxidante.

Tabela 12: Atividade sequestradora de radical DPPH• para as frações do vinho SyRe VSF

Amostras	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Fração Aquosa SyRe VSF	56,27 $\pm$ 5,50
FrAcOEt pH 7 SyRe VSF	3,4 $\pm$ 0,03
FrAcOEt pH 2 SyRe VSF	13,25 $\pm$ 0,07
Ácido Ascórbico	4,38 $\pm$ 0,07

Gráfico 7: Atividade sequestradora de radical DPPH $\cdot$ para as frações do vinho SyRe VSF.



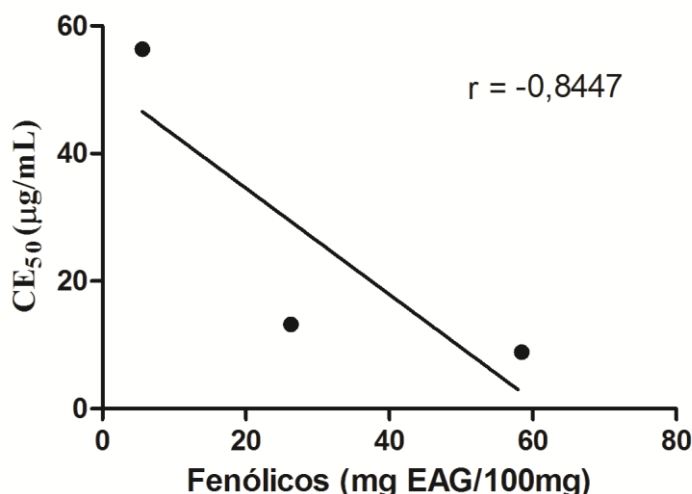
*** $p < 0,0001$ quando comparados a FrAcOEt pH 7 SyRe VSF.

Uma pesquisa no mesmo sentido, que avaliou a atividade antioxidante de frações obtidas a partir do fracionamento de vinhos do Vale do São Francisco, demonstrou que as frações ricas em flavonoides e glicosídeos de quercetina foram as mais ativas (LUCENA, 2010). Outro trabalho equivalente, também evidenciou a fração rica em flavonoides, proveniente de vinho tinto, como a mais ativa frente ao radical DPPH $\cdot$ (ROUSSIS, LAMBROPOULOS, SOULTI, 2005). Já Tenore, Basilo e Novellino (2011) revelaram que a fração aquosa, rica em antocianinas foi a que exibiu maior atividade antioxidante, mesmo apresentando um teor de fenólicos totais inferiores ou comparáveis às outras frações.

Observou-se uma forte correlação entre os fenólicos totais das frações e a CE₅₀, conforme mostrado no Gráfico 8, onde o coeficiente de correlação de Pearson foi: $r = -0,8447$; e ainda uma relação inversa entre as variáveis, ou seja, para as frações onde a quantidade de fenólicos totais foi maior, ocorreu

uma diminuição da CE_{50} , o que mostra que esses compostos de fato estão envolvidos com a resposta antioxidante nessas amostras. Um coeficiente de correlação semelhante, $r = -0,8196$, foi obtido entre os teores de fenóis totais e atividades antioxidante mensurada pelo ensaio DPPH nos extratos das folhas das cultivares de *Ipomoea batatas* (L.), vegetal nativo da América Tropical, que destaca pela presença dos compostos fenólicos (SOARES *et al.*, 2014).

Gráfico 8: Correlação entre Fenólicos totais das frações do vinho SyRe VSF e a CE_{50} obtida pelo método com DPPH como radical.



5.5 Avaliação da Atividade Sequestradora do Radical $ABTS^{\cdot+}$

Da mesma forma que o teste DPPH, o ABTS avalia a atividade antioxidante por meio da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfônico) ($ABTS^{\cdot+}$), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Esta captura provoca um decréscimo na absorbância, que é lida a partir da mistura do radical com o antioxidante (SUCUPIRA *et al.*, 2012).

A análise da atividade sequestradora do radical $ABTS^{\cdot+}$ baseia-se na geração do $ABTS^{\cdot+}$, de cor azul esverdeado, por meio da reação do ABTS com persulfato de potássio que possui absorção em 734 nm. Com a adição de um antioxidante ocorre a redução do $ABTS^{\cdot+}$ a ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional. Com a extensão da perda de cor, a porcentagem de inibição do $ABTS^{\cdot+}$ é determinada em função do Trolox (ácido 6-hidroxi-

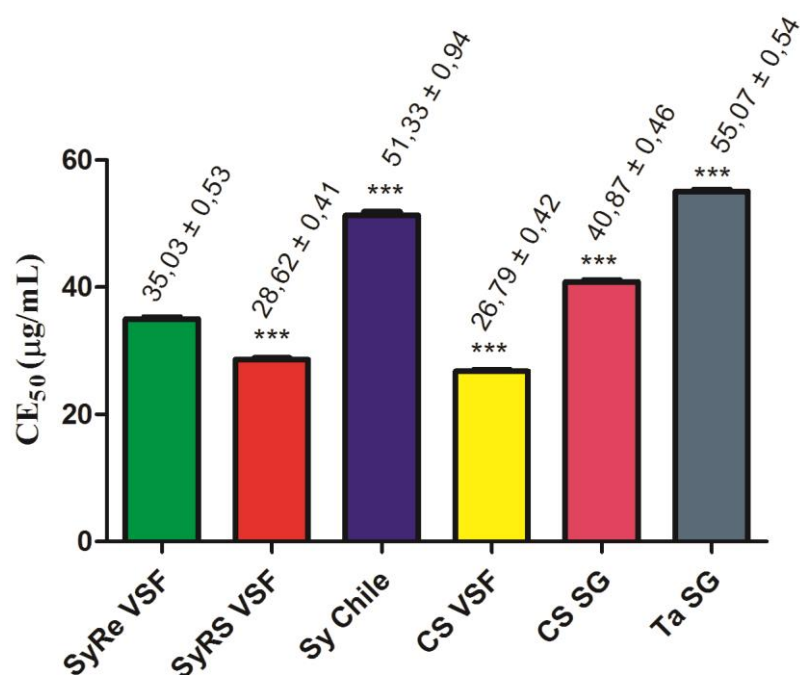
2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), um padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante.

A atividade antioxidante frente ao radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ foi expressa em CE_{50} , da mesma forma que para o radical DPPH e os valores encontram-se expressos nas tabelas 13 e gráfico 9 seguintes.

Tabela 13: Atividade sequestradora de radical ABTS para os vinhos analisados

Amostras	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
SyRe VSF	$35,03 \pm 0,53$
SyRS VSF	$28,62 \pm 0,41$
Sy Chile	$51,33 \pm 0,94$
CS VSF	$26,79 \pm 0,42$
CS SG	$40,87 \pm 0,46$
Ta SG	$55,07 \pm 0,54$
Trolox	$3,77 \pm 0,02$

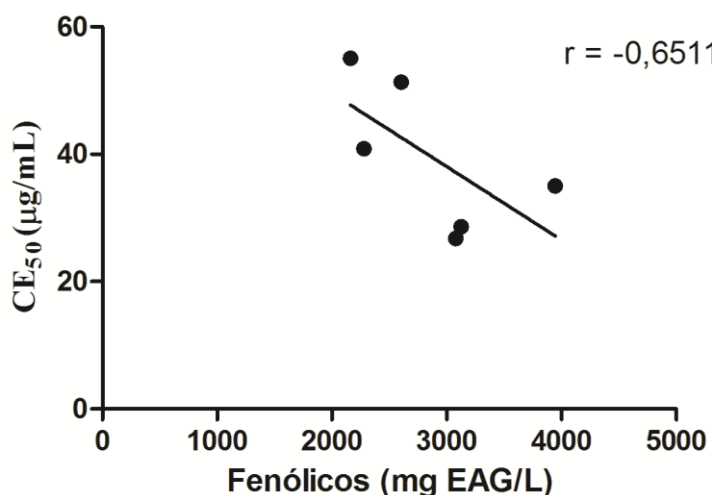
Gráfico 9: Atividade sequestradora de radical ABTS para os vinhos analisados



*** $p < 0,0001$ quando comparados a SyRe VSF

A amostra de vinho CS VSF, $CE_{50} = 26,79 \pm 0,42 \mu\text{g/mL}$, apresentou uma melhor atividade sequestradora do radical ABTS em comparação com as outras amostras de vinho e a amostra Ta SG, $CE_{50} = 55,07 \pm 0,54 \mu\text{g/mL}$, foi a menos ativa. O trolox (substância padrão) apresentou $CE_{50} = 2,27 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$. Este teste apresentou um moderado coeficiente de correlação negativo, $r = -0,6511$, sugerindo que os compostos fenólicos estão diretamente envolvidos na atividade antioxidante (gráfico 10).

Gráfico 10: Correlação entre Fenólicos totais dos vinhos analisados e a CE_{50} obtida pelo método com ABTS como radical.

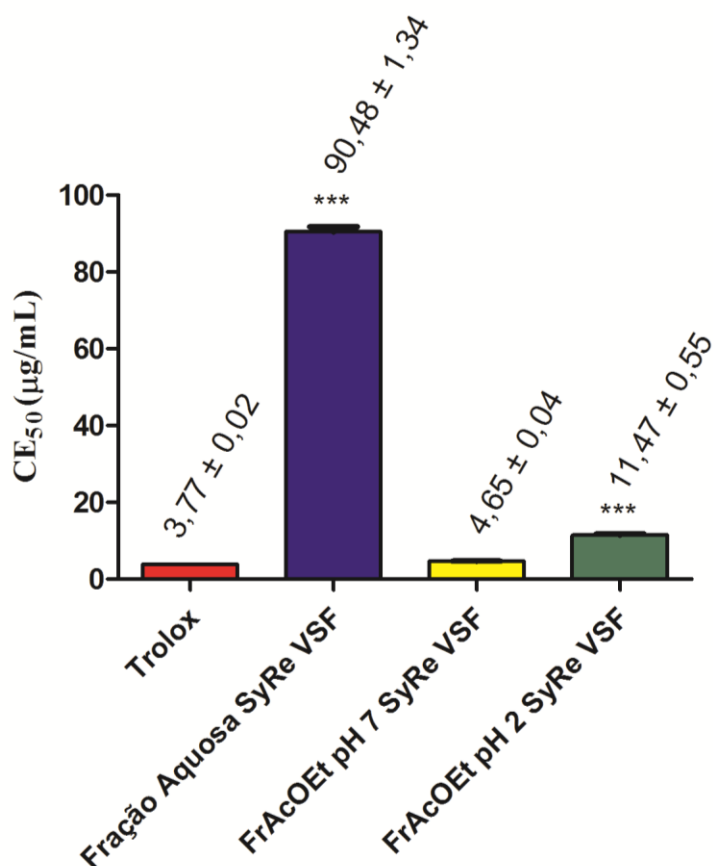


A Fração Aquosa SyRe VSF, $CE_{50} = 90,48 \pm 1,34 \mu\text{g/mL}$, foi a menos ativa. Já a amostra FrAcOEt pH 7 SyRe VSF, $CE_{50} = 4,65 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$, apresentou uma ótima atividade sequestradora do radical ABTS, bem semelhante ao Trolox (substância padrão), $CE_{50} = 3,77 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$, assim como no teste DPPH (tabela 14 e gráfico 11).

Tabela 14: Atividade sequestradora do radical ABTS para as frações do vinho SyRe VSF

Amostras	CE_{50} (µg/mL)
Fração Aquosa SyRe VSF	$90,48 \pm 1,34$
FrAcOEt pH 7 SyRe VSF	$4,65 \pm 0,04$
FrAcOEt pH 2 SyRe VSF	$11,47 \pm 0,55$
Trolox	$3,77 \pm 0,02$

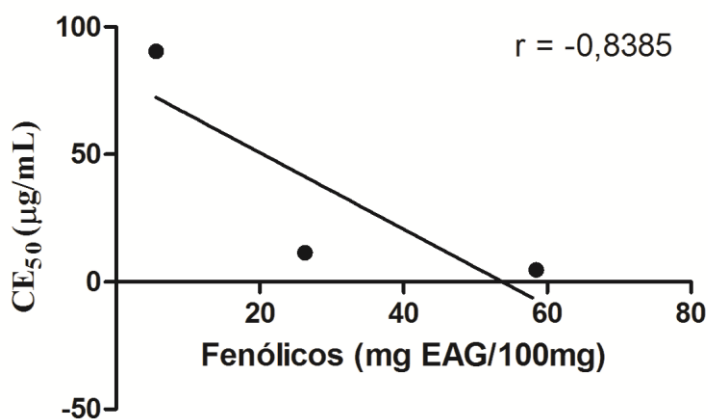
Gráfico 11: Atividade sequestradora de radical ABTS para as frações do vinho SyRe VSF.



*** p<0,0001 quando comparado a FrAcOEt pH 7 SyRe VSF.

Diferentemente do ensaio de DPPH, o teste ABTS apresentou uma forte correlação negativa, $r = -0,8385$ (gráfico 12). A literatura descreve dados equivalentes a este trabalho, onde o método ABTS apresenta melhor correlação com o teor de fenólicos totais que ensaios de mensuração da atividade antioxidante (BURIN *et al.*, 2010, BAIANO *et al.*, 2009, MELO *et al.*, 2011).

Gráfico 12: Correlação entre Fenólicos totais da fração do vinho SyRe VSF e a CE_{50} obtida pelo método com ABTS como radical



Apesar da semelhança entre os métodos, uma vez que ambos atuam como sequestrante de radicais, foi observado neste trabalho que ocorreu uma discrepância entre os resultados obtidos nos duas metodologias, foi possível notar que a mesma amostra não apresentou melhor atividade nos dois ensaios como, por exemplo, a amostra Sy RS VSF no teste DPPH apresentou uma CE_{50} elevada $89,44 \pm 0,36$ µg/mL, enquanto no ABTS mostrou-se como a segunda mais ativa, $CE_{50} = 28,62 \pm 0,41$ µg/mL. Porém, fatos similares a estes são relatados na literatura (ARCARI *et al.*, 2013). Šeruga, Jakobek, Novak (2011), avaliando a atividade antioxidante de vinhos de regiões da Croácia, também encontraram divergência para uma mesma amostra analisada nos dois métodos: DPPH - 37.8 mmol TE/L; ABTS - 24.2 mmol TE/L. Essa diferença pode ocorrer por diversas razões: princípios dos métodos, os reagentes utilizados, tempos de reação diferentes, comprimento de onda de absorção distinto, as diferentes características e mecanismos e sítios de ação dos compostos bioativos das amostras, possíveis erros de análise (ŠERUGA, JAKOBEK, NOVAK, 2011).

É possível que outros componentes, além dos polifenóis, estejam presentes nas amostras testadas, os quais podem estar contribuindo sinérgica ou antagonicamente com capacidade antioxidante dos vinhos. Entretanto, a participação de outros componentes não reduz a relevância da ação antioxidante dos polifenóis.

Estes fatos reforçam a evidência de que as propriedades biológicas podem ser alteradas por pequenas mudanças na estrutura química, além disso,

considerando esses dados, dificilmente haverá um único método capaz de representar de forma segura e precisa a verdadeira atividade antioxidante de uma substância. Cada método tem sua particularidade, entretanto é interessante observar a correlação entre os métodos (gráficos 13 e 14).

Gráfico 13: Correlação entre a CE_{50} obtida pelo método com DPPH e ABTS como radical para os vinhos analisados.

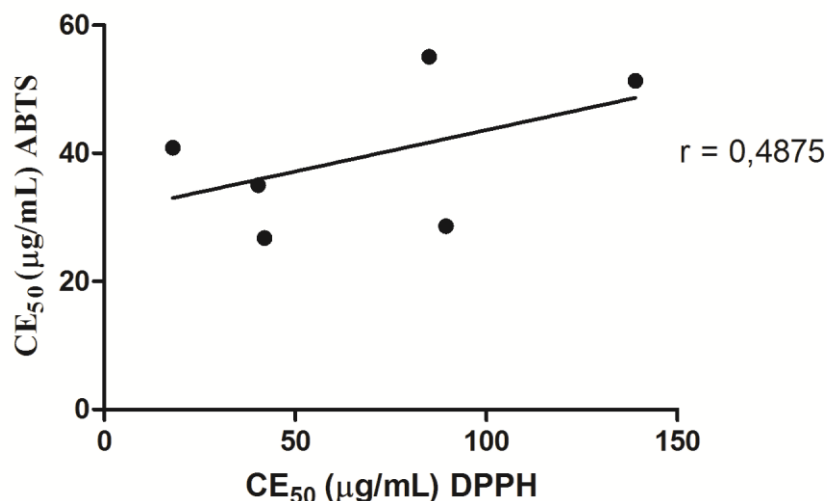
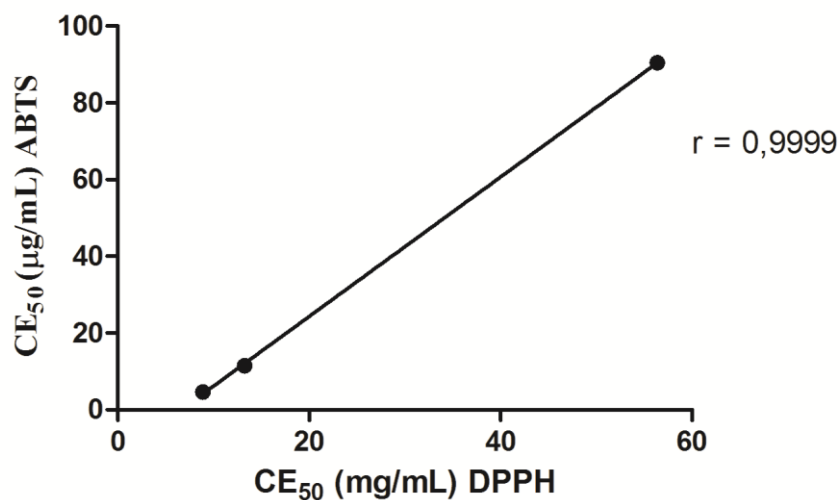


Gráfico 14: Correlação entre a CE_{50} obtida pelo método com DPPH e ABTS como radical para frações isoladas do vinho SyRe VSF



O coeficiente de correlação entre a CE_{50} dos dois métodos para as amostras de vinho foi de: $r = 0,4875$. E observou-se que para as frações uma

forte correlação entre os dois métodos que avaliam a atividade antioxidante, o coeficiente de $r = 0,9999$ e $p < 0,05$, isto é, a correlação foi significativa.

Essas correlações positivas demonstram que os dois métodos apontam da mesma forma para as amostras que possuem maior atividade antioxidante, ou seja, em ambos os ensaios as amostras de vinho e as frações apresentaram capacidade antioxidante, mesmo com intensidade da ação diferenciada, como no caso dos vinhos.

Com base no exposto, a escolha do vinho SyRe VSF para o fracionamento, a princípio foi devido ao elevado teor de fenólicos totais, visto que, das amostras analisadas foi o que apresentou maior conteúdo dos fenólicos totais, além disso, dentre as amostras de vinho, esse foi o que se mostrou mais constante nos testes de avaliação da atividade antioxidante, ficando entre os três mais ativos em ambos os testes, $CE_{50} = 40,24 \pm 1,61$ para o teste DPPH e $CE_{50} = 35,03 \pm 0,53$ no teste ABTS. E ainda por se tratar de um vinho da região do Vale do São Francisco, da variedade Syrah, que conforme já mencionado anteriormente é rico em compostos fenólicos em comparação a vinhos de outras regiões e possui efeitos benéficos à saúde comprovados. A partir de então todo o estudo se desenvolveu com o vinho SyRe VSF e a fração acetato pH7 correspondente, uma vez que, foi esta fração que apresentou o maior teor de fenólicos totais: $58,45 \pm 0,01$ mg EAG/100 mg, somado a sua elevada atividade antioxidante em relação às outras frações, em ambos os testes DPPH: $CE_{50} = 3,4 \pm 0,03$ μ g/mL e ABTS: $CE_{50} = 4,65 \pm 0,04$ μ g/mL .

5.6 Triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários

O processo de triagem ou *screening* fitoquímico se baseia no princípio de que toda e qualquer substância presente em uma amostra, independente da sua concentração, pode ser um princípio ativo, além de contribuir para caracterização química da matéria-prima (SIMÕES *et al.*, 2004)

Os dados da triagem fitoquímica realizado nas amostras do vinho tinto Syrah do Vale do São Francisco (SyRe VSF) e em suas frações evidenciaram a presença de esteroides, taninos, flavonoides e saponinas (tabela 15). Estes resultados vêm corroborar com os achados anteriores a este trabalho, que revelaram elevado teor de compostos fenólicos e flavonoides e também com

diversos estudos já realizados que relatam a presença desses compostos em uvas e produtos derivados.

Tabela 15: Análise fitoquímica do vinho tinto SyRe VSF e suas frações

Classes	Reações/volume de amostra (mL)	Resultados			
		SyRe VSF	Fração Aquosa SyRe VSF	FrAcOEt pH 7 SyRe VSF	FrAcOEt pH 2 SyRe VSF
Alcaloides	Bouchadart	-	-	-	-
	Mayer	-	-	-	-
	Dragendorf	-	-	-	-
	Ácido sílico-tungstico	-	-	-	-
Esteroides	0,12	++	+	+	+
	0,25	++	+	++	++
	0,50	+++	++	++	++
Gelatina 0,5%					
Taninos	0,5	-	-	+	-
	1,0	+	-	+	+
	2,0	+	-	+	+
	FeCl ₃				
	0,5	-	-	+	+
	1,0	+	-	++	+

	2,0	++	-	+++	++
	Fita-Magnésio	+++	-	+	+
Flavonoides	Fluorescência	+++	+	++	++
Saponinas	Espuma	+++	+++	+++	+++

LEGENDA - presença da classe de metabólitos secundários indicada por:

+: reação fracamente positiva

++: reação positiva

+++ : reação fortemente positiva

Ausência indicada por:

-: ausente

5.7 Perfil cromatográfico do vinho tinto SyRe VSF e fração FrAcOEt pH 7 utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Detector de Ultravioleta (CLAE-UV)

A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido utilizada para análises mais detalhadas para determinação dos componentes presentes no vinho. A detecção de substâncias fenólicas é tipicamente baseada na medida de absorção por ultravioleta, frequentemente usando um detector de arranjo de fotodiodo (DAD). A combinação do espectro de UV-Vis e do tempo de retenção (tR) pode conduzir mais facilmente à identificação das substâncias separadas (ANGELO & JORGE, 2007).

Com o propósito de adquirir apenas informações qualitativas a cerca das amostras realizou-se uma investigação do perfil cromatográfico por CLAE-UV do vinho tinto SyRe VFS e da fração FrAcOEt pH 7 SyRe VSF de acordo com o método descrito no item 4.1.8. Os cromatogramas das respectivas amostras estão representados nas figuras 8 e 9. Foi possível observar uma boa resolução entre os picos tanto do vinho quanto da fração e que os constituintes encontram-se de acordo com a polaridade do solvente com que foram eluídos, sendo as substâncias mais polares (provavelmente antocianinas) encontradas no início de cromatograma e as menos polares no final. No cromatograma da fração nota-se que há uma menor concentração de picos no início do

cromatograma, o que é esperado considerando que se trata de uma fração orgânica e que os constituintes mais polares foram concentrados na fração aquosa durante o fracionamento do vinho.

Contudo, uma abordagem convencional baseada no espectro de UV é frequentemente limitada quando amostras contêm substâncias muito semelhantes, ainda assim, o perfil cromatográfico do vinho e fração pode ser considerado representativo devido a complexidade química das amostras, guardadas as devidas ressalvas em relação às limitações do detector utilizado.

Figura 8: Perfil Cromatográfico do vinho tinto SyRe VFS

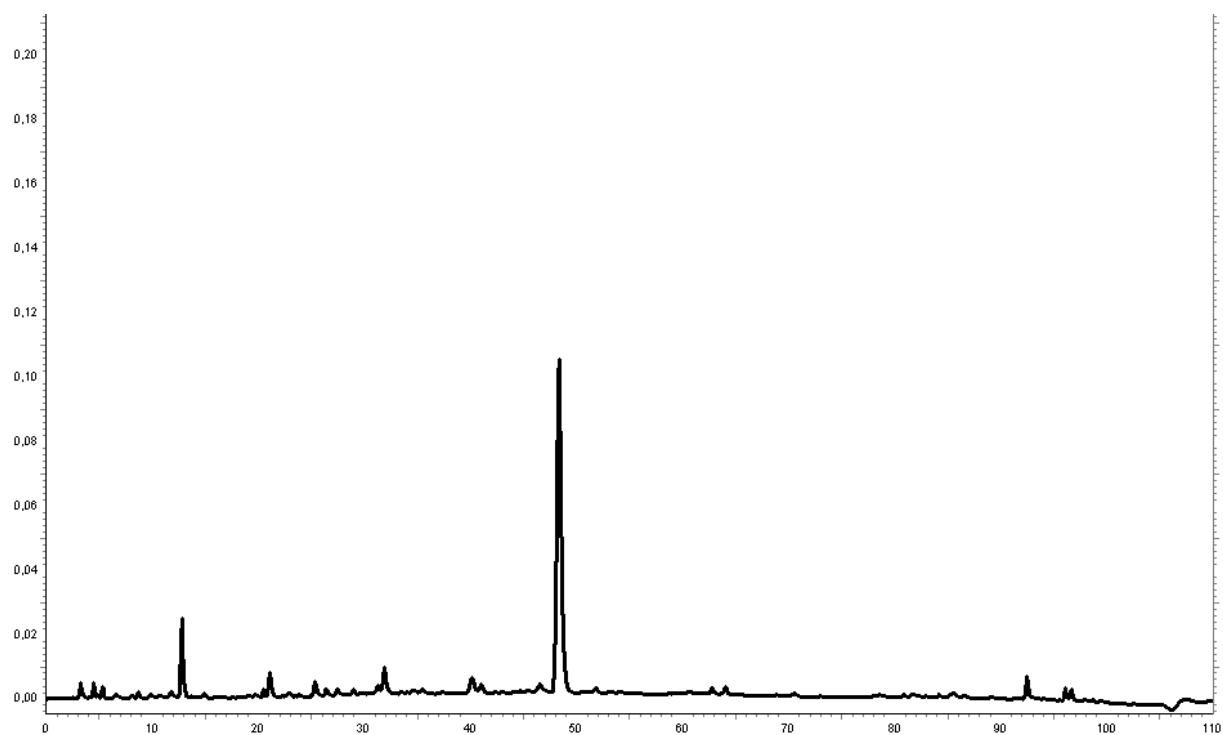
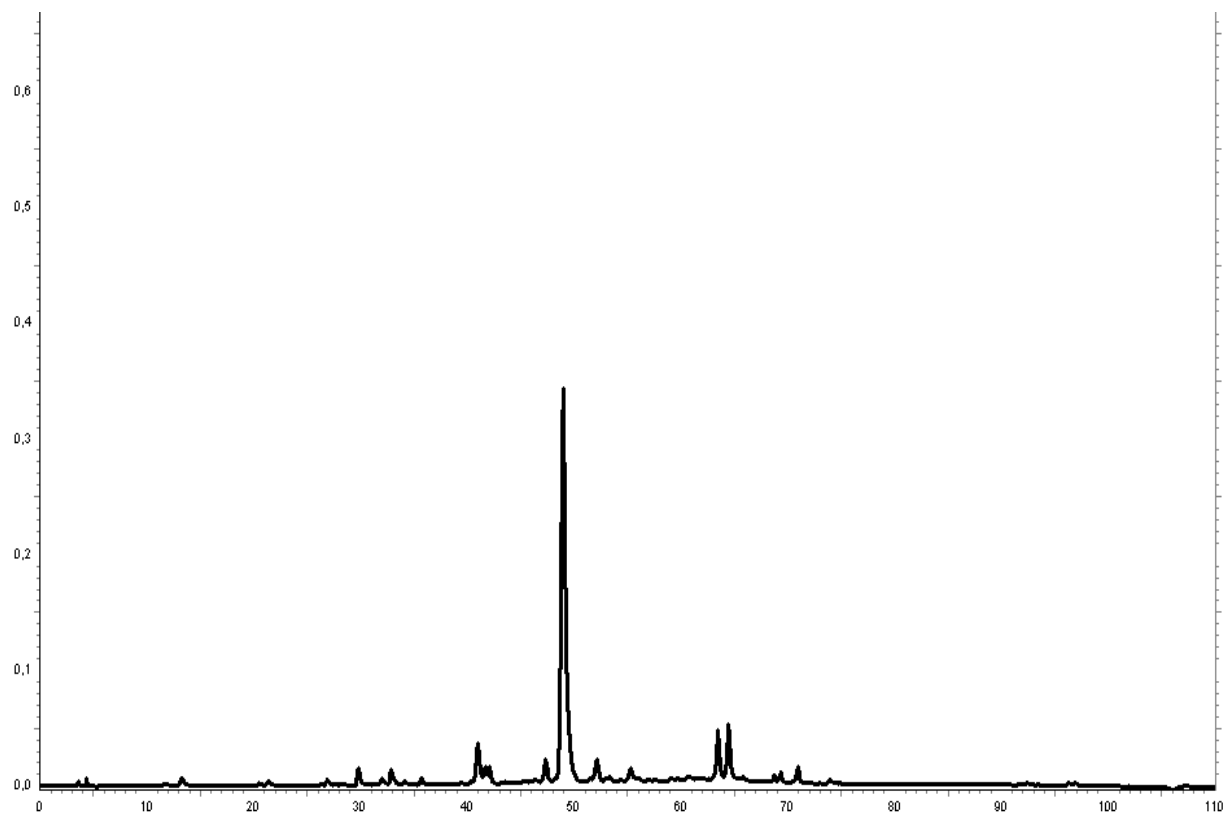


Figura 9: Perfil Cromatográfico da FrAcOEt pH 7 obtida do fracionamento do vinho tinto Syrah Rendeiras do Vale do São Francisco

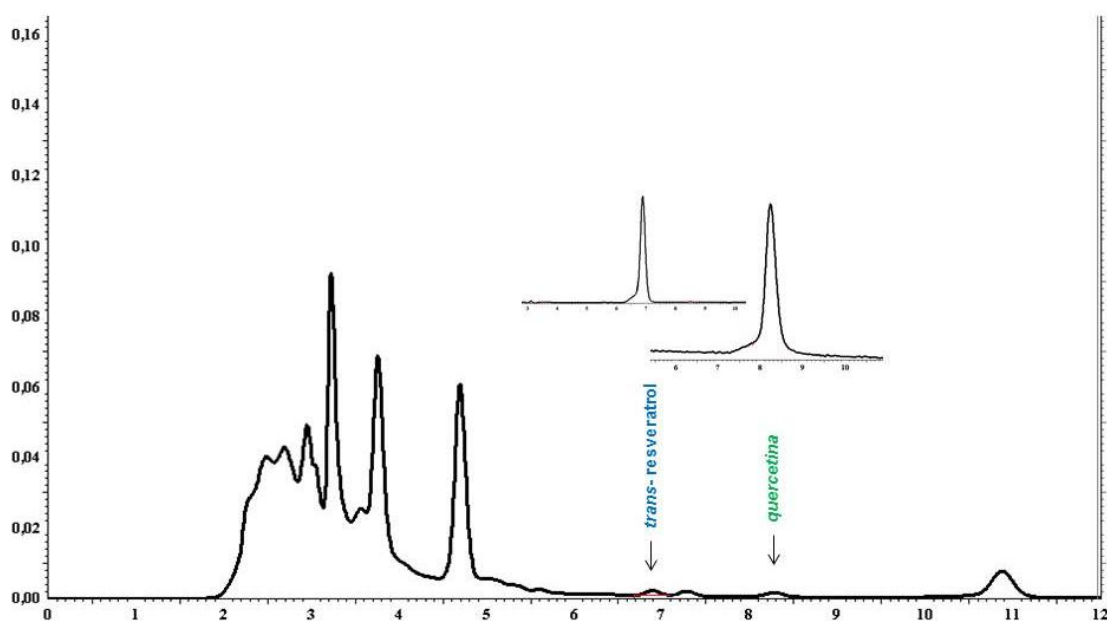


5.8 Quantificação do resveratrol (isômero *trans*) e quercetina empregando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Detector de Ultravioleta (CLAE-UV)

O resveratrol (que ocorre como mistura dos isômeros *trans* e *cis*), polifenol pertencente ao grupo dos estilbenos encontrado em uvas, vinhos e chocolate; e a quercetina, um flavonóide que ocorre amplamente em plantas e aparece significativamente presente no vinho tinto, tem atraído atenção dos pesquisadores por desempenharem importantes funções favoráveis à saúde (ARCHELA & ANTONIA, 2013; TOMAYKO *et al*, 2014; MONTEIRO *et al.*, 2012).

O resveratrol (isômero *trans*) e a quercetina foram quantificados a partir da substituição dos valores das áreas de cada pico na equação da reta extraída da curva de calibração dos analitos. Os analitos de interesse eluíram em 6,7 min e 8,2 min, sendo o primeiro atribuído ao *trans*-resveratrol e o segundo a quercetina (figura 10).

Figura 10: Cromatograma representativo da injeção do vinho tinto SyRe VSF eluídos em modo isocrático com ACN:H₂O + ácido fórmico (35:65%) em 12 minutos (A). Região dos picos dos padrões ampliada (B).



O vinho SyRe VFS apresentou teor de *trans*-resveratrol de $0,11 \pm 0,003$ $\mu\text{g/mL}$ e o teor de quercetina obtido foi $1,11 \pm 0,009$ $\mu\text{g/mL}$. Enquanto o teor da fração FrAcOEt pH 7 SyRe VSF para o *trans*-resveratrol foi de $2,32 \pm 0,381$ $\mu\text{g/mL}$ e de quercetina foi $8,56 \pm 0,078$ $\mu\text{g/mL}$ (tabela 16).

Tabela 16: Teor de *trans*-resveratrol e quercetina

Amostras	Teor de <i>trans</i> -resveratrol ($\mu\text{g/mL}$)	Teor de quercetina ($\mu\text{g/mL}$)
Vinho SyRe VSF	$0,11 \pm 0,003$	$2,32 \pm 0,381$
FrAcOEt pH 7 SyRe VSF	$1,11 \pm 0,009$	$8,56 \pm 0,078$

Valores semelhantes são relatados na literatura para vinhos do Vale do São Francisco da variedade Syrah. Nascimento (2010) relata teores de quercetina de $3,08 \pm 0,020$ mg/L; e *trans*-resveratrol de $0,22 \pm 0,001$ mg/L. Um outro estudo realizado com vinhos dessa região mostrou teores de quercetina variando entre 5.26 a 10.22 mg/L (DIAS, DAVID, DAVID, 2016). Dias, Silva e David (2013) determinaram o conteúdo de *trans*-resveratrol para sete vinhos de diferentes variedades do Vale do São Francisco, a concentração desse composto variou entre 1,5–5,9 mg/L nas amostras pesquisadas.

De acordo com outros autores, ocorre uma variabilidade considerável entre os teores de *trans*-resveratrol e quercetina, sendo essa última geralmente em concentração maior. Além disso, valores reduzidos de *trans*-resveratrol podem ser devido ao fato de que essa fitoalexina é produzida em resposta ao estresse fisiológico e infecções e seus níveis serão mais baixos onde esse efeito não é tão acentuado (CARERI *et al.*, 2003). Além do mais, pode estar ocorrendo fotoisomerização do *trans*-resveratrol para o *cis*-resveratrol em razão do excesso de irradiação solar que eleva a intensidade de raios ultravioleta sob a videira (SILVA, 2010).

A quantidade desses compostos na fração também se apresentou comparável a outros estudos. Shalashvili e colaboradores (2012) quantificaram além de outros compostos fenólicos, quercetina e *trans*-resveratrol em uma fração orgânica pH 7, oriunda do fracionamento de um vinho tinto da Georgia e

os valores obtidos para os analitos foram 7.3 ± 0.279 mg/L e 1.47 ± 0.323 mg/L, respectivamente.

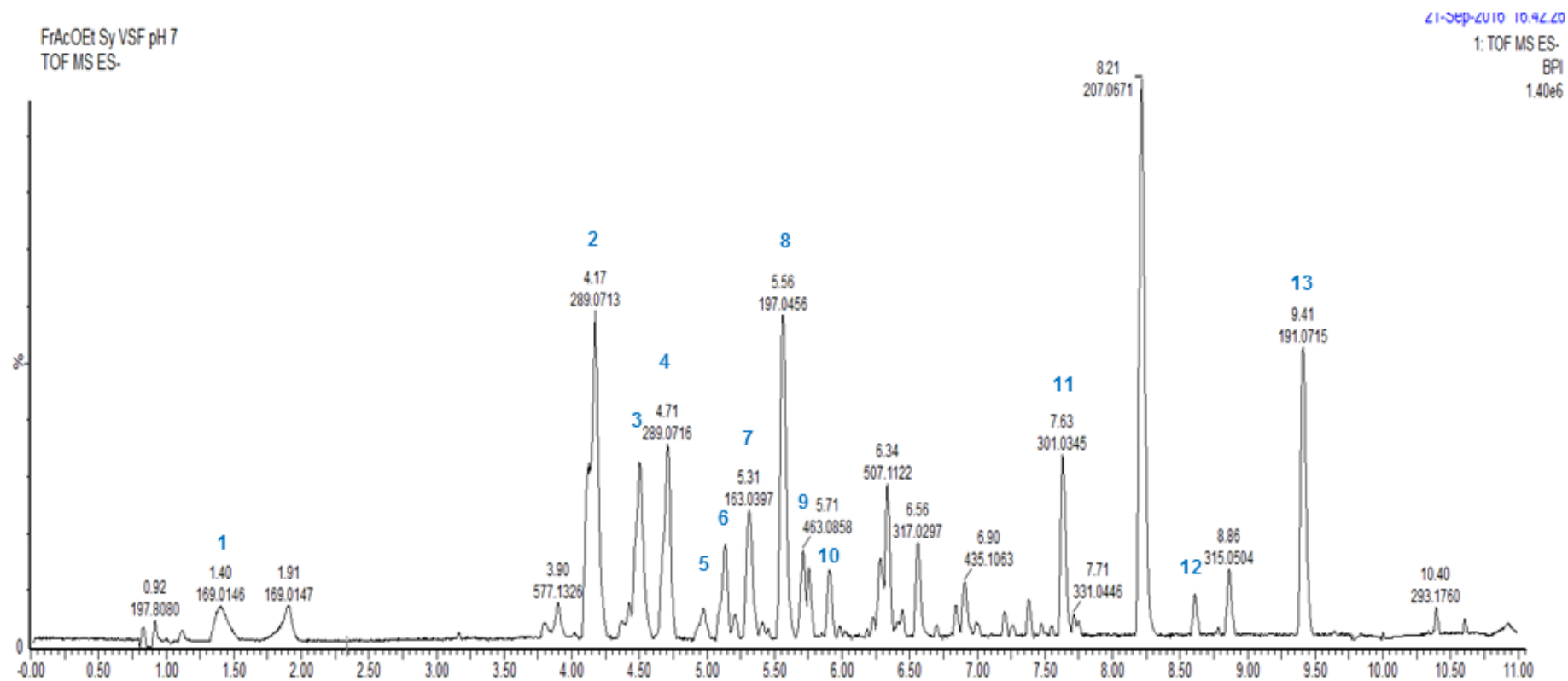
Uma fração acetato de etila, rica em compostos fenólicos, produzida a partir de um vinho tinto da região Sul do Brasil, apresentou uma concentração de quercetina de 14.36 µg/mL e de 0.32 µg/mL para o *trans*- resveratrol (HORT *et al.*, 2012).

5.9 Identificação de compostos fenólicos na FrAcOEt pH 7 SyRe VSF utilizando a técnica LC/MS

A cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) acoplada à espectrometria de massas em tandem de alta resolução (UPLC/MS) é uma ferramenta analítica versátil e de grande potencial na análise qualitativa e quantitativa, que permite a identificação da composição química de um determinado composto isolado, ou de diferentes compostos em misturas complexas, à medida que ocorre a separação em componentes individuais por cromatografia líquida, sendo o efluente da separação ionizado na fonte de íons do espectrômetro de massas (CHIARADIA, COLLINS, JARDIM, 2008).

Para verificar a presença dos compostos fenólicos presentes na FrAcOEt pH 7 SyRe VSF, procedeu-se à análise da amostra por UPLC/MS com um equipamento com filtro de íons do tipo quadrupolo/tempo de voo (qTOF) com a fonte de ionização por eletrospray (ESI) em modo negativo. Na figura 11 observam-se os cromatogramas de íon totais obtidos com ionização em modo negativo.

Figura 11: Cromatograma representativo da análise por LC/MS, 320 nm da FrAcOEt pH 7 SyRe VSF em modo negativo



A Análise da FrAcOEt pH 7 SyRe VSF por UPLC/MS, possibilitou a identificação de 13 compostos, entre eles flavonóis, flavan-3-óis, ácidos fenólicos, a partir dos fragmentos $[M - H]^-$ identificados nos espectros de massas (Figuras 12 a 18), do tempo de retenção (Tabela 17) e comparação com dados da literatura.

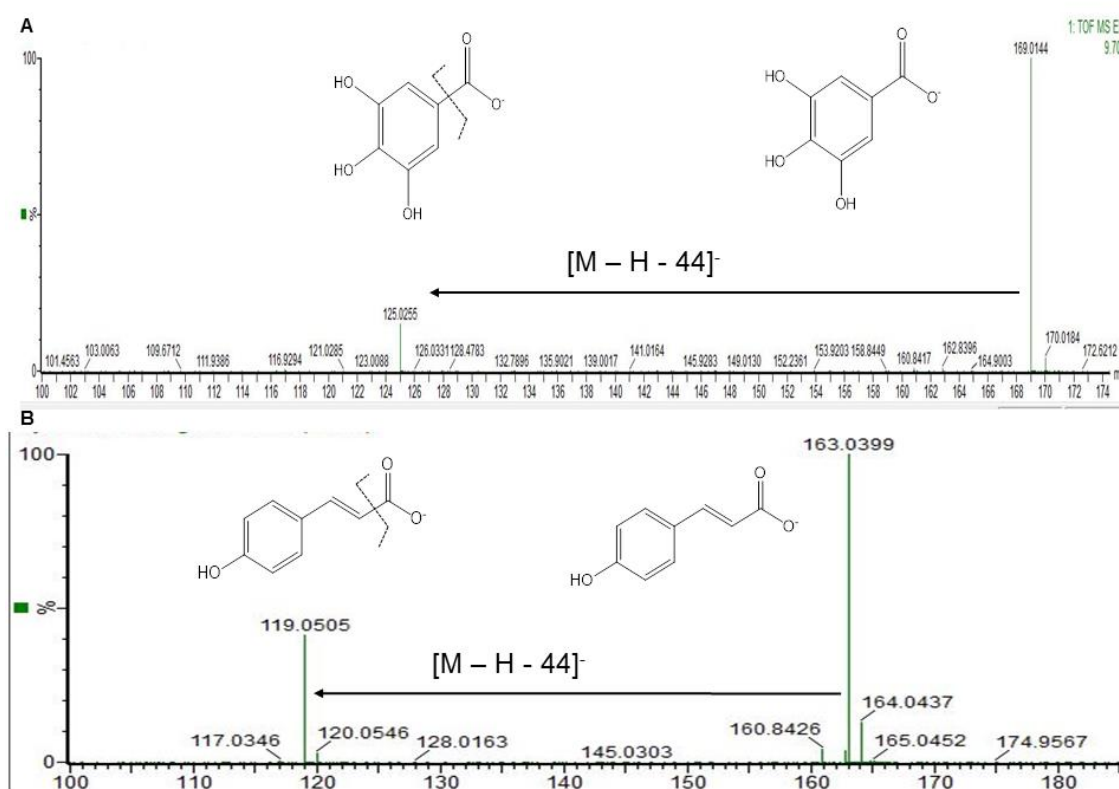
Tabela 17: Compostos fenólicos identificados na FrAcOEt pH 7 SyRe VSF. Análise por UPLC/MS

Pico	Tempo de Retenção (min)	Composto	Fórmula molecular	$[M-H]^-$	Fragmento	Massa exata teórica	Erro (ppm)
1	1,40	Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	169,0144	125,0255	169,0137	4,10
2	4,15	Catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0706	245,0816	289,0712	2,10
3	4,41	Ácido cafeico	C ₉ H ₈ O ₄	179,0346	135,0452	179,0344	1,11
4	4,73	Epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0710	245,0824	289,0712	0,72
5	4,96	Cianidina 3-glicosídeo (epi)catequina	C ₃₆ H ₃₆ O ₁₇	739,1638	577,1353	739,1874	>10
6	5,13	Miricetina-3-O-β-Dgalactopiranosídeo	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	479,0822	316,0234	479,0825	0,63
7	5,31	Ácido p-cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	163,0399	119,0505	163,0395	2,45

8	5,57	Ácido sirínico	C ₉ H ₁₀ O ₅	197,0453	-	197,0450	1,52
9	5,71	Quercetina 3-o-glicosídeo	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0852	300,0280	463,0876	5,20
10	5,90	Astilbina	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449,1067	285,0411	449,1083	3,78
11	7,63	Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301,0244	-	301,0348	1,33
12	8,60	Luteolina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0403	-	285,0399	1,40
13	9,44	Ácido quínico	C ₇ H ₁₂ O ₆	191,0714	145,0303	191,0555	>10

Os picos 1 e 7 geraram os íons de m/z 169,0144 e 163,039, que foram atribuídos ao ácido gálico e ao ácido p-cumárico, respectivamente. A fragmentação desses íons precursores levou aos fragmentos de m/z 125,0255 e 119,0505 (perda de CO₂ [M-H-44]) (figura 12).

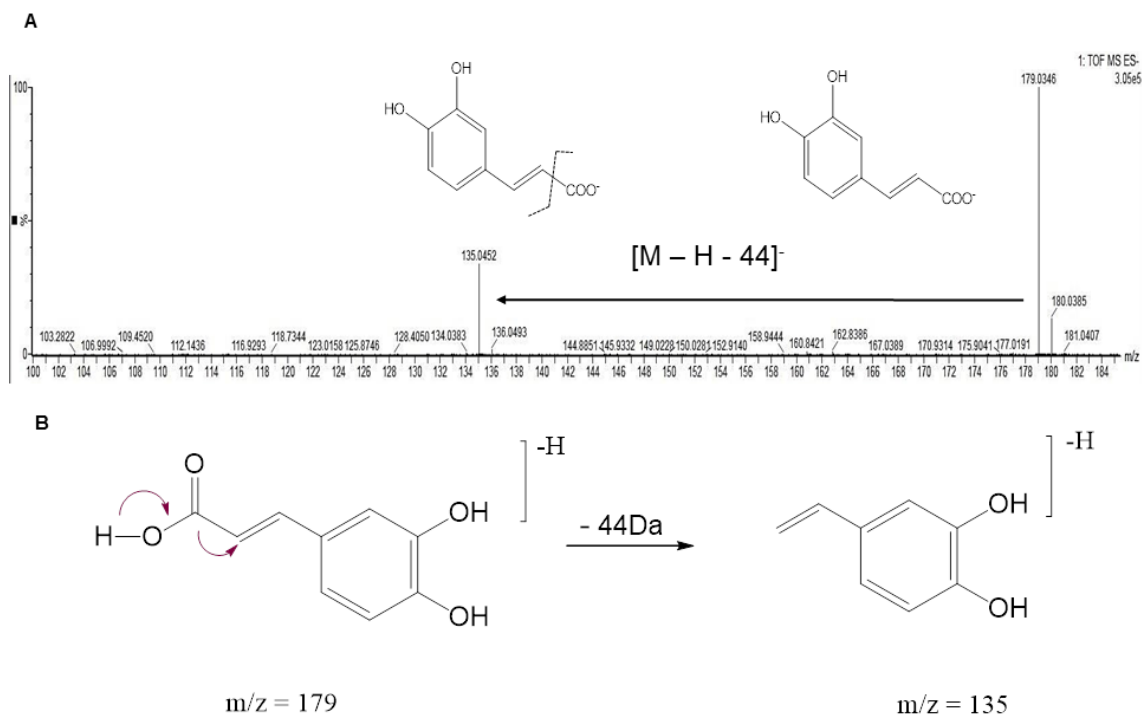
Figura 12: Espectro de massas (UPLC/MS) dos íons m/z 169,0144 (A); 163,0399 (B) – ácido gálico e ácido p-cumárico.



Os ácidos fenólicos caracterizam-se por possuírem um anel benzênico, um grupo carboxílico e um ou mais grupos hidroxila ligados ao anel aromático o que lhes confere propriedades antioxidantes. Suas reações de fragmentação têm como característica a perda de fragmentos neutros (H₂O, MeOH, CO, CO₂ etc.) que fornece informações acerca de grupos funcionais presentes na molécula, auxiliando na determinação estrutural. O padrão de fragmentação de uma molécula depende também do modo de ionização, sendo a ionização por eletrospray em modo negativo, o modo ideal para compostos fenólicos, pois devido a seu caráter ácido formam maior quantidade de íons. O espectro de massas de ácidos fenólicos tem como principal característica a presença de um íon fragmento intenso devido à perda de 44 Da a partir do íon molecular. A mesma é atribuída à saída do CO₂ devido à presença do grupo carboxila (SOARES, 2002; GÓMEZ-ROMERO, 2011).

O íon molecular m/z 179, 0346 gerado pelo pico 3 foi atribuído ao ácido cafeico (figura 13 A) através de seu padrão de fragmentação que apresentou um único fragmento m/z 135,0452 em virtude da perda de 44 Da (perda de CO₂), de acordo com a proposta de fragmentação observada na figura 13 B.

Figura 13: Espectro de massas (UPLC/MS) do íon 179,0346 – ácido cafeico (A). Proposta de fragmentação para o ácido cafeico (B).



Assim como nos ácidos fenólicos, nos espectros de massas dos flavonóides se observam fragmentos originados pela perda de pequenas moléculas neutras como: H_2O , CO , CO_2 , $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ e CH_3OH (GÓMEZ-ROMERO, 2011).

Os íons moleculares de m/z 289,0706 e 289,0710 referentes aos picos 2 e 4, foram atribuídos a catequina e a epicatequina respectivamente (figura 14). Observaram-se os fragmentos de 245,0816 e 245,0824 provavelmente devido a uma clivagem heterocíclica com eliminação do grupo alceno ligado à hidroxila ($\text{CH}_2=\text{CHOH}$) com retenção da carga negativa no anel A ou formação de um novo heterocíclico, com a carga dispersa no anel B, conforme fragmentação proposta (figura 15).

Figura 14: Espectro de massas (UPLC/MS) dos íons 289,0706 (A) e 289,0710 (B) – catequina e epicatequina.

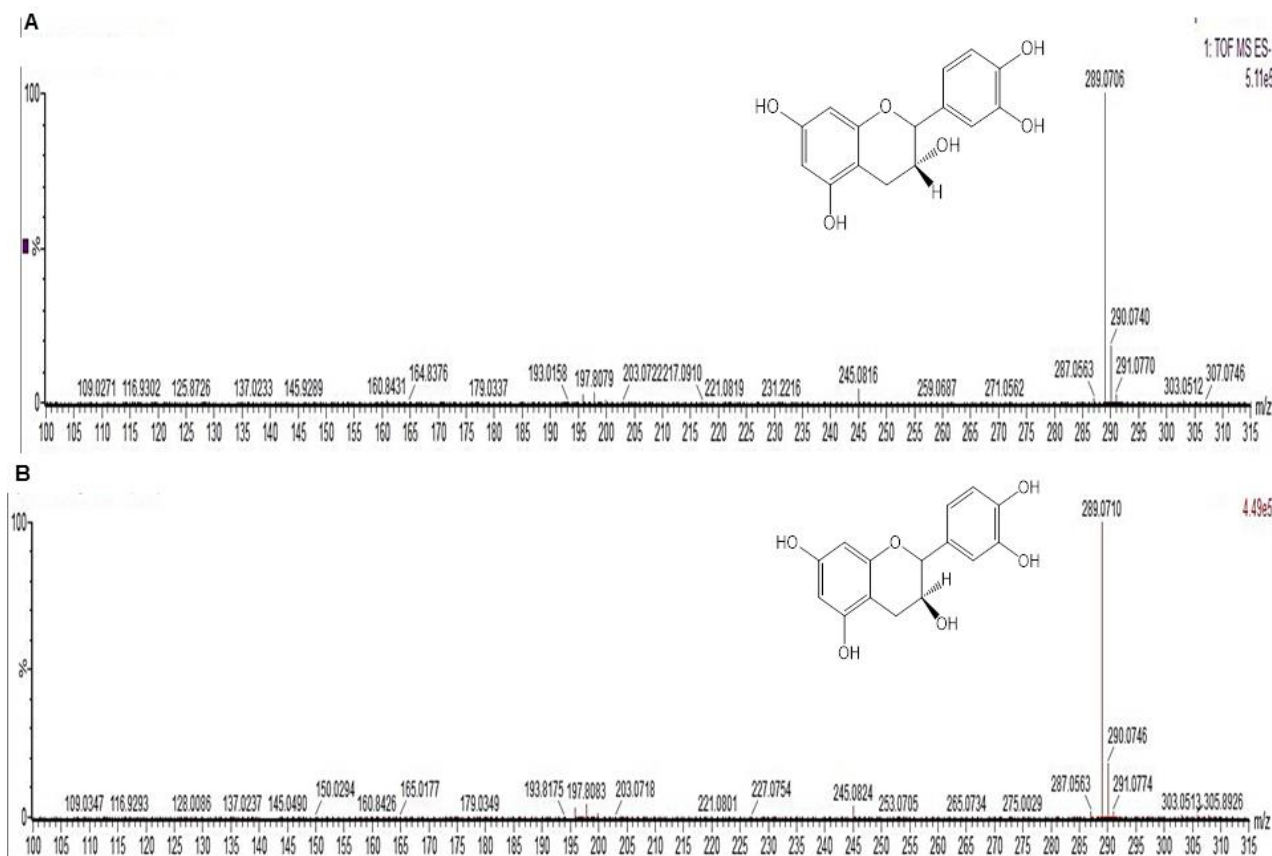
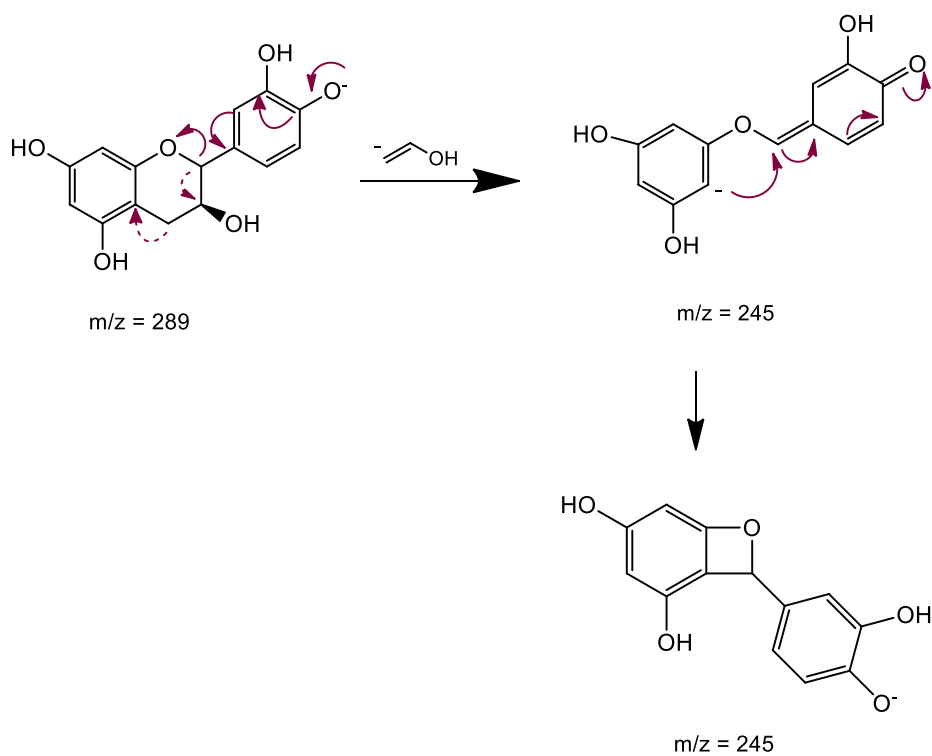


Figura 15: Proposta de fragmentação para a (±)-catequina ou (±)-epicatequina



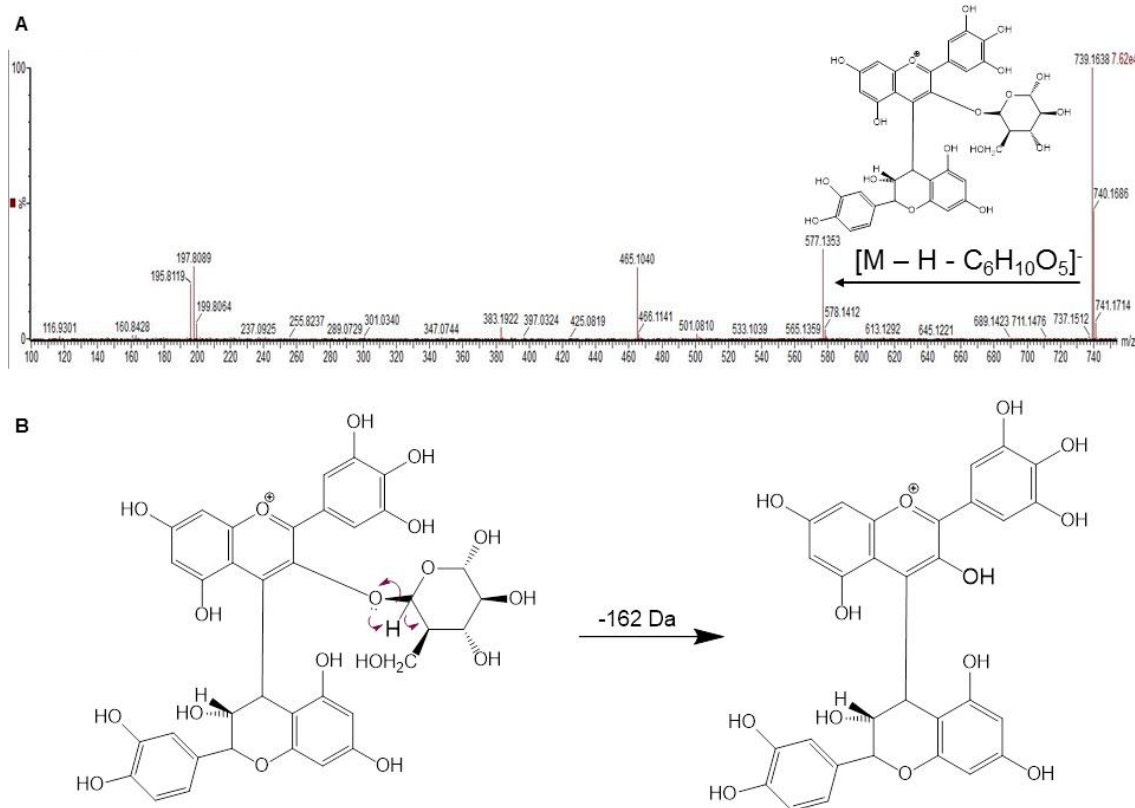
No espectro de massas obtido para o íon de m/z 739,1648 (figura 16 A), referente ao pico 5, foi possível identificar a cianidina 3-glicosídeo (epi)catequina, correspondente a condensação direta da antocianina com o flavanol (A-F). Neste espectro, observa-se o fragmento de m/z 577,1353, correspondente a perda de uma porção da glicose, que pode ser resultante de uma clivagem do tipo heterolítica, sendo esse íon gerado equivalente ao dímero (epi)catequina.

É bem conhecido que, durante a vinificação e processo de envelhecimento do vinho tinto uma grande diversidade de polifenóis pode ser formada tanto por reações enzimáticas, como não enzimáticas, originando compostos fenólicos bem mais complexos e estáveis; e a reação entre antocianinas e flavanois é uma das mais importantes durante esse processo. Na formação do aduto A-F, a forma flavilium da antocianina atua como eletrólito (BAOSHAN, FERNANDES E SPRANGER, 2010).

A identificação da cianidina 3-glicosídeo (epi)catequina foi realizada a partir da comparação dos nossos resultados com os dados do estudo de Baoshan, Fernandes e Spranger, (2010), que encontraram esse mesmo composto ao analisar por espectrometria de massas com ionização por eletrospray um vinho tinto produzido a partir das variedades de uvas Castelão e Tinta Miúda.

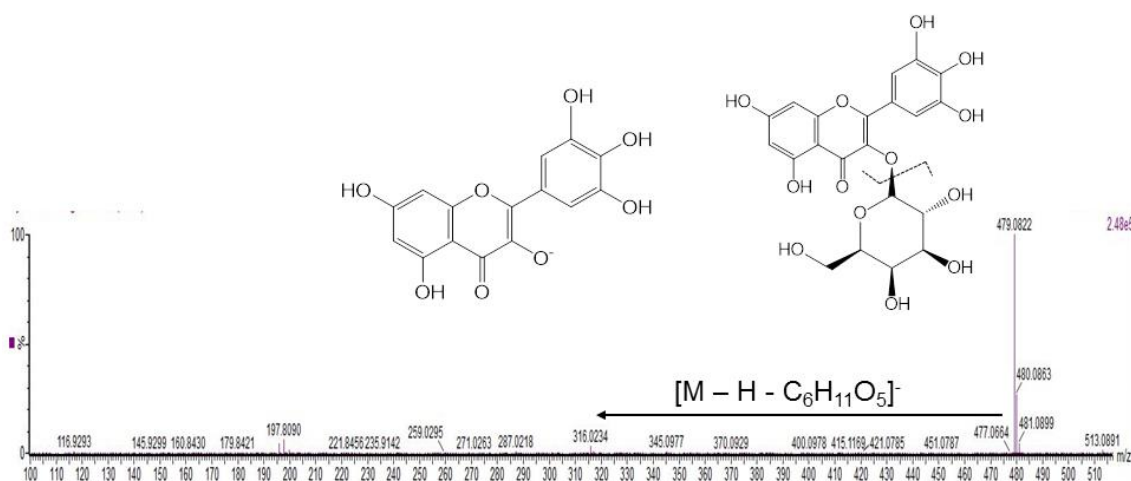
Com base no íon fragmento observado na figura 16 A foi possível propor o mecanismo de fragmentação da cianidina 3-glicosídeo (epi)catequina (figura 16 B).

Figura 16: Espectro de massas (UPLC/MS) do íon 739,1648 – cianidina 3-glicosídeo (epi)catequina (A) e proposta de fragmentação para a cianidina 3-glicosídeo (epi)catequina (B)



O íon de m/z 479,0822 (figura 17) referente ao pico 6, foi atribuído a miricetina-3-O- β -Dgalactopiranosídeo. Esse composto foi anteriormente identificado em extratos de folhas de *Myrcia bela*, uma planta utilizada contra a hipertensão pelas comunidades indígenas do Brasil (SALDANHA, VILEGAS, DOKKEDAL, 2013). O fragmento m/z 316,0234 se deve a perda de uma porção da glicose. As antocianinas normalmente são O-glicosiladas, dessa forma a fragmentação dessas moléculas envolve a clivagem da ligação glicosídica originando íons que contêm somente a aglicona (OLIVEIRA, *et al.*, 2001; VIVAR-QUINTANA *et al.*, 2002).

Figura 17: Espectro de massas (UPLC/MS) do íon 479,0822 - miricetina-3-O-β-Dgalactopiranosídeo.

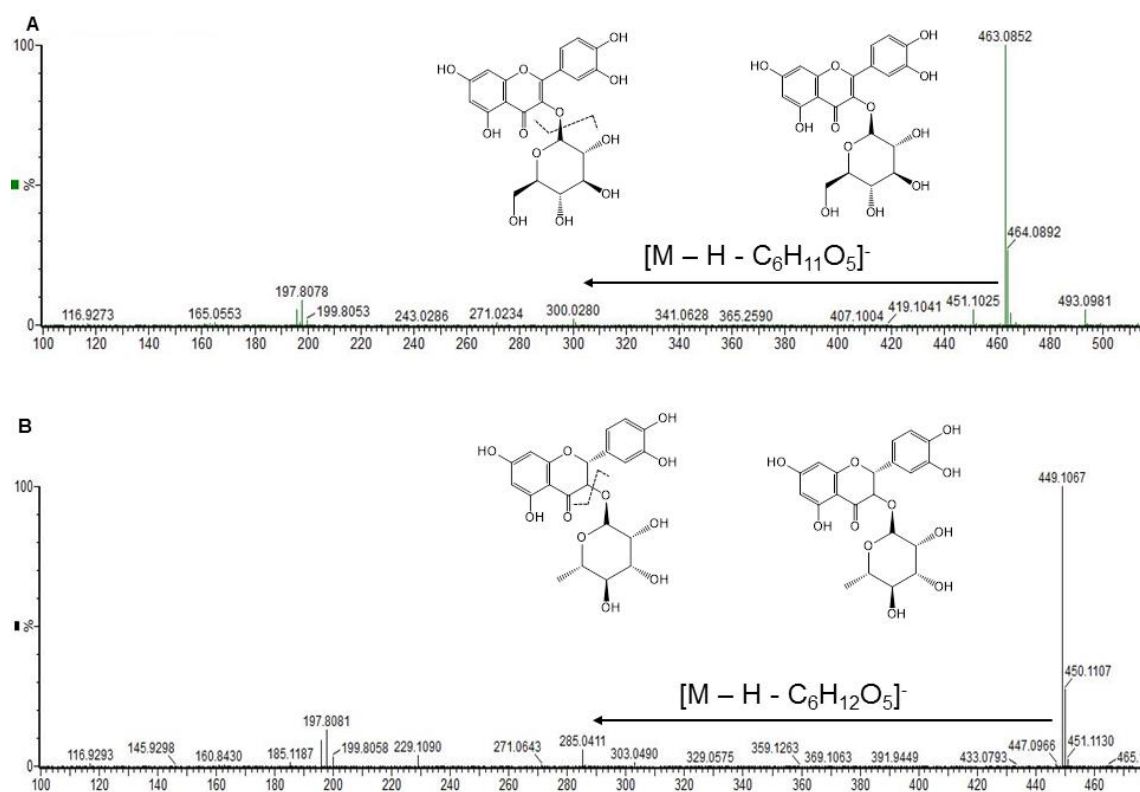


O íon m/z 463,0852 identificado como quercetina 3-O-glicosídeo (figura 18 A) produziu um fragmento de m/z 300,0280 atribuído à perda de uma porção da glicose.

Flavonoides O-glicosídeos se ligam a um açúcar com formação de uma ligação glicosídica O-C ácido lábil. A fragmentação desses flavonoides envolve clivagem na ligação O-glicosídica, com um concomitante rearranjo-H, que leva à eliminação do resíduo de sacarídeo (BEZERRA *et al.*, 2016).

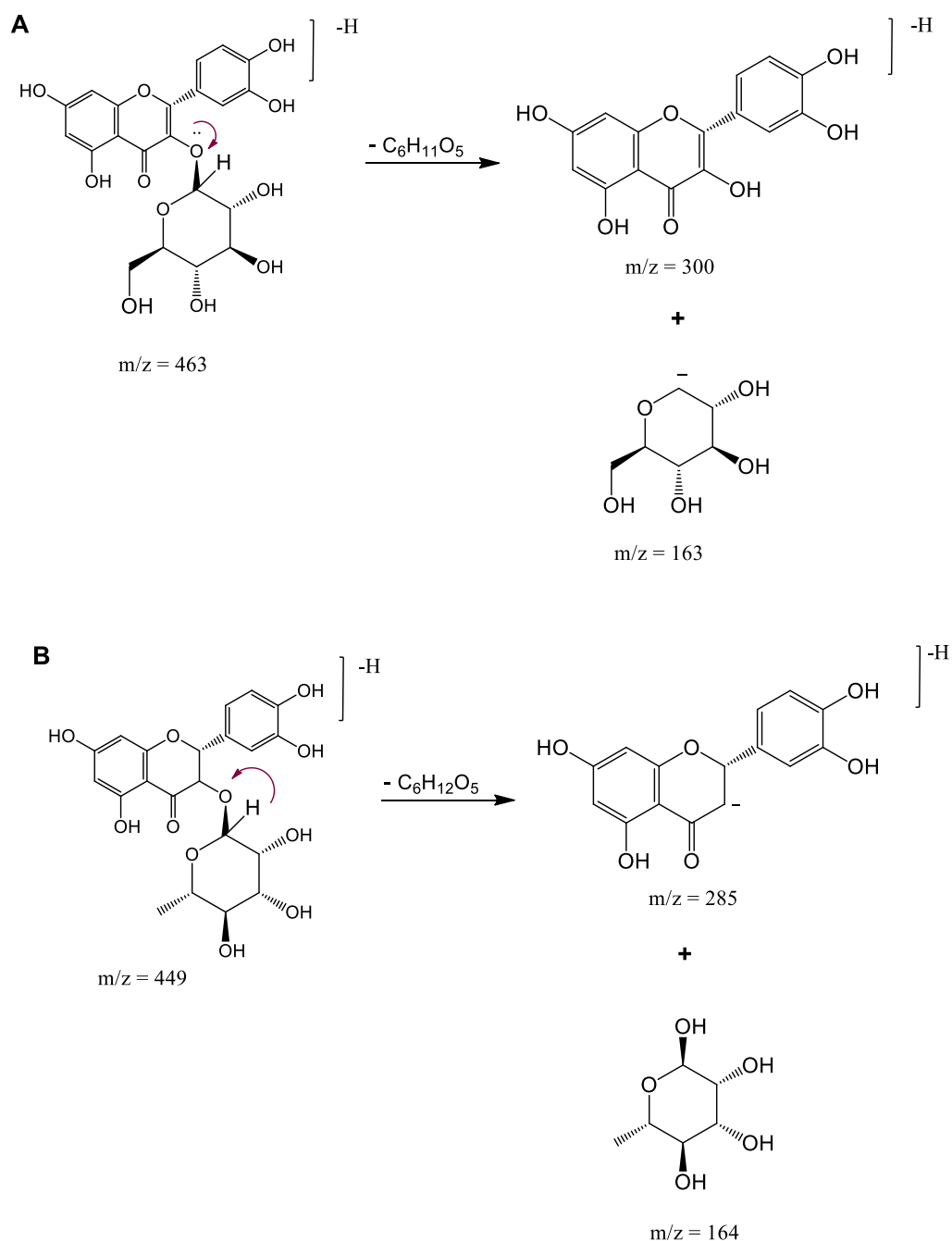
O íon de m/z 449,1067 foi atribuído ao flavonoide astilbina (figura 18 B) e o fragmento produzido por ele de m/z 285,0411 se deve também a perda de uma porção da glicose.

Figura 18: Espectro de massas (UPLC/MS) dos íons 463,0852 (A) e 449,1067 (B) – quercetina 3-o-glicosídeo e astilbina.



A proposta dos padrões de fragmentação para quercetina 3-O-glicosídeo e para astilbina é demonstrada na figura 19 A e B, respectivamente.

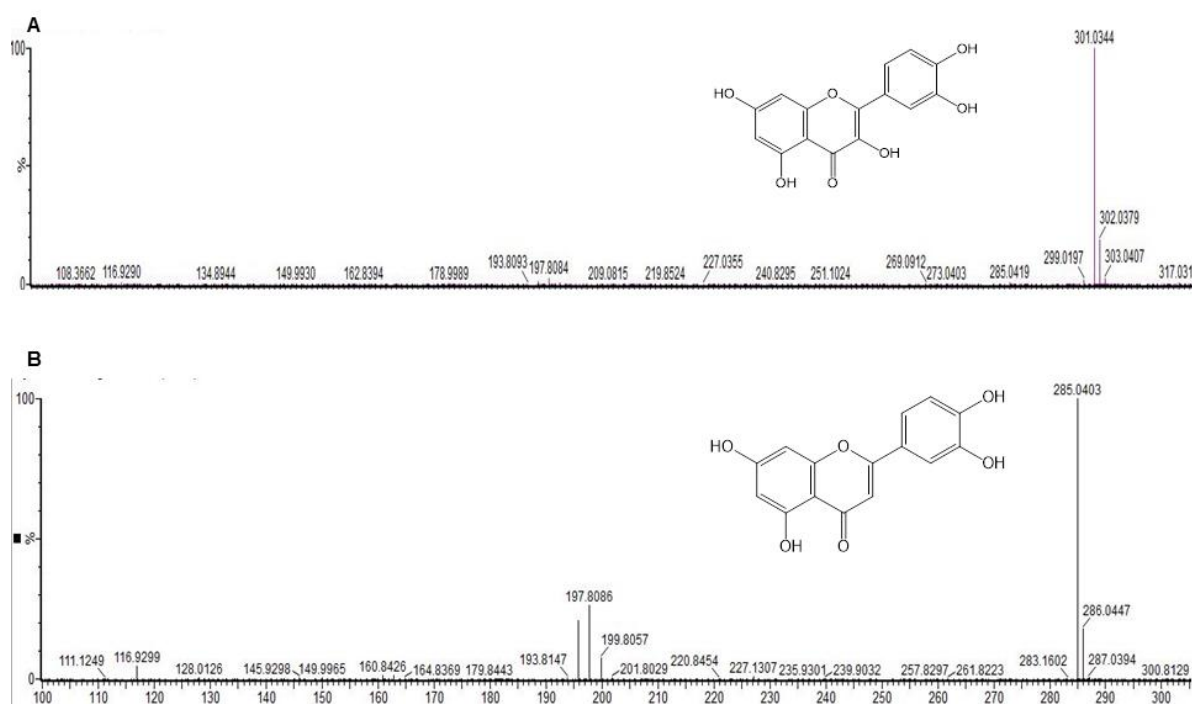
Figura 19: Proposta de fragmentação da quercetina 3-o-glicosídeo (A) e astilbina (B).



A quercetina m/z 301,0344 (figura 20 A) também foi identificada na análise por UPLC/MS da FrAcOEt pH 7 SyRe VSF aos 7,63 min. O íon m/z 285,0403 eluiu em 8,60 min e de acordo com a fórmula molecular compatível para esse íon, as possíveis identificações seriam a luteolina ou o canferol. Justesen, Knuthsen e Leth (1998) que determinaram flavonóis, flavonas e flavanonas em frutas, vegetais e bebidas por HPLC/MS, observaram que a luteolina elui em um tempo de retenção bem próximo a quercetina em média 4

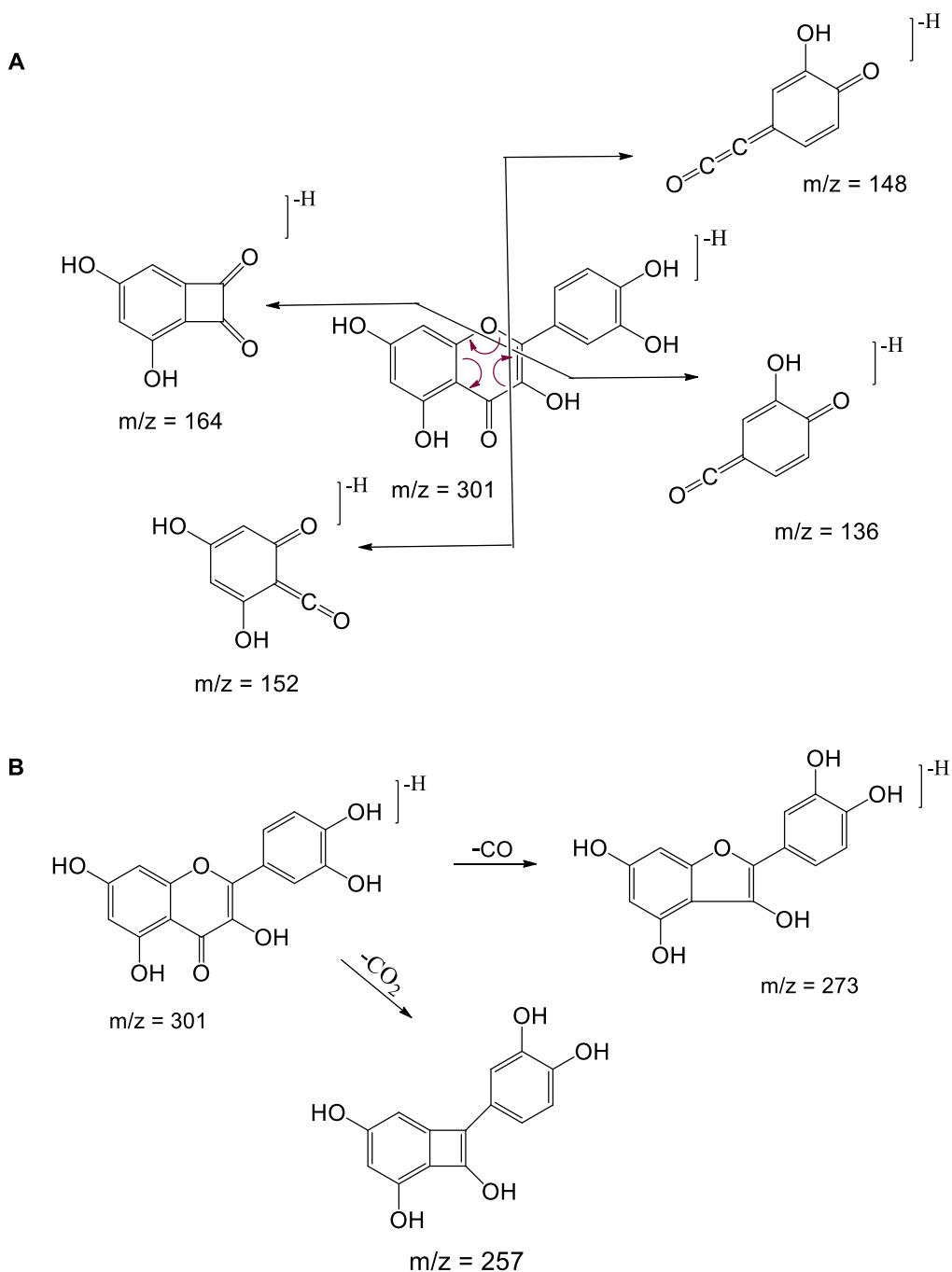
min depois, enquanto que o canferol elui cerca de 8 min depois da quercetina. Além disso, considerando que a estrutura química pode modular a polaridade desses flavonoides, o fato da luteolina eluir mais próximo a quercetina que o canferol apesar de possuírem mesma massa carga pode ser explicado pela presença das duas hidroxilas orto no anel B (formando o grupo catecol), conferindo a luteolina uma maior estabilidade em virtude da possibilidade de deslocalização de elétrons, enquanto que o canferol possui apenas uma hidroxila no anel B, tornando-se dessa forma menos polar que a luteolina. Sendo assim, baseando-se no tempo de retenção e nos dados da literatura o íon m/z 285,0403 foi atribuído a luteolina (figura 20 B).

Figura 20: Espectro de massas (UPLC/MS) dos íons 301,0344 (A) e 285,0403 (B) – quercetina e luteolina.



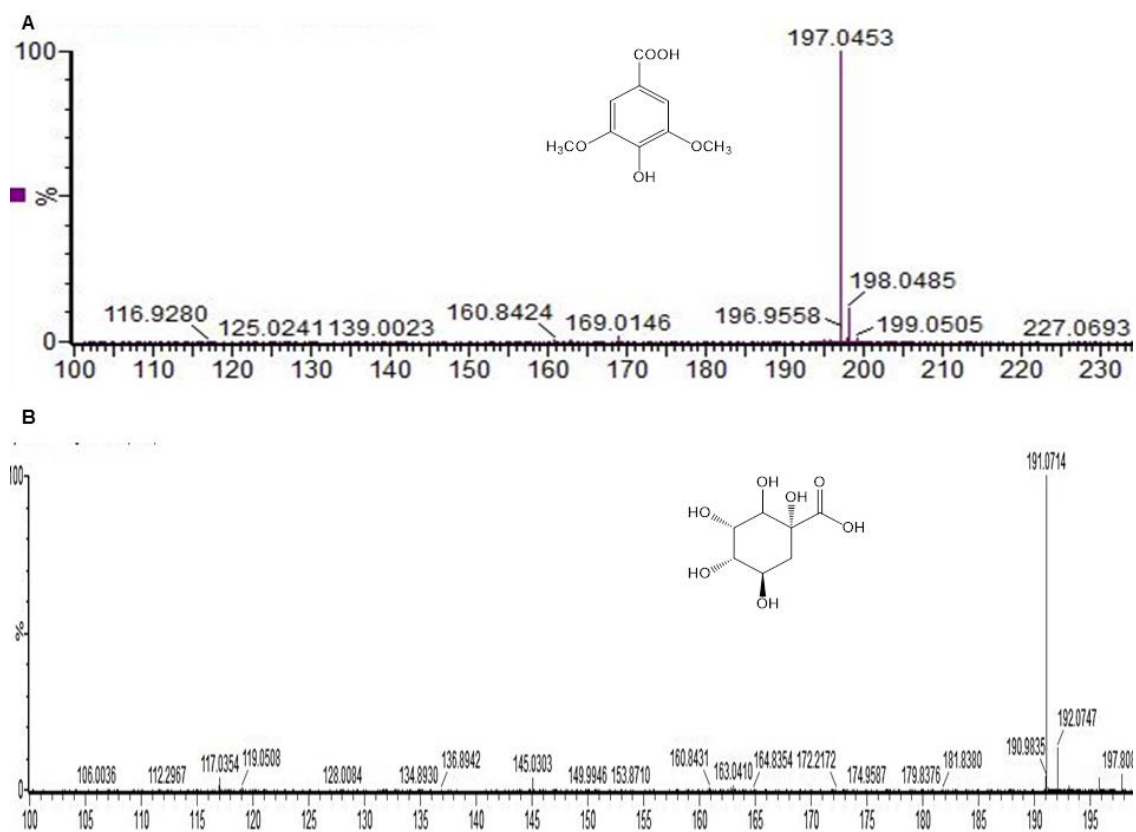
Uma importante reação de fragmentação que pode ocorrer nas agliconas de flavonoides é a Retro Diels Alder (RDA). RDA ocorre em anel de seis membros contendo uma ligação dupla e envolve a relocação de três pares de elétrons no anel (FABRE *et al.*, 2001). A Figura 21 apresenta as possíveis vias de clivagem que podem ser observados para a quercetina, por fragmentações do tipo RDA (figura 21 A) ou ainda por mecanismos de retrociclicização, devido à perda de moléculas neutras como CO e CO₂ sem a produção de fragmentos dos anéis A e B (figura 21 B).

Figura 21: Proposta de fragmentação para a quercetina Retro Diels Alder (RDA) (A) e por retrociclicização da clivagem do anel-C (B).



Ao tempo de retenção de 5,57 min detectou-se o íon de m/z 197,0453 que foi atribuído ao ácido sirínico (figura 22 A). Foi possível ainda a identificação do ácido quínico m/z 191 (figura 22 B).

Figura 22: Espectro de massas (UPLC/MS) dos íons 197,0453 e 191,0714 – ácido sirínico e ácido quínico.



Os compostos identificados neste trabalho são característicos de uvas e vinhos e já foram identificados em diversos estudos, bem como em outras amostras ricas em polifenóis, como mel e própolis, por exemplo.

5.10 Avaliação dos parâmetros cardiovasculares: pressão sanguínea e frequência cardíaca

O tratamento via oral dos animais espontaneamente hipertensos com a FrAcOEt pH 7 SyRe VSF (50 mg/Kg e 100 mg/Kg) durante 15 dias foi capaz de diminuir significativamente a pressão arterial média (PAM) dos ratos tratados quando comparado com o grupo controle que receberam apenas salina ($146,1 \pm 4,062$ n=7 vs $159,0 \pm 3,891$ n=7, respectivamente) e ($126,5 \pm 5,322$ n=8 vs $150,0 \pm 3,039$ n=7, respectivamente). Além disso, não foi observada nenhuma diferença na frequência cardíaca quando os animais foram tratados com a dose 50 mg/Kg em comparação com o grupo que recebeu salina ($320,0 \pm 16,10$ n=9, $361,0 \pm 11,59$ n=8, respectivamente) entretanto, quando receberam a dose 100 mg/Kg foi possível observar uma diminuição significativa da frequência cardíaca em comparação com o grupo controle ($314,6 \pm 9,507$ n=8, $358,6 \pm 15,00$ n=7, respectivamente), conforme pode-se observar na figura em traçados originais representativos de um animal de cada grupo (figura 23). A figura 24 apresenta os dados de grupo para níveis de pressão arterial média (A e B) e para frequência cardíaca (C e D).

Figura 23: Traçado representativo de um animal de cada grupo, ilustrando os níveis de Pressão Arterial Pulsátil (PAP, mmHg), Pressão Arterial Média (PAM, mmHg) e Frequência Cardíaca (FC, bpm), 50 mg/Kg (A) e 100 mg/Kg (B).

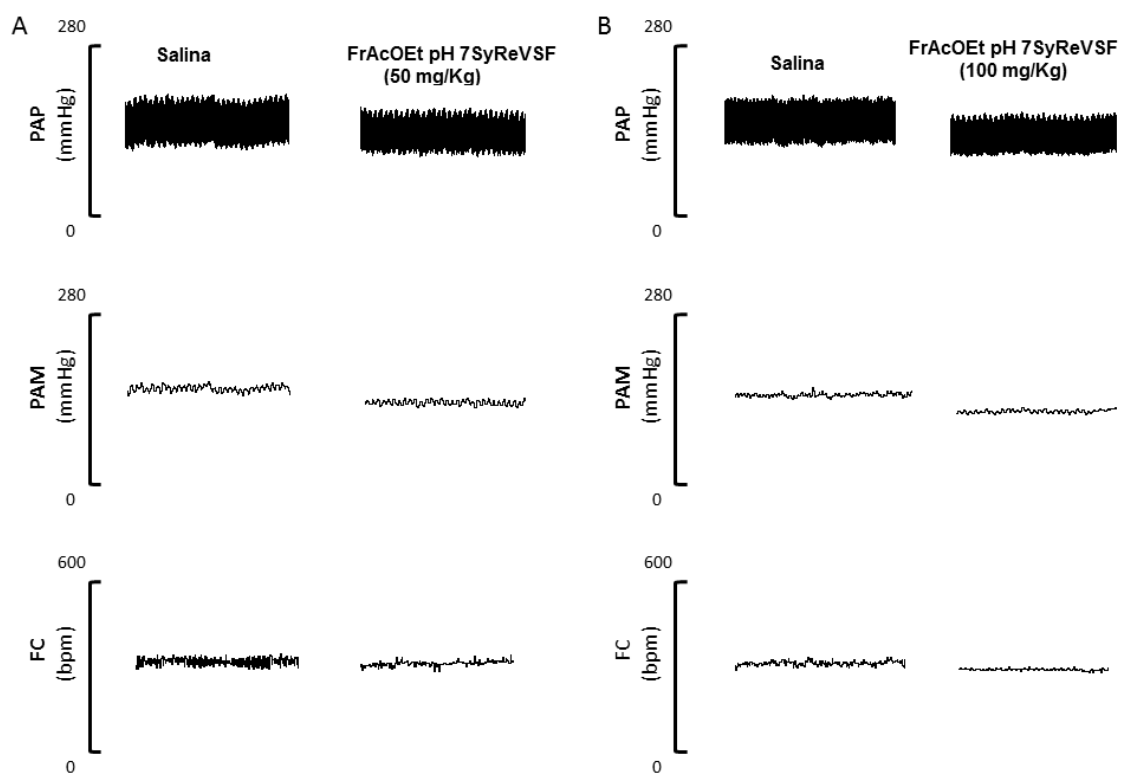
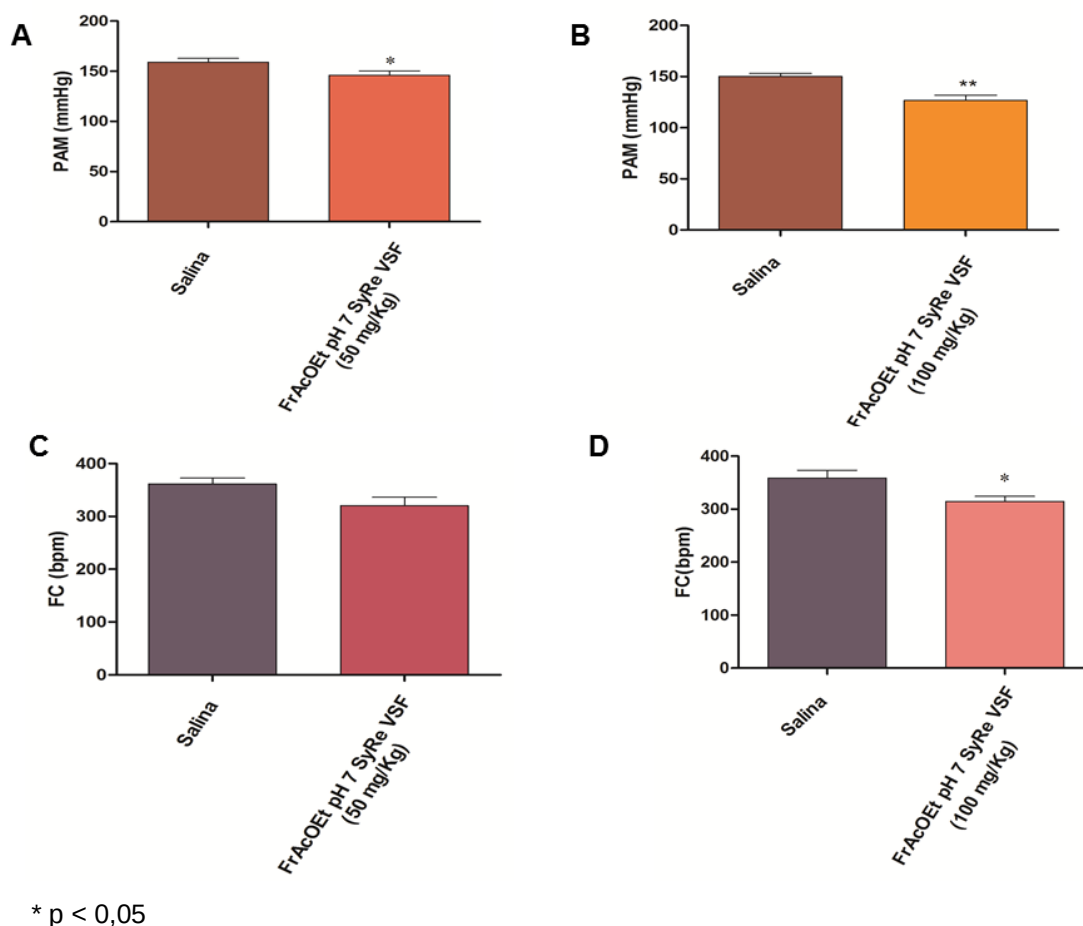


Figura 24: Efeito da FrAcOEt pH 7 SyRe VSF na PAM 50 mg/Kg (A) e 100 mg/Kg (B) e na FC 50 mg/Kg (C) e 100 mg/Kg (D)



Relatos da literatura apontam para a atividade antioxidante dos compostos fenólicos tais como a quercetina (MONTEIRO *et al.*, 2012), ácido vanílico (KUMAR, PRAHALATHAN, RAJA, 2014), rutina (MENDES-JÚNIOR, 2013) como a principal responsável pelos efeitos atenuantes da pressão arterial em diferentes modelos de hipertensão. Nossos resultados intensificam as evidências de que uma dieta rica em alimentos abundantes em compostos fenólicos é capaz de reduzir os níveis de pressão arterial.

Estudos semelhantes à avaliação do efeito anti-hipertensivo, com mensuração direta da pressão arterial após tratamento crônico com frações ricas em compostos fenólicos são escassos na literatura. A maioria das pesquisas que relatam a diminuição da pressão em razão da presença dos polifenóis envolvem medidas indiretas utilizando o método tail-cuff (DIEBOLT, BUCHER, ANDRIANTSITOHAINA, 2001; MOURA *et al.*, 2002; JOVELLANOS *et al.*, 2009; JIA *et al.*, 2011). No entanto, Ribeiro e colaboradores (2016)

constatarem que o tratamento via oral, durante nove dias, com o liofilizado do vinho Cabernet Sauvignon oriundo do Vale do São Francisco (100 mg/Kg) reduziu significativamente os níveis pressóricos com uma diferença de aproximadamente 29 mmHg entre os grupos de ratos Wistar com hipertensão induzida por L-NAME sem alteração da frequência cardíaca ($421,6 \pm 11,0$ vs $399,5 \pm 9,0$). Fazendo uma comparação com nosso trabalho, a mesma dose atenuou os níveis de pressão em aproximadamente 24 mmHg, afetando também significativamente a frequência cardíaca. Isto pode ser explicado devido ao fato de que o fracionamento do vinho levou a concentração de alguns constituintes, ao mesmo tempo em que levou a perda de outros que poderiam exercer um papel significativo na atividade biológica, acarretando assim, quase que uma equipotência da FrAcOEt pH 7 SyRe VSF com o vinho apenas liofilizado.

Outro trabalho equivalente investigou o efeito anti-hipertensivo de um extrato obtido a partir da casca da uva *V. labrusca* (Isabel varietal), oriunda do estado de Rio Grande do Sul, Brasil e observaram que a administração oral de 100 mg/Kg do extrato induziu um efeito anti-hipertensivo em animais hipertensos L-NAME (DE MOURA *et al.*, 2004).

Estudos que avaliaram o efeito do resveratrol, um dos constituintes do nosso extrato, observaram uma redução na pressão arterial de ratos SHR comparados com ratos não tratados com resveratrol (JAVKHEDKAR & BANDAY, 2015; BHATT, LOKHANDWALA & BANDAY, 2011). Outro constituinte do extrato de vinho tinto, a quercetina, foi capaz de reduzir a pressão arterial de animais espontaneamente hipertensos (ROMERO *et al.*, 2010).

É importante ressaltar, que os SHR são o modelo mais indicado para estudos de hipertensão, tendo em vista que estes animais têm características fenotípicas semelhantes aos observados na hipertensão essencial humana. Assim como nos seres humanos, em SHR a hipertensão surge com a idade e o desenvolvimento do aumento da pressão arterial ocorre a partir da terceira semana de nascimento, e caracteriza-se pelo aumento da resistência vascular periférica, hiperatividade simpática e aumento da frequência cardíaca, bem como aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (SOARES FILHO, CASTRO, STAHLSCMIDT, 2011).

Enquanto isso, o modelo experimental denominado L-NAME, é induzido farmacologicamente decorrente do bloqueio na formação de óxido nítrico pela administração do inibidor da NO sintase, a L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME). Nesse modelo, observa-se uma instalação rápida da hipertensão já nos primeiros dias de tratamento. Essa hipertensão é associada a uma intensa vasoconstrição periférica com conseqüente aumento da resistência vascular periférica e observa-se também intensa taquicardia. A hipertensão neste modelo experimental pode ser revertida apenas parcialmente pela interrupção do tratamento. Além disso, outros mecanismos fisiopato-gênicos podem estar envolvidos na manutenção da hipertensão desse modelo. E ainda, hipertensão similar provocada pela inibição crônica da NO sintase não é conhecida em seres humanos (FAZAN JR., SILVA, SALGADO, 2001).

5.11 Avaliação da Sensibilidade do Barorreflexo

Os barorreceptores representam um dos principais mecanismos de controle da pressão arterial em curto prazo, sendo responsável por manter a PA dentro de uma faixa estreita frente a diversos estímulos. Entretanto tem sido observada a ocorrência de disfunção importante do reflexo barorreceptor na hipertensão arterial e em outras doenças cardiovasculares. Sendo assim, a avaliação da sensibilidade do barorreflexo tem constituído uma ferramenta útil na detecção de disfunção autonômica (MARTELLI, 2013).

O barorreflexo de cada grupo foi avaliado administrando no cateter venoso dos animais as substâncias vasoativas: fenilefrina (8 µg/Kg) e nitroprussiato de sódio (25 µg/Kg). O tratamento dos animais espontaneamente hipertensos com a fração acetato pH 7 SyRe VSF (50 mg/Kg e 100 mg/Kg) não provocou alteração significativa na sensibilidade do barorreflexo, quando comparado ao grupo salina ($-2,154 \pm 0,293$ n=7, $-1,476 \pm 0,1774$ n=10, $-1,685 \pm 0,2320$ n=7, respectivamente) como pode ser verificado nos traçados originais das mudanças na pressão arterial média e frequência cardíaca induzida pela administração de FEN e NPS que estão apresentados na Figura 25; e nos dados de grupo representados na Figura 26.

Figura 25: Traçado representativo de um animal de cada grupo, ilustrando as mudanças na Pressão Arterial de Pulso (PAP, mmHg), Pressão Arterial Média (PAM, mmHg), e frequência cardíaca (FC, bpm) em resposta da fenilefrina (FEN 8 µg/kg – setas vazadas) e nitropussiato de sódio (NPS, 25 µg/kg – setas preenchidas), 50 mg/Kg (A) e 100 mg/Kg (B).

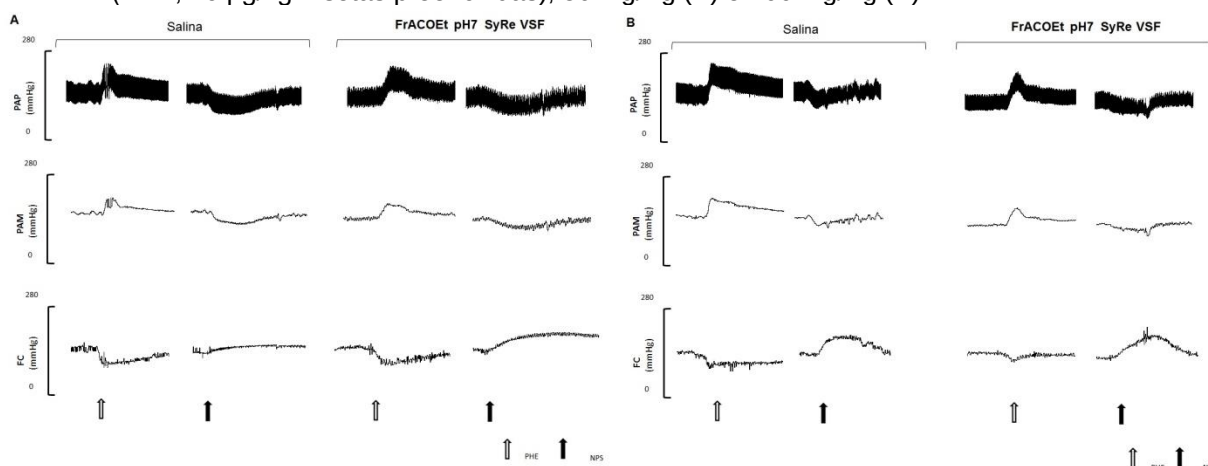
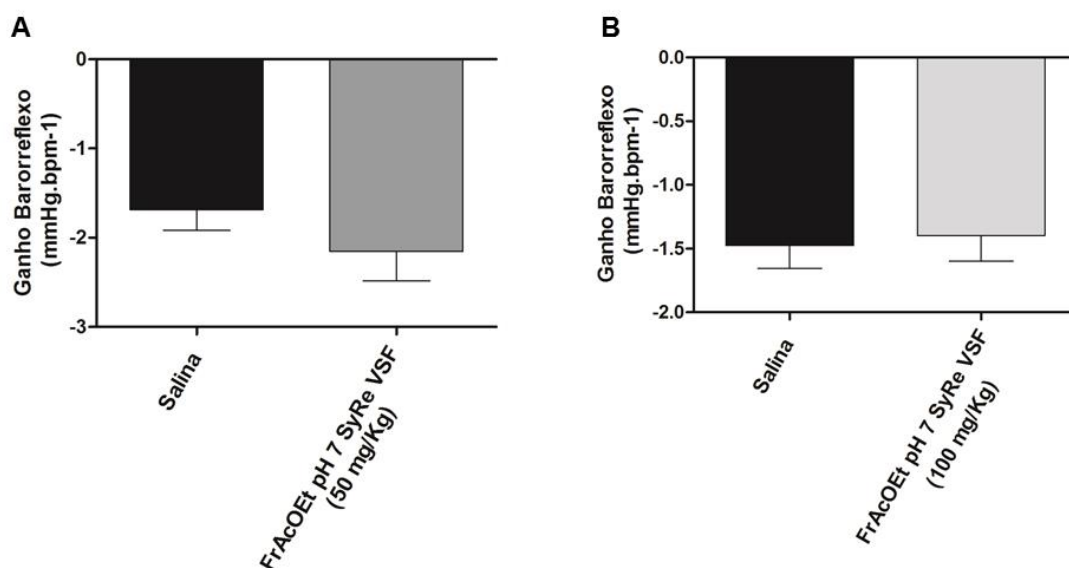


Figura 26: Ganho barorreflexo utilizando drogas vasoativas SHR + FrAcOEt SyRe VSF 50 mg/Kg(A) e SHR + FrAcOEt SyRe VSF 100 mg/Kg (B).



Apesar de não se ter observado mudanças significativas na sensibilidade barorreflexa, estudos experimentais demonstraram que os antioxidantes são capazes de restaurar o *deficit* na sensibilidade do barorreflexo observado em animais hipertensos (BRAGA *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2009). Em contraste com nossos resultados, estudos relatam que o resveratrol pode modular a função autonômica cardíaca e promover benefícios redox (DILLENBURG, 2013).

Além disso, Monteiro e colaboradores (2012) investigaram os efeitos do tratamento oral com quercetina em animais espontaneamente hipertensos e

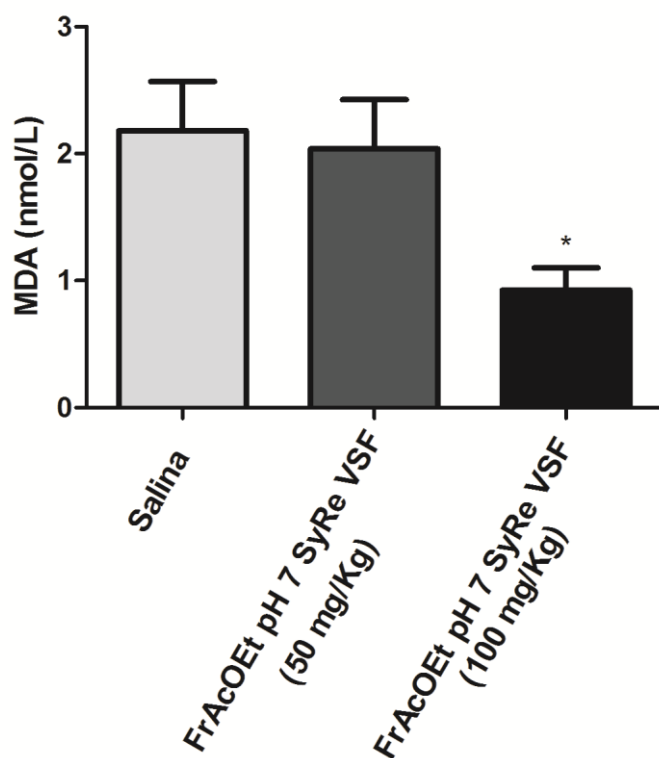
observaram que essa substância além de reduzir a hipertensão, melhorou a sensibilidade do barorreflexo nesse modelo. Outro estudo do mesmo grupo de pesquisa observou que a suplementação oral com óleo de coco, produto que também possui quantidades consideráveis de polifenóis e propriedades antioxidantes, apenas melhorou a sensibilidade do barorreflexo quando associado ao exercício físico (ALVES *et al.*, 2015). Vale salientar que, estudos que avaliassem a sensibilidade barorreflexa após o tratamento com extratos de vinho tinto não foram encontrados na literatura.

5.12 Avaliação das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Evidências sugerem que animais hipertensos apresentam níveis elevados de estresse oxidativo (BRAGA *et al.*, 2011). Dentre os marcadores mais utilizados para avaliar o dano lipídico por oxidação está a quantificação do MDA produzido na peroxidação lipídica através do método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) que é utilizada para a medição da oxidação lipídica em tecidos biológicos (GUTTERIDGE, 1981). O princípio deste método consiste na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), sendo o produto detectado através de leitura espectrofotométrica a 535 nm (ANTUNES *et al.*, 2008).

Dessa forma investigou-se o efeito do tratamento com a FrAcOEt pH 7 SyRe VSF (50 mg/Kg e 100 mg/Kg) em animais espontaneamente hipertensos. Na figura 27 é possível observar que a FrAcOEt pH 7 SyRe VSF (50 mg/Kg) não foi capaz de reduzir significativamente o estresse oxidativo no soro dos animais SHR quando comparado ao grupo controle ($2,040 \text{ nmol/L} \pm 0,3855 \text{ n}=5$ vs $2,180 \text{ nmol/L} \pm 0,3891 \text{ n}=5$, respectivamente), entretanto o grupo que recebeu a dose de 100 mg/Kg FrAcOEt pH 7 SyRe VSF apresentou uma diminuição significativa dos níveis de estresse oxidativo ($0,9250 \text{ nmol/L} \pm 0,1750 \text{ n}=4$ vs $2,180 \text{ nmol/L} \pm 0,3891 \text{ n}=5$, respectivamente). Provavelmente, esse efeito antioxidante pode ser justificado pela presença de flavonoides, como por exemplo a quercetina, que interferem nos sistemas biológicos produtores de radicais livres (NIJVELDT *et al.*, 2001). Um estudo de Monteiro e colaboradores (2012) relatou que a quercetina foi capaz de reduzir os níveis elevados de estresse oxidativo sérico encontrados em ratos hipertensos.

Figura 27: Peroxidação lipídica sérica dos grupos estudados.



*p <0,05 quando comparados com os animais do grupo salina

Outros autores observaram em diferentes modelos experimentais a diminuição dos níveis de malonaldeído após uma dieta rica em compostos fenólicos (GRIS *et al.*, 2013; DEIANA *et al.*, 2012; MONTEIRO *et al.*, 2012, RODRIGO *et al.*, 2005). Por outro lado, um estudo realizado por Egert e colaboradores (2009) examinaram os efeitos da suplementação com quercetina (150 mg/dia) durante 6 semanas em indivíduos obesos e portadores de síndrome metabólica e encontraram reduções significativas na PA, no entanto, não observaram diferença na capacidade antioxidante do plasma. Esses dados se assemelham aos resultados obtidos no nosso trabalho para a dose de 50 mg/Kg, uma vez que a redução da pressão arterial não foi acompanhada da diminuição do estresse oxidativo. É possível que esses efeitos distintos observados sobre o estresse oxidativo sejam devido à diferença de concentração dos compostos fenólicos nos tecidos/células, ou ainda que a redução da pressão arterial na dose de 50 mg/Kg possa ter ocorrido por efeito de outros mecanismos mais dominantes.

O resultado obtido com a dose de 100 mg/Kg aumenta as evidências da participação do estresse oxidativo na hipertensão e confirma a hipótese de que o tratamento por via oral de ratos hipertensos com uma fração de vinho tinto oriundo do Vale do São Francisco de composição quimicamente definida e elevada atividade antioxidante diminui a peroxidação lipídica destes animais, além de melhorar os níveis pressóricos e a frequência cardíaca, sugerindo assim o envolvimento dos compostos fenólicos na redução da pressão e do estresse oxidativo.

É importante ressaltar que os efeitos biológicos destes compostos estão associados aos seus metabólitos, a exemplo dos metabólitos de flavonoides (metilados, sulfatados, glicuronidados) gerados sistematicamente como produtos do metabolismo microbiano no trato gastrointestinal (ROCHA & GUERRA, 2008), uma vez que, estudos têm inferido que os polifenóis, presentes em nossa dieta não são absorvidos diretamente pelo organismo, mas necessitam serem hidrolisados por enzimas intestinais ou pela microflora colônica. Além disso, são rapidamente eliminados do plasma sanguíneo, o que indica que o consumo de alimentos que os contêm deve ser diário para a manutenção da concentração dos mesmos no sangue. (MANACH *et al.*, 2004).

5.13 Ensaios Farmacológicos *in vitro*

Em várias doenças cardiovasculares, inclusive a hipertensão arterial, ocorre disfunção endotelial. A integridade do endotélio, camada que reveste a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos, é essencial à regulação do tônus vascular e estrutura dos vasos, do fluxo sanguíneo, da perfusão tissular e desempenha importante papel na regulação da pressão arterial. Na disfunção endotelial ocorre predomínio de fatores contráteis, que induzem o aumento da resistência vascular periférica e hipertrofia da parede vascular. (BATLOUNI, 2001).

Após adição cumulativa da FrAcOEt pH 7 SyRe VSF (0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100; 300; e 1000 µg/mL), observou-se um vasorelaxamento de maneira concentração dependente em preparações com endotélio funcional ($E_{max} = 103,7 \pm 9,9 \%$ $n=7$). Após a remoção do endotélio, o vasorelaxamento

FrAcOEt pH 7 SyRe VSF não foi significativamente modificado ($E_{max} = 105,6 \pm 5,9\%$ $n=6$) (figura 28; figura 29). O tempo de relaxamento entre uma concentração e outra foi em média de 4 min.

As preparações com anéis de artéria mesentérica foram novamente contraídas com fenilefrina após o relaxamento induzido por FrAcOEt pH 7 SyRe VSF, a fim de mostrar a integridade do órgão e notou-se que houve 100% de reversão da resposta à fenilefrina.

Figura 28: Registros originais da resposta relaxante da FrAcOEt pH 7 SyRe VSF (0,01 – 1000 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato na presença (A) ou na ausência (B) do endotélio vascular.

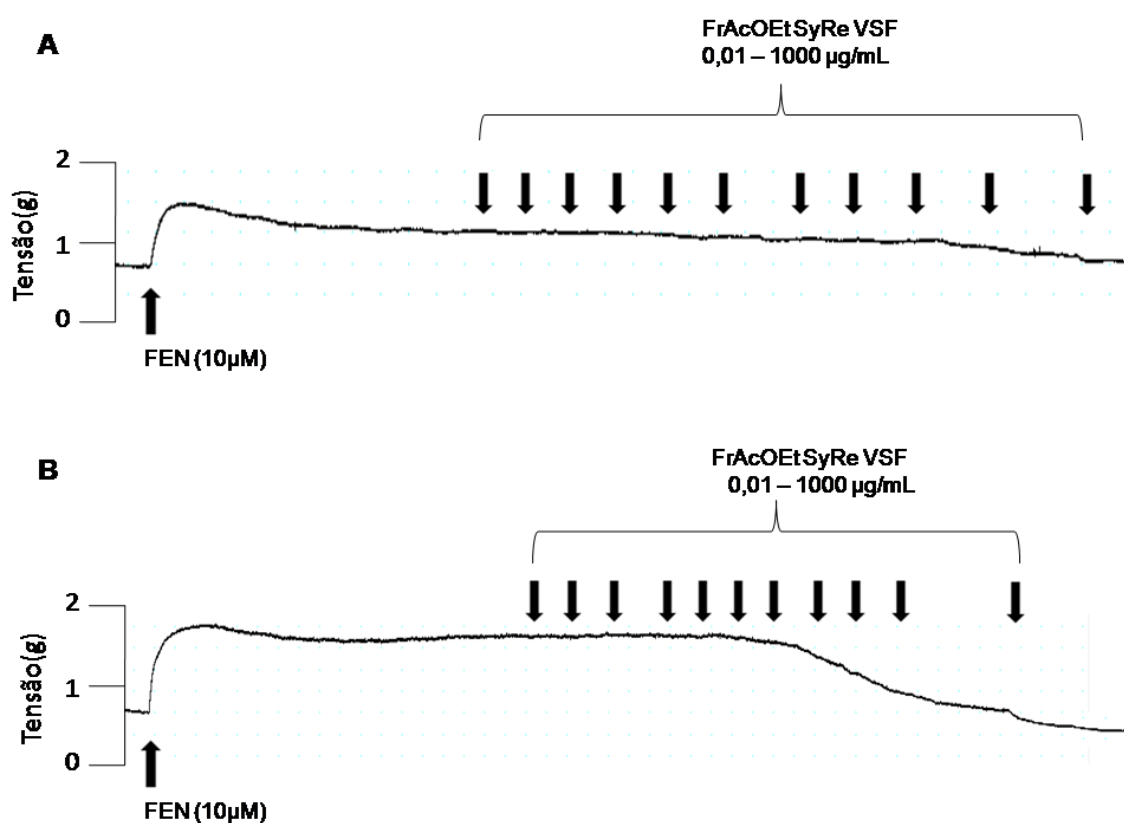
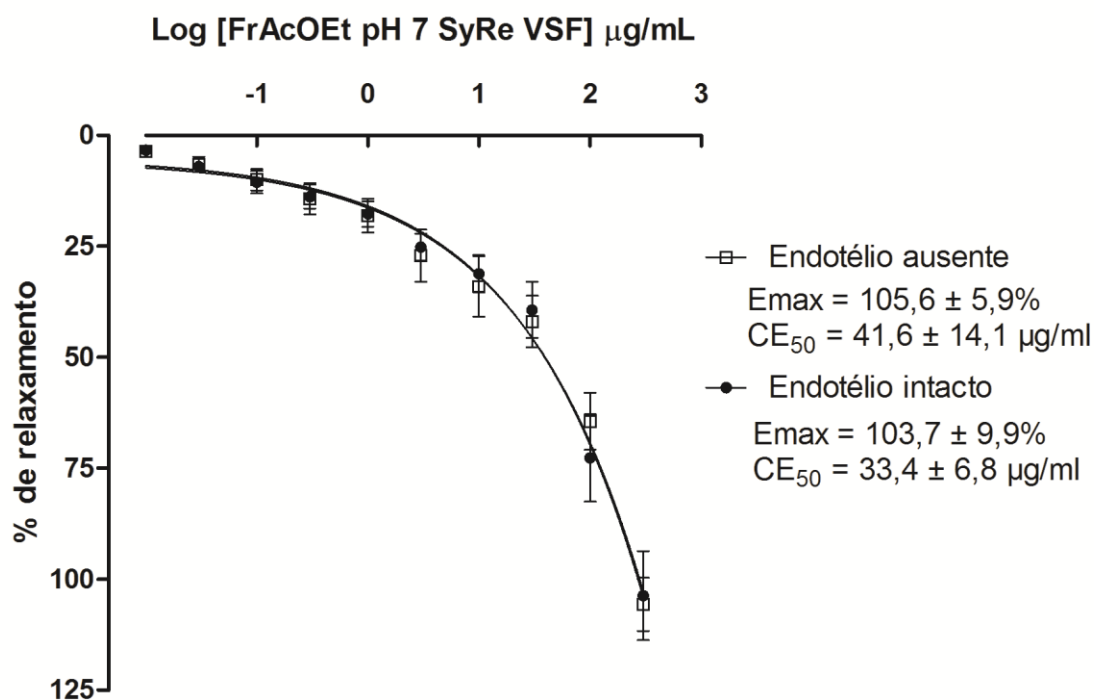


Figura 29: Curvas concentração resposta da FrAcOEt pH 7 SyRe VSF (0,01- 1000 µg/mL) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato pré-contraídos com fenilefrina (10 µM) na presença (●) e ausência de endotélio funcional (◻). Resultados estão expressos como média ± e.p.m.



*p<0,05.

Ao contrário de outros estudos semelhantes relatados na literatura a FrAcOEt pH 7 SyRe VSF apresentou potente efeito vasorrelaxante de forma independente de endotélio, uma vez que, não houve diferença estatística na presença e na ausência do endotélio nem do efeito máximo (E_{max}) nem na concentração que causa 50% do efeito máximo (CE_{50}) ($CE_{50} = 33,4 \pm 6,8$ vs. $CE_{50} = 41,6 \pm 14,1$).

Inúmeras pesquisas indicam que o vinho e os polifenóis presentes nele induzem efeito vasorelaxante dependente de endotélio (DE MOURA *et al.*, 2004; PORTERI *et al.*, 2010; DIEBOLT, BUCHER, ANDRIANTSITOHAINA, 2015). Luciano e colaboradores (2011) constataram o vasorelaxamento dependente de endotélio provocado pelo liofilizado do vinho tinto da variedade Shiraz do Vale do São Francisco, na presença do endotélio o E_{max} foi de $87,5 \pm 6,5$, $n = 10$ e quando o mesmo foi removido o efeito foi significativamente atenuado, $E_{max} = 28,4 \pm 4,9$, $n = 10$, no entanto, as concentrações avaliadas não foram capazes de produzir 100% de relaxamento. Da mesma forma o liofilizado do vinho tinto Cabernet Sauvignon induziu vasorelaxamento

dependente de endotélio em artéria mesentérica de ratos Wistar, na presença do endotélio: $E_{\max} = 87,2 \pm 3,2\%$, $n = 8$; e na ausência do endotélio $E_{\max} = 32,0 \pm 2,0\%$, $n = 8$ (RIBEIRO *et al.*, 2016).

Todavia, Novakovic e colaboradores (2006) mencionaram o que o resveratrol induz relaxamento independente do endotélio em artéria mamária interna humana. A quercetina, flavonoide abundante na maioria dos vinhos tintos, produziu relaxamento independente de endotélio em artérias de resistência e condutância de coelhos (RENDIG *et al.*, 2001). É interessante destacar que esses compostos fenólicos foram encontrados na FrAcOEt pH 7 SyRe VSF e quantificação dos mesmos revelou valores similares ou superiores aos encontrados em outros trabalhos.

A regulação do tônus vascular é dependente de uma complexa interação entre substâncias vasoativas (estímulos vasodilatadores e vasoconstritores), que é gerada por sinais variados, tais como: hormônios circulantes, neurotransmissores, fatores derivados do endotélio, sinais elétricos e/ou mecânicos, como a própria pressão sanguínea (JACKSON, 2005; CRIBBS, 2006). Uma vez intacto, o endotélio libera localmente, de forma controlada, compostos que induzem vasodilatação, como o óxido nítrico (NO), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), prostaciclina (PGI₂); e liberam substâncias vasoconstritoras, tais como: endotelina-1 (ET1), prostaglandina H₂ (PGH₂), tromboxano A₂ (TX A₂) e ânions superóxido (O₂⁻) (BATLOUNI, 2001; FÉLÉTOU; KÖHLER; VANHOUTTE, 2011). Por outro lado, os canais iônicos são importantes no processo de regulação da contratilidade vascular e, conseqüentemente, no controle da PA, pois estes canais funcionam como moduladores do potencial de membrana plasmática (KEVIN; NELSON, 2005).

Os canais para Ca²⁺ voltagem-dependentes (Cav) são considerados a principal via de entrada de Ca²⁺ do meio extracelular. Entretanto, a hiperpolarização ou repolarização induz fechamento dos canais para Ca²⁺ tipo-L, provocando vasodilatação (ADAMOVA; OZKAN; KHALIL, 2009; JACKSON, 2000). Dessa forma os canais para potássio (K⁺) também são importantes reguladores do tônus arterial, isto porque a abertura desses canais leva ao aumento do efluxo de K⁺, causando repolarização ou hiperpolarização do potencial de membrana. Estes eventos resultam no fechamento dos Cav,

impedindo a entrada de Ca^{2+} do meio extracelular, podendo provocar a vasodilatação (NELSON; QUAYLE, 1995; THORNELOE; NELSON, 2005).

Um estudo revelou que os compostos fenólicos do vinho tinto Cabernet Sauvignon oriundo da França e outro polifenol definido presente no vinho, flavan-3,4-ol, produziram relaxamento em anéis de aorta de rato com e sem endotélio, sendo necessário, porém, concentrações 1000 vezes maiores para relaxar anéis desnudos de endotélio, além disso, investigaram ainda o mesmo efeito produzido pela catequina e observaram que esse polifenol provocou apenas um relaxamento parcial dos anéis de aorta (ANDRIAMBELOSON *et al.*, 1997). Considerando que, neste estudo apenas um dos compostos reproduziu os efeitos verificados no vinho e que a diferença entre a estrutura química da catequina e o flavan-3,4-ol é a ausência de um substituinte hidroxila na posição 4 do anel pirano; e fazendo uma analogia aos resultados observados no nosso trabalho e em comparação com os dados da literatura, pode-se sugerir que o vasorelaxamento independente de endotélio pode ser resultante da estrutura química dos compostos fenólicos presentes no vinho bem como de sua concentração, que por sua vez, conforme mencionado anteriormente varia de acordo com vários fatores desde ambientais a técnicas de produção do produto.

Além disso, ao confrontar os resultados obtidos com apenas uma fração oriunda do vinho, ou um composto fenólico isolado, com os resultados existentes na literatura que utilizaram o liofilizado do vinho, pode-se sugerir que os compostos fenólicos atuam de maneira sinérgica e que talvez alguns constituintes químicos que seriam necessários para modular o vasorelaxamento dependente de endotélio tenham ficado concentrados nas demais frações durante o processo de fracionamento.

Conclusões

6 Conclusões

De acordo com os estudos realizados, foi possível concluir que:

- O vinho tinto Syrah Rendeiras da região do Vale do São Francisco apresentou teor de fenólicos totais superior ($3945,36 \pm 0,03$ mg EAG/L) quando comprado aos vinhos de outras regiões e variedades avaliadas. Este resultado pode estar associado ao elevado nível de radiação solar, temperatura e umidade dessa região, que exercem grande influência sobre o desenvolvimento, produção e qualidade da uva e por consequência do vinho, bem como no teor de compostos fenólicos do produto.
- O fracionamento do vinho tinto Syrah Rendeiras da região do Vale do São Francisco mostrou-se eficiente, uma vez que, a presença dos constituintes químicos esperados na FrAcOEt pH 7 SyRe VSF foi confirmada através dos experimentos utilizando UPLC/MS, que possibilitou a identificação de 13 compostos, entre eles derivados do ácido benzoico (ácido gálico), ácidos hidroxinâmicos (ácido cafeico) e flavonoides de diversas classes (quercetina, catequina, luteolina).
- A análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta da FrAcOEt pH 7 SyRe VSF permitiu a quantificação do trans-resveratrol e da quercetina.
- A FrAcOEt pH 7 SyRe VSF apresentou maior atividade anti-radicalar frente aos radicais DPPH e ABTS quando comparada as outras frações. Além disso, foi possível observar uma forte correlação entre os dois métodos e o teor de fenólicos totais desta fração. Isto significa que ambos os métodos indicam o envolvimento dos compostos fenólicos na atividade antioxidante.
- A FrAcOEt pH 7 SyRe VSF reduziu significativamente a pressão arterial média em animais espontaneamente hipertensos nas doses de 50 mg/Kg e 100 mg/Kg, acompanhada da redução da frequência cardíaca apenas na maior dose avaliada em comparação ao grupo controle.
- A FrAcOEt pH 7 SyRe VSF não melhorou a sensibilidade do barorreflexo de animais espontaneamente hipertensos em nenhuma das doses avaliadas.

- A FrAcOEt pH 7 SyRe VSF diminuiu significativamente o estresse oxidativo no soro de animais espontaneamente hipertensos apenas na dose de 100 mg/Kg quando comparados ao grupo controle. Este resultado corrobora que há uma associação entre as espécies reativas de oxigênio e a hipertensão arterial. Sugerindo assim o envolvimento dos compostos fenólicos na redução da pressão e do estresse oxidativo.

- A FrAcOEt pH 7 SyRe VSF induziu vasorelaxamento independente de endotélio. Apesar dos mecanismos que envolvem essa atividade não terem sido investigados neste trabalho, pode-se sugerir que o vasorelaxamento provocado pela FrAcOEt pH 7 SyRe VSF possivelmente envolve a participação dos canais de potássio e de cálcio.

- Este trabalho confirma o envolvimento dos compostos fenólicos presente no vinho tinto Syrah Rendeiras do Vale do São Francisco nas atividades antioxidante e anti-hipertensiva. E aponta para a importância da ação sinérgica que esses compostos podem exercer quando se compara os dados obtidos com o vinho fracionado com estudos realizados com o liofilizado do vinho, uma vez que, ao mesmo tempo em que o fracionamento leva a concentração de alguns constituintes químicos também pode levar a perda de outros que seriam necessários para uma melhor resposta farmacológica.

Perspectivas

7 Perspectivas

- Investigar a composição química das frações aquosa e acetato pH 2 do vinho tinto SyRe VSF.
- Avaliar as influências do tratamento com FrAcOEt pH 7 SyRe VSF sobre a pressão arterial e frequência cardíaca nos modelos animais normotensos.
- Investigar o mecanismo de ação de vasorelaxamento independente de endotélio da FrAcOEt pH 7 SyRe VSF.
- Avaliar a importância da variação do pH para a produção dos fenólicos e melhoria dos vinhos.

Referências

8 REFERÊNCIAS

- ABE, L.T. *et al.* Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.27, n.2, p.394-400, 2007.
- ADAMOVA, Z; OZKAN, S; KHALIL, R. A. Vascular and Cellular Calcium in Normal and Hypertensive Pregnancy. **Curr Clin Pharmacol**, v. 4, n. 3, p. 172–190, 2009.
- AGGARWAL *et al.* Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies. **Anticancer Research**. v.24, p.2783-2840, 2004.
- ALVES, N.F.B. *et al.* Coconut oil supplementation and physical exercises improves baroreflex sensitivity and oxidative stress in hypertensive rats. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.** v.40, p. 393–400, 2015.
- ANDRADE, D.M.L *et al.* Efeito Vasodilatador Independente do Endotélio Induzido pela Jabuticaba (*M.cauliflora*) em Artérias Isoladas. **Arq Bras Cardiol.** [online], 2016.
- ANDRIAMBELOSON, E. *et al.* Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. **British Journal of Pharmacology**. v.120, p.1053-1058, 1997.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** (Impr.), São Paulo, v. 66, n. 1, 2007.
- ANTUNES, M.V. *et al.* Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.44, n.2, 2008.
- APOSTOLIDOU C., *et al.* Cardiovascular risk and benefits from antioxidant dietary intervention with red wine in asymptomatic hypercholesterolemics. **Clin Nutr ESPEN**, v.10, n.6, p.e224–e233, 2015.
- ARCARI, S.G. *et al.* Brazilian fortified wines: Chemical composition, chromatic properties and antioxidant activity. **Food Research International**. v. 53, p. 164–173, 2013.
- ARCHELA, E.; DALL'ANTONIA, L.H. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. v. 34, n. 2, p. 193-210, 2013.

ARRAKI K. *et al.* Identification and quantification of stilbenes in some Tunisian red wines using UPLC-MS and HPLC-DAD. **OENO One**. v. 51, n. 3, p. 231-236. 2017.

ARSEGO, J.L. **Composição Polifenólica de Vinhos Bordô, Isabel, Seyve Villard e Niágara Branca, Produzidos no Alto Vale do Rio do Peixe-SC.** Dissertação, 2004.

AZEVEDO, F.T. Efeito da ingestão crônica de vinho tinto, vinho branco e suco de uva liofilizados, na aorta e fígado de coelhos adultos hipercoleste rolêmicos. [Tese]. Universidade Federal de Viçosa, 2011.

BAIANO *et al.* Phenolic content and antioxidant activity of Primitivo wine: comparison among winemaking technologies. **J Food Sci**. v.74, n.3, p.258-67, 2009.

BALIŠ P. *et al.* Short-term administration of alibernet red wine extract failed to affect blood pressure and to improve endothelial function in young normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Physiol Res**. v. 62, n.6, p.631-41, 2013.

BAOSHAN, SUN*, TIAGO A. FERNANDES AND M. ISABEL SPRANGER. A new class of anthocyanin-procyanidin condensation products detected in red wine by electrospray ionization multi-stage mass spectrometry analysis. **Rapid Commun Mass Spectrom.**;v.24, n.3, p.254-60, 2010.

BARADARAN A, NASRI H, RAFIEIAN-KOPAEI M. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences.*;v.19, n.4, p.358-367, 2014.

BARBOSA, K.B.F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARBOSA, L.F.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes?. **Quím. Nova.**, v. 29, n. 6, p. 1352-1360, 2006.

BARREIROS, A. DAVID, J. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova.**, v.29, p.113-123, 2006.

BARTOLOME B., *et al.* *In vitro* antioxidant activity of red grape skins. **Eur Food Res Technol.**, v.218, n.2, p.173–177, 2004.

BASTIANETTO S., ZHENG W.H., QUIRION R. Neuroprotective abilities of resveratrol and other red wine constituents against nitric oxide-related toxicity in cultured hippocampal neurons. **British Journal of Pharmacology**.v.131, n.4, p.711–720, 2000.

BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens.** v.8, p. 328-38, 2001.

BEER, D. *et al.* Changes in the Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Pinotage, Cabernet Sauvignon, Chardonnay and Chenin blanc Wines During Bottle Ageing. **S. Afr. J. Enol.Vitic**, v. 26, n. 1, 2005.

BERNETTI, I.; CASINI, L.; MARINELLI, N. Wine and globalisation: changes in the international market structure and the position of Italy. **British Food Journal**, v. 108, n.4, p. 306-315, 2006.

BEZERRA, Andréia Gomes *et al.* . Phytochemical analysis of hydroethanolic extract of *Turnera diffusa* Willd and evaluation of its effects on astrocyte cell death. **Einstein (São Paulo)**, São Paulo , v. 14, n. 1, p. 56-63, Mar. 2016 .

BIANCHINI F.; VAINIO H. Wine and resveratrol: mechanisms of cancer prevention?. **Eur J Cancer Prev.** v.12, n.5, p.417-25, 2003.

BORBALAN A.M.A. *et al.* Study of the polyphenol content of red and white grape varieties by liquid chromatography – mass spectrometry and its relationship to antioxidante power. **J Chromatog A.**, v.1012, n.1, p.31–38, 2003.

BOTELHO-ONO, M. S. *et al.* Acute superoxide scavenging restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v. 159, n. 1-2, p. 38–44, 2011.

BOTTERWECK, A.A.M.; *et al.* Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. **J. Food Chem. Toxicol.**, v.38, p.599-605, 2000.

BRAGA, V.A. *et al.* Cardiovascular responses to peripheral chemoreflex activation and comparison of different methods to evaluate baroreflex gain in conscious mice using telemetry. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.295, p.1168-74, 2008.

BRAGA, V. A. Dietary salt enhances angiotensin-II-induced superoxide formation in the rostral ventrolateral medulla. **Autonomic neuroscience: basic & clinical**, v. 155, n. 1-2, p. 14–18, 2010.

BRAGA, V. A. *et al.* Angiotensin-II-induced reactive oxygen species along the SFO-PVN-RVLM pathway: implications in neurogenic hypertension. **Braz J Med Biol Res.**, v. 44, n. 9, p. 871–876, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: hipertensão arterial sistêmica.** 128 p.il. (Cadernos de Atenção Básica, n. 37), 2013.

BRASIL. **Portaria nº 229, de 25 de outubro de 1988.** Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/admin/arquivos/leis/1456252517.pdf>> Acesso em: 05 dez. 2015.

BRAVO, M.N.S. **Caracterização Química e Funcional de Vinhos Moscatel Portugueses.** [Dissertação], Faculdade De Farmácia Da Universidade De Lisboa. Universidade De Lisboa, 2008.

BURIN *et al.* Phenolic composition, colour, antioxidant activity and mineral profile of Cabernet Sauvignon wines. **International Journal of Food Science and Technology.** v.45, p.1505–1512, 2010.

BURMEISTER, M. A. *et al.* In vivo bioluminescence imaging reveals redox-regulated activator protein-1 activation in paraventricular nucleus of mice with renovascular hypertension. **Hypertension**, v. 57, n. 2, p. 289–297, 2011.

CAMARGO, U.A.; MAIA, J.D.G.; RITSCHER, P. **Embrapa Uva e Vinho : novas cultivares brasileiras de uva** -Bento Gonçalves, 2010.

CAMPOS, M.G. *et al.* Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v.51, n.3, p. 742-745, 2003.

CARERI, M. *et al.* Direct HPLC Analysis of Quercetin and *trans*-Resveratrol in Red Wine, Grape, and Winemaking Byproducts. **J. Agric. Food Chem.** v. 51, p. 5226-5231, 2003.

CAVALCANTE, A.G.M.; BRUIN, P.F.C. O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. **J. bras. pneumol.**, v. 35, n. 12, p. 1227-1237, 2009.

CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Quím. Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008 .

CODEVASF – **Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba. 500 Anos de Integração Nacional.** Disponível em: <www.valedosaofrancisco.com.br>. Acesso em 28 de agosto de 2016.

COLLINS, C.H. ; BRAGA, G.L. ; BONATO, P.S. **Fundamentos da Cromatografia.** Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006.

CORDER, R. *et al.* Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. **Nature.**, v.414, p.863–864, 2001.

COSTA, C.A. *et al.* Antioxidant treatment with tempol and apocynin prevents endothelial dysfunction and development of renovascular hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 22, n. 12, p. 1242–1249, 2009.

COSTA, L. M. *et al.* Atividade antioxidante de pimentas do gênero *Capsicum*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 51-59, 2010.

CRAIGE, S.M; KANT, S.; KEANEY JR., J.F. Reactive Oxygen Species in Endothelial Function – From Disease to Adaptation – **Circ J**; v. 79, p.1145 – 1155, 2015

CRIBBS, L. L. T-type Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle: Multiple functions. **Cell Calcium**, v.40, n.20, p. 221-230, 2006.

DANCEY, C.; REIDY, J. **Estatística Sem Matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows**. Porto Alegre, Artmed, 2006.

DANTAS, T. "Vinho"; **Brasil Escola**. Disponível em: <<http://brasilecola.uol.com.br/saude/vinho.htm>>. Acesso em 24 de agosto de 2016.

DE MOURA *et al.* Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. **JPP**. v.54, p.1515–1520, 2002.

DE MOURA R.S. *et al.* Mechanism of the endothelium-dependent vasodilation and the antihypertensive effect of Brazilian red wine. **J Cardiovasc Pharmacol**. v.44, p.302–309, 2004.

DE QUEIROZ, T. M.; MONTEIRO, M. M. O.; BRAGA, V. A. Angiotensin-II-derived reactive oxygen species on baroreflex sensitivity during hypertension: new perspectives. **Frontiers in Physiology**, v. 4, p. 105, 2013.

DEIANA, M. *et al.* Wine extracts from Sardinian grape varieties attenuate membrane oxidative damage in Caco-2 cell monolayers. **Food Chemistry** v.134, l.4, p.2105–2113, 2012.

DELL'AGLI, M., BUSCIALÀ, A.,BOSISIO, E. Vascular effects of wine polyphenols. **Cardiovascular Research**., v.63, p.593– 602, 2004.

DIAS, F.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Determination of Phenolic Acids and Quercetin in Brazilian Red Wines from Vale do São Francisco Region Using Liquid-Liquid Ultrasound-Assisted Extraction and HPLC-DAD-MS. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 27, n. 6, p.1055-1059, 2016.

DIAS, F.S.; SILVA, M.F.; DAVID, J.M. Determination of Quercetin, Gallic Acid, Resveratrol, Catechin and Malvidin in Brazilian Wines Elaborated in the Vale do São Francisco Using Liquid–Liquid Extraction Assisted by Ultrasound and GC-MS. **Food Anal. Methods**. v. 6, p. 963–968, 2013.

DIEBOLT, M.; BUCHER, B.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Wine Polyphenols Decrease Blood Pressure, Improve NO Vasodilatation, and Induce Gene Expression. **Hypertension**.v.38, p.159-165, 2001.

DILLENBURG D.R. *et al.* Resveratrol and grape juice differentially ameliorate cardiovascular autonomic modulation in L-NAME-treated rats. **Auton Neurosci.** v.179, n.1-2, p.9-13, 2013.

DIMITROVSKA, M.; TOMOVSKA, E.; BOCEVSKA, M. Characterisation of Vranec, Cabernet Sauvignon and Merlot wines based on their chromatic and anthocyanin profiles. **J. Serb. Chem. Soc.** v.78, n.9, p.1309–1322, 2013.

DUARTE, J.T. **O sistema cardiovascular e a hipertensão**. Disponível em: <<https://radicaislivres97.wordpress.com/2013/07/13/o-sistema-cardiovascular-e-a-hipertensao/>>. Acesso em 02 de setembro de 2016 às 16:30 h.

DUARTE-ALMEIDA, J.M. *et al.* Avaliação da Atividade Antioxidante Utilizando Sistema β -Caroteno/Ácido Linoléico e Método de Sequestro de Radicais DPPH•. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.26, n.2,p.446-452, 2006.

EDER *et al.* Determination Of Pyranoanthocyanine And Malvidin-3-Glucoside Content In Red Wine Of Different Vintages Via LC-MS/ESI. **Mitteilungen Klosterneuburg**, v.64, p.183-192, 2014.

EGERT, S. *et al.* Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. **British Journal of Nutrition**, v. 102, n. 7 , p. 1065-1074, 2009.

ENGERS, V.K. *et al.* A Influência do Estresse Oxidativo no Processo de Envelhecimento Celular. **Revista Contexto & Saúde.**, v. 10, n. 20, 2011.

FABRE, N.; RUSTAN, I.; HOFFMANN, E.; QUETIN-LECLERQ, J.Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglicones by negative íon liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 12, p.707-715, 2001.

FALCÃO, A.P. *et al.* Índice de polifenóis, antocianinas totais e atividade antioxidante de um sistema modelo de geléia de uvas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n.3, p. 637-642, 2007.

FARACI, F.M., HEISTAD, D.D. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. **Physiol Rev.**; v.78, p.53–97,1998.

FAZAN JR. R, SILVA, VJD, SALGADO HC. Modelos de hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, n.1, p.19-29, 2001

FÉLÉTOU, M; KÖHLER, R; VANHOUTTE, P. M. Nitric oxide: Orchestrator of endothelium-dependent responses. **Ann. Med**, v. 7, 2011.

FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S. *et al.* Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. **Analytica Chimica Acta**. v. 513, p. 113–118, 2004.

FILHO, D.B.F.; JÚNIOR, J.A.S. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, v. 18, n. 1, 2009.

FILHO, P.R.S.; CASTRO, I.; STAHLSCHMIDT, A. Efeito do Vinho Tinto Associado ao Exercício Físico no Sistema Cardiovascular de Ratos Espontaneamente Hipertensos. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo , v. 96, n. 4, p. 277-283, 2011.

FREEDMAN J.E. *et al.* Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. **Circulation**., v.103, p.2792-2798, 2001.

FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life Sci**. v.66, n.8, p.663-673, 2000.

FREMONT, L. BELGUENDOUZ, L., DEPAL, S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. **Life Sci**., v.64, n.26, p. 2511-2521, 1999.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373–376, 27, 1980

GABRIELLI, M. *et al.* Determination of sotolon content in South African white wines by two novel HPLC–UV and UPLC–MS methods. **Food Chemistry**. v.169, p. 180-186, 2015.

GANONG, W.F., **Fisiologia Médica**. ed.22. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

GARCEZ, F. R. *et al.* Fenilpropanoides e outros constituintes biotivos de *Nectandra megapota mica*. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 407 - 411, 2009.

GHISELLI, A. *et al.* C. Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated from an Italian Red Wine. **J. Agric. Food Chem.**, v.46, n.2, p. 361 - 367, 1998.

GIEHL, M. R. *et al.* Eficácia dos flavonóides da uva,vinho tinto e suco de uva tinto na prevenção e no tratamento secundário da aterosclerose. **Sci.med.**, v. 17, n. 3, p. 145-155, 2007.

GOMES L. J. C.; VICENTE C.D. **Fenóis totais e a atividade antioxidante de diferentes bebidas comercial**. IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica Belém – PA, 2009.

GOMES, R.G. **Doenças cardiovasculares causam quase 30% das mortes no País**. Portal Brasil, 2011. Disponível em:< [http://www.brasil.gov.br/saude/2011/09/doencas-cardiovasculares causam-quase-30-das-mortes-no-pais](http://www.brasil.gov.br/saude/2011/09/doencas-cardiovasculares-causam-quase-30-das-mortes-no-pais)>. Acesso em 01 de dezembro de 2016.

GÓMEZ-PLAZA, E., *et al.* Color and phenolic compounds of a young red wine. Influence of wine-making techniques, storage temperature, and length of storage time. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.v.48,p. 736–741, 2000.

GÓMEZ-ROMERO, M. *et al.* Automated identification of phenolics in plant-derived foods by using library search approach. **Food Chemistry**, v.124, p.379–386, 2011.

GRIMALT, S. *et al.*, F. Quantification, confirmation and screening capability of UHPLC coupled to triple quadrupole and hybrid quadrupole time -of-flight mass spectrometry in pesticide residue analysis. **Journal of Mass Spectrometry**, v.45, p.421-436, 2010.

GRIS *et al.* Phenolic profile and effect of regular consumption of Brazilian red wines on in vivo antioxidant activity . **J. Food Comp. Anal.**, v.3, p.31–40, 2013.

GRIS, E.F. **Perfil fenólico e atividades antioxidante e hipolipemiante de vinhos de variedades Vitis vinifera cultivadas em São Joaquim - SC - Brasil** [tese]- Florianópolis, SC, 2010.

GUERRA, C.C. *et al.* Documento sobre uvas e vinhos. **Embrapa Uva e Vinho**, Bento Gonçalves. Documentos/ Embrapa Uva e Vinho, ISSN 1516-8107, nº48, 2009.

GUTTERIDGE, J.M. Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acids and carbohydrates. **FEBS Lett.**, v.128, p. 343–346, 1981.

HALLIWELL, B. Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role Human Disease. **The American Journal of Medicine**. v.9, 1991.

HORT *et al.* Anti-Atherogenic Effects of a Phenol-Rich Fraction from Brazilian Red Wine (*Vitis labrusca* L.) in Hypercholesterolemic Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice. **J Med Food**. v.15, n.10, p. 936–944, 2012.

HOSU, A.; CRISTEA, V.M; CIMPOIU, C. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. **Food Chemistry**, v.150, p.113–118, 2014.

IRIGOYEN, M.C.; CONSOLIM-COLOMBO, F.M.; KRIEGER, E.M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Rev Bras Hipertens.**, v.8, p. 55-62, 2001.

IVANOVA, V.; STEFOVA, M.; CHINNICI, F.. Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. **J. Serb. Chem. Soc.**, v. 75, n.1, p. 45–59, 2010.

JACKSON, R.S. **Wine Science – Principles and Applications**. 3ed., 789p. Academic Press, London, UK., 2008.

JACKSON, W. F. Potassium channels in the peripheral microcirculation. **Microcirculation**, v.12, n.1, p.113-27, 2005.

JACKSON, W. F. Ion channel and vascular tone. **Hypertension**. v.35 (parte 2), p.173 -178, 2000.

JAVKHEDKAR A.A.; BANDAY A.A. Antioxidant resveratrol restores renal sodium transport regulation in SHR. **Physiol Rep**. v.3, n.11, pii: e12618, 2015.

JIA *et al.* The antihypertensive effect of ethyl acetate extract from red raspberry fruit in hypertensive rats. **Phcog Mag**. v.7, p.19-24, 2011.

JIANG, B.; ZHANG, Z.W. Comparison on Phenolic Compounds and Antioxidant Properties of Cabernet Sauvignon and Merlot Wines from Four Wine Grape-Growing Regions in China. **Molecules**. v.17, p. 8804-8821; 2012.

JIMÉNEZ, R. *et al.* Polyphenols restore endothelial function in DOCA-salt hypertension: Role of endothelin-1 and NADPH oxidase. **Free Radical Biology & Medicine**., v.43, p.462-473, 2007.

JOHNSON, H. **"The Story of Wine"**. Mitchell-Beazley, Londres, 1989.

JOVELLANOS *et al.* Antihypertensive Effect of a Polyphenol-Rich Cocoa Powder Industrially Processed To Preserve the Original Flavonoids of the Cocoa Beans. **J. Agric. Food Chem**. v. 57, n.14, p.6156–6162, 2009.

JÚNIOR, M.L.C.D. F. **Ação extra nuclear do ácido retinóico via espécies reativas de oxigênio em células de Sertoli**. [Dissertação], Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

JUSTESEN, U., KNUTHSEN, P., LETH, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**., v.799, p. 101-110, 1998.

KAMERER, D. *et al.* Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L) by HPLC-DAD-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4360 – 4367, 2004.

KEDARE S.B.; SINGH R.P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*. v.48, n.4, p.412-422, 2011.

KEVIN, S. T.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Can J Pharmacol**, n.83, p.215 - 242, 2005.

KIM, D. *et al.* Quantification of Polyphenolics and Their Antioxidant Capacity in Fresh Plums. **J. Agric. Food Chem.** v.51, p.6509-6515, 2003.

KOPPENAAL *et al.* MS Detectors. **Analytical Chemistry**, v.77, n.21, p.418–427, 2005.

KRUEL, L.F. Peso hidrostático e frequência cardíaca em pessoas submetidas a diferentes profundidades de água. Santa Maria: UFSM, 1994. Dissertação. (Mestrado em Educação Física). Universidade Federal de Santa Maria, 1994.

KUMAR, S.; PRAHALATHAN, P.; RAJA, B. Vanillic acid: A potential inhibitor of cardiac and aortic wall remodeling in I-NAME induced hypertension through upregulation of endothelial nitric oxide synthase. **Enviromental Toxicology and Pharmacology**. v. 38, p. 643-652, 20014.

KUSHIRO, T. *et al.* Oxidative stress in the Dahl salt-sensitive hypertensive rat. **Clin Exp Hypertens.**; v.27, n.1, p.9-15, 2005.

LACHMAN *et al.* Major factors infl uencing antioxidant contentes and antioxidant activity in grapes and wines. **International Journal of Wine Research**. v.1, p. 101–121, 2009.

LAURSEN, J.B. *et al.* Role of superoxideinangiotensinII inducedbutnotcatecholamine- inducedhypertension. **Circulation.**, v. 95, p.588–593, 1997.

LAZARTIGUES, E. Inflammation and neurogenic hypertension: a new role for the circumventricular organs?. **Circ Res.**, v.107, p.166-7, 2010.

LI, H., FÖRSTERMANN, U. Resveratrol: A Multifunctional Compound Improving Endothelial Function. **Cardiovasc Drugs Ther.**, v.23, p.425–429, 2009.

LIMA *et al.* Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. **Food Chemistry**. v.161, p.94–103, 2014.

LIMA, A. **Caracterização Química, Avaliação da Atividade Antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no**

Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). [Tese], Universidade de São Paulo, 2008.

LIMA, N.E.F. **Perfil Fenólico e Atividade Antioxidante de Vinhos Goethe - Caracterização e Evolução Durante o Armazenamento em Garrafa.** [Dissertação], Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

LINS, A.R.; SARTORI G.V. Qualidade Fenólica e Atividade Antioxidante de Vinhos Tintos Produzidos no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais.** v.16, n.1, p.69-76, 2014.

LOPES *et al.* Antocianinas: Uma Breve Revisão das Características Estruturais e da Estabilidade. **R. Bras. Agrociência,** v.13, n.3, p. 291-297, 2007.

LUCENA, A. P. S. D. **Determinação da Atividade Antioxidante de Vinhos Tintos da Região do Vale do São Francisco.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, 2008.

LUCENA, A.P.S. *et al.* Antioxidant activity and phenolics content of selected Brazilian wines. **Journal of Food Composition and Analysis.** v.23, p.30–36, 2010.

LUCIANO, M.L. *et al.* Uncovering the Vasorelaxant Effect Induced by Vale do São Francisco Red Wine: A Role for Nitric Oxide. **J Cardiovasc Pharmacol.** v.57, p.696–701, 2011.

LUZIA, D.M.M.; JORGE, N. Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. **Quím. Nova.**, v. 32, n. 4, p. 946-949, 2009.

MAGALHÃES *et al.* Automatic Aluminum Chloride Method for Routine Estimation of Total Flavonoids in Red Wines and Teas. **Food Anal. Methods** v.5, p.530–539, 2012.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C. S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Quím. Nova,** v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C. S.F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica.** v.4, n.3, p.197-207, 2012.

MAMEDE, M.E.O; PASTORE, G.M.. Compostos Fenólicos do Vinho: Estrutura e Ação Antioxidante. **B.CEPPA.** v.22, n 2, p 233-252, 2004.

MANACH, C. DONOVAN, J. Pharmacokinetics and Metabolismo f Dietary Flavonoids in Humans. **Free Radical Research.**, v.38, n.8, p.771-785, 2004.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The american Journal of Clinical Nutrition,** Bethesda, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MANFROI, V. **Taninos enológicos e goma arábica na composição e qualidade sensorial do vinho Cabernet Sauvignon**. Dissertação (Doutorado em Ciências). 133 f. Universidade Federal de Pelotas, 2007.

MARINOVA, D.; RIBAROVA, F.; ATANASSOVA, M. Introduction Total Phenolics and Total Flavonoids in Bulgarian Fruits and Vegetables. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**. v.40, n.3, p.255-260, 2005.

MARTELLI, A. Reflexo dos barorreceptores e homeostase da pressão arterial. **Rev HCPA**. v. 33, (3/4), p. 230-327, 2013.

MELLO, L. M. R. Atuação do Brasil no Mercado Vitivinícola Mundial – Panorama 2013. Disponível em: Embrapa, www.cnpvu.embrapa.br, 2013. Acesso em 25 de agosto de 2016.

MELO *et al.*, 2011. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.6, p.1088-1093, 2011.

MENDES-JUNIOR, L.G. *et al.* Oral supplementation with the rutin improves cardiovagal baroreflex sensitivity and vascular reactivity in hypertensive rats. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.** v. 38, n. 11, p. 1099–1106, 2013.

MENKOVIĆ *et al.* Phenolic composition and free radical scavenging activity of wine produced from the Serbian autochthonous grape variety Prokupac – A model approach. **J. Serb. Chem. Soc.**, v.79, n.1, p. 11–24, 2014.

MIHAI, C. M. *et al.* Interactions among flavonoids of propolis affect antibacterial activity against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, p. 68–72, 2012.

MOLYNEUX P. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** v.26, n.2, p. 211-219, 2004.

MONTEIRO, M. O. *et al.* Quercetin Improves Baroreflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats. **Molecules**. v. 17, p.12997-13008, 2012.

MOURA *et al.* Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. **JPP**. v.54, p.151-1520, 2002.

NASCIMENTO, R. J. B. D. **Desenvolvimento de Método de Quantificação dos Constituintes Fenólicos e Ação Anti-radicalar de Vinhos Tintos Nacionais e Importados**. [Tese], Universidade Federal da Paraíba, 2010.

NAVARRO, F.F. **Cissus gongylodes: caracterização farmacognóstica e investigação de aspectos preliminares da seguridade da utilização de extratos aquosos das folhas de caules**. [Dissertação]. Universidade Estadual Paulista, 2009.

NELSON, M.T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **American Journal of Physiology**, v.268, p.799–822, 1995.

NEVES, L. C.; ALENCAR S. M.; CARPES S.T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis melífera*. **Braz. J. Food Technol.**, VII BMCFB, junho 2009.

NIESSEN, W. M. A. State-of the-art in liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** , v.856, p.179 – 197, 1999.

NIJVELDT, R.J. *et al.* Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.74, p.418–425, 2001.

NOBRE, F. *et al.* Hipertensão arterial sistêmica Primária. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v.46, n.3, p. 256-72, 2013.

NOGUEIRA, N.M. *et al.* Méritos comparativos da Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência em escala convencional e minituarizada. **Rev. Bras. Farm.**, v.92, n.2, p.44-50, 2011.

NORATTO, G.D. *et al.* Polyphenolics from Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) and Red Muscadine Grape (*Vitis rotundifolia*) Protect Human Umbilical Vascular Endothelial Cells (HUVEC) from Glucose- and Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammation and Target MicroRNA-126. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p.7999-8012, 2011.

NOVAKOVIC *et al.* The Mechanism of Endothelium-Independent Relaxation Induced by the Wine Polyphenol Resveratrol in Human Internal Mammary Artery. **J Pharmacol Sci.** v.101, p.85 – 90, 2006.

OLIVEIRA, L.C. **Avaliação Química e Sensorial de Vinhos Tintos Produzidos Nas Regiões do “Vale do São Francisco” e da “Serra Gaúcha”**. [Dissertação]. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, 2011.

OLIVEIRA, M. C.; ESPERANÇA, P.; ALMOSTER FERREIRA, M. A. Characterization of anthocyanins by electrospray ionization and collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.15, p.1525-1532, 2001.

ONO. M.I. **Estudo *In Vitro* da Composição de Compostos Fenólicos e Capacidade Antioxidante em Vinhos Finos Tintos**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal Tecnológica do Paraná, 2014.

ORTEGA, T. *et al.* Influence of grape variety and their phenolic composition on vasorelaxing activity of young red wines. **Eur Food Res Technol.**, v. 227, p.1641, 2008.

PACE-ASCIAC, C.R. *et al.* The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. **Clin Chim Acta.**, v. 235, n.2, p. 207-19, 1995.

PARAVICINI, T.M.; TOUYZ, R.M. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension. **Diabetes Care**, v.31, S.2, 2008.

PEDRO-BOTET, J. *et al.* Decreased endogenous antioxidant enzymatic status in essential hypertension. **J Hum Hypertens.**, v.14, p.343-5, 2000.

PENNA, N.G.; HECKTHEUER, L.H.R. Vinho e Saúde: uma revisão. **Infarma**. v.16, n. 1-2, 2004.

PEREIRA, G.E. Notas técnicas. Disponível em: <<http://www.vinhovasf.com.br/site/internas/valetecnico.php>>. Acesso em: 28 de setembro de 2016 às 22:30.

PETROVIC, M. *et al.* Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. **J Chromatogr A**, v. 1067, n. 1-2, p. 1-14, 2005.

PINHO, R.A. *et al.* Doença arterial coronariana, exercício físico e estresse oxidativo. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 94, n. 4, p. 549-555, 2010.

POIANA, M.A. *et al.* The Establishing the Quality of Red Wines on the Basis of Chromatic Characteristics. *Journal of Agrolimentary Processes and Technologies*. v. XIII, p.199-208, 2007

PORTERI, E. *et al.* Vasodilator Effects of Red Wines in Subcutaneous Small Resistance Artery of Patients With Essential Hypertension. **American Journal Of Hypertension**. v.23, n.4, p.373-378, 2010.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N.. Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e Alimentos Gordurosos. **Quim. Nova.**, v. 29, n. 4, 755-760, 2006.

RAMÓN R. *et al.* Diminution of tissue lipid peroxidation in rats is related to the in vitro antioxidant capacity of wine. **Life Sciences**. v.76, l.8, p.889–900, 2005.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 6 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 906 p, 2001.

RECHNER A.R., KRONER C. Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. **Throm Res**; v.116 n.4, p. 327-34, 2005.

REIS *et al.* Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no Diabetes Tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.52, n.7, p.1096-1105, 2008.

RENDIG, S.V. Effects of Red Wine, Alcohol, and Quercetin on Coronary Resistance and Conductance Arteries. **Journal of Cardiovascular Pharmacology.** v.38, p.219–227, 2001.

REVATHY B., DILSHAD P., RAJARATHNAM S. Characterization of free, esterified and bound phenolics in custard apple (*Annona squamosa* L) fruit pulp by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v.82, p.121–127, 2016.

RIBÉREAU-GAYON, P. *et al.* **Handbook of enology.** 2 ed., John Wiley & Sons Ltd, England, 2006.

RIBEIRO *et al.* Cardiovascular effects induced by northeastern Brazilian red wine: Role of nitric oxide and redox sensitive pathways. **Journal of Functional Foods.**, v.22, p.82–92, 2016.

RIQUE, A.B.R., SOARES, E.A., MEIRELLES, C.M. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. **Rev. Bras. Med. Esporte.** v. 8, n. 6, p. 244-254, 2002.

ROCHA, H.A.; GUERRA, N.B. Polifenóis Em Vinhos Tintos: Fatores Envolvidos, Propriedades Funcionais e Biodisponibilidade. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha.** v.9, n.2, p.93-105, 2008.

ROCHA, H.A.; GUERRA, N.B. Polifenóis em Vinhos Tintos: Fatores Envolvidos, Propriedades Funcionais e Biodisponibilidade. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha.** v. 9, n.2, p.93-105, 2008.

RODRIGO, R. *et al.* Diminution of tissue lipid peroxidation in rats is related to the in vitro antioxidant capacity of wine. **Life Sciences**, v. 76, p. 889-900, 2005.

RODRIGUES, J. A. **Determinação da actividade antioxidante e composição fenólica de vinhos portugueses e correlação com parâmetros de cor.** 2011. 143 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa, 2011.

ROMERO M. *et al.* Lack of beneficial metabolic effects of quercetin in adult spontaneously hypertensive rats. **Eur J Pharmacol.**, v.627, n.1-3, p.242-50, 2010.

ROMERO, J.C.; RECKELHOFF, J.F. State-of-the-Art lecture. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. **Hypertension.**, v.34, p.943-9, 1999.

RONALD E.; WROLSTAD. **Current Protocols In Food Analytical Chemistry**, Editora: John Wiley and Sons, Inc., 2006.

ROUSSIS, I.G.; LAMBROPOULOS, I.; SOULTI, K. Scavenging Capacities of Some Wines and Wine Phenolic Extracts. **Food Technol. Biotechnol.** v. 43, n. 4, p.351–358, 2005.

SALDANHA, L.L VILEGAS, W., DOKKEDAL, A. L. Characterization of Flavonoids and Phenolic Acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS Combined with NMR. **Molecules.**, v.18, p. 8402-8416, 2013.

SALVEMINI, D. *et al.* Peroxynitrite decomposition catalysts: therapeutics for peroxynitrite-mediated pathology. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 95, n. 5, p. 2659-2663, 1998.

SCHALLEY C. A. Supramolecular chemistry goes gas phase: the mass spectrometric examination of noncovalent interactions in host–guest chemistry and molecular recognition. **Int. J. Mass Spectrom.** v.194, n. 1, p. 11-39, 2000.

SCHIFFRIN, E. L.; TOUYZ, R. M. Multiple actions of angiotensin II in hypertension: Benefits of AT1 receptor blockade. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.42, n. 5, p. 911–913, 2003.

SCHINI-KERTH *et al.* Vascular Protection by Natural Product-Derived Polyphenols: In Vitro and In Vivo Evidence. **Planta Med.**, v.77, p.1161–1167, 2011.

SERAFINI M.; MAIANI M.; FERRO-LUZZI A. Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. **J Nutr.** v.128 ,n.6, p.1003–1007, 1998.

SERGHEI, S. **Ensaio com alternativas de madeira e taninos enológicos em vinho tinto. Efeitos na composição química e análise sensorial.** [Dissertação]. Universidade de Lisboa, 2013.

ŠERUGA, M.; NOVAK, I.; JAKOBEK, L. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. **Food Chemistry.** v.124, p.1208–1216, 2011.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolics Antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.**, v.36, p. 67-103, 1992.

SHALASHVILI, A. *et al.* Phenolic Compounds of Wines from Georgian Autochthonous Grapes, Rkatsiteli and Saperavi, Prepared by Georgian (Kakhetian) Technology. **Bull. Georg. Natl. Acad. Sci.** v. 6, n. 3, 2012.

SILVA *et al.* A fast method using a new hydrophilic–lipophilic balanced sorbent in combination with ultra-high performance liquid chromatography for quantification of significant bioactive metabolites in wines. *Talanta* 86 (2011) 82– 90, 2011.

SILVA *et al.* Application of FTIR-ATR to Moscatel dessert wines for prediction of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacity. **Food Chemistry** v.150, p.489–493, 2014.

SILVA *et al.* Application of FTIR-ATR to Moscatel dessert wines for prediction of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacity. **Food Chemistry**. v.150, p.489–493, 2014.

SILVA, A.D.F. **Análise de Compostos Fenólicos e Potencial Antioxidante de Amostras Comerciais de Suco de Uva e Produtos Derivados de Uvas Vinícolas**. [Dissertação]. Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal da Paraíba. 2010.

SILVA, C.T.; JASIULIONIS, M.G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Cienc. Cult.**, v. 66, n. 1, 2014.

SILVA, D.C. *et al.* Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Quím. Nova.**, v. 34, n. 2, p. 300-305, 2011.

SILVA, T.M. **Caracterização Fenólica e Capacidade Antioxidante de Vinhos Tintos do Hemisfério Sul**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2004.

SOARES *et al.* Conteúdo fenólico e atividade antioxidante de diferentes cultivares de ipomoea batatas (L.) lam. obtidas por melhoramento genético para produção industrial de etanol. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v.35, n.3, p. 479-488, 2014.

SOARES FILHO, P.R., CASTRO, I., STAHLSCHMIDT, A. Efeito do vinho tinto associado ao exercício físico no sistema cardiovascular de ratos espontaneamente hipertensos. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 96, n. 4, p. 277-283, 2011.

SOARES, S.E.; Phenolic acids as antioxidants. **Rev. Nutr., Campinas**, v.15, n.1, p.71-81, 2002.

SOBEY, C.G. Potassium Channel Function in Vascular Disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**; v.21, p.28-38, 2001.

SOUZA *et al.*, 2007. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. **Quim. Nova.**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SOUZA V. C.; LORENZI H. **Botânica Sistemática- Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Plantarum, Nova Odessa, 2005.

STEIN, J.H. *et al.* Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. **Circulation.**, v.100, n.10, p.1050-5, 1999.

STOCLET J.C. *et al.* Vascular protection by dietary polyphenols. **European Journal of Pharmacology**, v. 500, p. 299-313, 2004.

SUZUKI, H., *et al.* *In vivo* evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. **Hypertension.**, v.25, p.1083–1089, 1995.

SUZUKI, H. *et al.* "Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats," **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 8, p. 4754–4759, 1998.

SWEI, A. *et al.* Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. **Hypertension.**, v. 30, p.1628–1633, 1997.

TENORE, G.C.; BASILE, A.; NOVELLINO, E. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Polyphenolic Fractions from Selected Moroccan Red Wines. **Journal of Food Science**. v. 76, n. 9, 2011.

THORNEOLE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.83, p. 215-242, 2005.

TOMAYKO, E.J. *et al.* Resveratrol Supplementation Reduces Aortic Atherosclerosis and Calcification and Attenuates Loss of Aerobic Capacity in a Mouse Model of Uremia. **J Med Food** v.17, n. 2, p. 278–283, 2014.

VACCARI, N.F.S.; SOCCOL, M.C.H.; IDE, G.M. Revista de Compostos fenólicos em vinhos e seus efeitos antioxidantes na prevenção de doenças. **Ciências Agroveterinárias. Lages**. v.8, n.1, p. 71-83, 2009.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol.**, v.39, p.44-84, 2007.

VAQUERO *et al.* Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. **Food Control**. v.18, l.2, p. 93–101, 2007.

VARGAS *et al.*, 2008. Determinação do Teor de Polifenóis Totais e Atividade Antioxidante em Sucos de Uva Comerciais. **Alim. Nutr.**, v.19, n.1, p. 11-15, 2008.

VASCONCELOS *et al.* Hipótese oxidativa da hipertensão arterial: uma minirrevisão. **Rev Bras Hipertens.**, v.14, n.4, p. 269-274, 2007.

VAZIRI, N.D.; LIANG, K.; DING, Y. Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. **Kidney Int.**, v. 56, n. 4, p. 1492-1498, 1999.

VAZIRI ND. Causal link between oxidative stress, inflammation, and hypertension. **Iran J Kidney Dis.**, v.2, p.1-10, 2008.

VIRDIS, A. *et al.* Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. **J Hypertens.**; v.22, n.3, p.535-42, 2004.

VIVAR-QUINTANA, A. M.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. **Analytica Chimica Acta**, v.458, p.147-155, 2002.

WALSH, JH; BILSBOROUGH, W; MAIORAMA, A *et al.* Exercise training improves conduit vessel function in patients with coronary artery disease. **J Appl Physiol**; v.95:p.20-25, 2003.

WATERHOUSE, A. L. "Determination of total phenolics," in Current Protocols in **Food Analytical Chemistry**, R. E. Wrolstad, Ed., units I, pp. I1.1.1–I1.1.8, John Wiley & Sons, New York, NY, USA, 2003.

WHO- World Health Organization. **Global status report on noncommunicable diseases 2014.** Disponível em: <http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/>. Acesso em: 01 de setembro de 2016 às 20:30.

XANTHOPOULOU *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory activity of red and white wine extracts. **Food Chemistry**. v. 120, p. 665–672, 2010.

YILMAZ, B., USTA, C. Ellagic acid-induced endothelium-dependent and endothelium-independent vasorelaxation in rat thoracic aortic rings and the underlying mechanism. **Phytotherapy Research.**; v.27, n.2, p.285-289, 2013.

ZENEBE, M.V., PECHÁNOVÁ, O., BERNÁTOVÁ, I. Protective effects of red wine polyphenolic compounds on the cardiovascular system. **Exp Clin Cardiol. Autumn**; v.6, n.3, p.153–158, 2001.

ZIMMERMAN, M.C. *et al.* Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. **Circ Res.**, v. 95, p. 210-6, 2004.

ZORZAN, C. **Comparação físico-química e sensorial de vinhos tintos varietais Ancellota e Tannat.** Monografia (Tecnologia em Viticultura e Enologia). 81 f. Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves. Curso Superior de Tecnologia em Viticultura e Enologia, 2006.