

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**NUTRIENTES E SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS EM
VEGETAIS E FRUTOS FREQUENTEMENTE USADOS NA
DIETA: ESTUDO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO
RESVERATROL NAS UVAS**

Tiago Filipe Pinto Jorge

Dissertação

MESTRADO EM QUÍMICA

Química Analítica

2012

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**NUTRIENTES E SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS EM
VEGETAIS E FRUTOS FREQUENTEMENTE USADOS NA
DIETA: ESTUDO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DO
RESVERATROL NAS UVAS**

Tiago Filipe Pinto Jorge

Dissertação orientada pela:

Prof^a Doutora Maria Helena Ferreira da Silva Florêncio

Doutor Paulo Jorge Amorim Madeira

MESTRADO EM QUÍMICA

Química Analítica

2012

O trabalho apresentado nesta dissertação foi realizado no âmbito do 2º Ciclo em Química – Química Analítica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, no grupo de Espectrometria de Massa Ambiental e Biológica do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, sob a orientação da Professora Doutora Maria Helena Florêncio e do Doutor Paulo Madeira.

Agradecimentos

Quero agradecer aos meus orientadores, Prof. Maria Helena Florêncio e Doutor Paulo Madeira pela amizade, orientação e conhecimento transmitido durante a realização do trabalho.

Ao Pedro Falé e ao Nuno Neng por toda a ajuda com o HPLC, ao grupo de Química dos Glúcidos por gentilmente ter emprestado a coluna de HPLC e ter contribuído na preparação das amostras, e ao grupo de Ciência e Tecnologia de Separação pela liofilização das amostras.

Ao grupo de Espectrometria de Massa Ambiental e Biológica por me ter recebido de braços abertos e, em particular, ao Paulo Madeira, ao Pedro Alves, à Rita Gomes e à Kristina Slovaková por todos os momentos divertidos, jantares e saídas para descontrair.

Ao Prof. Ricardo Bettencourt da Silva pelos esclarecimentos e revisão do estudo metrológico incluído neste trabalho.

A todos os meus amigos e amigas porque sem eles a vida não tem graça.

Como os últimos são sempre os primeiros, quero agradecer aos meus pais por sempre terem acreditado em mim, pela frontalidade e força, ao meu irmão pela amizade e companheirismo e ao meu avô por toda a ajuda.

Obrigado!

Tiago Jorge

Resumo

O objectivo deste trabalho centrou-se no estudo com vista à possibilidade de identificação dos locais da uva (pele, polpa e pedúnculos) em que o resveratrol se encontra maioritariamente, através das técnicas analíticas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de ionização por electrospray, LC-ESI-MS, e acoplada à espectrometria de massa tandem, LC-ESI-MSⁿ.

Para tal, diferentes metodologias de preparação e extracção de amostra foram aplicadas e optimizadas. Além disto, foram também testadas diferentes condições cromatográficas para obter uma boa separação dos constituintes da amostra.

Não foi possível identificar o resveratrol mas apenas um dos seus dímeros, para além de vários outros compostos de diferentes subclasses de flavonóides.

Adicionalmente, foram estabelecidas vias de fragmentação para este composto, assim como foram determinados os locais de desprotonação energeticamente mais favoráveis utilizando cálculos semi-empíricos.

Foi realizado um breve estudo metrológico da curva de calibração do resveratrol para estimar o limite de detecção e de quantificação da componente instrumental.

Palavras-chave

Uvas, flavonóides, resveratrol, espectrometria de massa, cálculos semiempíricos.

Abstract

This work has focused on a study to potentially identify resveratrol in the different parts of grapes (skin, flesh and stems) by analytical methods such as liquid chromatography coupled to mass spectrometry electrospray ionization, LC-ESI-MS, and coupled to tandem mass spectrometry, LC-ESI-MSⁿ.

For that purpose, different methods of sample preparation and extraction were applied and optimized. Moreover, different chromatographic conditions were also tested in order to obtain a better separation of the constituents of the sample.

Resveratrol has not been identified, except for one of its dimers, besides several other compounds of flavonoids subclasses that were detected and identified.

Furthermore, fragmentation pathways were proposed for this compound, and the most probable deprotonation sites were accessed using semi-empirical calculations. A simple metrological analysis of the calibration curve for resveratrol was also done to estimate the limit of detection and the limit of quantification for the instrumental component.

Keywords

Grapes, flavonoids, resveratrol, mass spectrometry, semiempirical calculations.

Lista de Abreviaturas

A

ACN – Acetonitrilo

APCI – Ionização química à pressão atmosférica (**A**tmosferic **P**ressure **C**hemical **I**onization)

APPI – Fotoionização à pressão atmosférica (**A**tmosferic **P**ressure **P**hoto**I**onization)

C

CI – Ionização química (**C**hemical **I**onization)

E

EI – Ionização electrónica (**E**lectron **I**onization)

EtOH – Etanol

EtOAc – Acetato de Etilo

F

FAB – Bombardeamento por átomos rápidos (**F**ast **A**tom **B**ombardment)

FTICR – Ressonância ciclométrica de iões com transformada de Fourier (**F**ourier **T**ransform **I**on **C**yclotron **R**esonance)

G

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (**G**as **C**hromatography - **M**ass **S**pectrometry)

H

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography)

I

IPAC – Instituto Português de Acreditação

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

L

LC-ESI-MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de ionização por electrospray (**L**iquid **C**hromatography-**E**lectrospray **I**onization-**M**ass **S**pectrometry)

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

M

MALDI – Ionização por desadsorção laser assistida por matriz (**M**atrix-**A**ssisted **L**aser **D**esorption **I**onization)

MeOH – Metanol

MSⁿ – Espectrometria de massa tandem

R

RDA – Retro Diels-Alder

S

SIMS – Espectrometria de massa de iões secundários (**S**econdary **I**on **M**ass **S**pectrometry)

SPE – Extracção em fase sólida (**S**olid-**P**hase **E**xtraction)

SPME – Microextracção em fase sólida (**S**olid-**P**hase **M**icro**E**xtraction)

T

TOF – Analisador tempo de voo (**T**ime **O**f **F**light analyzer)

U

UV – Ultravioleta

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract.....	V
Lista de Abreviaturas.....	VII
Índice	IX
Índice de Figuras	XIII
Índice de Tabelas.....	XV

Capítulo 1 INTRODUÇÃO

1.1. A Química e os Alimentos – Importância da análise química.....	3
1.2. As Uvas.....	4
1.2.1. Breve História.....	4
1.2.2. Composição nutricional das uvas	5
1.2.3. Compostos fenólicos	6
1.2.4. Resveratrol.....	12
1.3. Espectrometria de Massa (MS).....	15
1.3.1. Breve História.....	15
1.3.2. O espectrómetro de massa	17
1.3.2.1. Princípios básicos do Electrospray (ESI).....	18
1.3.2.2. Analisador de Massa de Armadilha de Iões (Ion Trap-IT)	20
1.3.3. Espectrometria de massa Tandem (MS ⁿ).....	21
1.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	23
1.4.1. O sistema de HPLC e o processo cromatográfico	23
1.4.2. Interface LC-MS.....	26
1.5. Referências.....	26

Capítulo 2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiais	35
2.2. Reagentes	35
2.3. Plano de Amostragem	35
2.4. Preparação e Extracção da Amostra	35
2.4.1. Metodologia A	36
2.4.2. Metodologia B	36
2.4.3. Metodologia C	36
2.4.4. Metodologia D	36
2.5. Extracção em fase sólida (SPE)	37
2.6. Padrão de Resveratrol	37
2.7. Condições de análise LC-MS ⁿ	37
2.8. Cálculos Semiempíricos	38
2.9. Referências.....	41

Capítulo 3 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

3.1. Estudo do comportamento em fase gasosa do resveratrol	45
3.2. Desenvolvimento da metodologia analítica	48
3.3. Identificação dos compostos presentes nas uvas	54
3.3.1. Cacho de uva	55
3.3.2. Pele	58
3.3.3. Polpa	59
3.3.4. Pedúnculos.....	60
3.4. Estudo metrológico da curva de calibração do resveratrol	65
3.5. Referências.....	66

Capítulo 4 CONCLUSÃO..... 69

ANEXOS	73
A. Espectros de massa dos compostos presentes nas uvas.....	A
A.1. Procianidina do tipo C ou T	A
A.2. Procianidina do tipo B.....	B
A.3. (Epi)Catequina	C
A.4. Dímero Procianidina Galhato.....	D
A.5. Kaempferol- <i>O</i> -glucósido.....	E
A.6. Kaempferide- <i>O</i> -glucósido	F
A.7. Kaempferide- <i>O</i> -diglucósido.....	G
A.8. Quercetina- <i>O</i> -ramnose	H
A.9. Quercetina- <i>O</i> -glucósido	I
A.10. Quercetina- <i>O</i> -glucuronide.....	J
A.11. Quercetina- <i>O</i> -diglucósido	K
A.12. Isorhamnetina- <i>O</i> -glucósido	L
A.13. Astilbina	M
A.14. Engeletina.....	N
A.15. ϵ -viniferina	O
B. Definições metrológicas	P
B.1. Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	P
B.2. Homogeneidade de Variâncias	P
C. Estrutura dos compostos identificados	R

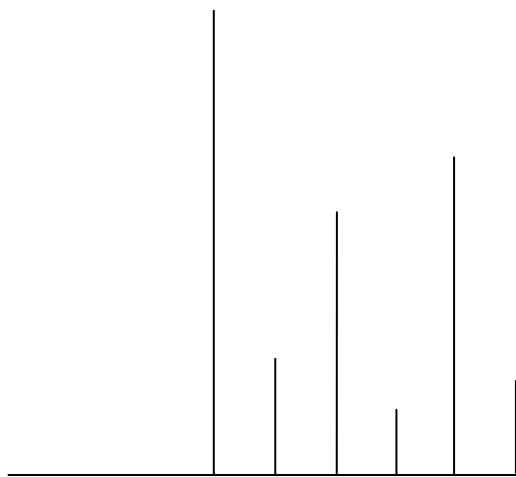
Índice de Figuras

Figura 1.1 – Principais ácidos fenólicos encontrados na uva e no vinho.(8)	7
Figura 1.2 – Flavonóides frequentemente presentes nas uvas e no vinho. (8)	9
Figura 1.3 – Taninos identificados na pele da uva. (8)	10
Figura 1.4 – Compostos encontrados nos diferentes constituintes da uva.(11).....	11
Figura 1.5 – Número anual de publicações sobre o resveratrol desde 1976 até Maio de 2012 (ISI Web of Knowledge).	12
Figura 1.6 – Esquema da síntese do resveratrol.(17).....	13
Figura 1.7 – Compostos análogos do resveratrol e respectivos dímeros, trímeros e tetrâmeros.	13
Figura 1.8 – Esquema dos principais componentes de um espectrómetro de massa.....	17
Figura 1.9 – Ilustração descritiva do processo de electrospray. (9)	18
Figura 1.10 – Formação dos iões em fase gasosa pelo modelo de evaporação iónica (IEM) e pelo modelo de carga residual (CRM). (9)	19
Figura 1.11 – Ilustração da constituição de um analisador de armadilha de iões.(40)...	20
Figura 1.12 - Esquema do princípio do MS/MS. (41).....	22
Figura 1.13 – Sistema de HPLC. (50)	24
Figura 1.14 – Esquema ilustrativo do processo cromatográfico. (50).....	25
Figura 2.1 – Fluxograma das metodologias utilizadas.	39
Figura 3.1 – Representação das três estruturas desprotonadas do resveratrol.....	45
Figura 3.2 – Espectros de MS ² , NCE = 40 % (I) e de MS ³ , m/z 185, NCE = 34 % (II) do resveratrol.	46
Figura 3.3 – Vias de fragmentação propostas para a molécula de resveratrol.	46
Figura 3.4 – Via de fragmentação da molécula de resveratrol com os iões produto mais estáveis.	47
Figura 3.5 – Eficiências de diferentes solventes utilizados na extracção de resveratrol e derivados da pele de uva. (4, 6).....	48
Figura 3.6 – Cromatogramas (DAD) obtidos para a Metodologia A: A - Eluição por gradiente; B - Eluição por gradiente para amostra diluída; C - Eluição por gradiente do	

padrão de resveratrol; D - Eluição por gradiente de amostra fortificada com resveratrol; E - Eluição isocrática; F - Eluição por gradiente de amostra extraída com EtOH.	50
Figura 3.7 – Cromatograma (DAD) da amostra de sumo preparada pela Metodologia A.	50
Figura 3.8 – Cromatogramas obtidos para amostras liofilizadas: G - Eluição por gradiente (30 minutos); H - Eluição por gradiente (60 minutos); I - Eluição por gradiente com composição diferente (60 minutos); J - Eluição por gradiente (43 minutos).	51
Figura 3.9 – Cromatogramas obtidos utilizando diferentes fluxos de injeção: K – 0,3 mL min ⁻¹ ; L – 0,2 mL min ⁻¹ , M – 0,3 mL min ⁻¹ SPE H ₂ O + HCOOH e N – 0,3 mL min ⁻¹ SPE MeOH.	52
Figura 3.10 – Cromatograma obtido para um maior tempo de extracção de amostra....	53
Figura 3.11 – Nomenclatura utilizada para os iões produto de flavonóides- <i>O</i> -glucósidos.	54
Figura 3.12 – Cromatogramas da amostra de cacho de uva: (i) Fracção de EtOAc e (ii) Fracção de MeOH.....	55
Figura 3.13 – Espectros de MS e MS ² da ϵ -viniferina obtidos e comparação com a literatura. (11).....	57
Figura 3.14 – Cromatogramas da amostra de pele de uva: (i) Fracção de EtOAc e (ii) Fracção de MeOH.....	58
Figura 3.15 – Cromatogramas da amostra de polpa de uva: (i) Fracção de EtOAc e (ii) Fracção de MeOH.....	59
Figura 3.16 – Cromatogramas da amostra de pedúnculos de uva: (i) Fracção de H ₂ O + HOOH e (ii) Fracção de EtOAc.	60
Figura 3.17 – Curva de Calibração do Resveratrol.	65

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Composição nutricional de 100 g de uvas (7)	6
Tabela 1.2 – Vantagens do analisador do tipo armadilha de iões. (40).....	21
Tabela 2.1 – Programa de HPLC utilizado.....	37
Tabela 3.1 – Valores de $\Delta_f H [A^-]$ para cada uma das estruturas.....	45
Tabela 3.2 – Valores de $\Delta_f H [A^-]$ das estruturas formadas.....	47
Tabela 3.3 – Compostos identificados nos diferentes constituintes da uva: (++) dois picos identificados.....	63
Tabela 3.4 – Valores de LD e LQ calculados.....	66



Capítulo 1
INTRODUÇÃO

1.1. A Química e os Alimentos – Importância da análise química.

“There is in this city [London] a certain fraternity of chemical operators who work underground in holes, caverns and dark retirements...They can squeeze Bordeaux from the sloe and draw champagne from an Apple.”

The Tatler,1710 (1)

Durante os séculos XVIII e XIX, o interesse em compreender a natureza química dos alimentos começou a surgir na comunidade científica. Em particular, os químicos começaram a perceber que este conhecimento era essencial para promover a saúde e o bem-estar. Deste conhecimento, iniciaram a descrição dos primeiros nutrientes, nomeadamente os hidratos de carbono, as gorduras e as proteínas, de acordo com a sua estrutura e propriedades físico-químicas. Estes avanços foram bastante importantes para as áreas da medicina e da fisiologia, no entanto, eram necessárias técnicas analíticas mais sofisticadas.

Com o desenvolvimento das técnicas instrumentais de análise durante o século XX, nomeadamente a espectrometria de massa, a permitirem maior sensibilidade e selectividade analítica, os componentes de muitos alimentos passaram a ser detectados e quantificados em concentrações muito baixas. Actualmente, a nível global, a identificação e quantificação de inúmeras substâncias indesejáveis, tanto naturais como artificiais, presentes nos alimentos, são alvo de estudos sistemáticos que permitem, não só, combater possíveis adulterações, como também assegurar a qualidade e a segurança alimentar.(1)

Existem no mercado variadíssimos suplementos alimentares, que permitem melhorar ou intensificar a capacidade de trabalho e suprir deficiências nutricionais, optimizando a saúde em geral, podendo também, nalguns casos, ser usados com fins terapêuticos. No entanto, muitas destas substâncias, encontram-se também em alimentos correntes, como vegetais e frutos. Uma destas substâncias é o resveratrol, um polifenol existente nas uvas e que tem sido nos últimos anos intensivamente estudado em todas as vertentes científicas, verificando-se que possui entre outras, propriedades anti-inflamatórias e anti-cancerígenas. Assim, o grande interesse em investigar a sua disponibilidade, procurando identificar os locais em que se encontra maioritariamente no seu meio natural, nomeadamente nas diferentes partes da uva (pele, polpa e pedúnculos) através das técnicas analíticas de cromatografia líquida acoplada

à espectrometria de massa de ionização por electrospray, LC-ESI-MS, e acoplada à espectrometria de massa tandem, LC-ESI-MSⁿ constitui o objectivo deste trabalho

1.2. As Uvas

1.2.1. Breve História

Evidências científicas demonstram que a história das uvas é bastante longa. Tendo crescido em ambiente selvagem, pelo menos desde tempos pré-históricos, são o mais antigo fruto cultivado, aproximadamente desde 5000 a.C. na Ásia. A primeira referência de produção de vinho foi encontrada em potes de cerâmica na Geórgia onde, em tempos, existiu uma aldeia neolítica que remonta a aproximadamente 6000 a.C. Várias outras referências foram encontradas no Irão, datando de 5000-5500 a.C. e também em túmulos do antigo Egipto.

Nas épocas Grega e Romana, as uvas eram amplamente conhecidas e usadas para fazer vinho. Já eram conhecidas mais de 90 variedades e cada civilização já tinha o seu representante mitológico do vinho, Baco e Dionísio para a civilização romana e grega respectivamente. Foram os gregos antigos a primeira civilização a fazer uma série de práticas de viticultura e vinificação. Sem refrigeração, fermentação descontrolada e falta de saneamento adequado, o sabor dos vinhos gregos não agradava a todos. Por causa da deterioração, o espesso, escuro e viscoso vinho grego era geralmente diluído com água e “sabor” a ervas, mel, cevada branca e até mesmo queijo de leite de cabra, o que não agradava a muitos. Os romanos, por sua vez, desenvolveram a refinação da arte do cultivo de uvas, o seu processamento e introduziram o uso de barris e garrafas devido à forte competição na produção de vinho entre diferentes províncias. Além disso, verificaram que factores externos como o clima, o solo e também o estilo da poda afectavam o sabor da uva.

Na época medieval, com as técnicas de vinificação já implementadas, o consumo de vinho era apreciado essencialmente pelas classes mais ricas, a realeza, a nobreza, os sacerdotes e os comerciantes, enquanto as classes camponesas bebiam principalmente cerveja. Os principais produtores de vinho eram sacerdotes, especialmente os beneditinos da França e da Alemanha. O vinho branco e rosé estavam generalizados, mas ambos eram geralmente bebidos jovens, aromatizados com especiarias ou mel e diluídos.

Durante a descoberta das Américas, os colonos espanhóis trouxeram as uvas para a América e no início do século XVII plantaram-nas na América do Norte. Devido ao habitat favorável (clima perfeito e ausência de predadores) existente no estado da Califórnia, as uvas espalharam-se rapidamente por esta zona e, como resultado, este estado produz actualmente quase 90% do total da colheita dos Estados Unidos.

Por volta de 1860, um pulgão conhecido como “*phylloxera vastatrix*” infestou algumas quintas por toda a Europa, incluindo a região do Douro em Portugal. Um dos países mais afectado foi a França, uma vez que quase todas as variedades de uva utilizadas foram afectadas. Como consequência, alguns botânicos experimentaram cruzar uvas francesas, não afectadas, com uva americana e, com êxito, tornaram o novo híbrido resistente ao insecto, preservando a produção de vinho em França. (2, 3)

Actualmente, os maiores produtores de uvas são a Itália, a França, a Espanha, os EUA, o México e o Chile. Em todo o mundo, em cerca de 77699 Km² de terras são plantadas videiras, resultando na produção anual de cerca de 68 triliões de quilogramas de uvas. (4)

1.2.2. Composição nutricional das uvas

As uvas desenvolvem-se na videira, uma árvore de escalada que exige um forte apoio para o seu crescimento, atingindo entre 6 a 300 cachos. Podem ter tonalidades carmesim, preta, azul-escuro, amarelo pálido, roxo, verde ou rosa.(5) São bastante nutritivas estimulando benefícios ao nível da saúde e do bem-estar. Cerca de 80 % do seu peso é constituído por água, contêm açúcar natural e fibra dietética que desempenha um papel importante na regulação da função intestinal e na redução do colesterol. São também ricas em minerais como o Ferro, componente essencial da hemoglobina do sangue que transporta o oxigénio; o Cálcio, essencial para a formação de ossos e dentes; o Magnésio, importante para a transmissão dos impulsos nervosos e o Potássio, que regula os batimentos cardíacos e mantém a tensão arterial estável. As vitaminas também estão presentes nas uvas, sendo maioritária a vitamina C que previne diversas doenças. As vitaminas do Complexo B, apesar de em menor quantidade, são necessárias ao bom funcionamento de todas as células. (6) Na Tabela 1.1 encontram-se os valores dos diferentes nutrientes por 100 g de uvas.

Tabela 1.1 – Composição nutricional de 100 g de uvas (7)

Valor nutricional / 100 g			
Proteínas	0,66 g	Manganês	0,058 mg
Lípidos	0,58 g	Selênio	0,2 mg
Hidratos de carbono	17,77 g	Vitamina C	10,8 mg
Energia	71 kcal	Tiamina (B1)	0,092 mg
Água	80,56 g	Riboflavina (B2)	0,057 mg
Cálcio	11 mg	Niacina (B3)	0,3 mg
Ferro	0,26 mg	Ácido pantoténico (B5)	0,024 mg
Magnésio	6 mg	Piridoxina (B6)	0,11 mg
Fósforo	13 mg	Ácidos gordos saturados	0,189 mg
Potássio	185 mg	Ácidos gordos monoinsaturados	0,023 mg
Sódio	2 mg	Ácidos gordos polinsaturados	0,169 mg
Zinco	0,05 mg	Colesterol	0 mg
Cobre	0,09 mg	Fitoesteróis	4 mg

1.2.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos constituem outra classe de nutrientes presentes nas uvas e no vinho, desempenhando um papel bastante importante nas características sensoriais destes, uma vez que são responsáveis por algumas propriedades organolépticas, como o aroma, a cor, o sabor, a amargura e a adstringência.(8) Contudo, os grandes responsáveis pelo aroma das uvas, são compostos voláteis, como monoterpenos, C₁₃-norisoprenóides, compostos benzenóides e 3-alkil-2-metoxipirazinas que foram identificados e quantificados por técnicas de extração em fase sólida (SPE e SPME) combinadas com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).(9)

A enorme diversidade de compostos fenólicos encontrados nas uvas deve-se, não só à grande variedade de espécies deste fruto, como também à existência de estruturas conjugadas deste tipo de compostos, como sejam os compostos glucosilados. Dentro da classe dos compostos fenólicos, podem-se agrupar subclasses de compostos como os ácidos fenólicos, flavonóides, taninos e proantocianidinas, estilbenos, coumarinas, entre outros.

Os ácidos fenólicos são frequentemente classificados em ácidos hidroxibenzóicos e em ácidos cinâmicos. No caso dos ácidos hidroxibenzóicos, os mais abundantemente encontrados nas uvas e no vinho são os ácidos *para*-hidroxibenzóico, protocatéquico,

vanílico, gálico e siríngico. Os ácidos caftárico, *p*-coutárico e fertárico e estéres derivados, constituem os ácidos cinâmicos mais representativos nas uvas e no vinho. As estruturas de alguns destes compostos são apresentadas na Figura 1.1.

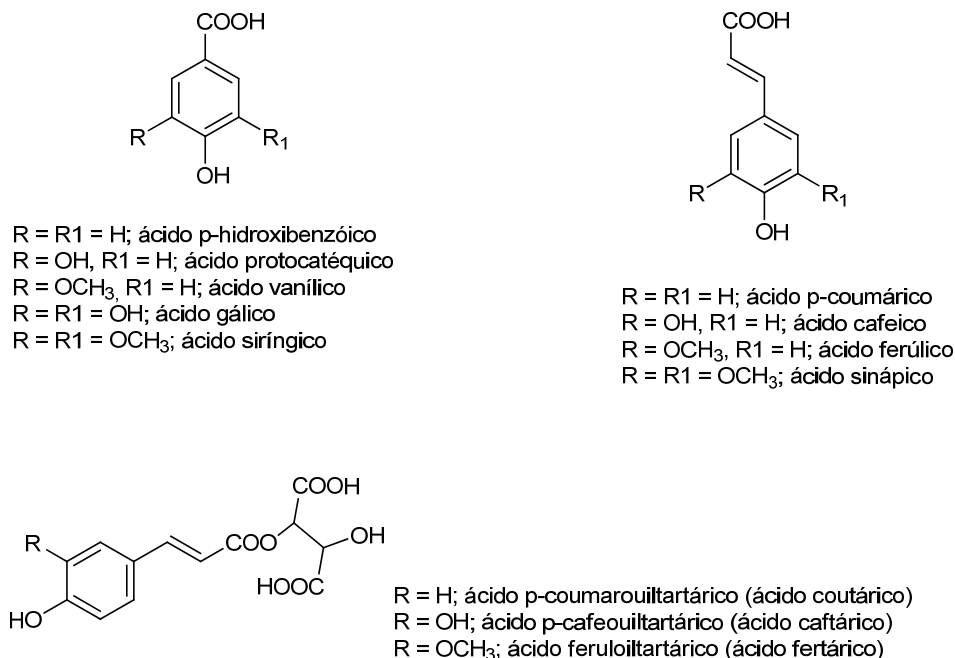


Figura 1.1 – Principais ácidos fenólicos encontrados na uva e no vinho.(8)

A dupla ligação na cadeia lateral destes compostos, promove a existência de duas formas isoméricas *cis* e *trans*. Nas uvas, os ácidos caftárico e fertárico estão presentes maioritariamente na forma *trans* e encontram-se sobretudo na polpa, enquanto o ácido coutárico, foi apenas encontrado numa pequena fracção *cis* na pele das uvas. (8)

Estima-se que cerca de 2 % de todo o carbono fotossintetizado pelas plantas, é convertido em flavonóides ou seus análogos, atingindo uma produção anual de 1×10^9 toneladas. Salvo algumas excepções, apenas as plantas possuem a capacidade de biossintetizar flavonóides, que se acumulam em toda a planta. Estes, além de abrangerem os pigmentos responsáveis pela cor de diferentes plantas, flores e frutos, também actuam como inibidores enzimáticos na defesa contra factores externos (radiação ultravioleta e predadores) e como agentes quelantes de metais nocivos para as plantas. Devido a uma grande tendência de plantas taxonomicamente relacionadas produzirem tipos semelhantes de flavonóides, estes compostos são usualmente utilizados como marcadores quimiotaxonómicos. As acções fisiológicas e efeitos benéficos que os flavonóides exercem na saúde humana, é uma área bastante estudada e a melhor propriedade que quase todos os grupos de flavonóides exibem é o

seu poder antioxidante. Além desta, também a actividade antiviral, antimicrobiana, antialérgica, entre outras, têm sido documentadas. (10)

Os flavonóides subdividem-se em diferentes grupos: flavonas, flavonóis, flavanonas, flavononóis, flavanos, flavanóis, antocianidinas e antocianinas, chalconas e dihidrochalconas. Algumas destas estruturas são apresentadas na Figura 1.2.

A existência de formas conjugadas deste tipo de compostos e a ocorrência muitas vezes de reacções de condensação explicam a sua diversidade e complexidade química. Existindo na forma livre ou conjugada, os flavonóides estão glucosilados num dos grupos hidroxilo (*O*-glucósidos) ou directamente no esqueleto do flavonóide através de uma ligação C-C (*C*-glucósidos) sendo os glucósidos mais vulgarmente ligados, a glucose, a galactose, a ramnose, a xilose ou a arabinose para os *O*-glucósidos e a glucose apenas para os *C*-glucósidos. (8)

Nos últimos anos têm sido identificados diferentes tipos de antocianinas e seus derivados em diferentes tipos de uva e vinhos. Muitas vezes, este tipo de compostos é designado por pigmentos antociânicos, uma vez que são responsáveis pela cor destes e de outros alimentos, como por exemplo, os morangos ou as amoras. Esta característica é determinada pela estrutura química, que é influenciada pelo pH, pelo grau de hidroxilação, metilação e/ou glucosilação. Normalmente só se encontram na pele das uvas e, durante o envelhecimento da planta, tendem a acumular-se nas folhas. A composição em antocianinas das uvas é afectada por diversos factores, entre os quais, o tipo e a origem da videira, o grau de maturidade e as condições climatéricas, pelo que tem sido proposto a utilização do perfil de antocianinas das uvas como parâmetro quimiotaxonómico. Têm sido realizados diversos estudos, publicados na literatura, com o objectivo de perceber a relação entre a composição da uva e a cor do vinho. (8)

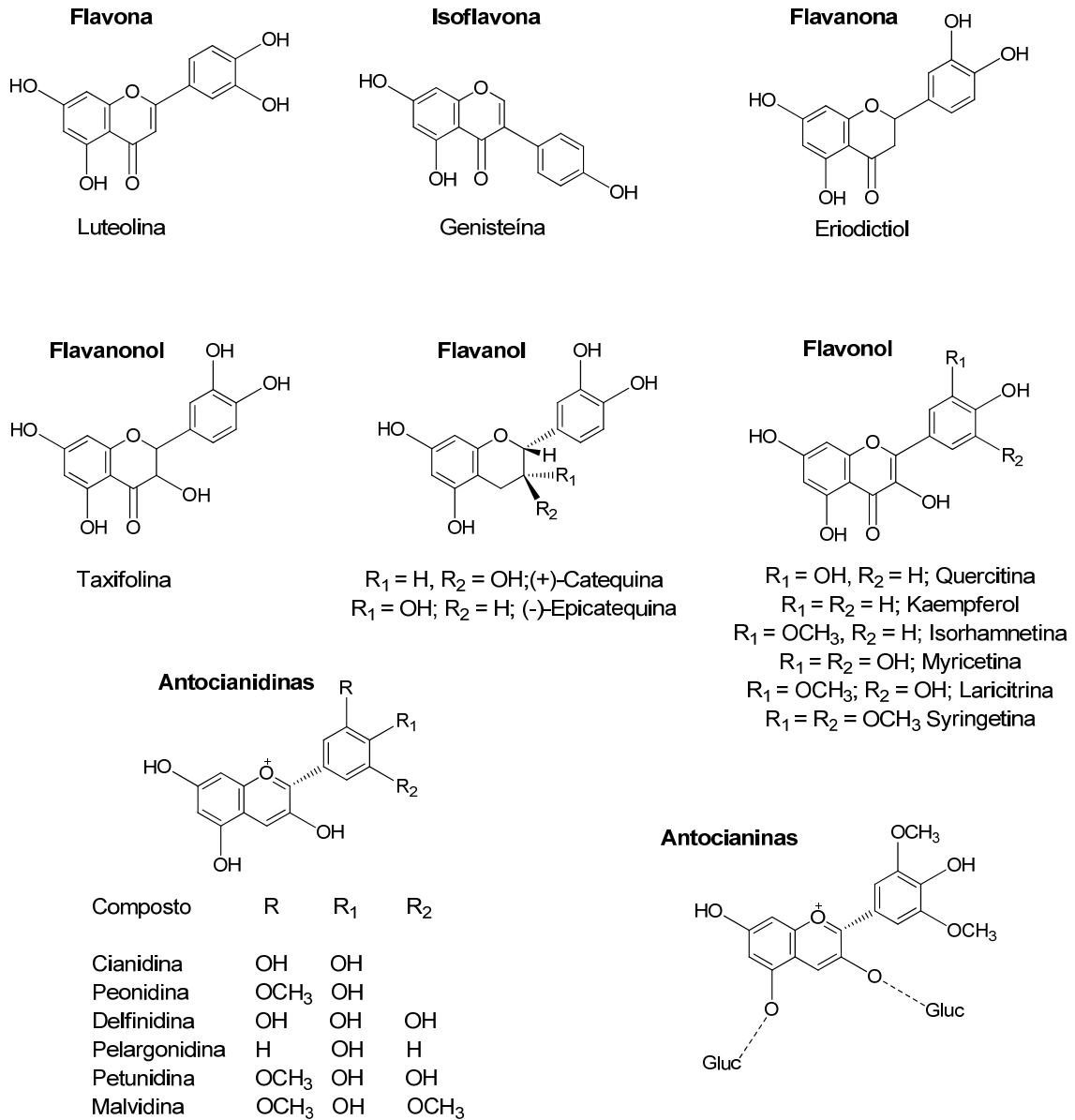


Figura 1.2 – Flavonóides frequentemente presentes nas uvas e no vinho. (8)

Os taninos constituem outra classe de compostos presentes nas uvas e são maioritariamente responsáveis pela adstringência do vinho. Normalmente estão agrupados em dois grupos: os taninos hidrolizáveis e os taninos não hidrolizáveis ou condensados, que são predominantes nas uvas e vinhos. O único tanino hidrolizável identificado no vinho, foi o ácido elágico, como consequência do envelhecimento em barris. Os taninos condensados mais abundantes, tanto nas uvas, como em vinhos, são as proantocianidinas, maioritariamente as procianidinas (ex: procianidinas do Tipo B).

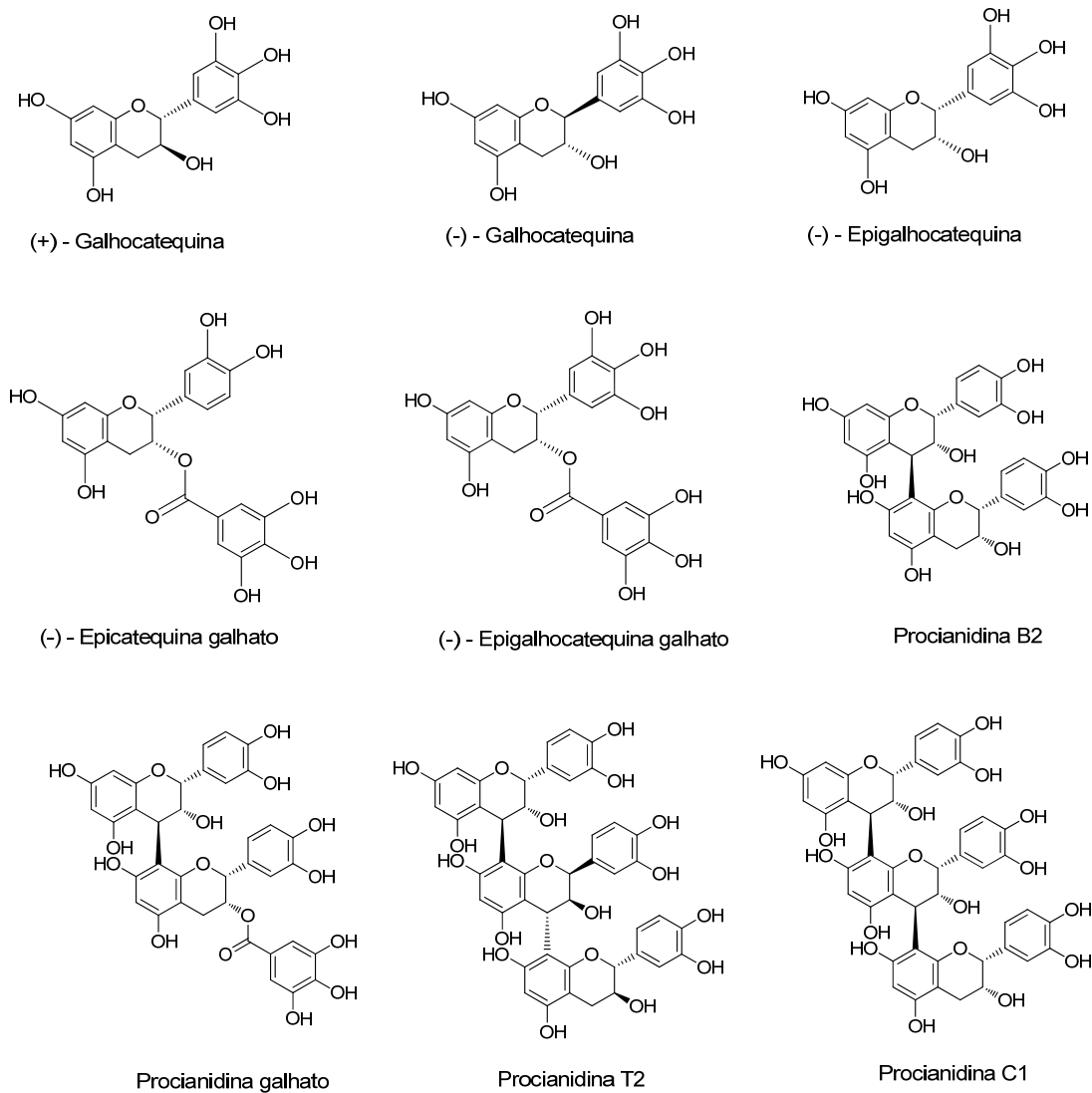


Figura 1.3 – Taninos identificados na pele da uva. (8)

A quantidade, a estrutura e o grau de polimerização das proantocianidinas diferem consoante a sua localização na uva. A pele contém a maior quantidade de taninos e estes diferem das outras partes da uva pelo seu elevado grau de polimerização. A (+) - catequina, a (-) - epicatequina, e a (-) - epigallocatequina (Figuras 1.2 e 1.3), são os principais taninos que constituem a pele da uva, enquanto a (+) - gallocatequina e a (-) - epigallocatequina galhato se apresentam em menor quantidade. As grainhas são ricas também em taninos compostos por monómeros de (+) - catequina, (-) - epicatequina, e (-) - epicatequina galhato, mas o grau de polimerização é mais baixo e tendem a apresentar-se na forma monomérica. O pedúnculo é constituído maioritariamente por taninos (cerca de 80%), também com um grau de polimerização bastante baixo.

A identificação destes compostos é bastante importante em Enologia, uma vez que são responsáveis pelas características sensoriais do vinho e desempenham um papel importante no seu envelhecimento, através da facilidade em sofrerem reacções de oxidação, condensação e polimerização. (8, 11, 12)

A ocorrência destes compostos em diferentes partes da uva, tem sido também estudada e referida na literatura, na tentativa de compreender quais os compostos que são extraídos em maior concentração para o vinho, e qual a parte da uva que mais contribui para essa extracção. Na pele da uva, os compostos fenólicos são classificados em fenóis da parede celular, ligados a polissacáridos por interacções hidrofóbicas e pontes de hidrogénio, e em fenóis “livres” ou ausentes da parede celular, que englobam aqueles que estão restritos nos vacúolos e no núcleo da célula vegetal. (11) A Figura 1.4, ilustra os diferentes compostos encontrados nos diferentes constituintes da uva.

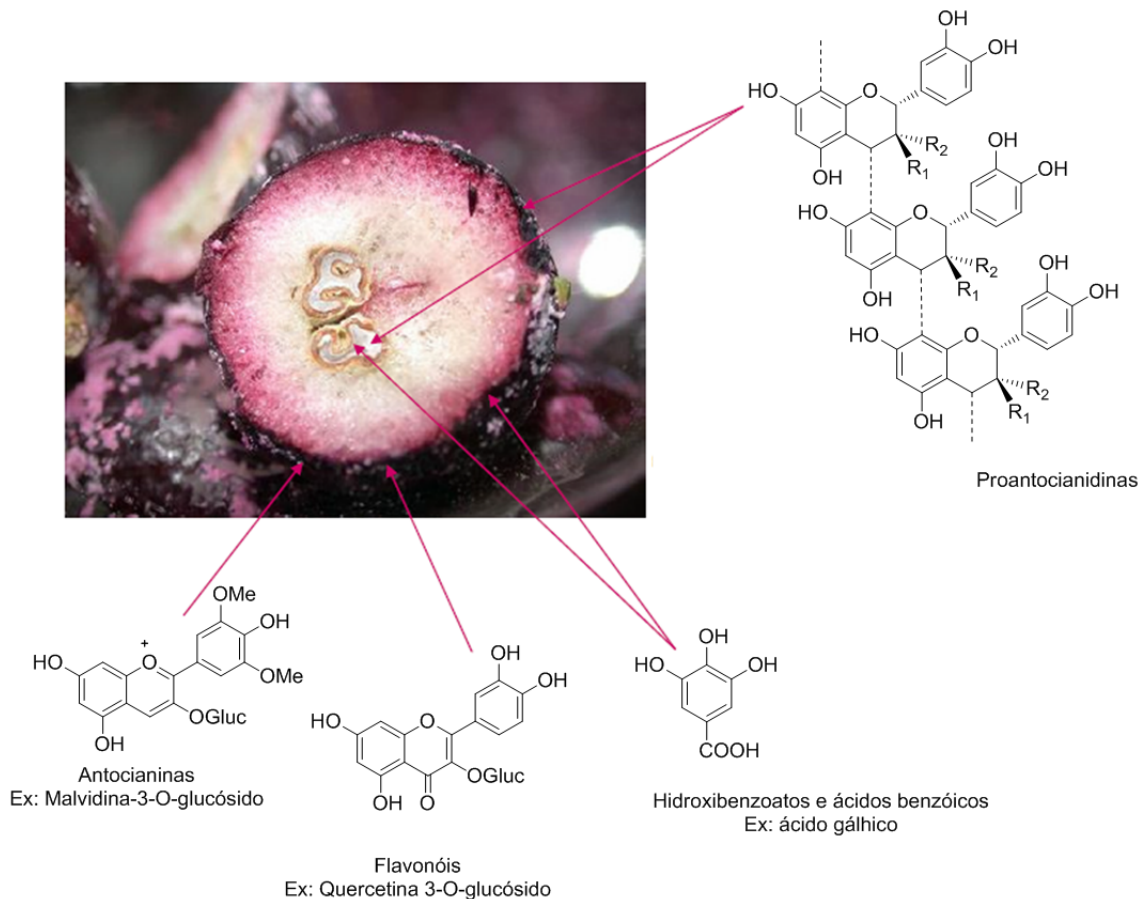


Figura 1.4 – Compostos encontrados nos diferentes constituintes da uva.(11)

Nos últimos anos, os estilbenos (1,2-diariletenos) têm recebido especial atenção, devido à presença do resveratrol, um antioxidante com propriedades bastante promissoras. A ocorrência dos estilbenos nos tecidos vegetais está vulgarmente

associada à resistência da planta a ataques de fungos ou ao stress abiótico como a radiação UV. Como consequência, este tipo de compostos são normalmente denominados de fitoalexinas, ou seja, toxinas de baixa massa molecular inibidoras de microorganismos, que tendem a acumular-se nos tecidos das plantas. (13)

1.2.4. Resveratrol

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) foi isolado pela primeira vez em 1940, das raízes de uma planta bulbosa, denominada heléboro-branco (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) e em 1963, a partir das raízes de uma planta utilizada na medicina tradicional chinesa e japonesa (*Polygonum cuspidatum*). Em 1976, Langcake and Pryce (14) detectaram o resveratrol em videiras mas, até à década de 90, o interesse da comunidade científica pelas potencialidades deste composto, não era significativo. Só em 1992, a detecção deste composto no vinho tinto por Siemaan and Creasy (15) viria a despertar os cientistas, uma vez que poderia explicar o “Paradoxo Francês”, termo utilizado para explicar a reduzida incidência de doenças cardíacas na população francesa, conhecida por consumir grandes quantidades de gordura saturada e ao mesmo tempo vinho tinto. Desde então, o número de publicações na literatura sobre o resveratrol, sua identificação e posterior quantificação e efeitos terapêuticos, tem aumentado. (16-18)

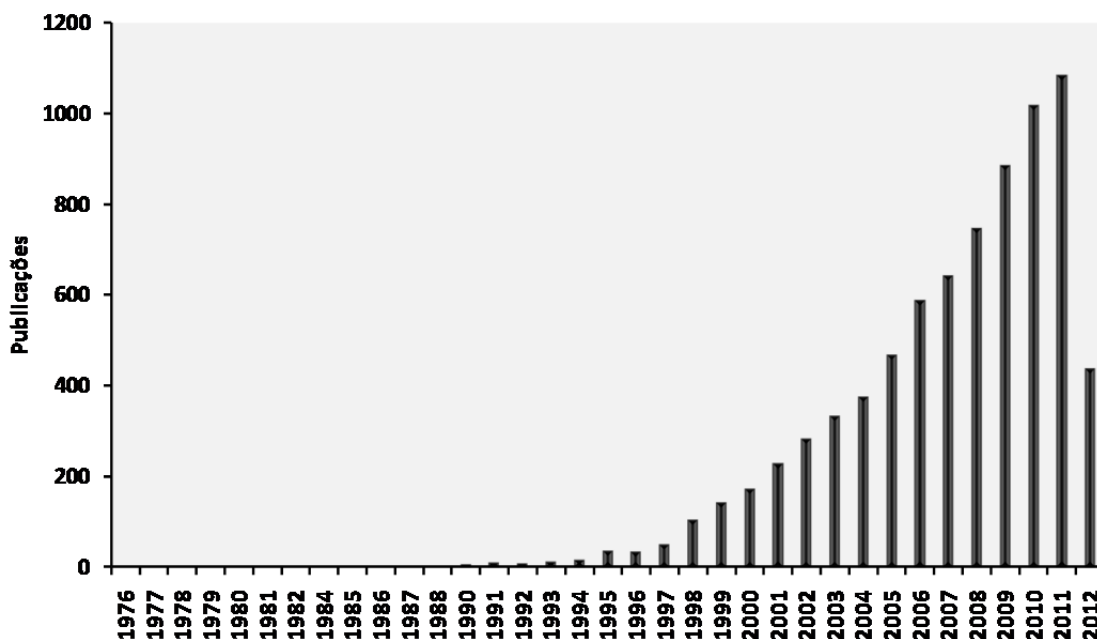


Figura 1.5 – Número anual de publicações sobre o resveratrol desde 1976 até Maio de 2012 (ISI Web of Knowledge).

A presença do resveratrol tem sido detectada nas uvas, no vinho e em outros alimentos como amendoins, pistáchios, morangos, groselhas e mirtilos. Nas uvas, é sintetizado, na sua maioria na pele e o seu máximo ocorre antes de as uvas atingirem a maturidade.(19) A biosíntese é catalisada pelo enzima estilbeno sintase e consiste na condensação descarboxilativa de um resíduo da molécula de p-coumaroil-CoA com três unidades da molécula malonil-CoA. (17)

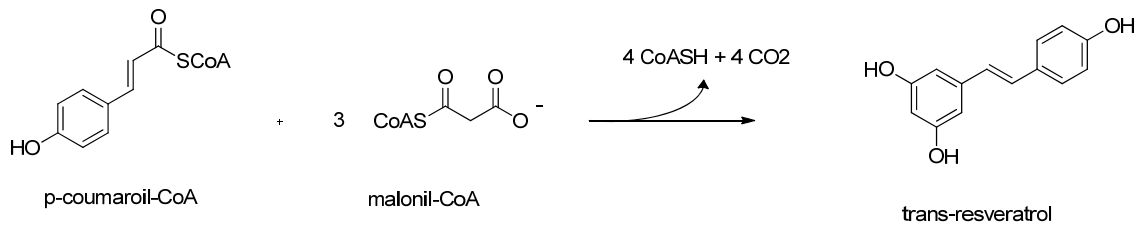


Figura 1.6 – Esquema da síntese do resveratrol.(17)

Apesar da maioria das publicações na literatura se focar essencialmente na extração, identificação e quantificação do resveratrol em uvas e vinhos (13, 19-22), recentemente têm sido identificados derivados deste composto, como o pteroesstilbeno, em que os grupos hidroxilo estão metilados, o piceatannol com mais um grupo hidroxilo e ainda dímeros, trímeros e tetrameros do resveratrol. As estruturas destes compostos estão representadas na Figura 1.7.(13, 23, 24)

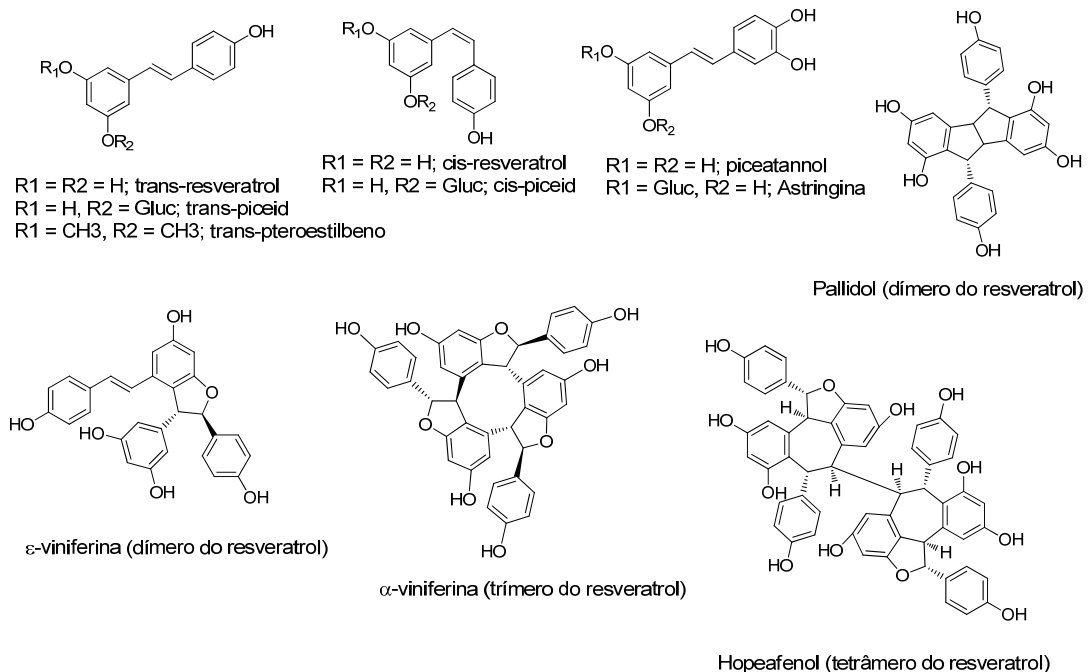


Figura 1.7 – Compostos análogos do resveratrol e respectivos dímeros, trímeros e tetrameros.

Os efeitos terapêuticos do resveratrol têm sido extensivamente estudados e referidos na literatura, entre os quais se destacam, a sua actividade antioxidante, anti-cancerígena, anti-inflamatória e fitoestrogénica e a sua importância na inibição da peroxidação lípídica ou modelação do metabolismo lipídico.(16, 17, 25, 26)

1.3. Espectrometria de Massa (MS)

1.3.1. Breve História

“Scientific breakthroughs made possible by MS have included the discovery of isotopes, the exact determination of atomic weights, the characterization of new elements, quantitative gas analysis, stable isotope labeling, fast identification of trace pollutants and drugs, and the characterization of molecular structure.”(27)

Fred W. McLafferty, Professor da Universidade de Cornell

A espectrometria de massa tornou-se uma ferramenta analítica indispensável em muitas áreas de investigação, desde a sua criação há mais de 100 anos. A história da espectrometria de massa começou quando em 1897, estudos realizados por Sir J.J. Thomson, do laboratório de Cavendish da Universidade de Cambridge, levaram à construção do primeiro espectrómetro de massa (espectrógrafo de parábola), na primeira metade do século XX. Em 1906, o mérito das suas investigações sobre a condução eléctrica em gases, foi laureado com o Prémio Nobel da Física. A continuidade das suas investigações, ficou a cargo de Francis W. Aston, seu orientando, que desenhou um espectrómetro de massa, onde os iões eram dispersados por massa e focados pela sua velocidade, melhorando bastante o poder de resolução do aparelho. Em 1922, os estudos com isótopos realizados por Aston foram reconhecidos pela atribuição do Prémio Nobel da Química. (27)

A introdução da ionização electrónica (EI) por Arthur Jeffrey Dempster, nos anos 20, e o seu desenvolvimento por Alfred O. C. Nier, nos anos 40, constituiu um grande passo no desenvolvimento dos espectrómetros de massa e ainda hoje esta técnica é utilizada largamente e essencialmente acoplada à cromatografia gasosa. Apesar deste intenso desenvolvimento, a análise de moléculas de maior peso molecular não era possível, tendo o primeiro avanço significativo surgido em 1966, pelas mãos de M.S.Munson e F.H.Field, que desenvolveram a técnica de ionização química (CI), permitindo a ionização de biomoléculas termolábeis.(28)

Na década de 80, de modo a resolver o problema da volatilização/ionização de moléculas de maior dimensão foram desenvolvidas as técnicas de ionização suave. Uma destas técnicas, foi a ionização por bombardeamento por átomos rápidos (FAB ou SIMS), desenvolvida por M. Barber, que, apesar do grande impacto, não resolveu

totalmente o problema da impossibilidade de análise de macromoléculas. Este problema só foi resolvido quando, em 1987, M. Karas e F. Hillenkamp desenvolveram uma técnica com recurso à radiação laser combinada com uma matriz (composto orgânico) que absorvia a energia em excesso, a técnica por ionização por desadsorção laser assistida por matriz (MALDI). A utilização de outro tipo laser e uma composição de matriz diferente, foi proposta por Koichi Tanaka. (29)

A técnica de ionização por electrospray veio também solucionar o problema, quando, em 1988, John B. Fenn apresentou um trabalho de identificação de polipéptidos e proteínas com massa molecular de 40 kDa. (30) Além disto, Fenn também demonstrou, que era possível obter uma precisão na medição do peso molecular aplicando um método que contabilizava a média dos sinais obtidos para os múltiplos iões formados no processo de electrospray. Com este trabalho, John B.Fenn foi laureado juntamente com Koichi Tanaka e Kurt Wüthrich com o Prémio Nobel da Química em 2002.

“Mass spectrometry is the art of measuring atoms and molecules to determine their molecular weight. Such mass or weight information is sometimes sufficient, frequently necessary, and always useful in determining the identity of a species. To practice this art one puts charge on the molecules of interest, i.e., the analyte, then measures how the trajectories of the resulting ions respond in vacuum to various combinations of electric and magnetic fields.” (27)

John B. Fenn

Por fim, nas duas últimas décadas, têm-se assistido a novos desenvolvimentos em espectrometria de massa, como por exemplo, a introdução de dois novos tipos de analisadores, a orbitrap em 2000 por Alexander Makarov (31) e a *trap* linear por James W.Hager em 2002 (32). Recentemente, foi também desenvolvida uma “nova” fonte de ionização electrónica que permite o acoplamento à cromatografia líquida (33)

1.3.2. O espectrómetro de massa

Um espectrómetro de massa moderno típico é composto por cinco componentes: o sistema de introdução da amostra, a fonte de ionização, o analisador de massa, o detector e o sistema de aquisição de dados.



Figura 1.8 – Esquema dos principais componentes de um espectrómetro de massa.

Independentemente do tipo de ionização e do analisador utilizado, pode dizer-se de um modo resumido que a amostra é introduzida na fonte de ionização, onde o analito é transferido para a fase gasosa e ionizado. De seguida, os iões são direccionados para o analisador onde são separados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z). No detector, vulgarmente um detector do tipo multiplicador de electrões (excepto para os analisadores FTICR e orbitrap, em que estes também funcionam como detector), a corrente iónica é multiplicada por aceleração de electrões na superfície de um eléctrodo, originando electrões secundários. Deste modo, é transmitido um sinal eléctrico, que chega ao sistema de aquisição de dados que, por sua vez, o exhibe na forma de um espectro de massa. Todo o processo, desde a fonte de ionização até ao detector, é realizado sob alto vácuo de modo a evitar colisões entre os iões e o gás de fundo durante o percurso e evitar a ocorrência de reacções ião-molécula.

A análise por espectrometria de massa de uma amostra, pode ser realizada através de uma diversidade de técnicas de ionização e de analisadores de massa, sendo a escolha correcta feita de acordo com as propriedades físico-químicas do analito, como a volatilidade e a estabilidade térmica. (34) Dentro das técnicas de ionização, as mais comuns são a ionização electrónica (EI), a ionização química (CI), a ionização por desadsorção laser assistida por matriz (MALDI) e a ionização por electrospray (ESI) enquanto os analisadores mais vulgares são o de sector, o quadrupólo, a armadilha de

iões (*ion trap*), o de tempo de voo (TOF) e ainda o de ressonância ciclotrónica de iões com transformada de Fourier (FTICR). Neste trabalho, utilizou-se um espectrómetro de massa equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) e com um analisador de armadilha de iões (*ion trap*).

Como o processo de ESI ocorre à pressão atmosférica e o espectrómetro de massa trabalha sob vácuo (Figura 8), é necessário transferir os iões de uma região de maior pressão para uma região de mais baixa pressão e, para isso, utilizam-se bombas de vácuo (bombas rotatórias e/ou turbomoleculares). Adicionalmente, um gás de secagem, vulgarmente azoto, é utilizado para ajudar na dessolvatação das gotículas e impedir a formação de aglomerados ou “clusters” ao longo do capilar. Para melhorar a eficiência de transmissão de iões, são também utilizados multipólos de rádio-frequências (quadrupólos, hexapólos ou octapólos) colocados entre a fonte de ESI e o analisador de massa. (35, 36)

1.3.2.1. Princípios básicos do Electrospray (ESI)

O princípio do electrospray, foi descrito pela primeira vez em 1968, quando Malcom Dole e os seus colaboradores, baseados em experiências realizadas pelo físico John Zeleny em 1917, consideraram a possibilidade de gerar iões em fase gasosa, provenientes de macromoléculas, por pulverização de uma solução contida na ponta de um capilar carregado electricamente. Foi a partir destes estudos que, 20 anos mais tarde, John Fenn viria a aplicar este princípio à espectrometria de massa. (29) Na Figura 1.9, encontra-se esquematizado o processo de electrospray.

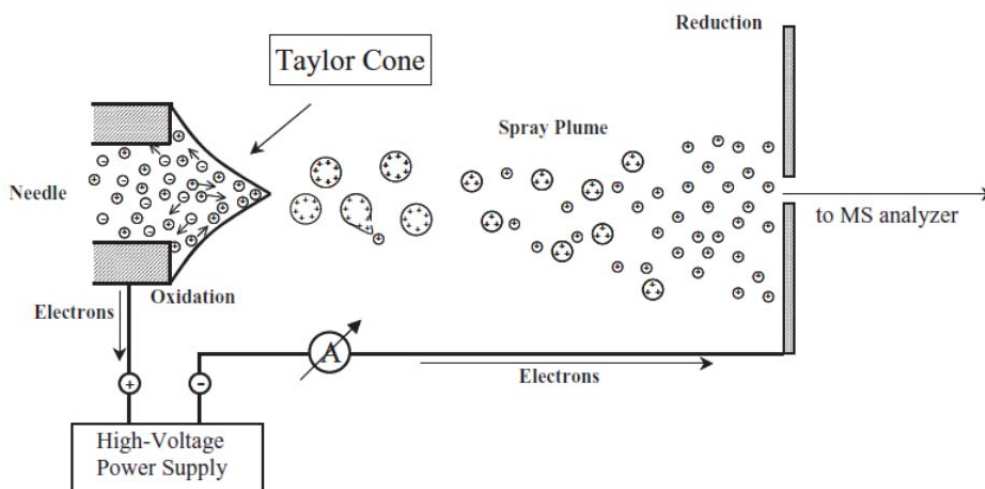


Figura 1.9 – Ilustração descritiva do processo de electrospray. (9)

O processo de electrospray é muitas vezes dividido em três fases: formação da gotícula, redução da gotícula e formação do ião em fase gasosa. Na primeira fase, uma solução diluída do analito é bombeada a um fluxo bastante baixo ($0,1-10 \mu\text{L min}^{-1}$) através de um capilar, ao qual foi aplicada uma voltagem na ordem dos kilovolts que, consoante a polaridade pretendida, pode ser positiva ou negativa. Esta voltagem tem como função criar um gradiente de campo eléctrico, entre o capilar e o contra-eléctrodo, que promove a separação de cargas à superfície do líquido. Como resultado, o líquido é projectado na ponta do capilar assumindo uma forma de cone, conhecido como cone de Taylor (Figura 1.9). Numa segunda fase, quando as repulsões de Coloumb na superfície carregada igualam a tensão superficial da solução, atinge-se o limite de Rayleigh, e as gotículas que contêm excesso de carga desprendem-se do capilar. Em direcção ao analisador de massa, as gotículas vão sofrer um mecanismo no qual se formam os iões na fase gasosa e que constitui a terceira fase do processo de ESI. Este mecanismo tem sido estudado intensivamente e referenciado na literatura e, actualmente, existem basicamente dois modelos diferentes: o Modelo de Carga Residual (CRM) e o Modelo da Evaporação Iónica (IEM). (35) Ambos são capazes de explicar muitos dos comportamentos observados em experiências ESI. No entanto, uma distinção clara entre os dois mecanismos está na forma pela qual uma molécula de analito é separada a partir das outras moléculas, quer de analito quer de solvente. (9) O Modelo da Evaporação iónica predomina para iões de massa relativamente pequena ($m/z < 3300$) enquanto o Modelo de Carga Residual se adequa a espécies de maior multiplicidade de cargas, pelo que se considera que estes modelos descrevem os dois extremos do mesmo processo geral. (34) A Figura 1.10 esquematiza a diferença entre os dois modelos.

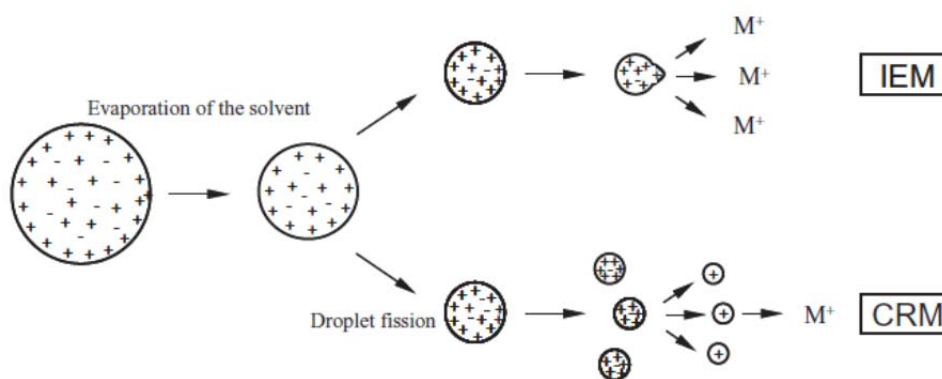


Figura 1.10 – Formação dos iões em fase gasosa pelo modelo de evaporação iónica (IEM) e pelo modelo de carga residual (CRM). (9)

No Modelo de Carga Residual (CRM) desenvolvido por Dole em 1968 (37), a evaporação do solvente das gotículas carregadas provoca um aumento das repulsões electrostáticas à superfície e esta acaba por “explodir” (explosão de Rayleigh), originando gotículas mais pequenas. (29) Consequentemente, sucessivas cisões levam à produção de gotículas mono ou multicarregadas, estáveis em fase gasosa, e que contêm apenas uma molécula do analito.(9)

Na década seguinte, em 1979, Thomson e Iribane propuseram o Modelo da Evaporação Iónica (IEM) (38, 39). Segundo este, a evaporação do solvente ao provocar repulsões de Coloumb superiores à tensão superficial do líquido, causa a emissão directa dos iões a partir das gotículas carregadas. Apesar de ser um assunto ainda bastante abordado, é indiscutível que independentemente do mecanismo, o processo de ESI gera iões em fase gasosa os quais podem ser analisados pela sua razão massa/carga num espectrómetro de massa.(35)

1.3.2.2. Analisador de Massa de Armadilha de Iões (Ion Trap-IT)

O analisador de armadilha de iões é composto por dois eléctrodos com superfícies hiperbólicas, os eléctrodos end cap, e por um eléctrodo de anel central (Figura 1.11).

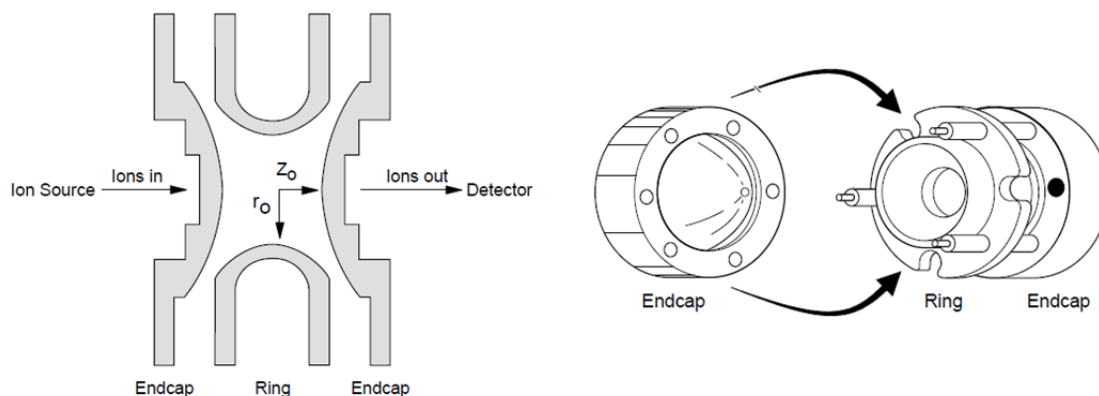


Figura 1.11 – Ilustração da constituição de um analisador de armadilha de iões.(40)

O princípio de funcionamento da armadilha de iões é bastante semelhante ao do quadrupólo linear, uma vez que os iões também são sujeitos a um campo de radiofrequências. Na armadilha de iões, a aplicação do campo em três coordenadas (x,y,z) em vez das duas dimensões, para o quadrupólo linear, confina os iões ao centro do analisador. O campo de radiofrequências tridimensional cria trajectórias estáveis para os iões de um determinado intervalo de massa/carga, que vão sendo sequencialmente ejectados, por aplicação de voltagens nos eléctrodos de endcap, em

direcção ao detector. Por sua vez, remove também iões indesejáveis fazendo-os colidir com as paredes do analisador. (34, 40). Uma das vantagens do analisador de armadilha de iões é que permite fazer experiências de espectrometria de massa tandem no tempo (secção 1.3.3.). Outras vantagens deste tipo de analisador são descritas na Tabela 1.2.

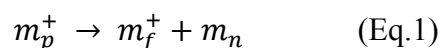
Tabela 1.2 – Vantagens do analisador do tipo armadilha de iões. (40)

Armadilha de iões (Ion Trap IT)	Elevada sensibilidade.
	Mecanicamente simples e compacto para um equipamento de alto desempenho.
	Permite experiências de espectrometria de massa tandem através de medições sequenciais de massa (no tempo).
	Podem ser estudadas reacções ião-molécula seleccionando a massa do ião.

1.3.3. Espectrometria de massa Tandem (MSⁿ)

A espectrometria de massa tandem (MSⁿ) engloba, pelo menos, duas fases de análise de massa. Na prática, um primeiro analisador é utilizado para isolar o ião precursor (m_p^+), o qual, ao sofrer fragmentação por colisão com um gás inerte, produz iões produto (m_f^+) e fragmentos neutros (m_n) sendo os iões produto então analisados pelo analisador de massa seguinte (Figura 1.12).

A formação dos iões produto (m_f^+) e dos fragmentos neutros (m_n) é traduzida pela equação 1:



Para que esta reacção ocorra, é necessário atingir um estado de energia, que permita ultrapassar a barreira de activação da reacção. Esta energia pode resultar de duas fontes:

1. Do excesso de energia depositado sobre o ião precursor pelo processo de ionização. (Válido apenas para ionização electrónica e ionização química com determinados gases reagente, como, por exemplo, H₂ ou CH₄).
2. Através de métodos de activação, como a dissociação induzida por colisões (CID), a dissociação por absorção de fotões na gama do infravermelho (IRMPD), a dissociação por captura de electrões (ECD) para o FTICR, a

dissociação por transferência de electrões (ETD) para a armadilha de iões, e a dissociação induzida por superfície (SID). (41)

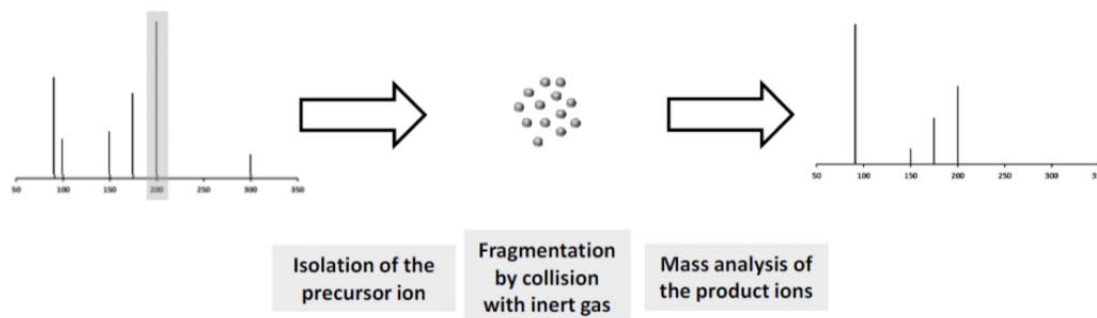


Figura 1.12 - Esquema do princípio do MS/MS. (41)

A espectrometria de massa tandem (MS^n) pode ser realizada no espaço por acoplamento de dois espectrômetros de massa, ou no tempo através de uma sequência de eventos num dispositivo de armazenamento de iões.(41) Inicialmente, a espectrometria de massa tandem foi desenvolvida como método tandem no espaço, na qual eram utilizados espectrômetros de massa de sector e, mais tarde, em analisadores do tipo quadrupólo e tempo de voo (TOF). O conceito foi alargado a instrumentos de espectrometria de massa no tempo, isto é, com analisadores de armadilha de iões (ion trap) e de ressonância ciclométrica de iões (ICR).

Neste trabalho foram realizadas experiências de espectrometria de massa tandem por dissociação induzida por colisão (CID), que permitiram obter informação estrutural dos compostos presentes nas uvas.

O desenvolvimento da dissociação induzida por colisões (CID) começou quando a presença de picos difusos nos espectros de massa, descritos pela primeira vez por Aston (bandas de Aston) (42), foram investigados por Hipple e Condon. (43) Estes dois investigadores concluíram que os picos eram provenientes do decaimento unimolecular de iões seleccionados (iões metaestáveis) que, com energia interna suficiente, se dissociavam espontaneamente.

A aplicação de técnicas de varrimento para a investigação do processo de decaimento unimolecular foi desenvolvida independentemente e quase em simultâneo em 1965 por Jennings(44) e por Futrell e seus colaboradores.(45)

A realização de vários estudos fundamentais e aplicados ao longo dos anos, tornou a colisão induzida por dissociação numa “técnica” essencial em espectrometria de massa, estando os equipamentos comerciais equipados com uma célula de colisão

(equipamentos de espectrometria de massa tandem no tempo) ou contendo dois ou mais analisadores acoplados (equipamentos de espectrometria de massa no espaço). (46)

1.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

O conceito de cromatografia foi introduzido no início do século XX, quando o botânico russo Mikhail Tswett concebeu uma coluna de cromatografia clássica, e demonstrou a sua capacidade para separar os componentes de diferentes extractos de plantas. Tswett observou que, as espécies separadas formavam bandas coloridas na coluna e decidiu denominar a técnica por cromatografia, junção das palavras gregas *chroma* = cor e *graphein* = escrita(47). A experiência marcou o início da cromatografia, mas o seu trabalho não foi reconhecido durante duas décadas. No início dos anos 30, o trabalho foi redescoberto, estimulando o interesse dos cientistas, e consequentemente o desenvolvimento de vários novos tipos de técnicas cromatográficas e suas aplicações.

Durante os anos 60, o sistema de HPLC viria a ser desenvolvido por dois grupos diferentes, um nos Estados Unidos sob a liderança de Csaba Horváth (48) e outro na Europa (Holanda) pelas mãos de Josef Huber (49). Os resultados imediatos destes dois grupos foram descritos entre 1966 e 1968, e levaram à comercialização dos equipamentos de HPLC. O tremendo impacto destes métodos foi comprovado pela entrega do Prémio Nobel da Química, em 1952, a A. J. P. Martin e a R.L.M. Synge pelas suas descobertas na área, e também pelo número de Prémios Nobel entregues a trabalhos, nos quais, a cromatografia desempenhou um papel vital. (50, 51)

1.4.1. O sistema de HPLC e o processo cromatográfico

Um sistema de HPLC é constituído usualmente por um sistema de distribuição de solvente (reservatórios de solventes e bomba), uma válvula de injeção da amostra, uma coluna de aço ou plástico, um detector e um sistema de controlo e de aquisição de dados (Figura 1.13). Alguns equipamentos contêm ainda um forno de modo a controlar a temperatura da coluna.(52) As colunas de HPLC podem ter um comprimento variável de 5 a 30 cm e um diâmetro interno de 1 a 5 mm e, por terem um custo elevado, são por vezes utilizadas pré-colunas com a mesma fase estacionária, para proteger a coluna de possíveis impurezas presentes na amostra que possam diminuir o seu tempo de vida e também evitar o arrastamento da fase estacionária devido a pressões elevadas.

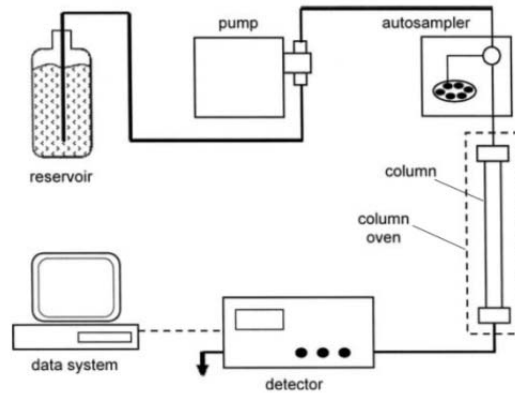


Figura 1.13 – Sistema de HPLC. (50)

A utilização correcta de um sistema de HPLC e de qualquer outro equipamento de cromatografia pressupõe um conhecimento prévio do processo cromatográfico e das condições experimentais que o afectam. Neste processo a amostra é dissolvida numa fase móvel (no caso do HPLC esta fase é líquida), que atravessa uma fase estacionária imiscível usualmente fixa numa coluna ou superfície. A escolha destas fases e do tipo de eluição, em modo isocrático (composição constante de eluente com o tempo) ou em modo gradiente (variação da composição de eluente com o tempo), é feita consoante o tipo de amostra e componente alvo. As diferenças de mobilidade dos componentes em ambas as fases provocam a separação destes em bandas ou zonas que podem ser analisadas qualitativamente e quantitativamente. (50)

Na Figura 1.14 é visível o processo cromatográfico para uma amostra contendo três compostos X, Y e Z. Os compostos vão fluindo na fase móvel consoante a sua afinidade para ambas as fases e, à medida que deixam a coluna, vão sendo detectados em função do tempo, obtendo-se a resposta sob a forma de um cromatograma. O tempo decorrido desde a injeção da amostra até ao momento em que determinado analito chega ao detector define-se como tempo de retenção t_r . Os componentes que não são passíveis de serem retidos são rapidamente detectados, apresentando-se sob a forma de um pico inicial (50) e o tempo que estas espécies demoram a chegar ao detector é denominado tempo morto, t_0 . A diferença entre o tempo de retenção e o tempo morto determina o tempo de retenção ajustado, isto é, o tempo necessário para o componente percorrer o comprimento da coluna, tendo em conta o tempo necessário para o solvente e outros componentes, que não sofrem retenção, percorrem o mesmo caminho.

$$t'_r = t_r - t_0 \quad (\text{Eq.2})$$

Por sua vez, a razão entre os tempos de retenção ajustados para dois componentes, define a selectividade, α , entre dois picos:

$$\alpha = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}} \quad (\text{Eq.3})$$

Onde $t'_{r2} > t'_{r1}$ de modo que $\alpha > 1$. Assim, quanto maior for a selectividade maior será a separação entre os dois componentes.

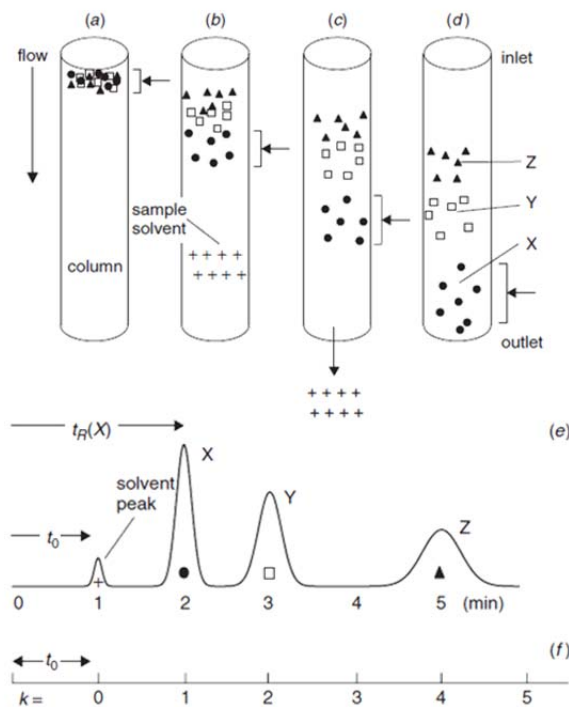


Figura 1.14 – Esquema ilustrativo do processo cromatográfico. (50)

Além da selectividade, também a eficiência contribui para a separação de componentes de uma amostra. A eficiência é uma medida da capacidade da coluna para limitar a dispersão do pico e, deste modo, fornecer melhor resolução. Assim sendo, quanto mais largos os picos, pior a separação entre estes. O alargamento ocorre devido ao deslocamento dos componentes através da coluna, que tendem a espalhar-se de forma a ocupar um maior volume no interior da coluna, e está directamente relacionado com o tempo de residência do componente na coluna (resolução) e inversamente relacionado com o fluxo da fase móvel (coeficiente de difusão).

A eficiência da coluna é usualmente medida pela altura e pelo número de pratos teóricos. A altura de prato é, aproximadamente, o comprimento da coluna necessário para que o soluto atinja um equilíbrio entre as fases móvel e estacionária, e quanto

menor a altura de prato, menor a largura da banda. Assim, para que uma coluna atinja uma máxima eficiência é necessário que tenha um número elevado de pratos teóricos com altura reduzida. Além destes, muitos outros factores são considerados para explicar o alargamento da banda, sendo que, uma explicação mais detalhada de todos estes factores pode ser encontrada na literatura.(52)

1.4.2. Interface LC-MS

O desenvolvimento da interface LC-MS demonstrou mais uma potencialidade da bem sucedida técnica de espectrometria de massa, neste caso, como detector. Uma vez que na espectrometria massa os iões são manipulados e detectados em fase gasosa, a fase móvel proveniente do HPLC deve ser evaporada e a amostra deve ser ionizada. Além disso, devem ser obtidos fluxos mais baixos a partir de colunas de HPLC de diâmetro reduzido ou através da utilização de um divisor de fluxo na saída da coluna. Estão disponíveis uma série de interfaces para o acoplamento LC-MS, sendo as mais comuns, o electrospray (ESI) já discutido anteriormente, a ionização química à pressão atmosférica (APCI) e a fotoionização à pressão atmosférica (APPI). Estas interfaces conseguem tolerar fluxos de 1 mL min^{-1} sem a necessidade de um divisor de fluxo, o que é vantajoso, uma vez que aumenta o limite de detecção destes métodos. (50)

1.5. Referências

1. Coultate, T., Food The Chemistry of its Components. In *Food The Chemistry of its Components*, The Royal Society of Chemistry: 2009; p 501.
2. History of Grapes. <http://grapesweb.com/grapes/History+of+Grapes> (Acedido a 12 de Abril de 2012)
3. History of the grape-follow the fruit from mesopotamia to your supermarket. http://www.nationalgrape.com/02a_gh.shtml (Acedido a 12 de Abril de 2012)
4. Mateljan, G. The world's healthiest foods <http://www.whfoods.com/genpage.php?tname=foodspice&dbid=40>(Acedido a 12 de Abril de 2012)

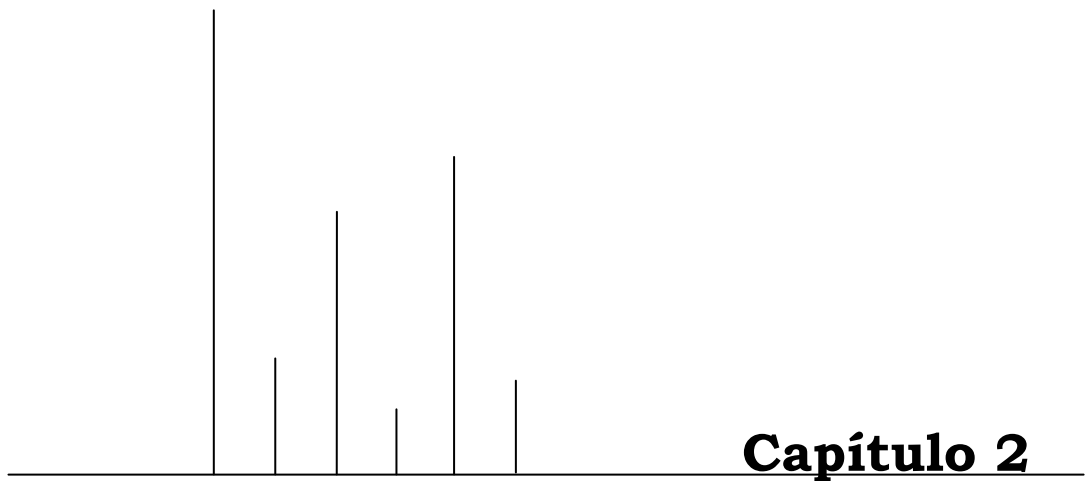
5. Jathar, R. The Origin and History of Grapes. <http://www.buzzle.com/articles/the-origin-and-history-of-grapes.html> (Acedido a 12 de Abril de 2012)
6. Rosa, V. d. Valores Nutricionais. http://www.valedarosa.com/index.php?option=com_content&view=article&id=9&Itemid=83(Acedido a 12 de Abril de 2012)
7. Deo, M. Grapes Nutritional Value. <http://www.buzzle.com/articles/grapes-nutritional-value.html> (Acedido a 12 de Abril de 2012)
8. Garrido, J.; Borges, F., Wine and grape polyphenols—A chemical perspective. *Food Research International* **2011**, *44*, 3134-3148.
9. Traldi, R. F. a. P., *Mass Spectrometry in Grape and Wine Chemistry.pdf*. Wiley & Sons: 2010; p 348.
10. Cuyckens, F.; Claeys, M., Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of mass spectrometry : JMS* **2004**, *39*, 1-15.
11. Pinelo, M.; Arnous, A.; Meyer, A. S., Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology* **2006**, *17*, 579-590.
12. Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Laureano, O.; Ricardo da Silva, J. M., Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-ol Composition of Wines and Grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of agricultural and food chemistry* **2003**, *51*, 6475-6481.
13. Sun, B.; Ribes, A. M.; Leandro, M. C.; Belchior, A. P.; Spranger, M. I., Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *563*, 382-390.

14. Langcake, P.; Pryce, R. J., The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology* **1976**, *9*, 77-86.
15. Siemmaan, E. H.; Creasy, L. L., Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **1992**, *43*, 49-52.
16. Baur, J. A.; Sinclair, D. A., Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature reviews. Drug discovery* **2006**, *5*, 493-506.
17. Frémont, L., Biological effects of resveratrol. *Life Sciences* **2000**, *66*, 663-673.
18. Pezzuto, J. M., The phenomenon of resveratrol: redefining the virtues of promiscuity. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2011**, *1215*, 123-30.
19. Stervbo, U.; Vang, O.; Bonnesen, C., A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chemistry* **2007**, *101*, 449-457.
20. Romero-Pérez, A. I.; Lamuela-Raventós, R. M.; Andrés-Lacueva, C.; de la Torre-Boronat, M. C., Method for the Quantitative Extraction of Resveratrol and Piceid Isomers in Grape Berry Skins. Effect of Powdery Mildew on the Stilbene Content. *Journal of agricultural and food chemistry* **2000**, *49*, 210-215.
21. Wang, Y.; Catana, F.; Yang, Y.; Roderick, R.; van Breemen, R. B., An LC-MS Method for Analyzing Total Resveratrol in Grape Juice, Cranberry Juice, and in Wine. *Journal of agricultural and food chemistry* **2002**, *50*, 431-435.
22. Careri, M.; Corradini, C.; Elviri, L.; Nicoletti, I.; Zagnoni, I., Direct HPLC Analysis of Quercetin and trans-Resveratrol in Red Wine, Grape, and Winemaking Byproducts. *Journal of agricultural and food chemistry* **2003**, *51*, 5226-5231.
23. Kong, Q. J.; Ren, X. Y.; Hu, N.; Sun, C. R.; Pan, Y. J., Identification of isomers of resveratrol dimer and their analogues from wine grapes by HPLC/MSn and HPLC/DAD-UV. *Food Chemistry* **2011**, *127*, 727-734.

24. Pezet, R.; Perret, C.; Jean-Denis, J. B.; Tabacchi, R.; Gindro, K.; Viret, O., δ -Viniferin, a Resveratrol Dehydrodimer: One of the Major Stilbenes Synthesized by Stressed Grapevine Leaves. *Journal of agricultural and food chemistry* **2003**, *51*, 5488-5492.
25. Tosun, İ.; İnkaya, A. N., Resveratrol as a Health and Disease Benefit Agent. *Food Reviews International* **2009**, *26*, 85-101.
26. King, R. E.; Bomser, J. A.; Min, D. B., Bioactivity of Resveratrol. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2006**, *5*, 65-70.
27. Borman, S. A Brief History of Mass Spectrometry Instrumentation. <http://masspec.scripps.edu/mshistory/perspectives/sborman.php> (Acedido a 14 de Maio de 2012)
28. Munson, M. S. B.; Field, F. H., Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction. *Journal of the American Chemical Society* **1966**, *88*, 2621-2630.
29. Gräslund, K. M. a. A. Mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) applied to biological macromolecules. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/advanced-chemistryprize2002.pdf Acedido a 14 de Maio de 2012)
30. C.K. Meng, M. M., J.B. Fenn In 36th Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 1988; 1988; pp 771-772.
31. Makarov, A., Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 1156-1162.
32. Hager, J. W., A new linear ion trap mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2002**, *16*, 512-526.
33. Flender, C.; Wolf, C.; Leonhard, P.; Karas, M., Nano-liquid chromatography—direct electron ionization mass spectrometry: improving performance by a new ion source adapter. *Journal of Mass Spectrometry* **2011**, *46*, 1004-1010.

34. Madeira, P. J. A. A MASS SPECTROMETRY STUDY OF COMPOUNDS WITH ENVIRONMENTAL AND BIOLOGICAL INTEREST. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, 2010.
35. Cech, N. B.; Enke, C. G., Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass spectrometry reviews* **2001**, *20*, 362-87.
36. Castro, A. L. L. P. d. Study of the degradation of organic pollutants using heterogeneous photocatalysis and mass spectrometry. Universidade de Lisboa, 2009.
37. Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B., Molecular Beams of Macroions. *The Journal of Chemical Physics* **1968**, *49*, 2240-2249.
38. Iribarne, J. V.; Thomson, B. A., On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics* **1976**, *64*, 2287-2294.
39. Thomson, B. A.; Iribarne, J. V., Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *The Journal of Chemical Physics* **1979**, *71*, 4451-4463.
40. Cooks, P. S. H. W. a. R. G., Ion Trap Mass Spectrometry. *Current Separations* **1997**, *16*.
41. Florêncio, P. J. A. M. a. M. H., Applications of Tandem Mass Spectrometry: From Structural Analysis to Fundamental Studies. In *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*, Prasain, D. J., Ed. InTech: 2012; p 794.
42. Aston, F. W., *Proc. Cambridge Philos. Soc* **1919**, *19*, 317.
43. Hipple, J. A.; Condon, E. U., Detection of Metastable Ions with the Mass Spectrometer. *Physical Review* **1945**, *68*, 54-55.
44. Jennings, K. R., Metastable Transitions in the Mass Spectrum of Benzene. *The Journal of Chemical Physics* **1965**, *43*, 4176-4177.

45. Futrell, J. H.; Ryan, K. R.; Sieck, L. W., Study of Metastable Transitions in Mass Spectra Using a Double-Focusing Instrument. *The Journal of Chemical Physics* **1965**, *43*, 1832-1833
46. Shukla, A. K.; Futrell, J. H., Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35*, 1069-1090.
47. Tswett, M. S. In *O novoy kategorii adsorbtsionnykh yavleny i o primenenii ikh k biokhimicheskomu analizu (On a new category of adsorption phenomena and on its application to biochemical analysis)*, Proceedings of the Warsaw Society of Naturalists, Biology Section, 1905; 1905; pp 20-39.
48. Greibrokk, T., The contributions of Csaba Horváth to liquid chromatography. *Journal of Separation Science* **2004**, *27*, 1249-1254.
49. Kenndler, E.; Dickert, F., Tribute to J.F.K. Huber. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **2001**, *371*, 2-3.
50. W.Dolan, L. R. S. J. J. K. a. J., *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Wiley & Sons: 2010.
51. Skoog, D. A.; Leary, J. J., *Principles of Instrumental Analysis*. 4th ed.; Saunder College: 1992.
52. Harris, D. C., *Análise Química Quantitativa*. 7th ed.; 2008.



Capítulo 2

PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiais

Todas as pesagens foram efectuadas numa balança analítica Sartorius CP225D. Na preparação das amostras, além do material corrente de laboratório, foi utilizada uma microcentrifugadora digital Galaxy 7D 230V-EV VWR International, filtros de seringa Whatman (USA) GD/X NYL 13 mm, 0,45 μm , cartuchos de SPE Waters Oasis HLB 30 μm , Sigma-Aldrich ENVI-18 SupelClean 45 μm e Teknokroma Finisterre C18 50 μm . Utilizou-se também um liofilizador Thermo Savant MicroModulyo acoplado a uma bomba de vácuo VRC 100 – 3.5, um evaporador rotativo Büchi Switzerland R210 acoplado a uma bomba de vácuo Büchi Switzerland V-710 e uma bomba de alto vácuo PC3/ RZ 2.5 da Vacuubrand (Alemanha). Para armazenamento, preparação e extracção das amostras foram utilizados, sempre que possível, frascos de vidro de cor âmbar.

2.2. Reagentes

Nas análises de LC-MSⁿ foram utilizados solventes de grau HPLC. O metanol (MeOH), o acetonitrilo (ACN), a água (H₂O) e o ácido fórmico (HCOOH), foram obtidos da Fisher Scientific, UK. O etanol absoluto (EtOH) foi adquirido da Merck, Alemanha e o acetato de etilo (EtOAc) obtido da BDH Laboratories, UK. O padrão de resveratrol foi adquirido da Sigma com um grau de pureza $\geq 99\%$ e a água Millipore (resistividade 18,2 M Ω cm, a 25 °C) foi retirada de um sistema de purificação de água Milli-Q Academic da Merck Millipore, USA.

2.3. Plano de Amostragem

As uvas de origem sul-americana (Chile e Perú) foram adquiridas comercialmente e de modo aleatório, sendo armazenadas no congelador até à sua utilização. Teve-se o cuidado de adquirir uvas de pele escura, uma vez que o teor de resveratrol neste tipo de uvas é superior. (1, 2)

2.4. Preparação e Extracção da Amostra

Foram adoptadas diferentes metodologias com o objectivo de otimizar o processo de extracção.

2.4.1. Metodologia A

Uma porção de 1-2 g de uvas foi triturada em 20 mL de metanol. De seguida, a amostra foi submetida aos ultra-sons durante cerca de 15 minutos, ficando a agitar durante a noite. Após este período, um alíquota de 1 mL foi centrifugada a $10,000 \times g$ durante 10 minutos e o sobrenadante foi filtrado. Pequenas modificações foram introduzidas, como sejam, a repetição do procedimento utilizando etanol como solvente e a preparação de um sumo em metanol (cerca de 20 g de uvas) que não foi sujeito aos ultra-sons.

2.4.2. Metodologia B

Uma amostra de aproximadamente 160 g de uvas foi previamente liofilizada e armazenada no congelador. Uma porção de 5 g foi pesada, desfeita em metanol e centrifugada a $10,000 \times g$ durante 10 minutos. O sobrenadante foi sujeito a um cartucho de SPE Waters Oasis HLB 30 μm . Para uma quantidade maior de amostra decidiu-se introduzir um passo de filtração prévia ao SPE.

2.4.3. Metodologia C

Um sumo preparado em água (≈ 500 g) foi previamente liofilizado. A partir deste retirou-se uma porção de 5 g e adicionaram-se 10 a 15 mL de metanol ficando a solução nos ultra-sons durante cerca de 4 horas. Uma alíquota de 1 mL foi filtrada, enquanto outra de 2 mL foi centrifugada a $10,000 \times g$ durante 10 minutos e sujeita a SPE (cartuchos Sigma-Aldrich ENVI-18 SupelClean 45 μm). Preparou-se ainda uma nova amostra em metanol, que ficou a agitar durante a noite e que, após este período, foi submetida ao mesmo procedimento das alíquotas referidas anteriormente.

2.4.4. Metodologia D

200 mL de metanol foram adicionados a uma porção de 12 g de sumo liofilizado (Metodologia C). Após agitação durante a noite, a amostra foi filtrada a vácuo, o solvente removido no evaporador rotativo e o resíduo seco na bomba de alto vácuo de modo a obter-se um pó. A partir deste foram preparadas soluções em água Millipore de 10 mg/mL, 50 mg/mL e 200 mg/mL que, por sua vez, foram sujeitas a SPE (cartuchos Teknokroma Finisterre C18 50 μm) e concentradas. Esta metodologia foi

posteriormente aplicada na análise da polpa, tendo-se neste caso preparado uma solução de 500 mg/mL, da pele e dos pedúnculos das uvas. A Figura 2.1 esquematiza um fluxograma com as diferentes metodologias utilizadas.

2.5. Extracção em fase sólida (SPE)

Foram utilizados três cartuchos de diferentes marcas, no entanto, dado a equivalência entre os tipos de enchimento dos cartuchos, o procedimento aplicado foi o mesmo. Assim, o cartucho foi condicionado com 3 mL de MeOH, 3 mL de H₂O + HCOOH (pH=2,5) e 3 mL de EtOAc. De seguida, as amostras foram eluídas em três fracções, uma com 2 x 2 mL de H₂O + HCOOH (pH=2,5), outra com 2 x 2 mL de EtOAc e a última 2 x 2 mL de MeOH. Numa fase inicial, apenas MeOH e H₂O + HCOOH (pH=2,5) foram utilizados como eluentes.

2.6. Padrão de Resveratrol

Uma solução 10⁻³ M do padrão de resveratrol foi preparada e injectada no espectrómetro de massa de modo a realizar-se o estudo do seu comportamento em fase gasosa. A partir da solução inicial foram ainda preparadas por diluição soluções até 10⁻⁸ M para construção de uma curva de calibração.

2.7. Condições de análise LC-MSⁿ

As análises por LC-MSⁿ foram efectuadas num equipamento HPLC Surveyor Plus Thermo Scientific acoplado a um espectrómetro de massa LCQ Duo Ion Trap Mass Spectrometer Thermo Scientific (San Jose, USA). As colunas cromatográficas utilizadas foram uma LiChrospher RP 18 5u 250 mm x 4,6 mm (i.d.) e uma GraceSmart RP 18 5u 150 mm x 2,1 mm (i.d.). Para esta, foi utilizada uma fase móvel constituída por sistema binário de MeOH (A) e H₂O+HCOOH (1%) (B) a um fluxo de 200 µL min⁻¹. O volume de injeção foi de 10 µL e o programa de gradiente utilizado encontra-se na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Programa de HPLC utilizado.

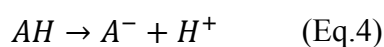
Tempo/minutos	% A	% B
0	20	80
50	80	20
55	20	80
60	20	80

Os espectros de massa foram adquiridos num espectrómetro de massa LCQ-Duo da Thermo Scientific (San Jose, USA) equipado com fonte de ionização por electrospray e com um analisador de massa do tipo *ion trap*. Todos os parâmetros instrumentais foram otimizados para garantir a melhor razão sinal/ruído. Resumidamente, azoto foi utilizado como gás nebulizador (40 ua) e como gás auxiliar (20 ua). O potencial aplicado ao capilar foi de 4.5 kV e a temperatura do capilar metálico foi de 220°C. A pressão na zona da fonte de ionização era de 1.25×10^2 Pa enquanto no analisador, com He (Praxair, Porto, Portugal) a servir de gás de termalização era de 1.59×10^{-3} Pa. As experiências foram realizadas com a polaridade negativa.

Para a aquisição dos espectros de massa o tempo máximo de injeção na *ion trap* foi de 50 ms. As experiências de MSⁿ foram realizadas isolando os iões desejados na *ion trap* e acelerando-os provocando a sua colisão com o gás de termalização. Para as experiências de MSⁿ o tempo máximo de injeção foi de 200 ms. O software Xcalibur versão 1.2 da Thermo Scientific foi usado para aquisição e processamento dos espectros de massa.

2.8. Cálculos Semiempíricos

Para determinar os locais prováveis de desprotonação recorreu-se a cálculos semiempíricos usando o hamiltoniano PM6 (3) implementado no pacote de software MOPAC2009 versão 11.366L. (4) Para tal foram calculadas as entalpias de formação, $\Delta_f H$ para a espécie neutra, bem como para o anião e com estas foram calculadas as entalpias de reacção de desprotonação de acordo com a seguinte equação:



O valor de $\Delta_r H$ de desprotonação é dado pela seguinte equação:

$$\Delta_r H(\text{desp}) = \Delta_f H(A^-) + \Delta_f H(H^+) - \Delta_f H(AH) \quad (\text{Eq.5})$$

Para o cálculo dos valores de $\Delta_r H$ considerou-se que $\Delta_f H(H^+) = 1530 \text{ kJ mol}^{-1}$, de acordo com a “convenção do ião” (5)

Para determinar a natureza dos mínimos de energia foram realizados cálculos de frequências.

O software Avogadro foi usado para visualizar os outputs do MOPAC2009. (6)

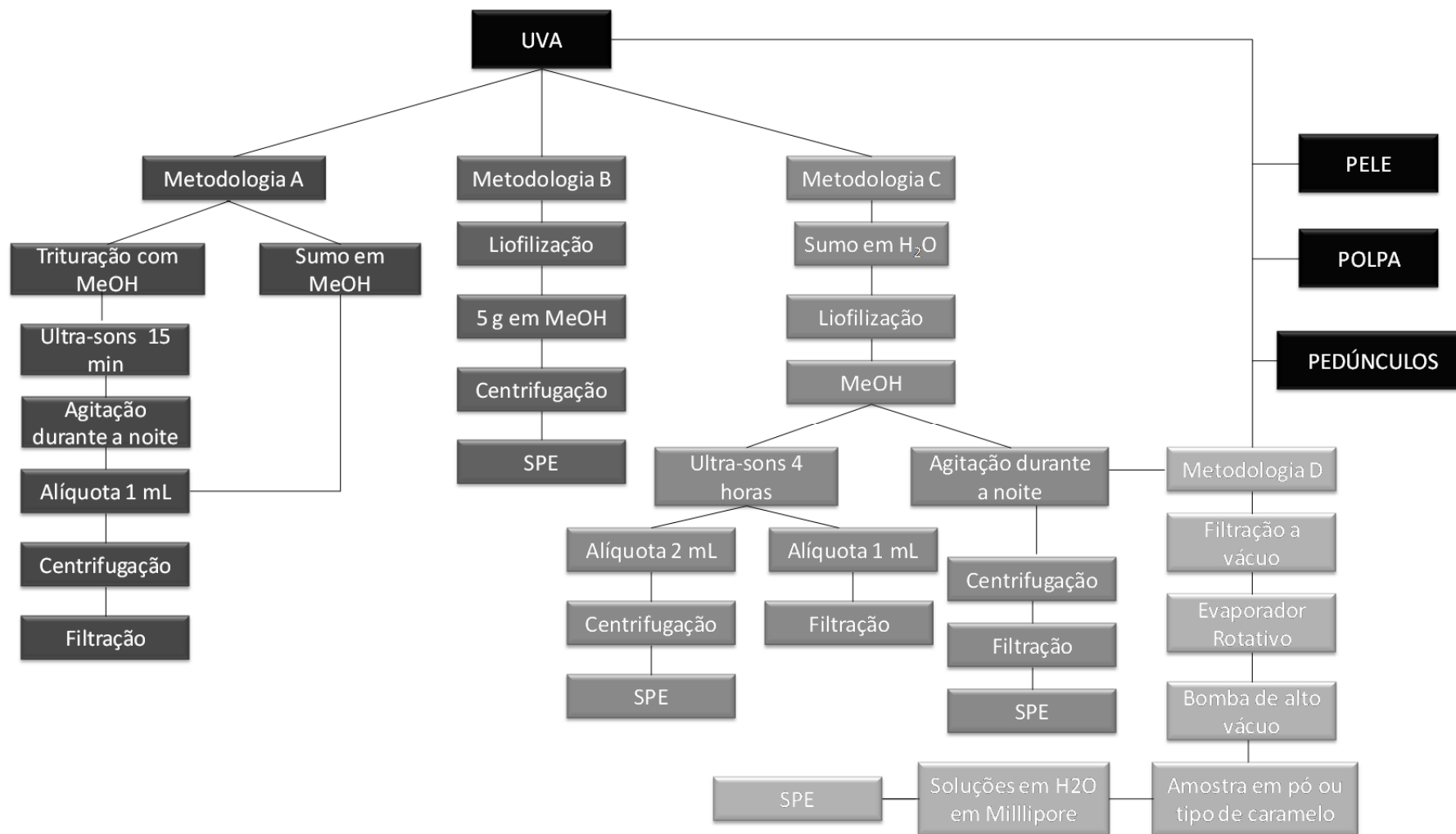
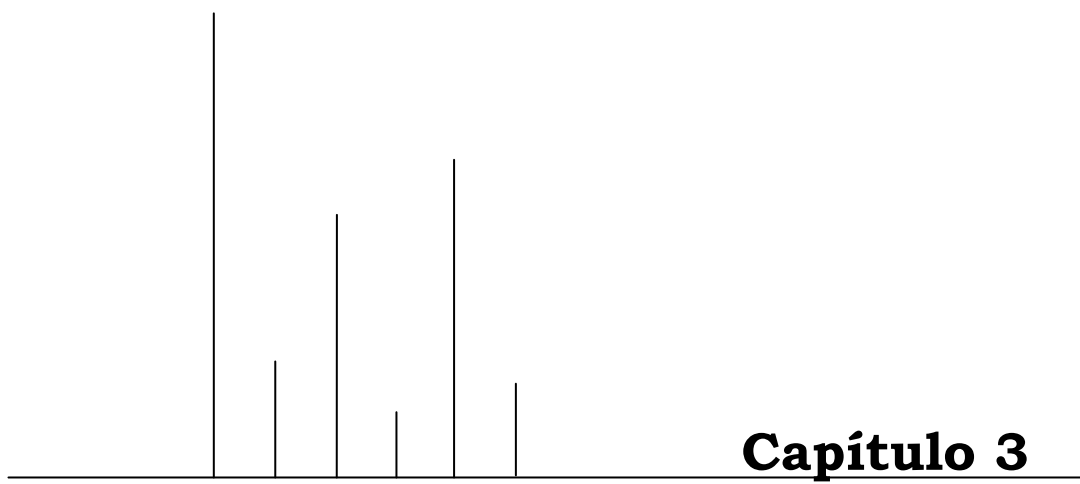


Figura 2.1 – Fluxograma das metodologias utilizadas.

2.9. Referências

1. Careri, M.; Corradini, C.; Elviri, L.; Nicoletti, I.; Zagnoni, I., Direct HPLC Analysis of Quercetin and trans-Resveratrol in Red Wine, Grape, and Winemaking Byproducts. *Journal of agricultural and food chemistry* **2003**, *51*, 5226-5231.
2. Casas, L.; Mantell, C.; Rodríguez, M.; Ossa, E. J. M. d. l.; Roldán, A.; Ory, I. D.; Caro, I.; Blandino, A., Extraction of resveratrol from the pomace of Palomino fino grapes by supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering* **2010**, *96*, 304-308.
3. Stewart, J. J. P., Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *Journal of Molecular Modelling* **2007**, *13*, 1173-1213.
4. Stewart, J. J. P. Stewart Computational Chemistry, MOPAC2009. [HTTP://OpenMOPAC.net](http://OpenMOPAC.net) (2008) (Acedido a 3 de Agosto de 2012)
5. Sharon G. Lias, J. E. B. Gas-phase ion thermochemistry. <http://webbook.nist.gov/chemistry/ion> (Acedido a 3 de Agosto de 2012)
6. Avogadro Avogadro: an open-source molecular builder and visualization tool. Version 1.03 <http://avogadro.openmolecules.net/> (Acedido a 3 de Agosto de 2012)



Capítulo 3

**APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO
DE RESULTADOS**

3.1. Estudo do comportamento em fase gasosa do resveratrol

O espectro de full scan em modo negativo do resveratrol (Figura 3.1) foi obtido segundo as condições descritas no capítulo 2.

O resveratrol tem uma massa molecular de 228 g mol^{-1} e a desprotonação pode ocorrer num dos três grupos hidroxilo, como é visível na Figura 3.1.

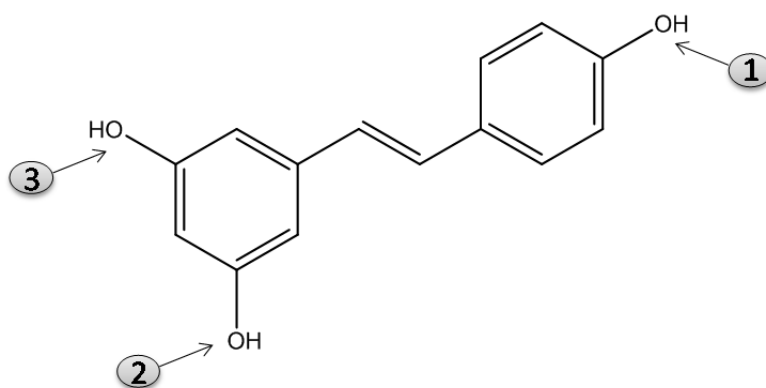


Figura 3.1 – Representação das três estruturas desprotonadas do resveratrol.

Através dos cálculos semiempíricos efectuados obtiveram-se os valores da Tabela 3.1

Tabela 3.1 – Valores de $\Delta_f H [A^-]$ para cada uma das estruturas.

Grupo Hidroxilo	$\Delta_f H [A^-] / \text{kJ mol}^{-1}$
1	-516,3
2	-482,5
3	-482,5

Verificou-se que a desprotonação ocorre mais favoravelmente no grupo hidroxilo 1, uma vez que, o valor de entalpia de formação é o mais baixo. Observou-se também que os valores obtidos para os grupos hidroxilo 2 e 3 foram os mesmos.

Uma solução 10^{-4} M de padrão de resveratrol foi injectada no espectrómetro de massa e os espectros de MS^2 e MS^3 em modo negativo foram registados (Figura 3.2). No espectro de MS^2 verificaram-se perdas de 42 Da e 68 Da correspondentes a C_2H_2O e a C_4H_4O respectivamente e no espectro de MS^3 do ião m/z 185 observou-se uma perda de 42 Da.

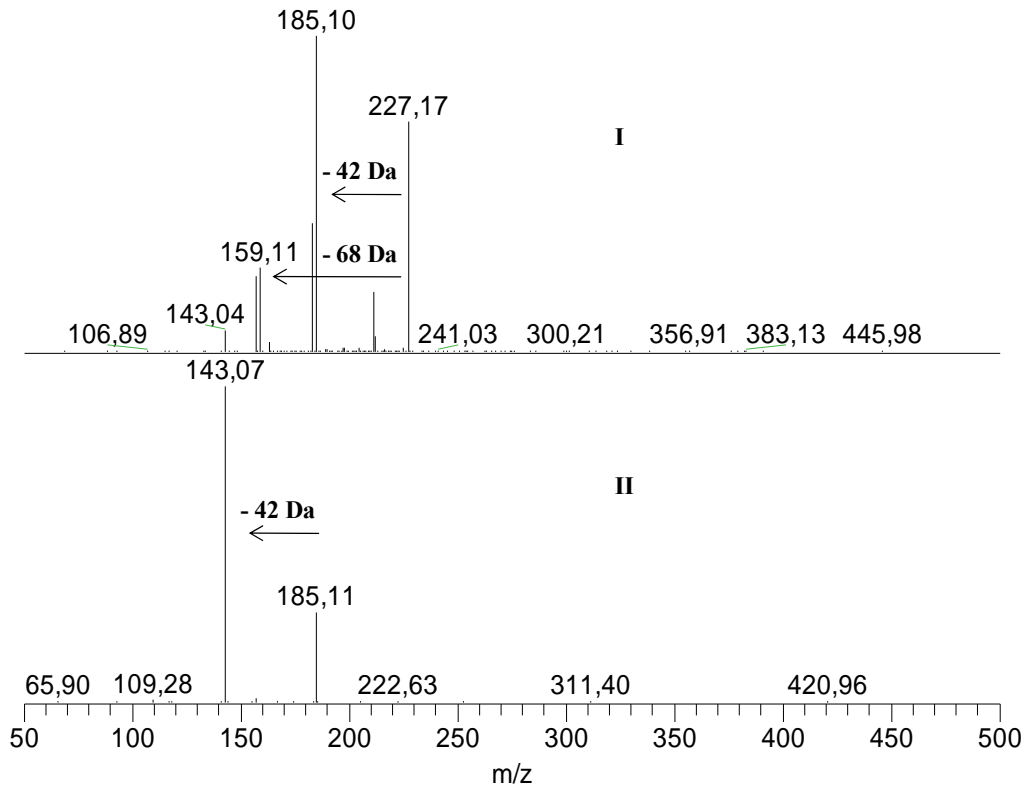


Figura 3.2 – Espectros de MS², NCE = 40 % (I) e de MS³, m/z 185, NCE = 34 % (II) do resveratrol.

Através das perdas de massa observadas, propuseram-se as vias de fragmentação esquematizadas na Figura 3.3.

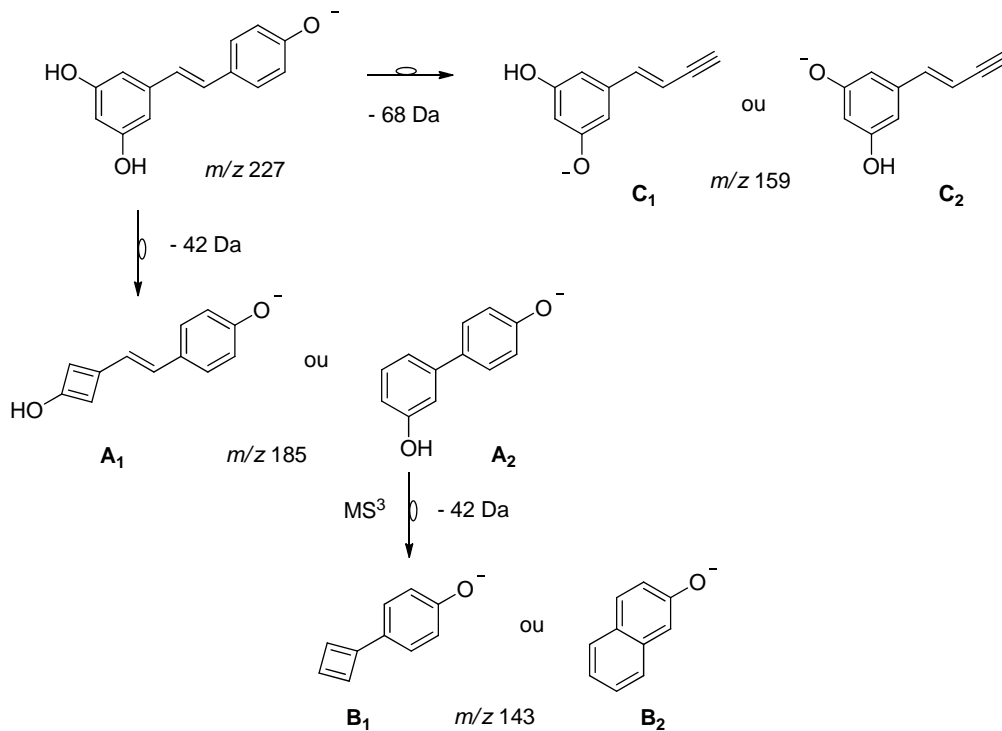


Figura 3.3 – Vias de fragmentação propostas para a molécula de resveratrol.

A presença de rearranjos por transferência de hidrogénio possibilitou a formação de dois tipos de estruturas. Recorrendo aos cálculos semiempíricos foi possível prever qual das estruturas era energeticamente mais estável.

Tabela 3.2 – Valores de $\Delta_f H [A^-]$ das estruturas formadas.

Estrutura	$\Delta_f H(A^-) / \text{kJmol}^{-1}$
A ₁	87,9
A ₂	-354,1
B ₁	92,8
B ₂	-173,4
C ₁	-157,5
C ₂	-170,3

Os valores obtidos permitiram distinguir com facilidade quais as estruturas que se formam preferencialmente e confirmar a presença dos rearranjos por transferência de hidrogénio, uma vez que formam as estruturas mais estáveis. Assim sendo, estabeleceu-se a via de fragmentação da molécula de resveratrol com os iões produto mais estáveis.

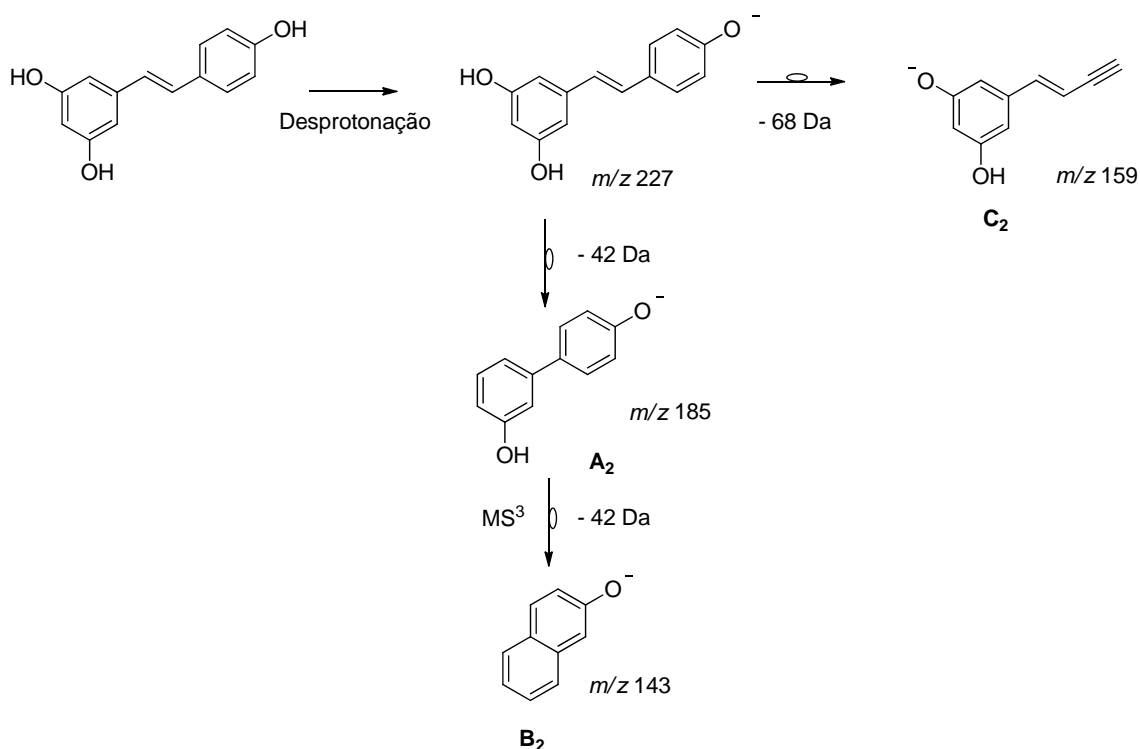


Figura 3.4 – Via de fragmentação da molécula de resveratrol com os iões produto mais estáveis.

3.2. Desenvolvimento da metodologia analítica

Neste trabalho foram utilizadas diferentes metodologias para extração do resveratrol nos diferentes constituintes da uva. Durante o planeamento das metodologias, consideraram-se os valores de resveratrol usualmente detectados em uvas na ordem dos $\mu\text{g g}^{-1}$ (1, 2), a variabilidade destes por diversos agentes (3, 4) e ainda a presença de uma matriz complexa.

Assim, delineararam-se metodologias que envolvessem o menor número de passos possíveis e, simultaneamente, um reduzido volume de solvente, uma vez que, em alguns estudos (5), o processo é lento, utiliza vários solventes e volumes consideravelmente elevados, por exemplo, quando incluem uma extração líquido-líquido. De forma a escolher qual o solvente para extração dos analitos, nomeadamente, o resveratrol, teve-se em conta resultados previamente obtidos e que demonstraram que o metanol e o etanol são aqueles que apresentam melhor eficiência de extração. Os resultados desses estudos podem ser visualizados na Figura 3.5. (4, 6)

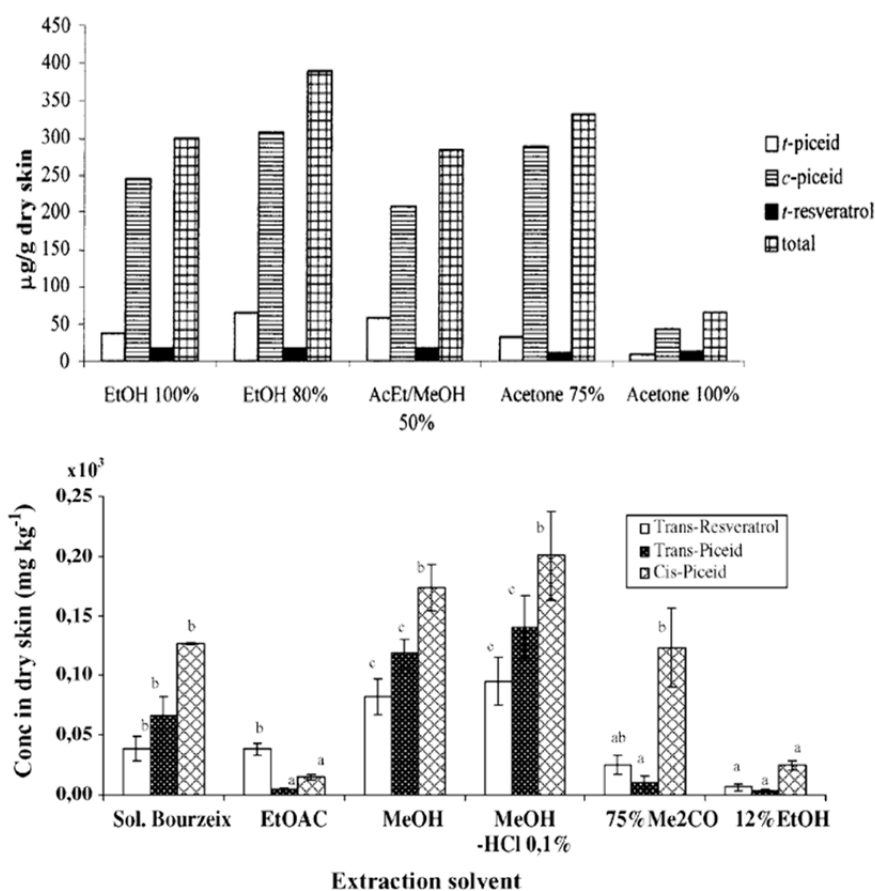


Figura 3.5 – Eficiências de diferentes solventes utilizados na extração de resveratrol e derivados da pele de uva. (4, 6)

Nesta primeira fase, utilizou-se a coluna LiChrospher RP 18 5u 250 mm x 4,6 mm (i.d.) e apenas se realizaram experiências de HPLC com o objectivo de visualizar o perfil cromatográfico das amostras e proceder à optimização das condições de análise.

Durante a realização de todo o trabalho foram programados métodos cromatográficos em modo isocrático e em modo gradiente. De um modo geral, estes métodos iniciavam-se com uma maior composição de fase aquosa ($\text{H}_2\text{O} + \text{HCOOH}$ 1%). No fim de cada método, as condições iniciais eram restabelecidas. A optimização das condições cromatográficas incluíram modificações no fluxo de eluente, na composição deste, no tempo de corrida e no volume de injeção da amostra.

Assim sendo, tentou-se dissolver directamente um pouco de amostra de uva em MeOH e após centrifugação e filtração, injectá-la no HPLC (Metodologia A). Posteriormente, as amostras foram diluídas de 1:10 e adicionaram-se 100 μL de uma solução 10^{-4} M de padrão de resveratrol à amostra não diluída com o objectivo de determinar o tempo de retenção do resveratrol nas condições cromatográficas estabelecidas. Na Figura 3.6 estão representados os cromatogramas obtidos e, segundo estes, verificou-se que o padrão de resveratrol (cromatograma C) foi eluído aos 12,5 minutos e que a adição deste à amostra (cromatograma D) não permitiu visualizar os outros analitos presentes na amostra pois o padrão estava muito concentrado. O cromatograma E correspondente a um método de eluição isocrático revelou menos informação que um método por gradiente, concluindo-se que este último seria uma melhor opção. Este procedimento foi reproduzido utilizando etanol absoluto como solvente, no entanto, o cromatograma obtido (cromatograma F) não diferiu significativamente dos anteriores.

Preparou-se também um sumo (Metodologia A) que foi analisado após uma optimização das condições de análise, que demonstrou melhorias no cromatograma obtido (Figura 3.7).

Finalizadas estas análises, verificou-se que de um modo geral, os picos apresentaram baixa resolução e, que a pouca informação fornecida pelos cromatogramas é contraditória dada a complexidade da matriz da amostra, ou seja, era de esperar que os cromatogramas apresentassem um maior número de picos uma vez que as uvas contêm muitos compostos. Estes resultados permitiram concluir que esta ausência de picos poderia ser explicada por três factores: (i) o processo de extracção foi pouco eficaz, (ii) os métodos de HPLC utilizados não foram adequados e (iii) os analitos estavam diluídos na própria matriz da amostra (cerca de 80 % do peso da uva é constituído por água).

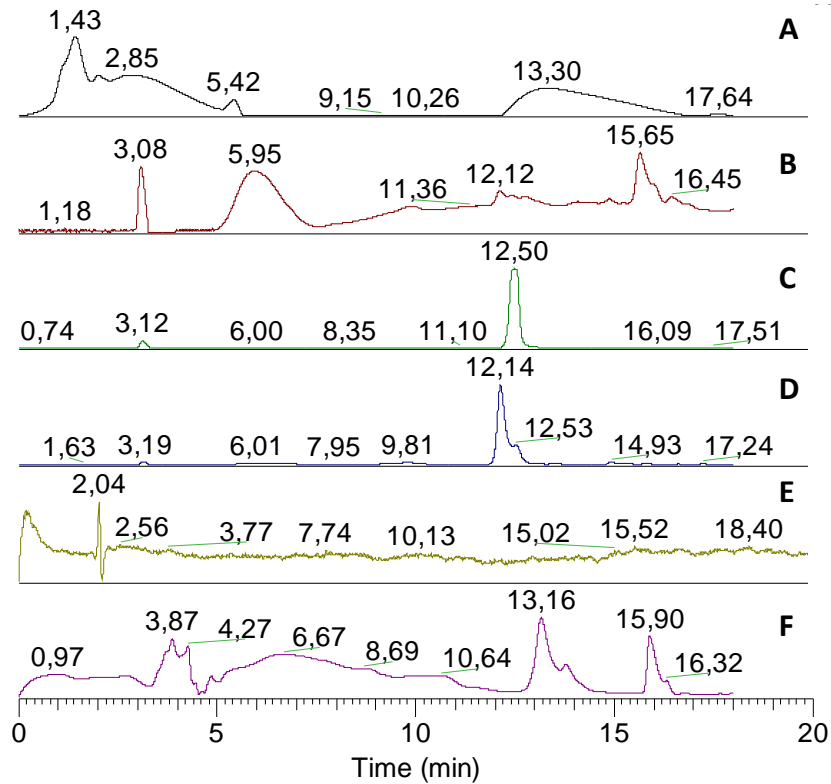


Figura 3.6 – Cromatogramas (DAD) obtidos para a Metodologia A: A - Eluição por gradiente; B - Eluição por gradiente para amostra diluída; C - Eluição por gradiente do padrão de resveratrol; D - Eluição por gradiente de amostra fortificada com resveratrol; E - Eluição isocrática; F - Eluição por gradiente de amostra extraída com EtOH.

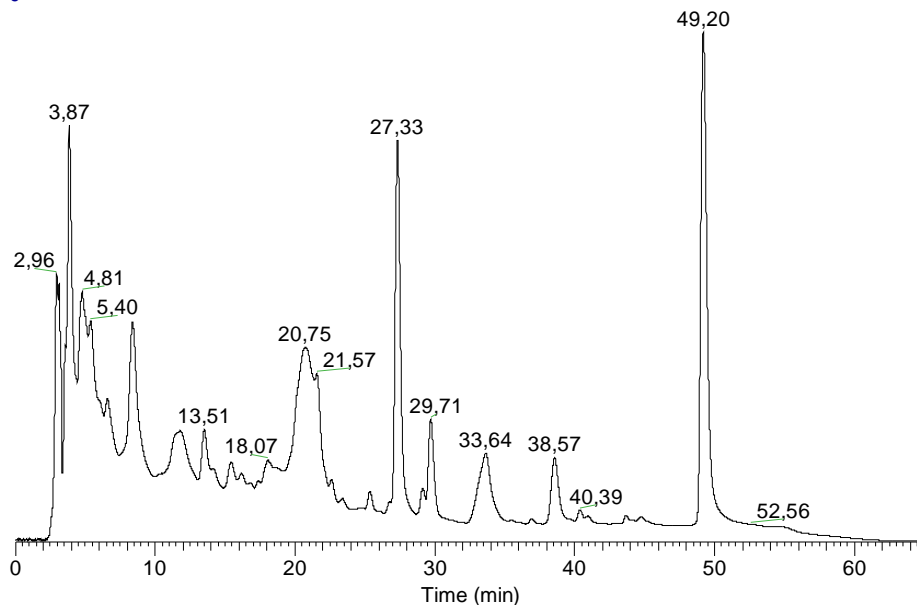


Figura 3.7 – Cromatograma (DAD) da amostra de sumo preparada pela Metodologia A.

No sentido de ultrapassar o problema da diluição dos analitos pela matriz da amostra introduziu-se um passo de liofilização e um de enriquecimento da amostra por SPE (Metodologia B). Mais uma vez, vários métodos de HPLC foram utilizados e decidiu-se realizar experiências de LC-MS e LC-MS/MS para uma primeira visualização do tipo de compostos encontrados. Alguns dos cromatogramas obtidos para estas amostras apresentaram mais informação e melhorias significativas na resolução dos picos (Figura 3.8).

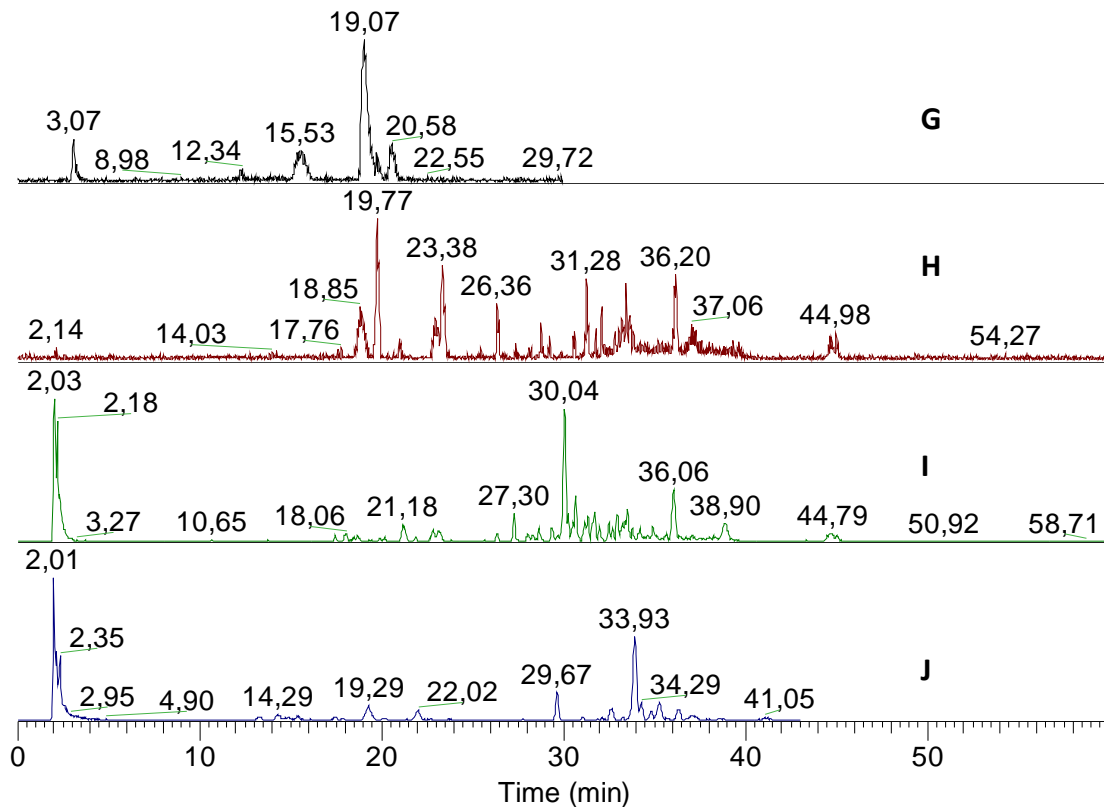


Figura 3.8 – Cromatogramas obtidos para amostras liofilizadas: G - Eluição por gradiente (30 minutos); H - Eluição por gradiente (60 minutos); I - Eluição por gradiente com composição diferente (60 minutos); J - Eluição por gradiente (43 minutos).

Durante o trabalho adquiriu-se uma coluna GraceSmart RP 18 5u 150 mm x 2,1 mm (i.d.) que possibilitou a utilização de menores fluxos de eluente. Como tal, uma nova optimização das condições de análise foi efectuada. Além disso, uma nova metodologia de extracção foi também executada (Metodologia C). A Figura 3.9 apresenta os cromatogramas obtidos e segundo estes, verificou-se que, apesar de alguma instabilidade durante a corrida, foi obtida mais informação utilizando um fluxo mais baixo ($0,2 \text{ mL min}^{-1}$). Com o objectivo de obter mais informação com um fluxo de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, foram testadas, embora sem sucesso, diferentes composições de eluentes.

Optou-se então por acrescentar um passo de SPE fazendo eluir a amostra com H₂O + HCOOH (fracção 1) e MeOH (fracção 2). Pela visualização dos cromatogramas comprovou-se que a eluição com metanol arrastou mais analitos do que a eluição apenas com água e ácido fórmico e que o SPE constituiu um passo essencial na preparação da amostra.

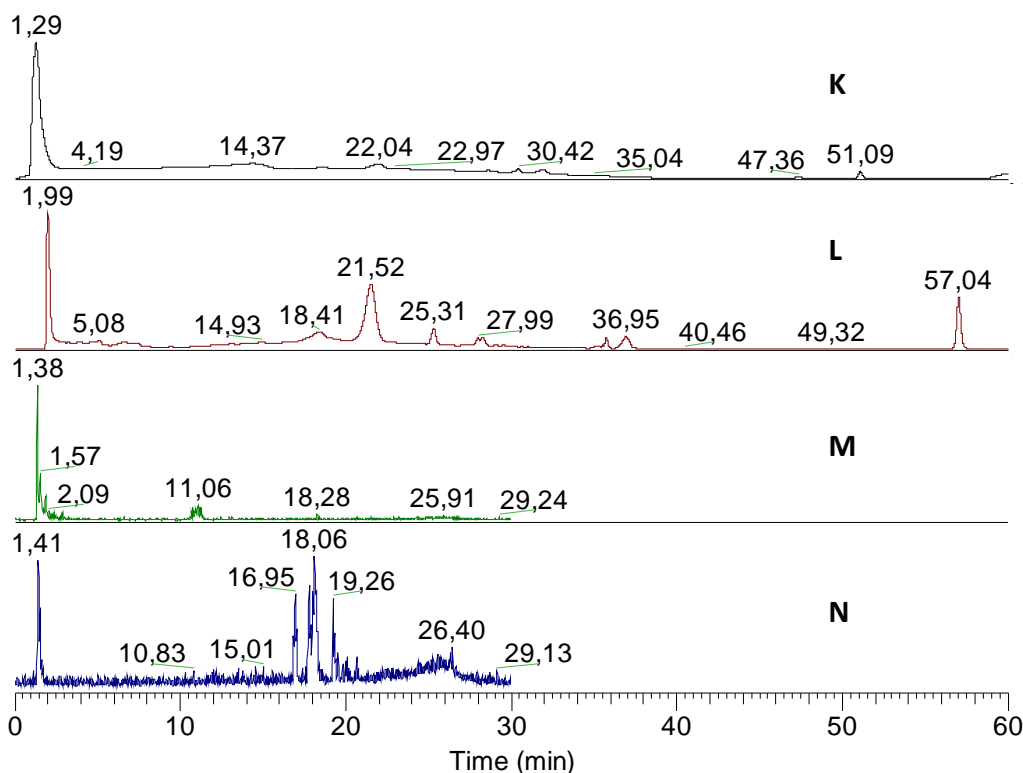


Figura 3.9 – Cromatogramas obtidos utilizando diferentes fluxos de injeção: K – 0,3 mL min⁻¹; L – 0,2 mL min⁻¹, M – 0,3 mL min⁻¹ SPE H₂O + HCOOH e N – 0,3 mL min⁻¹ SPE MeOH.

Finalmente, de modo a otimizar o tempo de extracção preparou-se outra solução em metanol e deixou-se a agitar durante a noite. Após SPE e concentração, reconstituiu-se a amostra e analisou-se por LC-MS. O aumento do tempo de extracção possibilitou extrair mais analitos da matriz da amostra como é comprovado no cromatograma da Figura 3.10. Contudo, uma análise detalhada permitiu verificar que alguns dos picos não estavam separados e, por isso eram necessárias pequenas alterações na metodologia e nas condições cromatográficas.

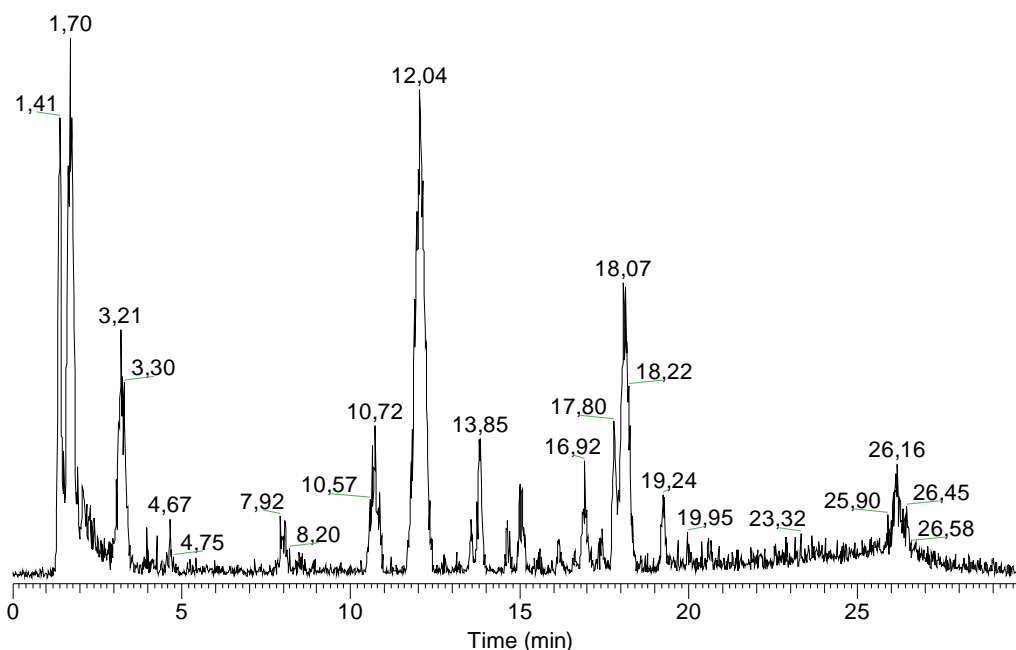


Figura 3.10 – Cromatograma obtido para um maior tempo de extração de amostra.

Assim, foi desenvolvida uma metodologia baseada na anterior utilizando uma maior quantidade de material de partida (Metodologia D). Após agitação durante a noite, a amostra foi filtrada a vácuo, o solvente removido no evaporador rotativo e o resíduo seco na bomba de alto vácuo. De seguida, soluções de 10 mg mL^{-1} , 50 mg mL^{-1} e 200 mg mL^{-1} foram preparadas em água Millipore e sujeitas a SPE, na qual o acetato de etilo foi incluído (7). Os cromatogramas (Figura 3.12) apresentaram picos mais selectivos, não só pelo tempo da corrida ser superior (60 minutos) mas também devido à distribuição dos analitos pelas fracções. Nesta análise, utilizou-se um fluxo de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ que demonstrou estabilidade ao longo da corrida e não provocou alargamentos dos picos. Face a todo este processo de optimização e aos resultados obtidos, decidiu-se que a metodologia D seria aplicada para a extração dos analitos dos restantes constituintes da uva e que as condições cromatográficas seriam as descritas na parte experimental.

3.3. Identificação dos compostos presentes nas uvas

A identificação dos analitos presentes nas amostras foi realizada através de experiências de LC-MSⁿ. Neste ponto será abordada a identificação dos compostos através das suas fragmentações. As mais úteis na identificação dos flavonóides são aquelas que requerem quebra de duas ligações C-C no anel C e resultam em iões estruturalmente informativos, $^{i,j}A^-$ e $^{i,j}B^-$. Estes iões podem ser formados por reacções de retro-Diels-Alder (RDA) e são os melhores fragmentos de diagnóstico para a identificação de flavonóides, uma vez que proporcionam informação sobre o número e o tipo de substituintes nos anéis A e B. As designações $^{i,j}A^-$ e $^{i,j}B^-$ referem-se aos fragmentos que contêm intactos os anéis A e B, respectivamente, enquanto o subscrito i e j indicam as ligações do anel C que foram quebradas. Para flavonóides conjugados, um subscrito adicional 0 é adicionado para evitar confusões com as designações A_i^- e B_i^- utilizadas para designar fragmentos de açúcares após a quebra da ligação deste à aglicona. (8) A Figura 3.11 esquematiza a nomenclatura das principais quebras para flavonóides-*O*-glucósidos.

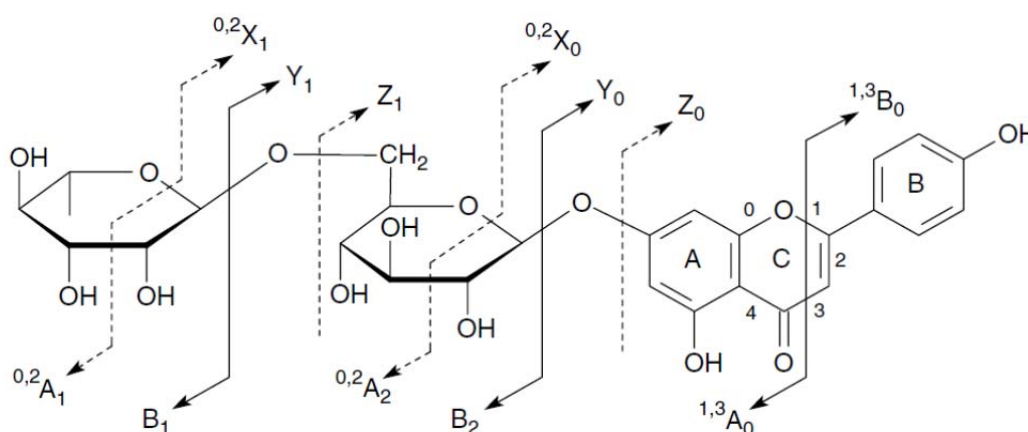


Figura 3.11 – Nomenclatura utilizada para os iões produto de flavonóides-*O*-glucósidos.

As principais vias de fragmentação, que resultam em iões A e B requerem a clivagem das ligações C-C nas posições 1/3, 0/2, 0/3, 0/4 ou 2/4 do anel C. Contudo, estes caminhos de fragmentação dependem fortemente da subclasse de flavonóides em estudo. Por exemplo, o grupo hidroxilo adicional na posição 3 dos flavonóis resulta em mais e diferentes possibilidades de fragmentação em comparação com as flavonas. Tipicamente, os iões $^{0,2}A^-$, $^{0,2}A^- - CO$, $^{1,4}A^- + 2H$ e $^{1,3}B^- - 2H$ são observados para flavonóis, enquanto os iões $^{1,3}B^-$, $^{0,4}B^-$ e $^{0,4}B^- - H_2O$ são encontrados para as flavonas. (8)

Neste trabalho, foram observadas algumas destas vias de fragmentação. Os compostos identificados nos diferentes constituintes das uvas encontram-se sumarizados na Tabela 3.3 e as estruturas destes no Anexo C.

3.3.1. Cacho de uva

Os cromatogramas representados na Figura 3.12 correspondem às fracções de EtOAc e de MeOH de uma solução de 200 mg mL⁻¹.

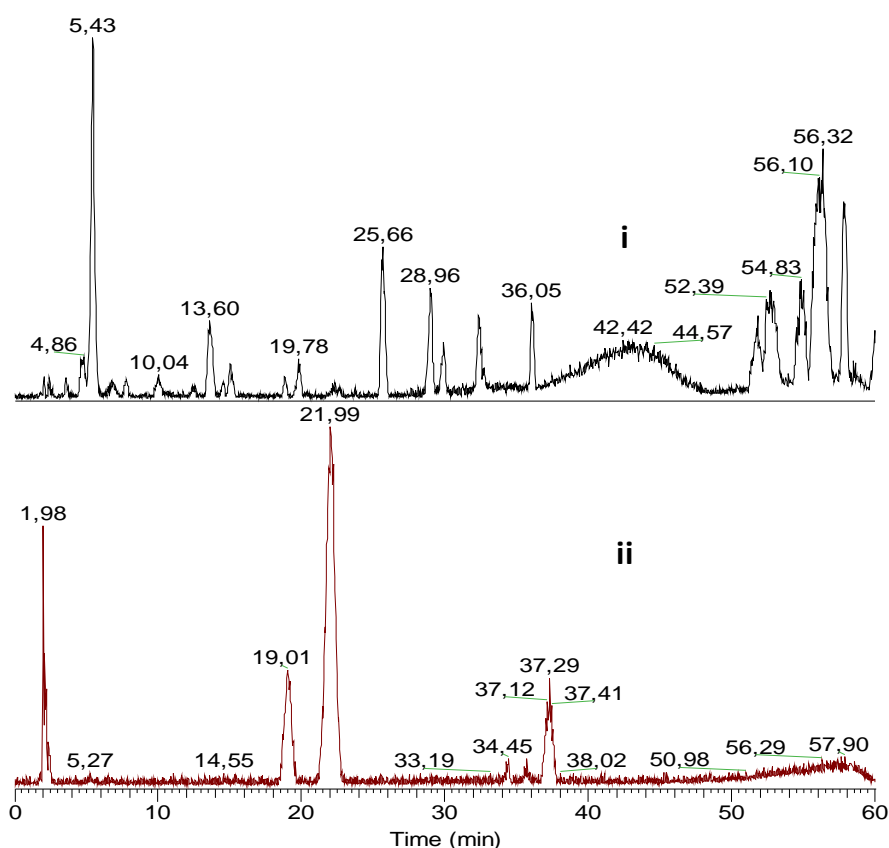


Figura 3.12 – Cromatogramas da amostra de cacho de uva: (i) Fracção de EtOAc e (ii) Fracção de MeOH.

Numa primeira análise, verificou-se que a eluição com EtOAc eluiu mais compostos que a eluição com MeOH.

Começando pelo cromatograma da fracção de EtOAc, verificou-se que os primeiros compostos a serem eluídos pertenceram à classe dos flavan-3-óis de maior massa molecular. Analisando os respectivos espectros de massa, confirmou-se que o pico maioritário aos 5,43 minutos, m/z 865, corresponde a uma procianidina trimérica do tipo C ou do tipo T (Anexo A.1.). Duas procianidinas diméricas do tipo B, m/z 577 foram detectadas aos 5,72 e aos 10,04 minutos e outra do tipo galhato, m/z 729, aos 13,60 minutos. Os espectros de massa de MS² e MS³ de ambas são apresentados em

anexo (Anexos A.2. e A.4.). A fragmentação destes compostos difere significativamente no que diz respeito à intensidade relativa dos iões, e, por isso, existem estudos de espectrometria de massa tandem para sequência destes compostos. (9) Observaram-se perdas de 18 Da relativas a moléculas de água, 108 Da relativas a um resíduo de catecol, 152 Da de reacções de retro Diels-Alder (RDA) e ainda de 288 Da relativas à perda de uma unidade de (epi)catequina.

A catequina e/ou a epicatequina, m/z 289 também foi identificada aos 7,80 minutos (Anexo A.3.). Ao tempo de retenção de 19,78 detectou-se um ião m/z 509 que não se conseguiu identificar.

Nesta fracção foram também identificados dois flavonóis. O primeiro flavonol eluiu aos 28,96 minutos apresentando um ião m/z 463. No espectro de massa MS^2 (Anexo A.9.) observou-se uma perda de 162 Da proveniente de um açúcar (glucose ou galactose). A distinção destes dois isómeros, assim como, a posição em que estes se ligam à aglicona poderia ser determinada através de análises de MS/MS mais detalhadas. O fragmento $[M-H-Glu]^- = 301$ verificou-se que podia corresponder a duas agliconas diferentes: a uma quercetina ou a um ácido elágico ou se $[M-2H-Glu]^- = 301$ que corresponderia a uma delfinidina (antocianidina). Por comparação do espectro de massa de MS^3 com a base de dados de espectros de massa (MassBank) (10) confirmou-se que o fragmento correspondia a uma quercetina, sendo o ião m/z 463 uma quercetina-*O*-glucósido. O outro flavonol identificado exibiu um ião m/z 461 e foi eluído aos 22,34 minutos tendo-se verificado que se tratava de um kaempferide (ou metilkaempferol)-*O*-glucósido (Anexo A.6.). Estes dois compostos foram também identificados nos outros constituintes das uvas como é visível pela Tabela 3.3.

Além dos flavonóis, dois compostos do grupo dos flavanonóis também foram identificados. Um ião m/z 449 foi detectado aos 25,66 minutos. O espectro de MS^2 (Anexo A.13.) apresentou um fragmento a m/z 303 que verificou-se corresponder a uma aglicona (Y_0^-) após uma perda de 146 Da relativa a uma ramnose. Por sua vez, visualizando o espectro de MS^3 confirmou-se a identidade da aglicona como sendo uma Dihidroquercetina ou Taxifolina. Assim sendo o composto de m/z 449 corresponde a uma Astilbina (Dihidroquercetina 3-*O*-ramnose). O outro flavanonol detectado aos 29,31 minutos apresentou um ião m/z 433 que foi identificado como uma Engeletina (Dihidrokaempferol 3-*O*-ramnose). O espectro de massa de MS^3 deste composto (Anexo A.14), tal como no caso anterior, revelou a presença da aglicona (Dihidrokaempferol ou Aromadedrina), $[Y_0^-] = 287$ com a perda de 146 Da do açúcar.

Um composto de m/z 453 eluiu a dois tempos de retenção 32,33 e 36,05 minutos. Pela proximidade dos tempos de retenção foi possível afirmar que ou são dois isômeros do mesmo composto ou existe a presença de dois compostos com a mesma massa. Por sua vez, os espectros de massa de MS^2 indicaram perdas maioritárias de 94 Da (C_6H_6O). Uma vasta pesquisa bibliográfica permite sugerir que estes compostos sejam estruturas diméricas do resveratrol: δ -viniferina, ϵ -viniferina e/ou pallidol (Figura 1.7.) Assim, por comparação dos espectros de MS^2 obtidos (Anexo A.15.) com um espectro de massa da referência (11), pareceu provável que os compostos eluídos aos 32,33 e 36,05 minutos fossem ϵ -viniferina (dímero do resveratrol).

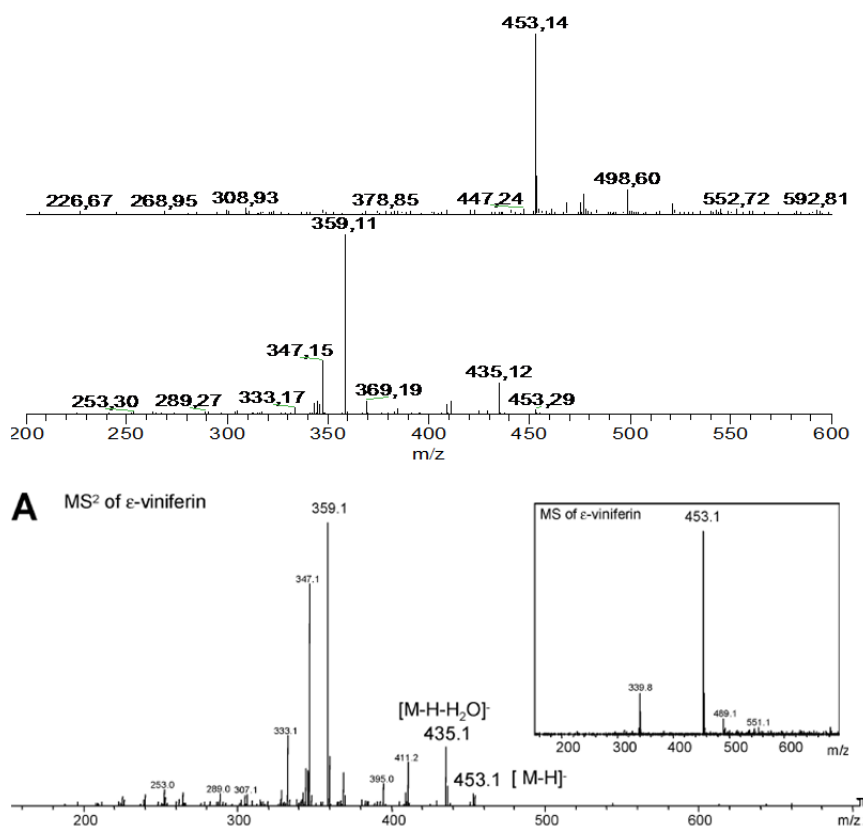


Figura 3.13 – Espectros de MS e MS^2 da ϵ -viniferina obtidos e comparação com a literatura. (11)

Considerando o cromatograma da fracção de metanol, menos compostos foram eluídos, sendo que, após identificação verificou-se pertencerem ao grupo dos flavonóis. Além do kaempferide-*O*-glucósido ($tr = 19,69$ min) também eluído na fracção de acetato de etilo, foi detectado aos 13, 59 minutos um ião m/z 447 que após uma perda de 162 Da formou um fragmento m/z 285. Pela base de dados MassBank (10) confirmou-se a presença de kaempferol, sendo então composto um kaempferol-*O*-glucósido. Foi também detectado um ião m/z 607 ($tr = 34,10$ min e $tr = 37,11$ min), cujo espectro de MS^2 exibiu uma perda de 308 Da relativa a um dissacárido de rarnnose e glucose e que

formou o ião $Y_0^- = 299$. Contudo, foi também observada a perda de 146 Da de uma unidade de ramnose pela presença do fragmento $Y_1^- = 461$. Por sua vez, o ião $Y_0^- = 299$ poderia ser indicativo de um kaempferide ou na presença de $[M-2H]^- = 299$ de uma antocianina (peonidina). Através da base de dados Massbank (10) comprovou-se que este ião correspondeu a um kaempferide e portanto o composto mais provável para o ião m/z 607 seria um kaempferide-O-diglucósido (Anexo A.7.).

3.3.2. Pele

A Figura 3.14 ilustra os cromatogramas obtidos de cada fracção de SPE da solução de 200 mg mL^{-1} de pele de uva.

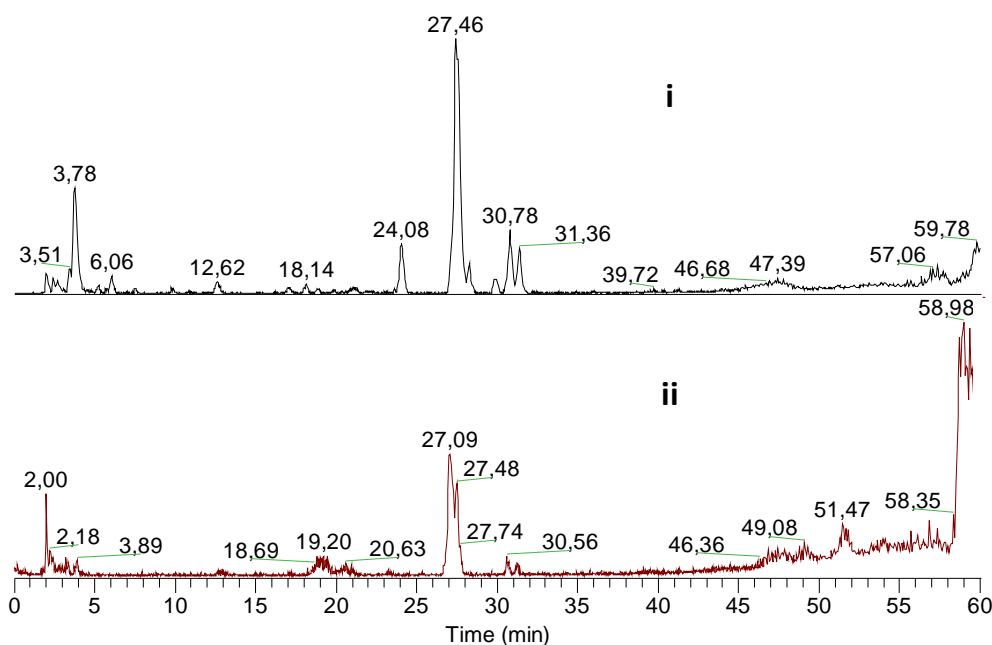


Figura 3.14 – Cromatogramas da amostra de pele de uva: (i) Fracção de EtOAc e (ii) Fracção de MeOH.

Na fracção de acetato de etilo, como sucedido em todas as amostras, os primeiros compostos eluídos foram flavan-3-óis. Neste caso, foi apenas identificada e somente nesta fracção, uma procianidina do tipo B, m/z 577, aos 3,78 minutos. Não foi possível identificar os iões m/z 371 aos 6,06 minutos, m/z 412 aos 12,62 minutos e m/z 495 aos 24,08 minutos. O pico maioritário aos 27,46 minutos verificou-se corresponder a dois compostos co-eluídos. Um deles apresentou um ião m/z 463 correspondente a uma quercetina-O-glucósido já referida anteriormente enquanto o outro de m/z 477, após uma perda de 176 Da correspondente um resíduo de ácido glucurónico foi identificado como uma quercetina-O-glucuronido (Anexo A.10.).

Aos 30,78 minutos foi detectado um íon m/z 447 que após uma perda de 162 Da formou um fragmento m/z 285. Com o auxílio da base de dados Massbank (10) confirmou-se a presença de kaempferol, sendo então composto uma kaempferol-*O*-glucósido. Com este composto, ainda foi co-eluída uma quercetina-*O*-ramnose, m/z 447 (Anexo A.8.). Um composto de m/z 477 eluído aos 31,36 minutos apresentou uma perda de 162 Da (glucose ou galactose) e originou um fragmento $[M-H-Glu]^- = 315$ no espectro de MS^2 . Por sua vez, pelo espectro de MS^3 (Anexo A.12.) e com o auxílio da base de dados MassBank (10) verificou-se tratar de uma metilquercetina (Isorhamnetina), sendo o composto m/z 477 uma Isorhamnetina-*O*-glucósido.

Na fracção de metanol, os compostos que eluíram foram os dois derivados de quercetina, quercetina-*O*-glucósido m/z 463 e quercetina-*O*-glucuronido m/z 477. Além destes, foi também identificado um composto, correspondente ao íon m/z 609 cujo espectro MS^2 revelou uma perda de 308 Da relativa a um dissacárido de ramnose e glucose e originou um fragmento $[M-H-Diglu]^- = 301$ que pelo espectro de MS^3 (Anexo A.11.) revelou ser uma quercetina (quercetina-*O*-diglucósido).

3.3.3. Polpa

Para a análise da polpa foi preparada uma solução de 500 mg mL^{-1} de modo a visualizar-se picos nos cromatogramas.

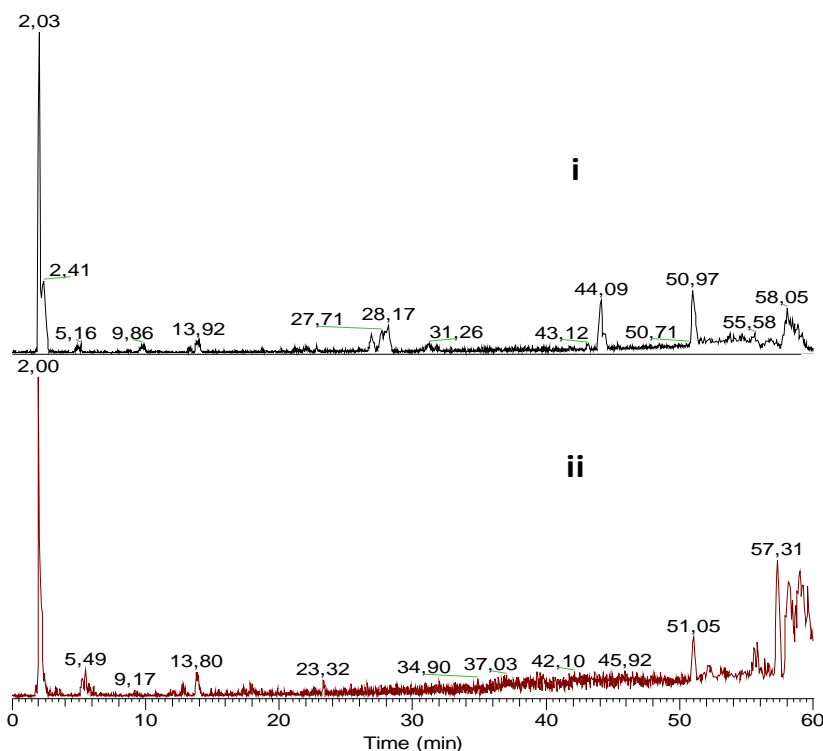


Figura 3.15 – Cromatogramas da amostra de polpa de uva: (i) Fracção de EtOAc e (ii) Fracção de MeOH.

Pela visualização dos cromatogramas e da Tabela 3.3 verifica-se que foi na polpa que se identificaram menos compostos. Na fracção de acetato de etilo foi apenas identificado um flavonol, quercetina-*O*-glucósido, m/z 463 aos 27,71 minutos. Aos 44,09 minutos detectou-se um ião m/z 658 que, no entanto, não se conseguiu identificar. Por sua vez, na fracção de metanol identificou-se apenas uma procianidina do tipo B m/z 577 aos 5,49 minutos. Em ambas as fracções, eluiu por volta dos 14 minutos, um composto correspondente ao ião m/z 412 que não se conseguiu identificar e aos 51 minutos um outro correspondente ao ião m/z 285. Não foi possível confirmar por MS/MS as duas estruturas possíveis, kaempferol ou luteolina.

3.3.4. Pedúnculos

Quando a amostra de 200 mg mL^{-1} dos pedúnculos foi eluída no SPE com $\text{H}_2\text{O} + \text{HCOOH}$ (pH=2,5) verificou-se uma coloração acastanhada pelo que decidiu-se injectar esta fracção. Por sua vez, a eluição com metanol não originou uma fracção de cor avermelhada como aconteceu com as outras partes da uva e por isso, a injeção desta não revelou a presença de picos, confirmando-se que os analitos foram todos eluídos nas fracções anteriores. Os cromatogramas obtidos para as fracções de $\text{H}_2\text{O} + \text{HCOOH}$ e EtOAc estão ilustrados na Figura 3.16.

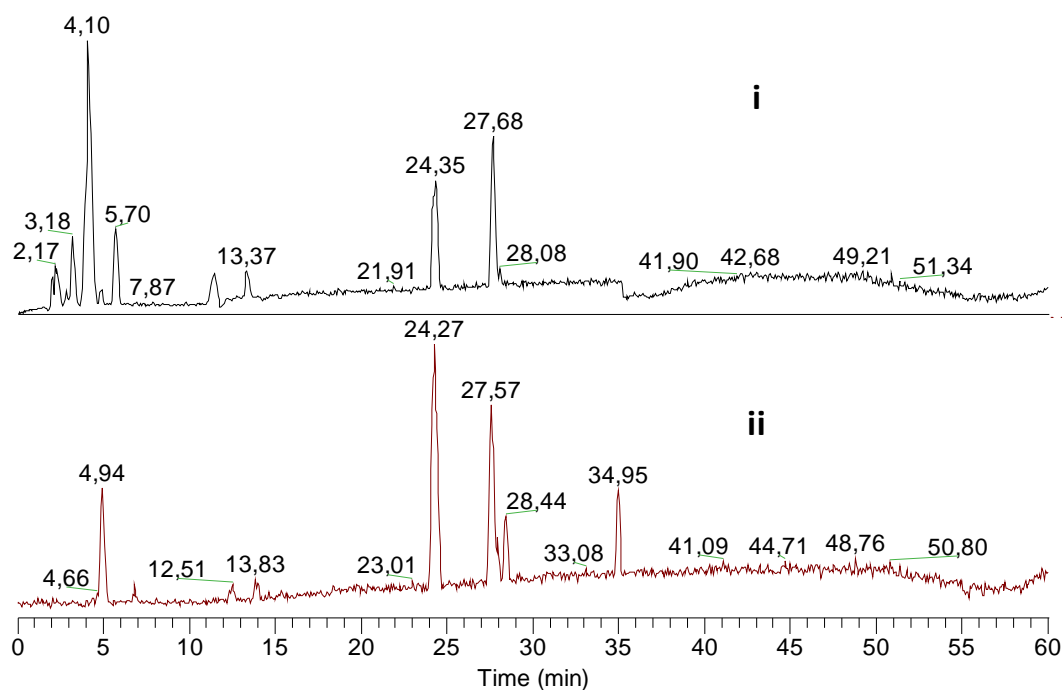


Figura 3.16 – Cromatogramas da amostra de pedúnculos de uva: (i) Fracção de $\text{H}_2\text{O} + \text{HOOH}$ e (ii) Fracção de EtOAc.

Tanto na fracção de H₂O + HCOOH como na fracção de EtOAc verificou-se que os primeiros compostos a serem eluídos foram flavan-3-óis. Em ambas detectou-se a presença do ião m/z 577 aos 4 e 13 minutos correspondentes a procianidinas do tipo B e do ião m/z 729 relativo a uma procianidina dimérica galhato. Além destes, os iões m/z 335 (tr = 6 min) e m/z 495 (tr = 24 min) foram também detectados, mas não se conseguiram identificar. Um ião m/z 477 foi identificado em ambas fracções (\approx 27,6 minutos) como sendo uma quercetina-*O*-glucuronido, após uma perda de 176 Da correspondente um resíduo de ácido glucurónico. Uma quercetina-*O*-glucósido, m/z 463, foi também identificada, mas apenas na fracção de acetato de etilo, tendo sido co-eluída juntamente com a quercetina-*O*-glucuronido. Foi ainda detectado aos 28 minutos em ambas as fracções, um ião m/z 609. No espectro de MS², a perda de 308 Da relativa a um dissacárido de rarnose e glucose formou o fragmento [M-H-Diglu]⁻ = 301 que pelo espectro de MS³ revelou ser uma quercetina (quercetina-*O*-diglucósido).

Na fracção de acetato de etilo identificou-se ainda um pico aos 28,44 minutos como sendo uma engeletina e outro aos 34,95 minutos como sendo uma ϵ -viniferina.

Tabela 3.3 – Compostos identificados nos diferentes constituintes da uva: (++) dois picos identificados.

Classe de Compostos	<i>m/z</i>			Cacho de Uva		Pele		Polpa		Pedúnculos	
	[M-H] ⁻	MS ²	MS ³	<i>EtOAc</i>	<i>MeOH</i>	<i>EtOAc</i>	<i>MeOH</i>	<i>EtOAc</i>	<i>MeOH</i>	H ₂ O + HCOOH	<i>EtOAc</i>
Flavan-3-óis											
Procianidina do tipo C ou T	865	847, 739, 713, 577	695, 677, 543, 425, 407	+							
Procianidina do tipo B	577	559, 451, 425	407, 273	++		+			+	++	++
(Epi) Catequina	289	245	227, 203, 187	+							
Dímero Procianidina galhato	729	711, 603, 577	559, 451, 425, 407, 289	+						+	+
Flavonóis											
Kaempferol- <i>O</i> -glucósido	447	285	257, 243, 147		+	+					
Kaempferide- <i>O</i> -glucósido	461	299	284, 255	+	+	+					
Kaempferide- <i>O</i> -diglucósido	607	299	284, 255		+						
Quercetina- <i>O</i> -ramnose	447	301	271, 255, 179, 151			+					
Quercetina- <i>O</i> -glucósido	463	301	271, 255, 179, 151	+		+	+	+			+
Quercetina- <i>O</i> -glucuronide	477	301	179, 151			+	+			+	+
Quercetina- <i>O</i> -diglucósido	609	301	271, 255, 179, 151			+	+			+	+
Isorhamnetina- <i>O</i> -glucósido	477	315	285, 271, 243			+					
Flavananóis											
Astilbina	449	431, 303	285, 177	+							
Engeletina	433	287, 269	225	+							+
Estilbenos											
ε-viniferina ou Pallidol	453	435, 359, 347	317, 265, 253	++							+

3.4. Estudo metrológico da curva de calibração do resveratrol

Neste trabalho procedeu-se ainda ao traçado de uma curva de calibração numa gama de concentrações entre 10^{-5} e 10^{-8} M. Esta curva seria utilizada para quantificação do resveratrol nas uvas, contudo, como este analito não foi detectado, apenas um seu dímero, decidiu-se aproveitá-la para realizar um pequeno estudo metrológico.

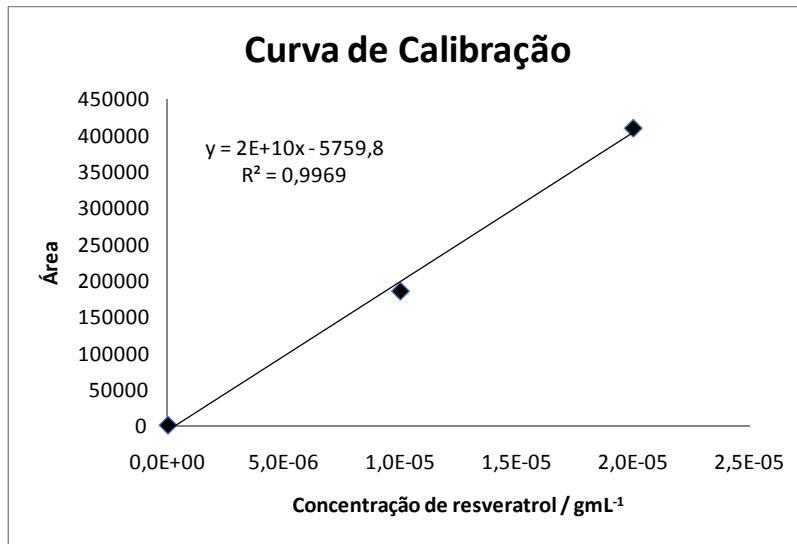


Figura 3.17 – Curva de Calibração do Resveratrol.

À curva de calibração inicial foram retirados dois pontos que apresentavam área de pico semelhante aos primeiros pontos da curva de calibração apresentados e, por isso, conduziam à construção de uma linha de regressão menos adequada para descrever a resposta instrumental nas concentrações mais elevadas. Por outro lado, o conhecimento do desempenho às concentrações mais baixas é particularmente útil no cálculo dos limites de detecção e de quantificação (Anexo B1) da componente instrumental (HPLC). Segundo o Guia OGC002 do IPAC (12), estes dois parâmetros, podem ser determinados teoricamente, a partir da estatística de mínimos quadráticos (método dos mínimos quadráticos) da recta de calibração, admitindo-se que o desvio-padrão residual ($S_{y/x}$) representa o desvio-padrão do branco e interpolando o correspondente valor em concentração, isto é:

$$LD = \frac{3 s_o}{b} \quad e \quad LQ = \frac{10 s_o}{b} \quad , \quad \text{sendo } s_o \approx S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_{teórico} - y_{experimental})^2}{n - 2}}$$

Se a gama de concentrações for heteroscedástica, ou seja, não se verifica a homogeneidade de variâncias (Anexo B2), este método conduz a valores de LD

sobrestimados (i.e. mais elevados do que o real). Os valores de LD e LQ obtidos encontram-se na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Valores de LD e LQ calculados.

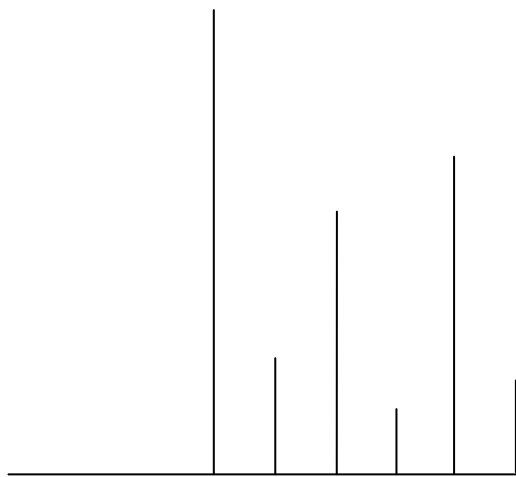
	gmL ⁻¹	µgmL ⁻¹
LD	2,357E-06	236
LQ	7,855E-06	786

Para que estes valores, pudessem ser comparados com valores obtidos na literatura (1), a metodologia de preparação e extração da amostra utilizada teria de ser a mesma.

3.5. Referências

1. Careri, M.; Corradini, C.; Elviri, L.; Nicoletti, I.; Zagnoni, I., Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry of cis-Resveratrol and trans-Resveratrol: Development, Validation, and Application of the Method to Red Wine, Grape, and Winemaking Byproducts. *Journal of agricultural and food chemistry* **2004**, *52*, 6868-6874.
2. Cho, Y.-J.; Hong, J.-Y.; Chun, H. S.; Lee, S. K.; Min, H.-Y., Ultrasonication-assisted extraction of resveratrol from grapes. *Journal of Food Engineering* **2006**, *77*, 725-730.
3. Tosun, İ.; İnkaya, A. N., Resveratrol as a Health and Disease Benefit Agent. *Food Reviews International* **2009**, *26*, 85-101.
4. Romero-Pérez, A. I.; Lamuela-Raventós, R. M.; Andrés-Lacueva, C.; de la Torre-Boronat, M. C., Method for the Quantitative Extraction of Resveratrol and Piceid Isomers in Grape Berry Skins. Effect of Powdery Mildew on the Stilbene Content. *Journal of agricultural and food chemistry* **2000**, *49*, 210-215.
5. Fan, E.; Lin, S.; Du, D.; Jia, Y.; Kang, L.; Zhang, K., Current separative strategies used for resveratrol determination from natural sources. *Analytical Methods* **2011**, *3*, 2454-2462.

6. Sun, B.; Ribes, A. M.; Leandro, M. C.; Belchior, A. P.; Spranger, M. I., Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *563*, 382-390.
7. Lee, J.-H.; Johnson, J. V.; Talcott, S. T., Identification of Ellagic Acid Conjugates and Other Polyphenolics in Muscadine Grapes by HPLC-ESI-MS. *Journal of agricultural and food chemistry* **2005**, *53*, 6003-6010.
8. Cuyckens, F.; Claeys, M., Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of mass spectrometry : JMS* **2004**, *39*, 1-15.
9. Deinzer, H.-J. L. a. M. L., Tandem Mass Spectrometry for Sequencing Proanthocyanidins. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1739-1748.
10. Horai, H.; Arita, M.; Kanaya, S.; Nihei, Y.; Ikeda, T.; Suwa, K.; Ojima, Y.; Tanaka, K.; Tanaka, S.; Aoshima, K.; Oda, Y.; Kakazu, Y.; Kusano, M.; Tohge, T.; Matsuda, F.; Sawada, Y.; Hirai, M. Y.; Nakanishi, H.; Ikeda, K.; Akimoto, N.; Maoka, T.; Takahashi, H.; Ara, T.; Sakurai, N.; Suzuki, H.; Shibata, D.; Neumann, S.; Iida, T.; Tanaka, K.; Funatsu, K.; Matsuura, F.; Soga, T.; Taguchi, R.; Saito, K.; Nishioka, T., MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of Mass Spectrometry* **2010**, *45*, 703-714.
11. Pezet, R.; Perret, C.; Jean-Denis, J. B.; Tabacchi, R.; Gindro, K.; Viret, O., δ -Viniferin, a Resveratrol Dehydrodimer: One of the Major Stilbenes Synthesized by Stressed Grapevine Leaves. *Journal of agricultural and food chemistry* **2003**, *51*, 5488-5492.
12. Acreditação, I. P. d. <http://www.ipac.pt/docs/documentos.asp> (Acedido a 24 de Julho de 2012).



Capítulo 4
CONCLUSÃO

A extracção dos compostos presentes nas uvas foi conseguida através de uma optimização das metodologias de preparação e extracção da amostra em que o passo de liofilização e de extracção em fase sólida (SPE) foram fundamentais.

A optimização das condições cromatográficas permitiu obter a separação dos compostos. Alguns analitos foram no entanto co-eluídos, como sucedeu com a quercetina-*O*-glucósido e a quercetina-*O*-glucuronido.

A utilização da biblioteca de espectros e das referências disponíveis permitiram identificar 15 compostos de quatro classes diferentes (flavan-3-óis, flavonóis, flavananóis e estilbenos), permanecendo no entanto alguns analitos por identificar.

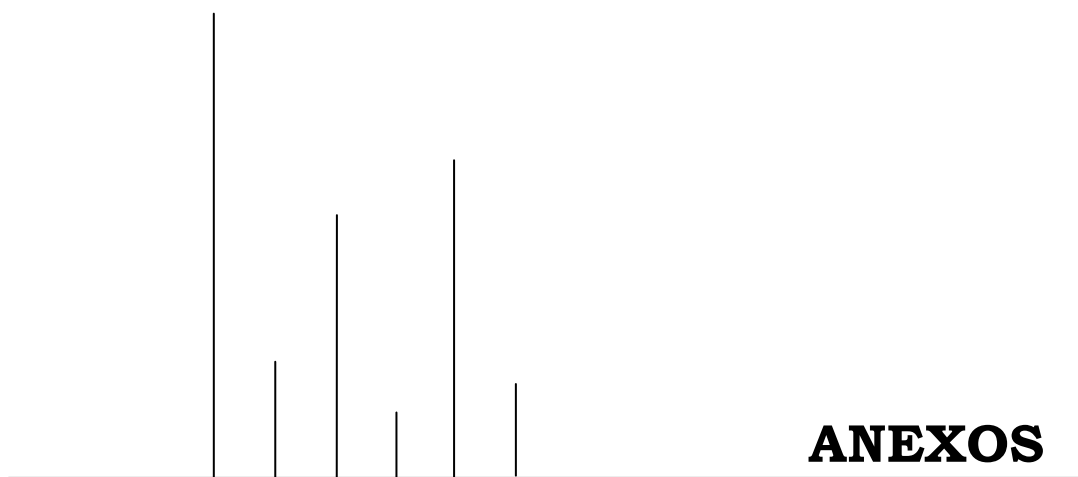
Um dos compostos identificados, m/z 607 corresponde possivelmente a um kaempferide-*O*-diglucósido, o qual, de acordo com as referências disponíveis não foi anteriormente identificado nas uvas.

O resveratrol não foi identificado em nenhuma parte da uva, mas a presença do dímero do resveratrol poderá ser indicativa da presença inicial deste composto. Uma justificação possível para não ter sido detectado pode ser o facto da presença de estilbenos, incluindo o resveratrol, nos tecidos vegetais estar associada a factores abióticos (radiação UV), e no caso das uvas, da variedade e da maturidade.

A pele foi o constituinte da uva onde se identificou maior número de compostos enquanto na polpa foi identificado apenas um composto por fracção. Nos pedúnculos foram também identificados alguns compostos, incluindo o dímero do resveratrol e a engeletina, composto característico das uvas.

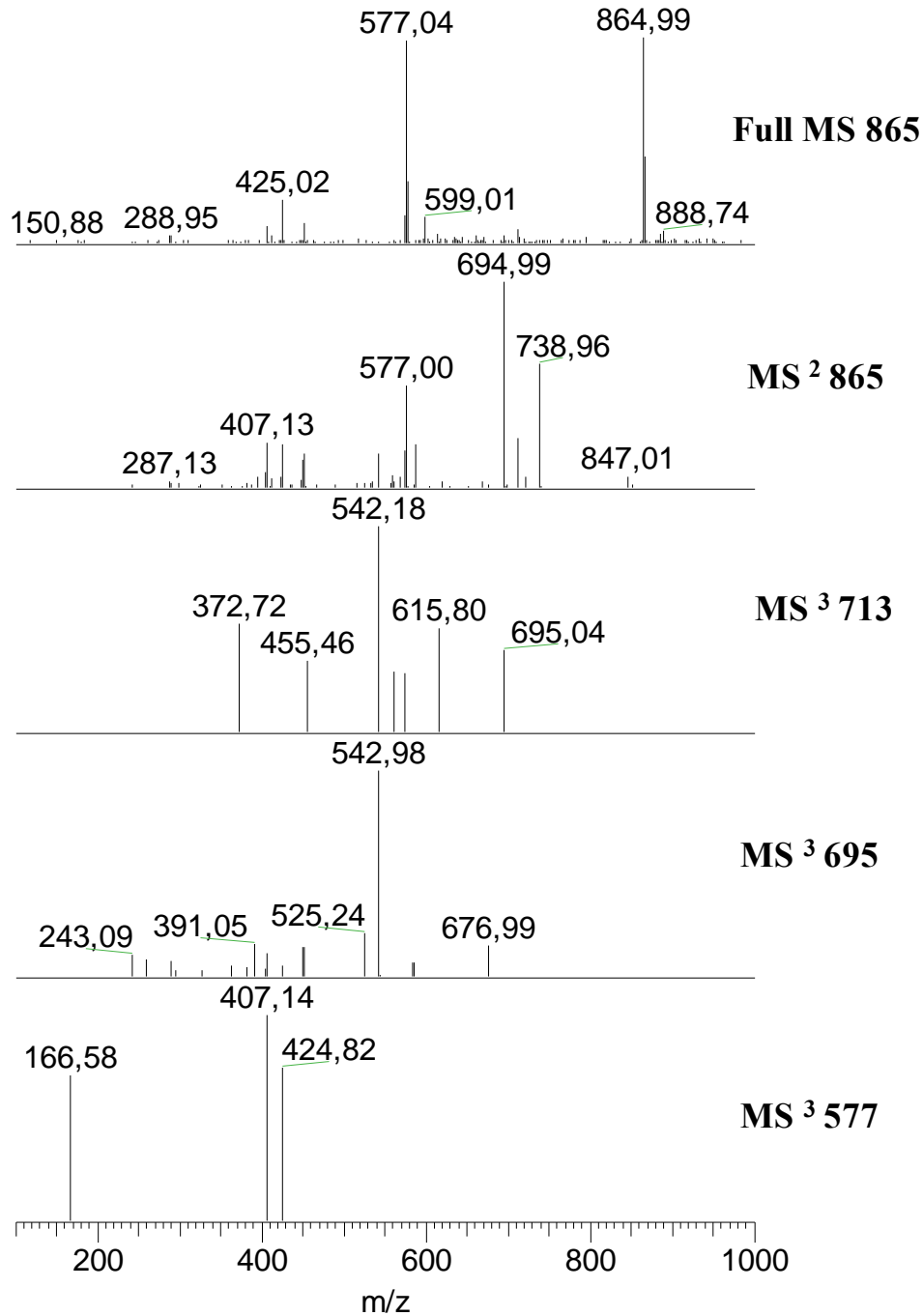
Os cálculos semiempíricos demonstraram que a desprotonação ocorre preferencialmente no grupo fenol da molécula de resveratrol e que os rearranjos por transferência de hidrogénio formam estruturas mais estáveis.

O estudo da curva de calibração do resveratrol permitiu calcular o LD e o LQ da componente instrumental.

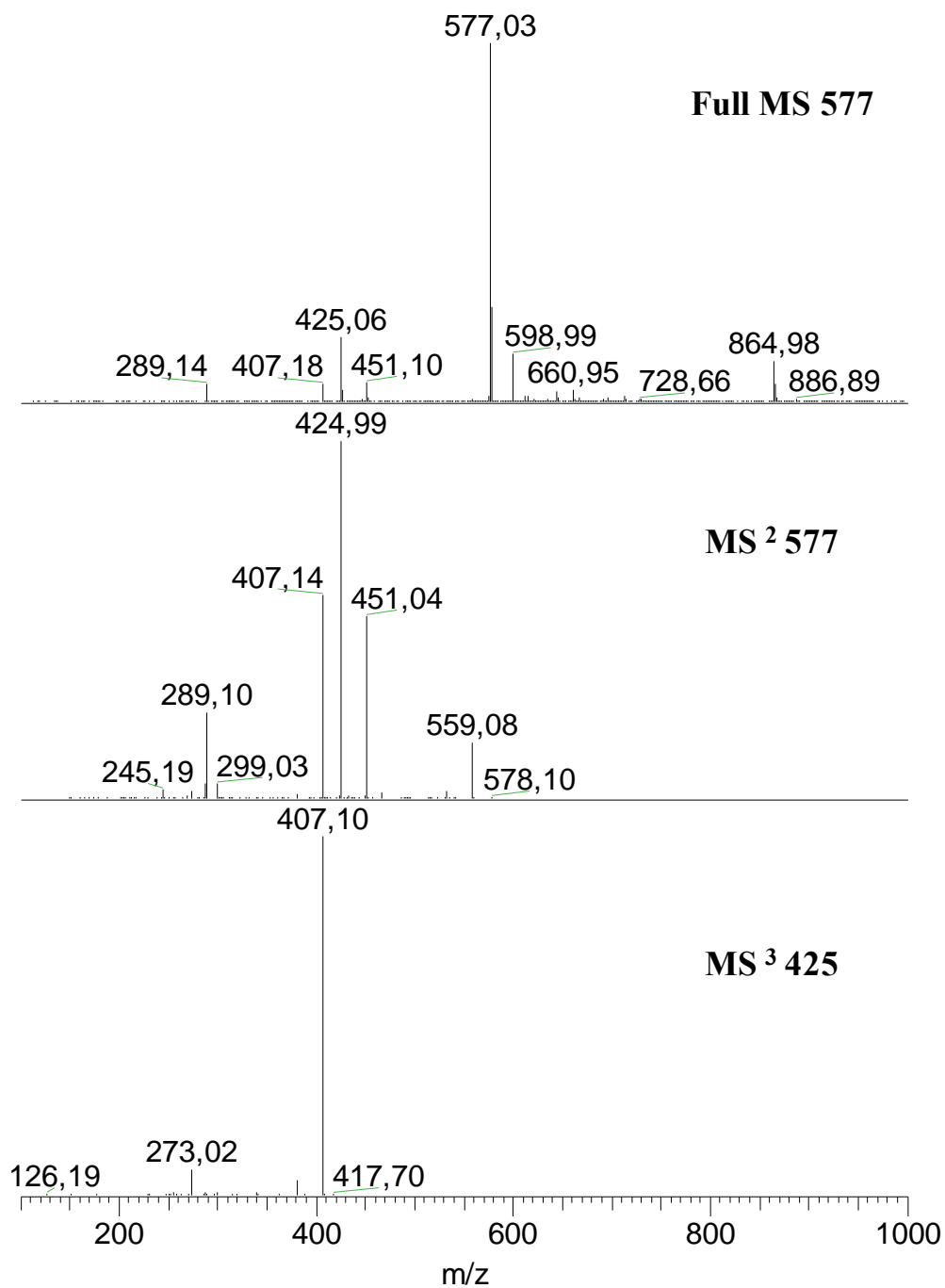


A. Espectros de massa dos compostos presentes nas uvas

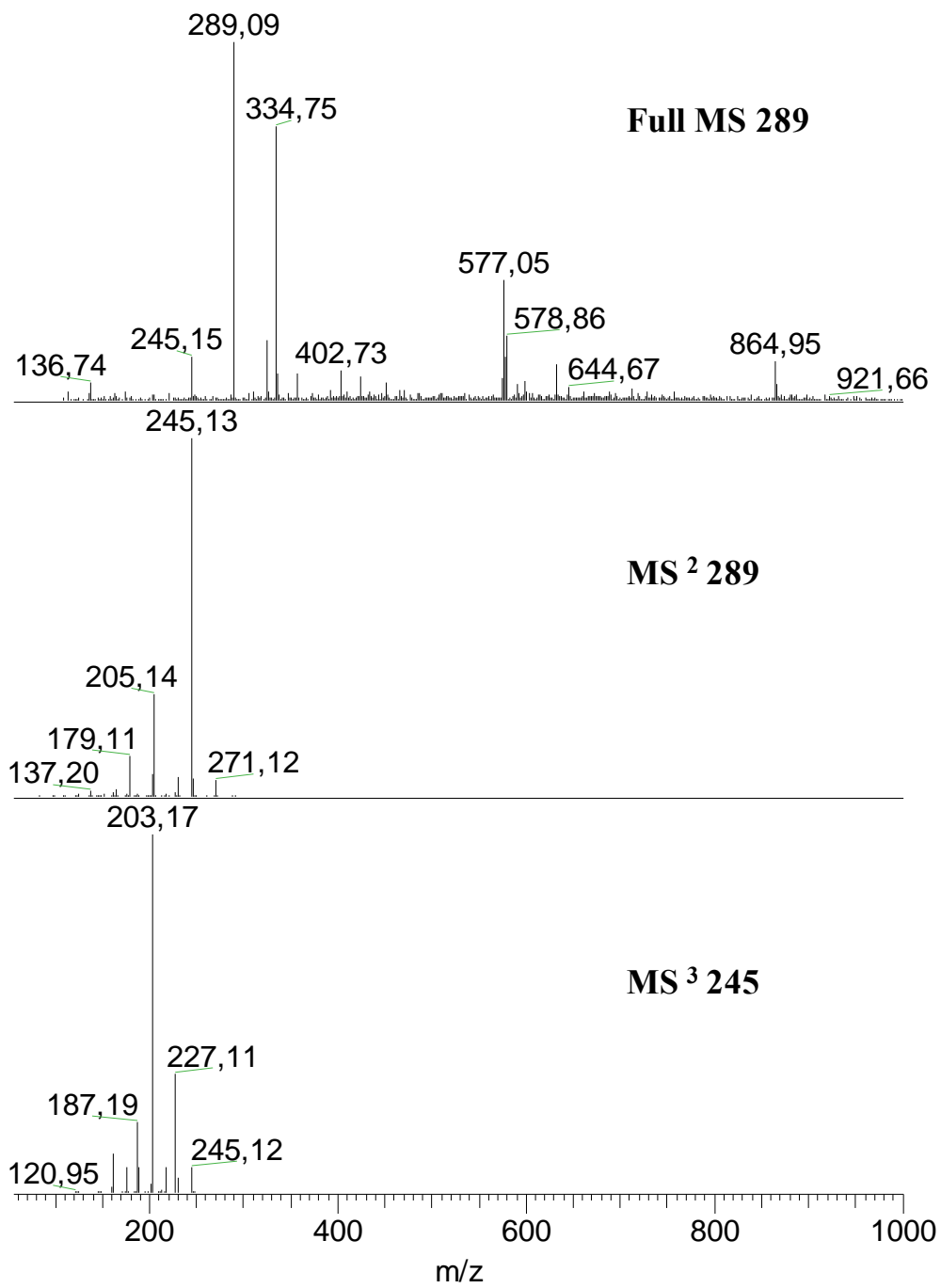
A.1. Procianidina do tipo C ou T



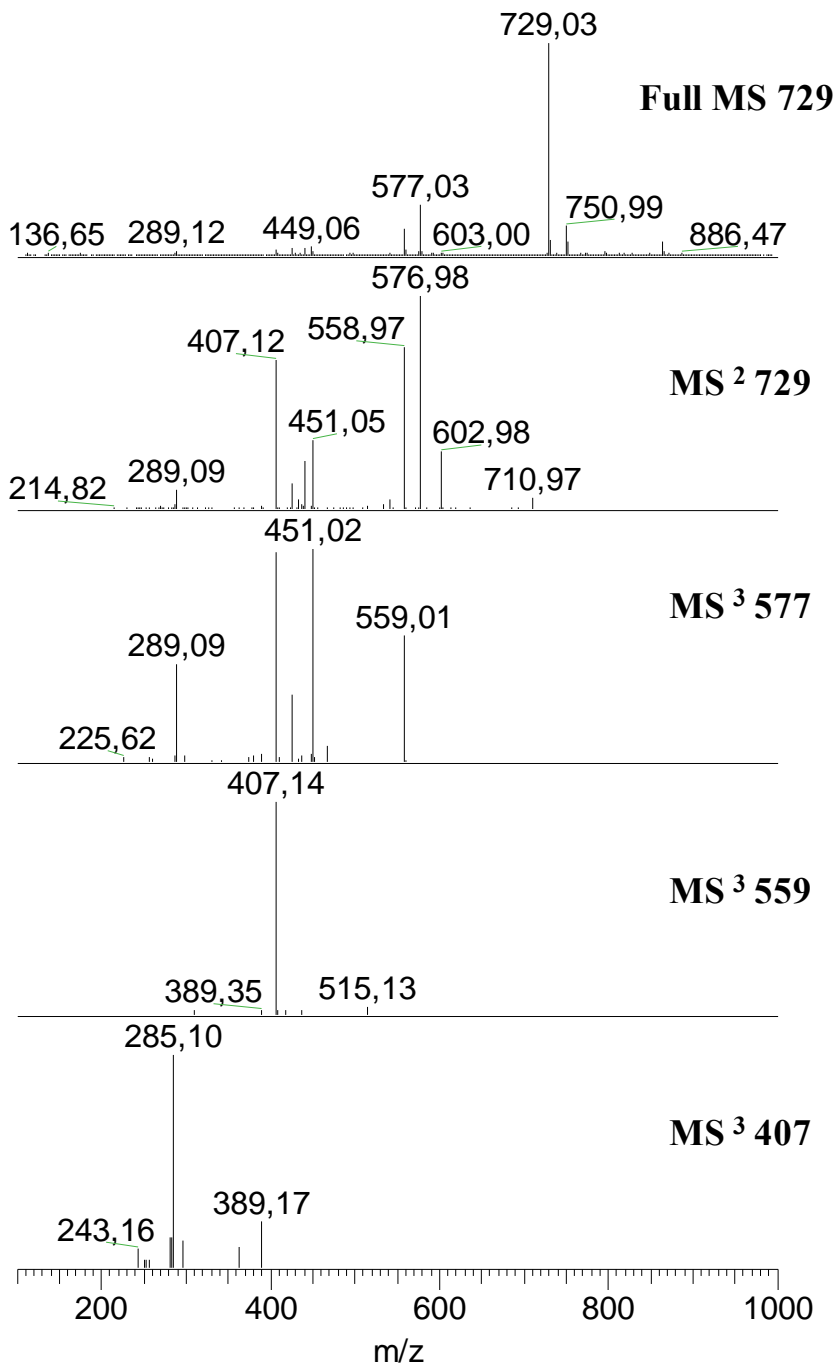
A.2. Procianidina do tipo B

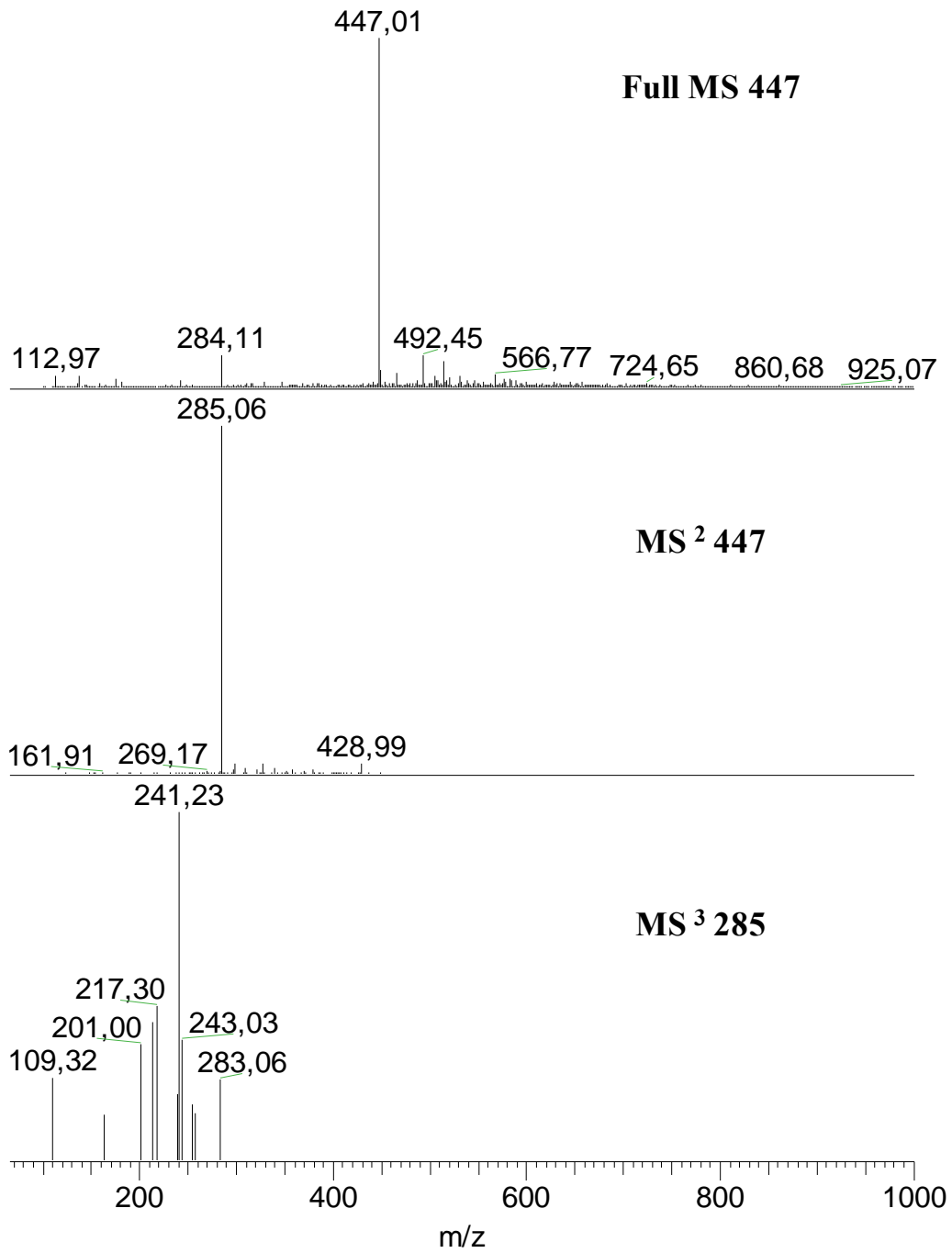


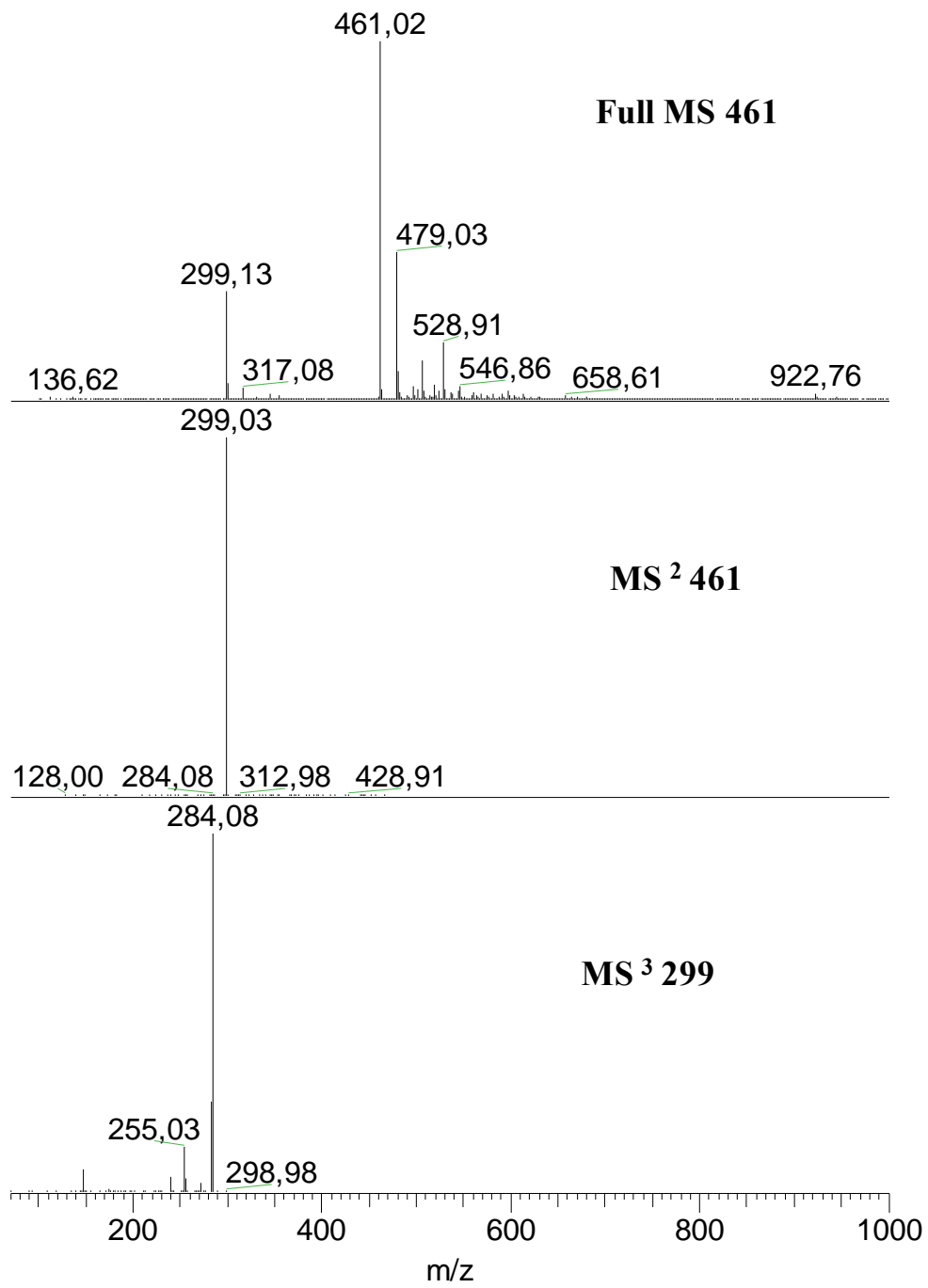
A.3. (Epi)Catequina

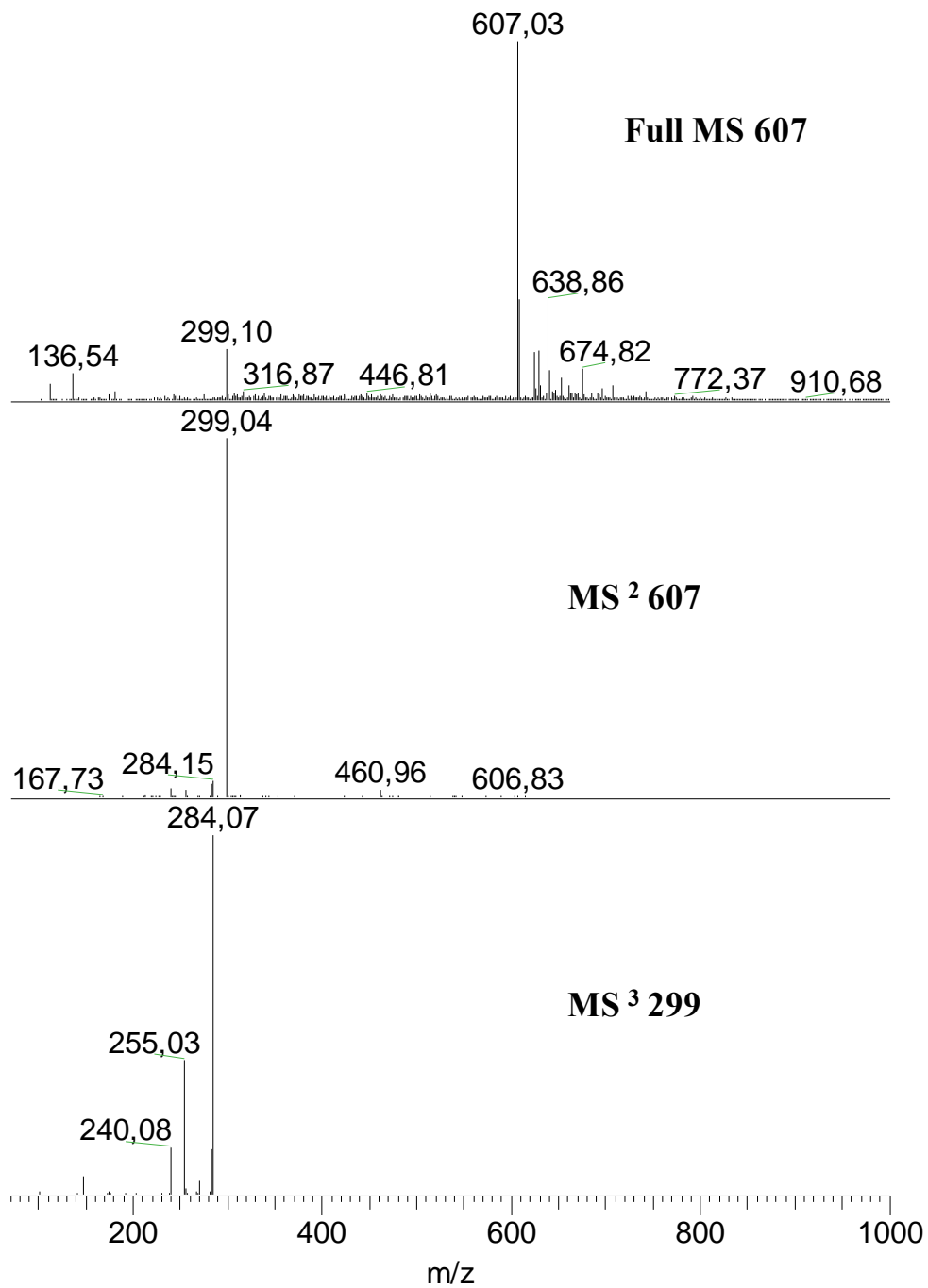


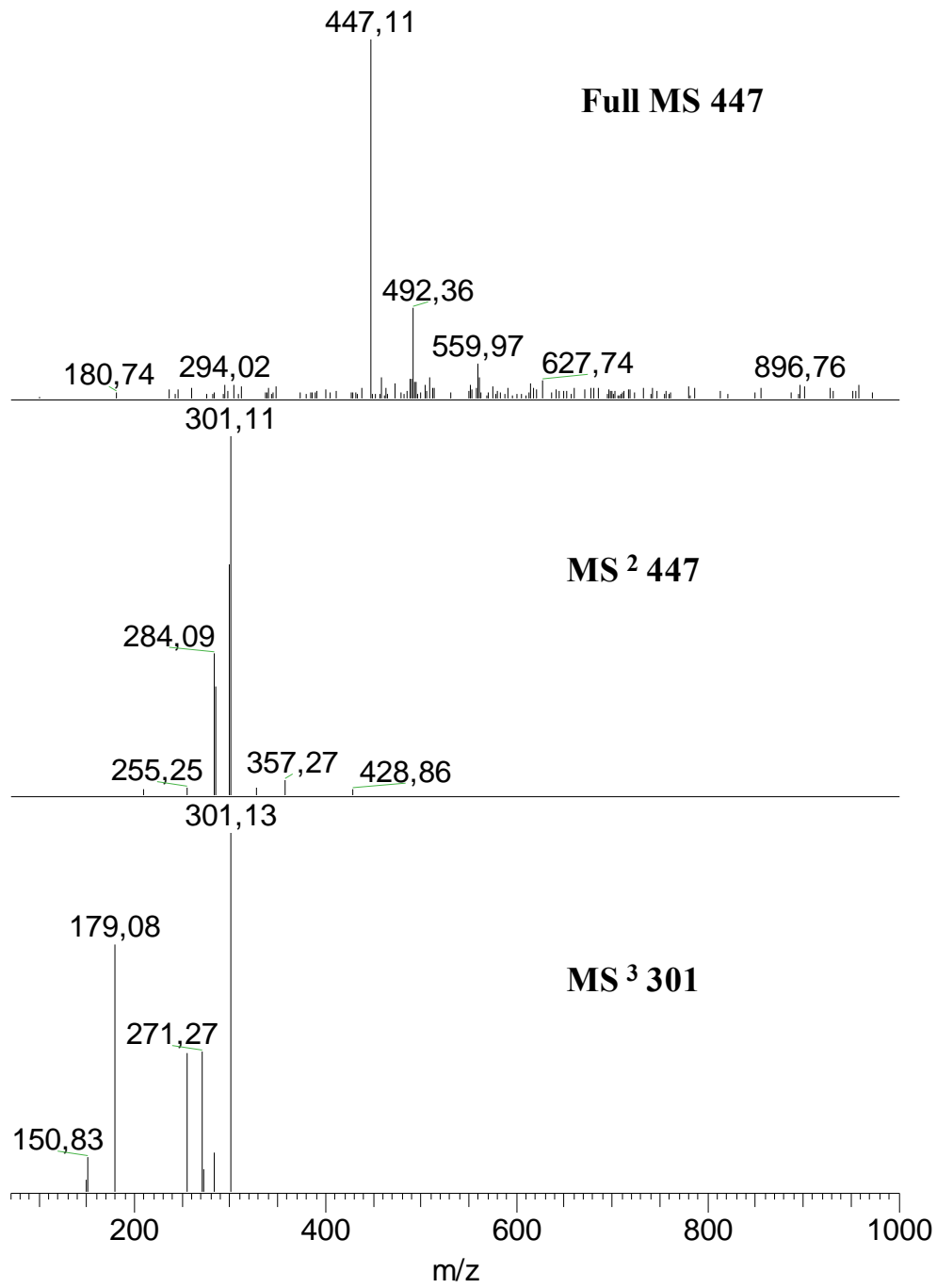
A.4. Dímero Procianidina Galhato

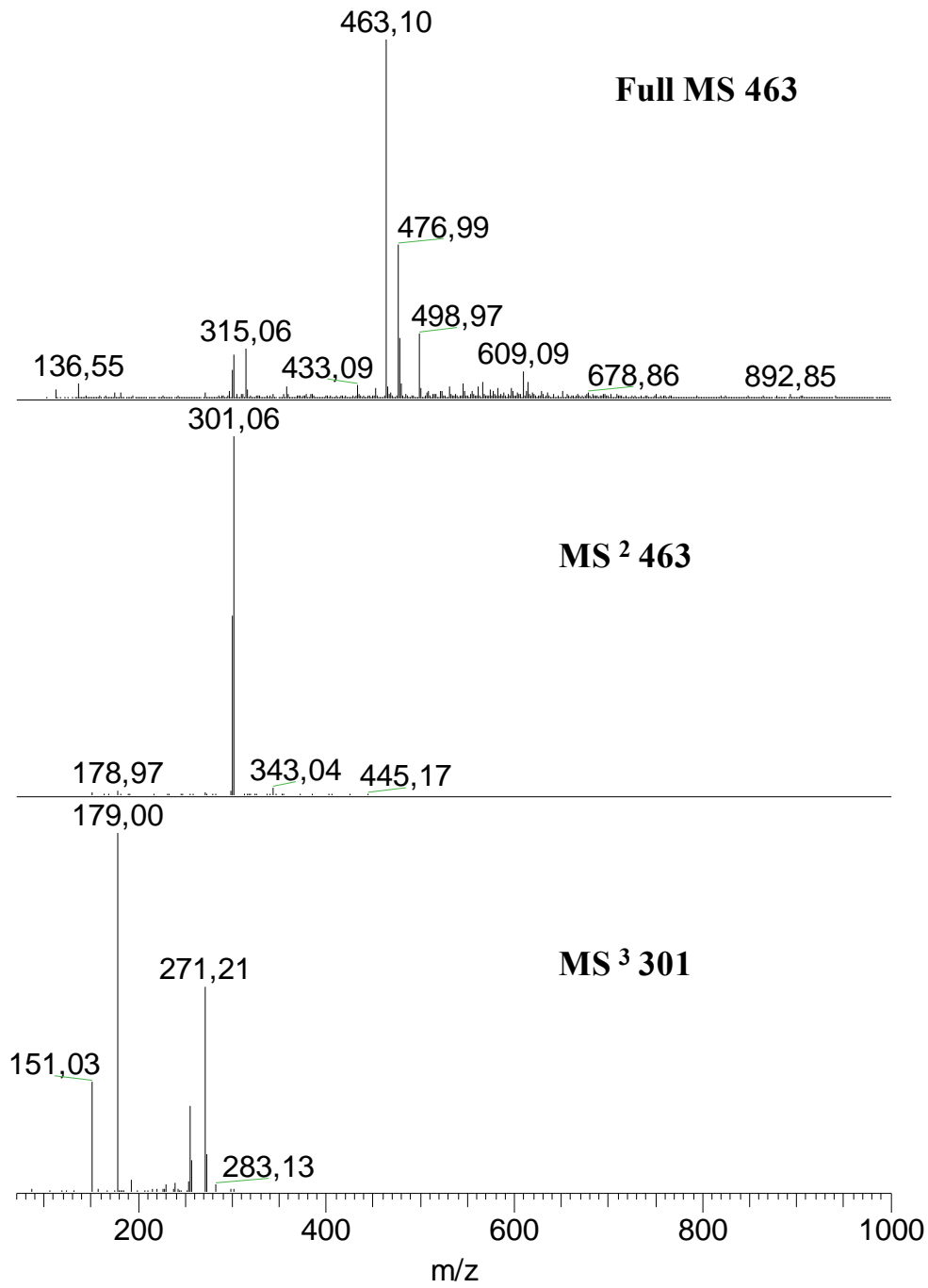


A.5. Kaempferol-*O*-glucósido

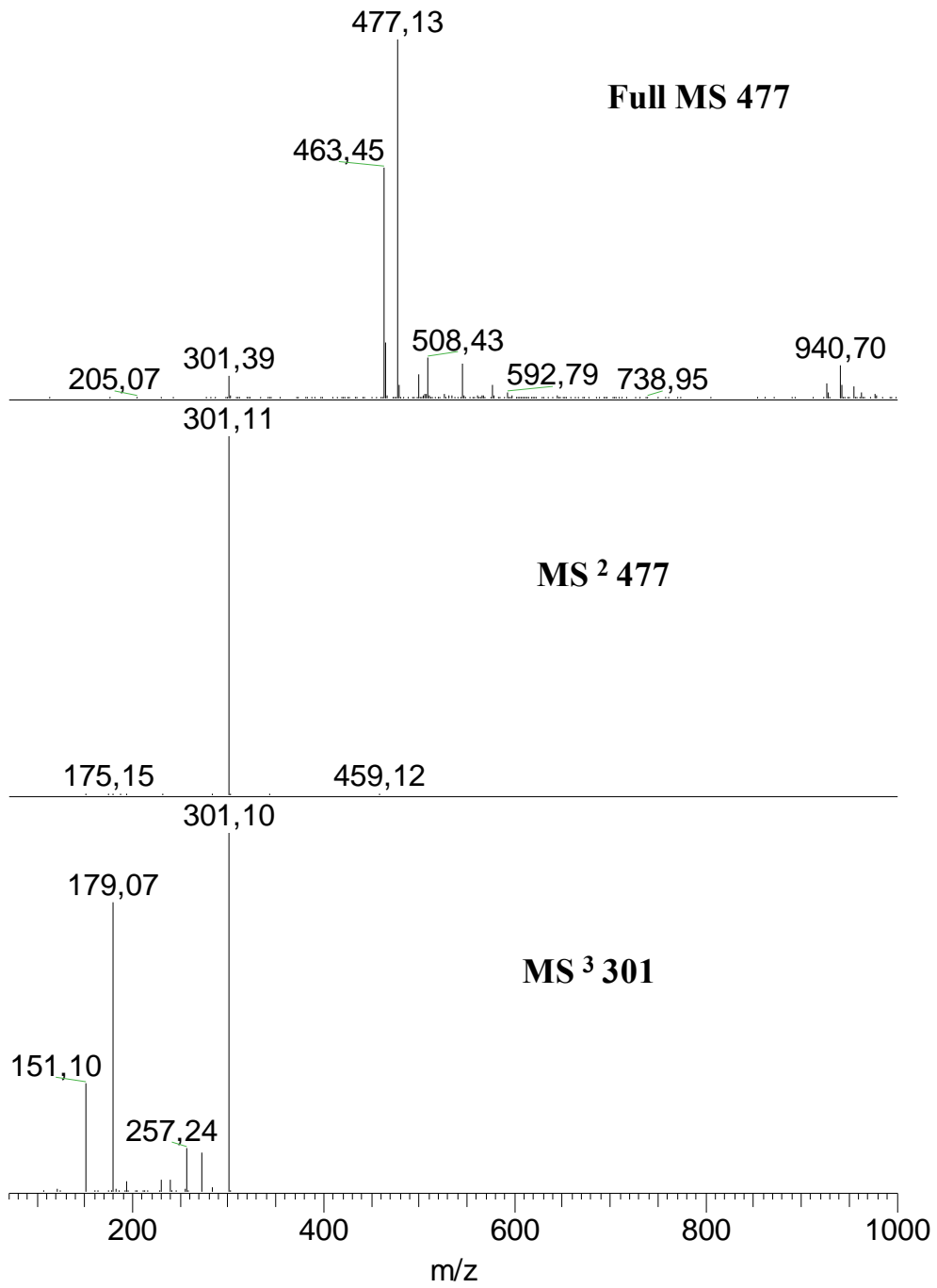
A.6. Kaempferide-*O*-glucósido

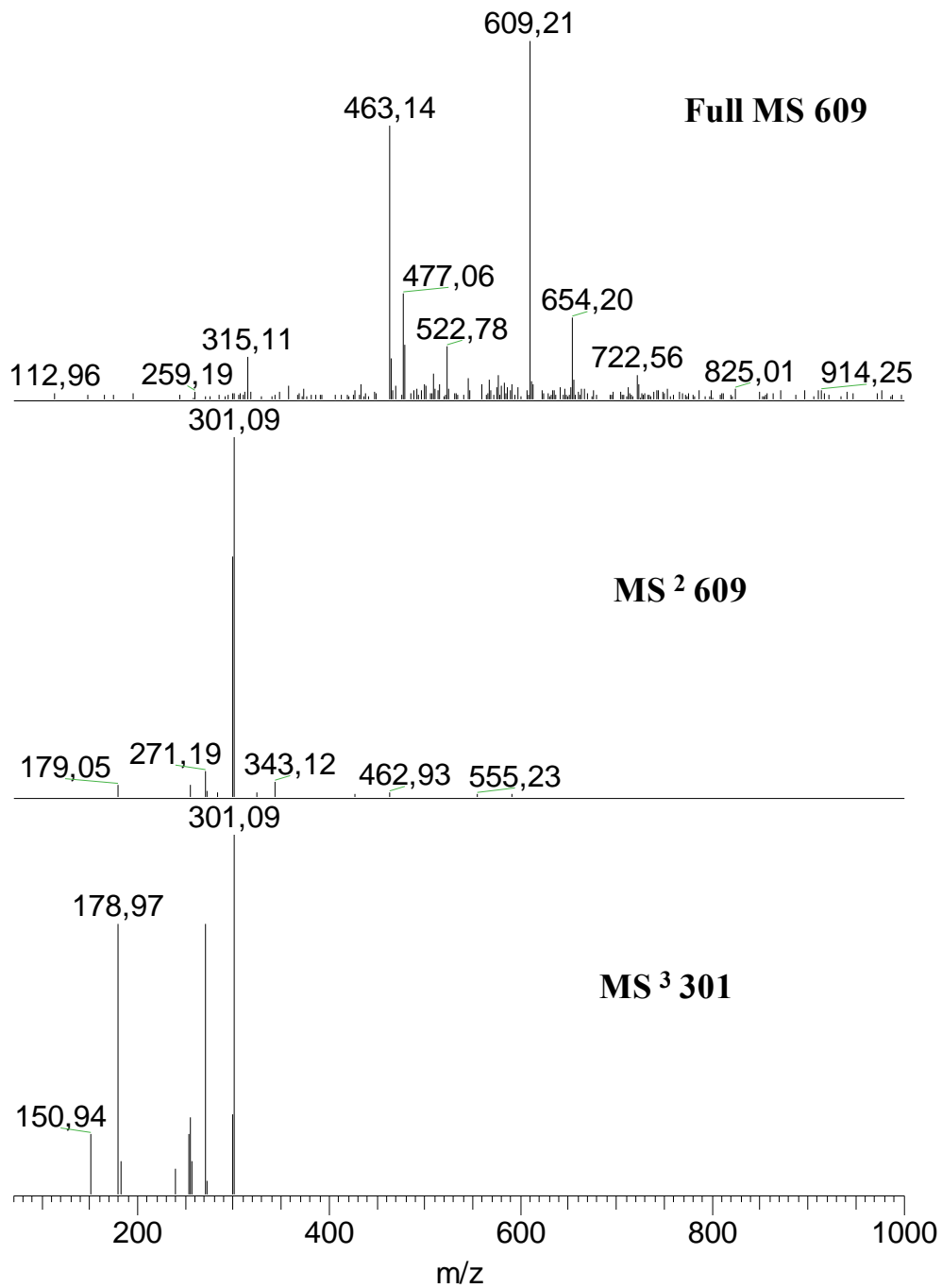
A.7. Kaempferide-*O*-diglucósido

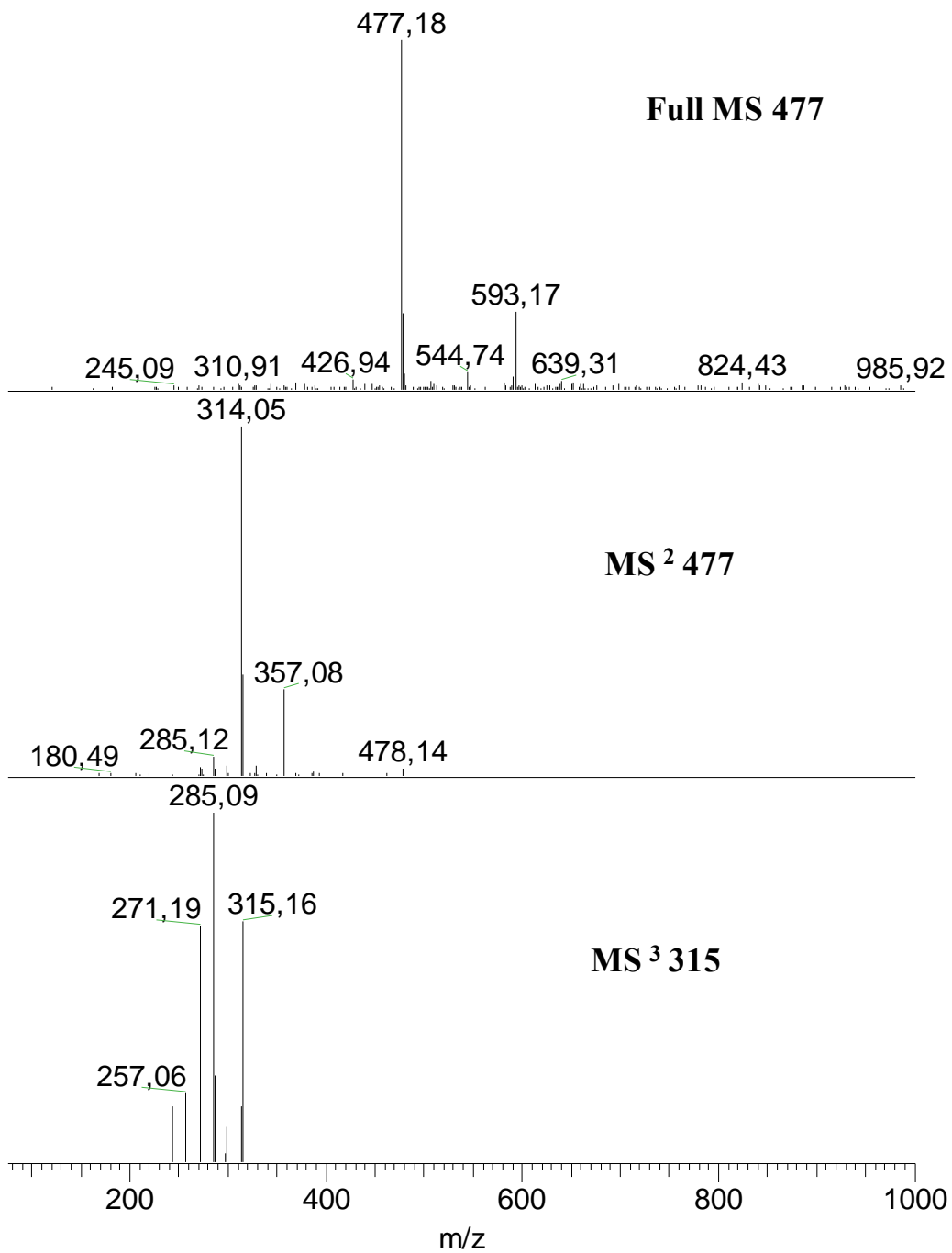
A.8. Quercetina-*O*-ramnose

A.9. Quercetina-*O*-glucósido

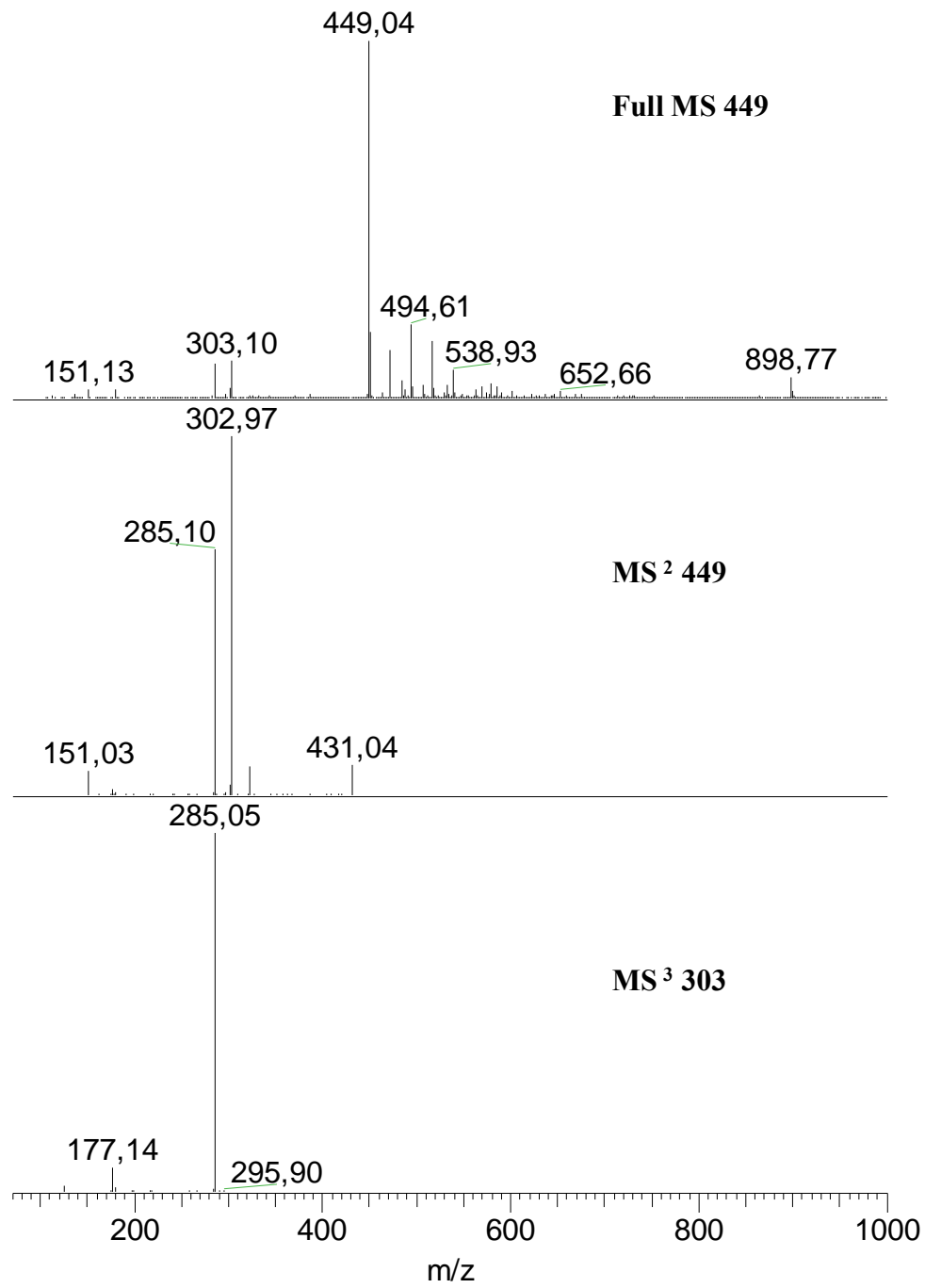
A.10. Quercetina-O-glucuronide



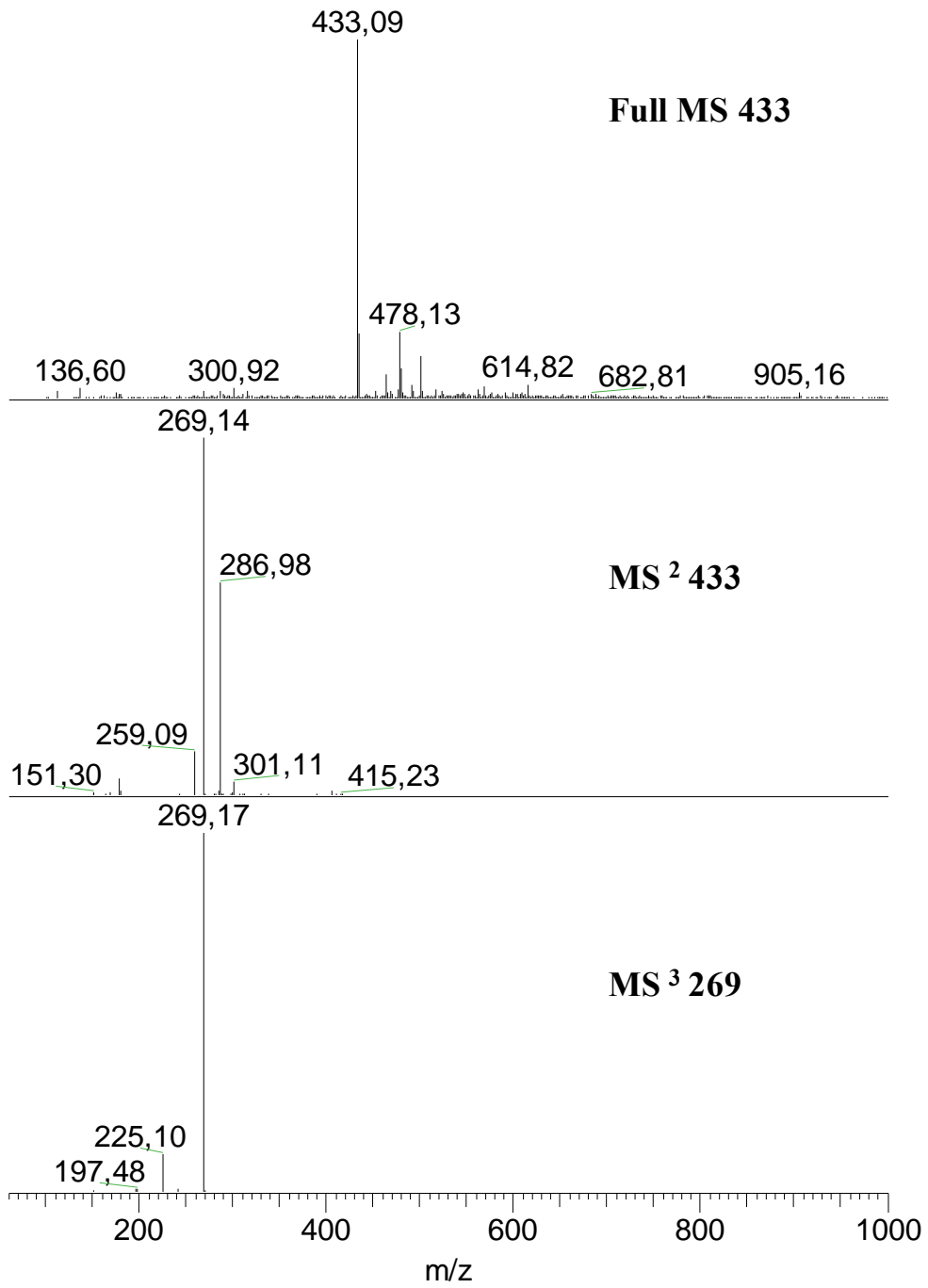
A.11. Quercetina-*O*-diglucósido

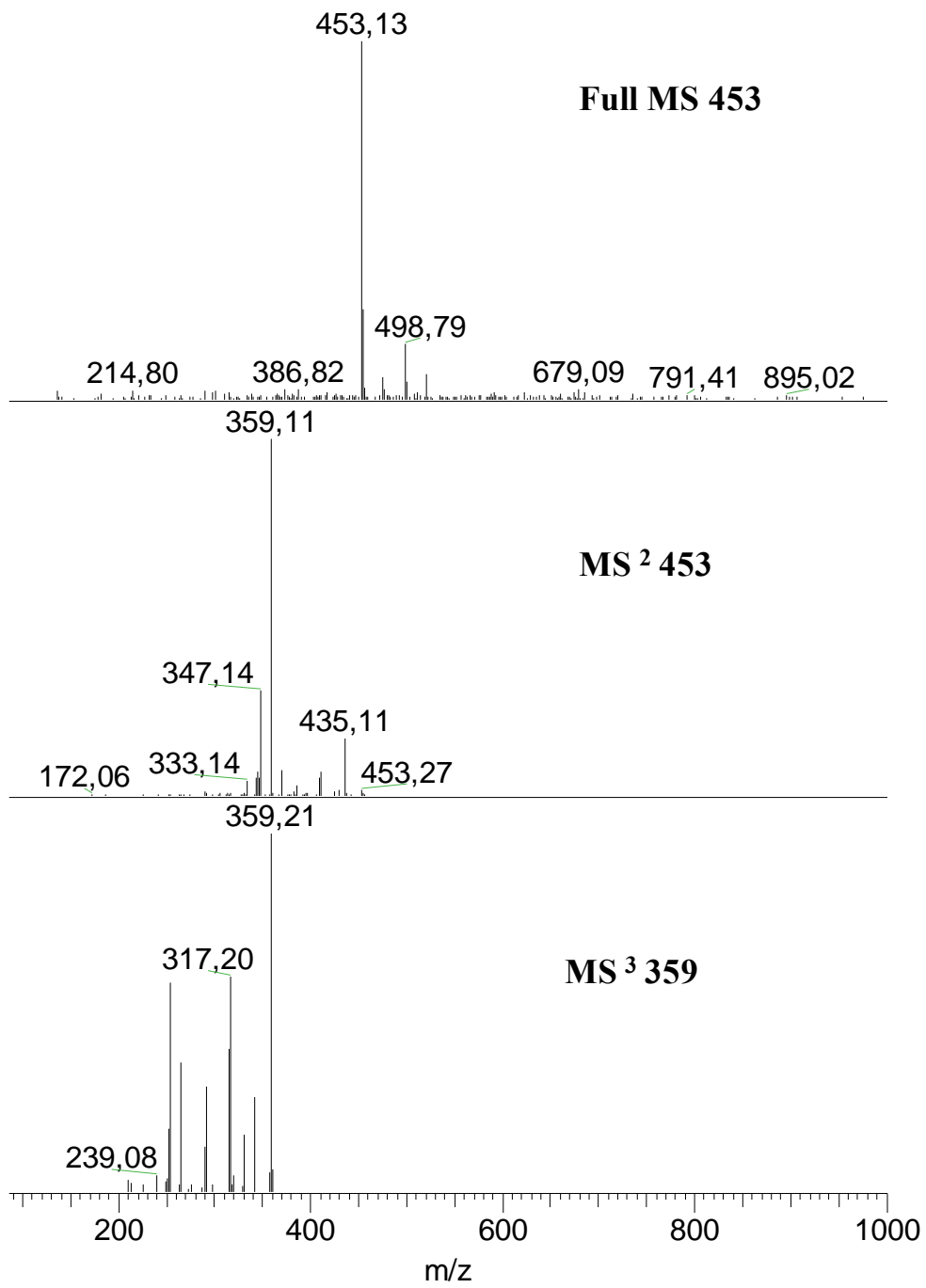
A.12. Isorhamnetina-*O*-glucósido

A.13. Astilbina



A.14. Engeletina



A.15. ϵ -viniferina

B. Definições metrológicas

B.1. Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Conforme a IUPAC, os conceitos de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método devem ser entendidos como:

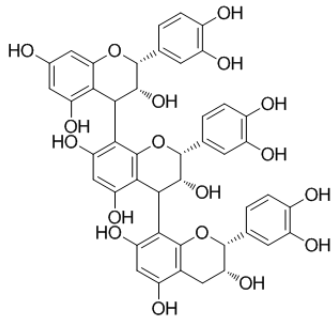
- O LD corresponde ao início do intervalo em que é possível distinguir com uma dada confiança estatística (normalmente 95%), o sinal do branco do sinal da amostra e como tal indicar se o analito em questão está ausente ou presente;
- O LQ corresponde ao início da gama em que o coeficiente de variação do sinal e o erro relativo se reduziram a valores razoáveis (normalmente 10%) para se poder efectuar uma avaliação quantitativa; deste modo, na prática deve usar-se o LQ como início da zona em que se reportam valores numéricos

Ainda seguindo as recomendações da IUPAC, o valor do LD corresponde a uma concentração que apresenta um sinal igual ao sinal médio do branco (x_0) acrescido de 3 vezes o desvio-padrão do branco ($LD = x_0 + 3 s_0$), enquanto o LQ envolve um acréscimo de 10 vezes o referido desvio-padrão ($LQ = x_0 + 10 s_0$). Contudo, estas fórmulas pressupõem que o número de ensaios para estimar o LQ é estatisticamente significativo (elevado número de ensaios).

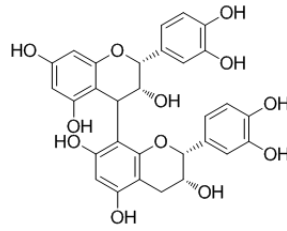
B.2. Homogeneidade de Variâncias

A descrição da resposta instrumental deve ter em conta não só a tendência média do sinal instrumental em função do teor do analito, mas também o comportamento da dispersão da resposta instrumental na gama de calibração. Quando a dispersão da resposta instrumental ao longo da gama de calibração é constante é designada por *homoscedástica*, e quando varia é designada por *heteroscedástica*. Geralmente quando a resposta é *heteroscedástica* a variância da resposta aumenta com o teor do analito, e não se verifica a condição de **Homogeneidade de Variâncias**.

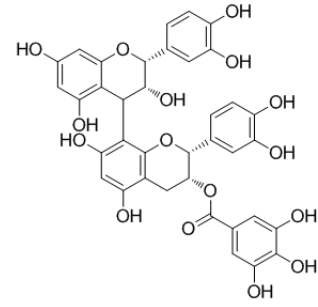
C. Estrutura dos compostos identificados



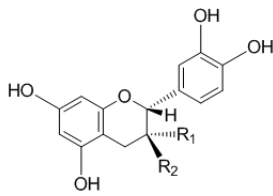
Procianidina Trimérica do tipo C ou T



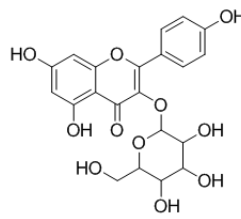
Procianidina Dimérica do tipo B



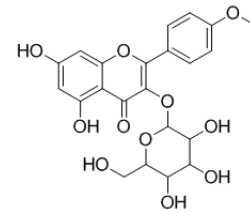
Procianidina Dimérica Galhato



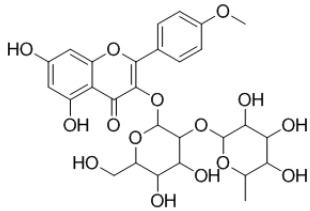
(Epi) Catequina



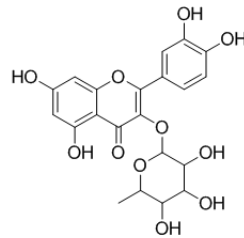
Kaempferol-O-glucósido



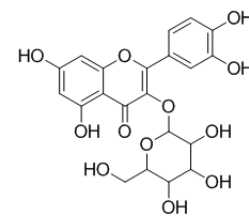
Kaempferide-O-glucósido



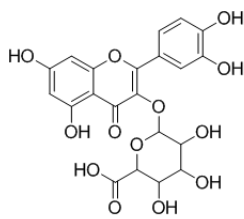
Kaempferide-O-diglucósido



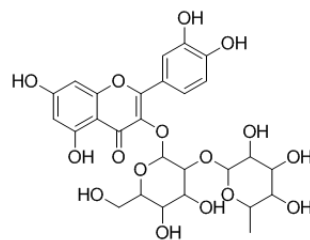
Quercetina-O-ramnose



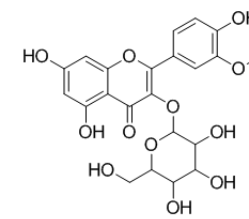
Quercetina-O-glucósido



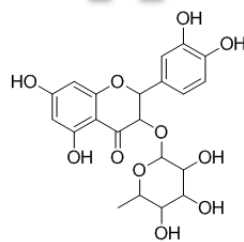
Quercetina-O-glucuronide



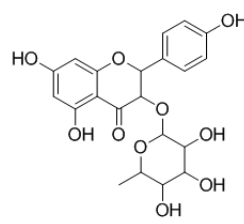
Quercetina-O-diglucósido



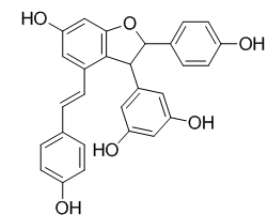
Isorhamnetina-O-glucósido



Astilbina



Engeletina



ε-viniferina



Legenda: Cacho de Uva

Pele

Polpa

Pedúnculos