



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Determinação dos Teores de Resveratrol em Vinhos Tintos com Denominação de Origem Controlada Beira Interior e Avaliação das suas Propriedades Antimicrobianas

Luísa Alexandra Serrano Paulo

Tese para obtenção do Grau de Doutor em
Biomedicina
(3º ciclo de estudos)

Orientador: Professor Doutor João António de Sampaio Rodrigues Queiroz

Co-orientadores: Professora Doutora Fernanda da Conceição Domingues

Professora Doutora Maria Eugenia Gallardo Alba

Covilhã, Março de 2011

Dedico esta tese aos meus pais e ao ADMV

“A coisa mais maravilhosa que podemos experimentar é o Misterioso. É a fonte de toda a verdadeira arte e de toda a verdadeira ciência”

Albert Einstein

Ao tentarmos ir mais além teremos de ultrapassar numerosos obstáculos. Valerá sempre a pena porque, como dizia o poeta: *“tudo vale a pena se alma não é pequena...”*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Uma palavra de agradecimento a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

Ao Professor Doutor João Queiroz, orientador desta tese, gostaria de agradecer o exemplo de elevado rigor científico demonstrado desde a primeira hora, a confiança que depositou em mim, toda a disponibilidade prestada e as palavras de incentivo manifestadas durante a realização desta tese. Um agradecimento igualmente muito especial, às minhas co-orientadoras Professora Doutora Fernanda Domingues e Professora Doutora Eugenia Gallardo. Agradeço todo o apoio, partilha de conhecimento, à vontade, pelos preciosos conselhos, pela constante e excelente orientação dada durante o decorrer do trabalho descrito nesta dissertação. Foi para mim um enorme privilégio poder trabalhar com todos vocês.

A todos os membros do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS), agradeço a forma como me receberam e integraram, por estarem sempre disponíveis, pela sua simpatia e por todo o apoio técnico e científico.

Às minhas colegas de gabinete e de laboratório por todo o companheirismo demonstrado, interessantes discussões e preciosos conselhos.

À Professora Doutora Mónica Oleastro pela forma como me recebeu, pela simpatia, pelo inestimável apoio e colaboração no fornecimento e caracterização das estirpes de *Helicobacter pylori*.

À Comissão Vitivinícola Regional da Beira Interior (CVRBI), Comissão Vitivinícola Regional do Tejo (CVRT) e Comissão Vitivinícola Regional dos Vinhos Verdes (CVRVV) pela oferta das amostras de vinho tinto comercial, e a todos aqueles que contribuíram individualmente com amostras de vinho tinto. Muito Obrigada por todo o apoio, sem o qual a realização deste trabalho não seria possível.

Ao Professor Doutor António Maçanita, Professora Doutora Palmira da Silva, Doutor Roberto di Paolo, Doutora Melinda Noronha, Doutor Adilson e Doutora Karina pelo apoio num dos momentos mais difíceis da minha vida profissional, sem a vossa ajuda não teria conseguido alcançar este objectivo. E claro, em especial à Ritinha pela

amizade, por me teres ouvido, apoiado e ajudado em todos os momentos difíceis por estares sempre presente. Agradeço a todos os meus amigos, sem vocês tudo se teria tornado bem pior.

Agradeço a toda a minha família, em especial aos meus pais, irmãs e ao Ricardo, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a lutar pelos meus objectivos, sempre com Amor e uma palavra amiga. Aos meus pais por serem referências fundamentais nos valores e percurso da minha vida, pelo apoio incondicional em todas as decisões. Ao Ricardo, pelo Amor, compreensão, por estares sempre lá quando preciso, pelo apoio incondicional nesta etapa da “nossa” vida.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo financiamento do trabalho presente nesta dissertação através da Bolsa de Doutoramento SFRH/BD/28168/2006.

A todos um enorme Bem Haja!

PUBLICAÇÕES E COMUNICAÇÕES REALIZADAS NO ÂMBITO DA TESE

- Paulo L, Oleastro M, Gallardo E., Queiroz JA, Domingues F. *Anti-Helicobacter pylori* and Urease Inhibitory Activities of Resveratrol and Red Wine, *Food Research International* 2011, DOI: 10.1016/j.foodres.2011.02.017.
- Paulo L, Domingues F, Queiroz JA, Gallardo E. Development and validation of an analytical method for *trans*- and *cis*-resveratrol in wine: Analysis of its contents in 186 Portuguese red wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011, 59 (6): 2157-2168 DOI: dx.doi.org/10.1021/jf105004y.
- Paulo L, Ferreira S, Gallardo E, Queiroz JA, Domingues F. Antimicrobial activity and effects of resveratrol on human pathogenic bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2010, 26 (8), 1533-1538 DOI: 10.1007/s11274-010-0325-7.
- Paulo L, Gallardo E, Queiroz JA, Domingues F. *In Vitro Anti-Helicobacter pylori and Urease inhibitory activities of Resveratrol*, ICAR2010 — International Conference on Antimicrobial Research, Valladolid (Espanha), de 3 de Novembro a 5 de Novembro de 2010 (comunicação em poster).
- Paulo L, Jerónimo D, Domingues F, Queiroz JA, Gallardo E. *Development and Validation of a New Analytical Method for Resveratrol Determination in Portuguese Red Wines*, V Annual CICS Symposium, Covilhã, 6 de Julho de 2010 (comunicação oral).

- Paulo L, Domingues F, Queiroz JA, Gallardo E. *Determination of resveratrol in Portuguese red wines by high performance liquid chromatography with photodiode array*, 5th Central European Congress on Food, Bratislava, de 19 a 22 de Maio de 2010 (comunicação em poster).
- Paulo L, Ferreira S, Gallardo E, Domingues F, Queiroz JA, *Antibacterial activity and effects of resveratrol on human pathogenic bacteria*, FEMS2009 — 3rd FEMS Congress of European Microbiologists, Gotemburgo (Suécia), de 28 de Junho a 2 de Julho de 2009 (comunicação em poster).
- Paulo L, Ferreira S, Gallardo E, Domingues F, Queiroz JA, *Antimicrobial activity and effects of resveratrol on human pathogenic bacteria*, Ciclo de Conferências do CICS, FCS-UBI, 14 de Abril de 2009 (comunicação oral).
- Paulo L, Ferreira S, Gallardo E, Domingues F, Queiroz JA, *Preliminary studies of the antimicrobial activity of resveratrol against some pathogens— XVI National Congress of Biochemistry*, Ponta Delgada (Açores- Portugal), de 22 a 25 de Outubro de 2008 (comunicação em poster).

RESUMO

Reconhece-se actualmente que o vinho tem propriedades benéficas no organismo humano, sendo constituído por compostos que exercem uma influência positiva no metabolismo dos indivíduos que o consomem com regularidade e moderação. O resveratrol (*trans*-3,4',5-trihidroxiestilbeno) é uma fitoalexina que está presente em diversos alimentos e bebidas, em particular no vinho tinto. Das várias classes de polifenóis existentes no vinho, o resveratrol (estilbeno) é um dos compostos mais estudados do ponto de vista de importância biológica, devido aos potenciais efeitos benéficos para a saúde humana.

Na primeira parte deste trabalho foi desenvolvido e validado um método analítico sensível, com vista a determinar, quantitativamente, as concentrações de resveratrol em amostras de vinhos tintos portugueses, utilizando a extracção em fase sólida (SPE) e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de díodos (HPLC-DAD). Na segunda parte, foram implementadas técnicas, tais como, o método de difusão em disco e o método da microdiluição, que permitiram avaliar a actividade antimicrobiana do resveratrol em diversos microrganismos, nomeadamente bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*). O efeito do resveratrol em bactérias Gram-positivas foi também analisado, recorrendo-se às curvas de morte, de forma a tentar assim compreender se o resveratrol actua como um agente bactericida ou bacteriostático. Analisou-se, ainda, a acção do resveratrol em *Bacillus cereus*, recorrendo à microscopia e à citometria de fluxo, de forma a tentar compreender o mecanismo de acção deste composto. Finalmente, foi também avaliada a actividade antimicrobiana do resveratrol em diferentes estirpes de *Helicobacter pylori*, utilizando o método da difusão em disco e o método da diluição em agar. Para além disso, verificou-se a hipótese do resveratrol e amostras de vinho tinto (devidamente quantificadas na primeira parte deste trabalho) inibirem a actividade da urease de *H. pylori*, considerada um dos principais factores de virulência deste microrganismo. Complementou-se, ainda, o estudo analisando cineticamente a actividade da urease na presença do resveratrol.

O método analítico foi validado de acordo com normas internacionalmente aceites quanto a: especificidade, linearidade, limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), precisão, exactidão, estabilidade e eficiência de extracção. Verificou-se ainda a aplicabilidade do método, analisando 186 amostras de vinhos tintos comerciais, provenientes de diferentes regiões, castas e anos. Os resultados obtidos demonstraram que os níveis de *trans*-resveratrol nos vinhos tintos, variaram entre 0,05 e 10,9 µg/mL, enquanto que as concentração de *cis*-resveratrol variaram entre 0,04 e 8,71 µg/mL. No que diz respeito à actividade antimicrobiana do resveratrol, verificou-se que este composto possui actividade contra todas as bactérias Gram-positivas em estudo. Os resultados demonstraram que o resveratrol tem um efeito bacteriostático que afecta o crescimento da célula bacteriana em todas as estirpes testadas. Quanto ao mecanismo de acção do resveratrol, os resultados obtidos sugerem que o crescimento celular do *Bacillus cereus* foi inibido, o que por sua vez terá levado à paragem da divisão celular. Na última parte deste trabalho, confirmou-se a actividade antibacteriana do resveratrol em diferentes estirpes de *Helicobacter pylori*. Para além disso, quer o resveratrol, quer os vinhos tintos analisados demonstraram um efeito inibitório na actividade da urease de *Helicobacter pylori*. A análise cinética revelou que o resveratrol é um inibidor da urease não competitivo e reversível.

O presente trabalho contribuiu por um lado, para o melhor conhecimento do teor de resveratrol nos vinhos portugueses, e por outro demonstrou o potencial do resveratrol como agente antibacteriano, podendo no futuro ter potenciais aplicações tanto na conservação dos alimentos como na terapia clínica.

PALAVRAS-CHAVE

Resveratrol, SPE, HPLC-DAD, Vinho Tinto, Actividade Antimicrobiana, *Helicobacter pylori*, Urease

ABSTRACT

It is now recognized that wine has beneficial properties for the human health, since it is constituted by compounds that exert a positive influence on the individuals' metabolism, provided that the consumption is moderate. The phytoalexin resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) is commonly found in foodstuffs and drinks, particularly in red wine. From the various classes of polyphenols presented in wine, resveratrol (stilbene) is one of the most studied from the viewpoint of biological importance, due to the possible beneficial effects on the human health.

In the first part of this work it was developed and validated a sensitive analytical method for the quantitative analysis of resveratrol in portuguese red wines, using solid-phase extraction (SPE) and liquid chromatography coupled with diode array detector (HPLC-DAD). In the second part the antimicrobial activity of the compound was evaluated by means of different techniques, such as the disc diffusion and microdilution methods, and the studied microorganisms included Gram-positive (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*) and Gram-negative (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria. We also analyzed the effect of resveratrol on Gram-positive organisms using time-kill assays, in order to understand whether resveratrol acts as a bactericide or bacteriostatic. In order to understand the mechanism of action of this compound, its action against *Bacillus cereus* was analysed by microscopy and flow cytometry. Finally, the antimicrobial activity of resveratrol against different strains of *Helicobacter pylori* was evaluated using both the disk diffusion and agar dilution methods. In addition, we verified the ability of resveratrol and red wine samples (properly quantified in the first part of this work) to inhibit the urease activity of *H. pylori*, since this is considered a major virulence factor of this microorganism. Moreover, we complemented the study analyzing kinetically urease activity in the presence of resveratrol.

The analytical method was fully validated according to internationally accepted guidelines, regarding specificity, linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), precision, accuracy, stability and extraction efficiency. Once validated, the methodology was applied to 186 commercial red wine samples from different regions, grape varieties and vintage. The results showed that the content of *trans*-resveratrol in red wines ranged from 0.05 to 10.9 µg/mL, while the concentration of *cis*-resveratrol

ranged from 0.04 to 8.71 µg/mL. Regarding the antimicrobial activity of resveratrol, we found that this compound has activity against all tested Gram-positive bacteria. The results demonstrated that resveratrol has a bacteriostatic effect which affects bacterial cell growth in all tested strains. As regards the mechanism of action of resveratrol, the results suggest that cell growth of *Bacillus cereus* was inhibited, which may in turn stop cell division. In the last part of this work, we confirmed the antibacterial activity of resveratrol against different strains of *Helicobacter pylori*. Furthermore, both resveratrol and red wines showed an inhibitory effect on urease activity of *Helicobacter pylori*. The kinetic analysis revealed that resveratrol is a non-competitive and reversible inhibitor of urease.

The present work contributed to the best knowledge of portuguese wines regarding the levels of resveratrol, and demonstrated the possible use of this compound as an antibacterial agent, and may in future have potential applications for both food preservation and clinical therapy.

KEYWORDS

Resveratrol, SPE, HPLC-DAD, Red Wine, Antimicrobial Activity, *Helicobacter pylori*
Urease

ÍNDICE

Índice de Figuras	xvii
Índice de Tabelas	xix
Lista de Acrónimos	xxi
Justificação do Tema e Objectivos	xxv
Capítulo I - Revisão da Literatura	1
1. Resveratrol	3
1.1. Descoberta Histórica	3
1.2. Biossíntese do Resveratrol	4
1.3. Propriedades Físico-Químicas.....	5
1.4. Principais Fontes de Resveratrol	7
1.4.1. Vinho	9
1.5. Biodisponibilidade	13
2. Identificação e Quantificação do Resveratrol	15
3. Benefícios do Resveratrol na Saúde Humana.....	35
3.1. Efeito Cardioprotector	36
3.2. Efeito Anticancerígeno.....	37
3.3. Actividade Antimicrobiana.....	37
4. <i>Helicobacter pylori</i>	51
4.1. Enquadramento Histórico	51

4.2. Características Microbiológicas	52
4.3. Epidemiologia e Transmissão	54
4.4. Factores de Patogenicidade	56
4.5. Diagnóstico e Terapêutica	59
4.6. Terapias alternativas	60
Capítulo II – Parte Experimental	63
Artigo I - Development and validation of an analytical method for <i>trans</i> - and <i>cis</i> -resveratrol in wine: Analysis of its contents in 186 Portuguese red wines	65
Artigo II - Antimicrobial activity and effects of resveratrol on human pathogenic bacteria.....	79
Artigo III - Anti- <i>Helicobacter pylori</i> and urease inhibitory activities of resveratrol and red wine.....	87
Capítulo III – Discussão Geral	115
Capítulo IV – Conclusões	131
Capítulo V – Perspectivas Futuras.....	135
Capítulo VI – Referências Bibliográficas	139

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Biossíntese do resveratrol (adaptado de (SIGNORELLI, P. e GHIDONI, R., 2005)).	4
Figura 2- Estrutura química dos isómeros (A) <i>trans</i> - e (B) <i>cis</i> -resveratrol.	5
Figura 3- Derivados do resveratrol (adaptado de (TOSUN, I. e INKAYA, A.N., 2010)).	6
Figura 4- Fontes de resveratrol (adaptado de (SHISHODIA, S. e AGGARWAL, B.B., 2006)).	7
Figura 5- Metodologias utilizadas na determinação de resveratrol em alimentos, bebidas e plantas. Abreviaturas: LLE, extracção líquido-líquido (<i>liquid-liquid extraction</i>); SPE, extracção em fase sólida (<i>solid-phase extraction</i>); ID, injeção directa; SPME, microextracção em fase sólida (<i>solid phase micro-extraction</i>); SBSE, extracção sortiva em barra de agitação; GC-MS, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (<i>gas chromatography-mass spectrometry</i>); LC, cromatografia líquida (<i>liquid chromatography</i>); DAD, detector de díodos (<i>diode array detector</i>); FLD, detector de fluorescência (<i>fluorescence detector</i>); ED, detector electroquímico (<i>electrochemical detector</i>); MS, espectrometria de massa (<i>mass spectrometry</i>) e CE, electroforese capilar (<i>cappilary electrophoresis</i>).	15
Figura 6- Efeitos benéficos do resveratrol na saúde humana.	35
Figura 7- Representação gráfica do número de publicações por ano em revistas e jornais internacionais, subordinados ao tema <i>Helicobacter pylori</i> .	52
Figura 8- As três formas fisiologicamente possíveis de <i>H. pylori</i> : espiral (a); forma de “U” (b) e cocóide (c). <i>H. pylori</i> no estômago humano (d) (adaptado de Science Photo Library).	53
Figura 9- Prevalência de <i>H. pylori</i> no mundo (adaptado de (AZEVEDO, N.F. [et al.], 2007)).	55
Figura 10- Factores de patogenicidade de <i>H. pylori</i> (adaptado de (OLEASTRO, M. e MONTEIRO, L., 2001)).	57

Figura 11- *H. pylori* a) microscopia electrónica e b) representação esquemática da acção da urease que torna o ambiente ácido do estômago (representado a amarelo) num ambiente neutro (representado a azul), possibilitando a sobrevivência da bactéria (adaptado de (MONTECUCCO, C. e RAPPUOLI, R., 2001))..... 58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Níveis de <i>trans</i> - resveratrol presentes em diversos alimentos.....	9
Tabela 2- Níveis de resveratrol presentes em vinhos tintos portugueses.....	12
Tabela 3- Revisão das metodologias analíticas que visam a determinação de resveratrol em amostras de vinho e derivados.....	19
Tabela 4- Revisão da literatura relativamente à actividade antimicrobiana do resveratrol.....	40
Tabela 5- Vias de transmissão possíveis de <i>H. pylori</i> em humanos.....	56

LISTA DE ACRÓNIMOS

ATCC - *American Type Culture Collection*

CagA - Citotoxina Vacuolizante Associada

cag PAI - “Ilha de Patogenicidade” do Gene Citotoxina Vacuolizante Associada
(*Cytotoxin Associated Gene Pathogenecity Island*)

CE - Electroforese Capilar (*Cappillary Electrophoresis*)

CID - Detector de Quimioluminescência (*Chemiluminescence Detection*)

DAD - Detector de Díodos (*Diode Array Detector*)

DIZ - Diâmetro da Zona de Inibição (*Diameter Inhibition Zone*)

DOC - Denominação de Origem Controlada

ED - Detector Electroquímico (*Electrochemical Detector*)

ESI-MS - Espectrometria de Massa com Ionização por Electrospray (*Electrospray Ionization- Mass Spectrometry*)

ET - *Electronic Tongue*

FDA - *Food and Drug Adiministration*

FLD - Detector de Fluorescência (*FLuorescence Detector*)

FTICR - Ressonância Ciclotrónica de Iões com Transformada de Fourier (*Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance*)

GC-MS - Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

ICH - *International Conference on Harmonization*

ID - Injecção Directa

LC - Cromatografia Líquida (*Liquid Chromatography*)

LC-MS - Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade (*Low Density Lipoprotein*)

LD-REMPI-TOFMS - *Laser Desorption coupled with Resonance-Enhanced Multiphoton Ionization and Time-of-Flight Mass Spectrometry detection*

LLE - Extração Líquido-Líquido (*Liquid-Liquid Extraction*)

LOD - Limite de Detecção (*Limit of Detection*)

LOQ - Limite de Quantificação (*Limit of Quantitation*)

MALDI - Desadsorção com Laser Assistida por Matriz (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*)

MALT - Tecido Linfóide Associado à Mucosa (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*)

MBC - Concentração Mínima Bactericida (*Minimum Bactericidal Concentration*)

MIC - Concentração Mínima Inibitória (*Minimum Inhibition Concentration*)

MOC - Microscópio Óptico Composto

MRSA - *Staphylococcus aureus* Meticilina-Resistente (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*)

MS - Espectrometria de Massa (*Mass Spectrometry*)

MS-MS - Espectrometria de Massa Tandem (*Tandem Mass Spectrometry*)

MSSA - *Staphylococcus aureus* Meticilina-Sensível (*Methicillin-Sensitive Staphylococcus aureus*)

OIV - *Organization Internacional de la Vigne et du Vin*

OMS - Organização Mundial de Saúde

PLE - *Extracção Líquida Pressurizada (Pressurised Liquid Extraction)*

RP - *Fase Reversa (Reverse Phase)*

SEM - *Microscopia de Varrimento Electrónico (Scanning Electronic Microscopy)*

SBSE - *Extracção Sortiva em Barra de Agitação (Stir Bar Sorptive Extraction)*

SFE - *Extracção de Fluídos Supercríticos (Supercritical Fluid Extraction)*

SPE - *Extracção em Fase Sólida (Solid-Phase Extraction)*

SPME - *Microextracção em Fase Sólida (Solid Phase Micro-Extraction)*

SS - *Suporte Sólido (Solid Supported)*

UV - *Espectroscopia de Ultravioleta; Luz Ultravioleta*

UV-Vis - *Espectroscopia de Ultravioleta-Visível; Luz Ultravioleta-Visível*

VacA - *Citotoxina Vacuolizante*

WT - *Estirpe Selvagem (Wild Type)*

JUSTIFICAÇÃO DO TEMA E OBJECTIVOS

Durante as últimas décadas, os polifenóis presentes nas uvas e no vinho têm atraído considerável atenção da comunidade científica internacional, não só pelo seu importante contributo para a qualidade dos vinhos, mas também pelo seu potencial efeito benéfico para a saúde (SPRANGER, I. e SUN, B., 2007). Portugal possui uma longa tradição enquanto produtor de vinho, e existem várias regiões registadas que produzem vinhos de qualidade com Denominação de Origem Controlada (DOC) reconhecidas pela União Europeia.

Uma das classes de polifenóis de natureza não flavonóide, os estilbenos, dos quais se destaca o resveratrol, têm sido objecto de intensa investigação nos últimos anos, essencialmente por se admitir que são compostos chave nos efeitos benéficos para a saúde humana.

O resveratrol (3,4',5- trihidroxiestilbeno) tem vindo a ser identificado como um dos principais compostos biologicamente activos presente não só no vinho, como noutros alimentos (JEANDET, P. [et al.], 1991); (GOLDBERG, D.M. [et al.], 1995c); (JEANDET, P. [et al.], 1995). Na uva, esta fitoalexina é sintetizada num processo induzido especialmente em condições de *stress*, trauma e infecção microbológica, conferindo à planta uma protecção contra diferentes doenças (SOLEAS, G.J. [et al.], 2001). O resveratrol é sintetizado naturalmente na planta sob duas formas isoméricas: *trans*-resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e *cis*-resveratrol (*cis*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno). As concentrações de cada um dos isómeros em diferentes variedades de uvas e os respectivos vinhos são extremamente variáveis, dependendo da origem geográfica, dos processos de vinificação, do clima e da presença de microrganismos (STERVBO, U. [et al.], 2007).

Diversos autores consideram o resveratrol como uma molécula de elevadas potencialidades devido ao seu amplo espectro de benefícios para a saúde, nomeadamente o efeito antioxidante (FILIP, V. [et al.], 2003), anti-inflamatório (LEIRO, J.M. [et al.], 2010), cardioprotector (BRADAMANTE, S. [et al.], 2004) e ainda, como um quimioprotector do cancro (JANG, M. [et al.], 1997); (ATHAR, M. [et al.], 2007). Assim sendo, o resveratrol tem vindo a ser reconhecido como um dos compostos mais importante, presente no vinho, pelo que muitos procedimentos analíticos têm sido publicados visando a sua quantificação em diversas amostras de vinho.

Além das actividades acima descritas, o resveratrol tem vindo a ser objecto de estudo relativamente à sua capacidade de inibir o crescimento de alguns microrganismos patogénicos (DOCHERTY, J.J. [et al.], 2001); (CHAN, M.M.Y., 2002); (TEGOS, G. [et al.], 2002) incluindo a actividade anti-*Helicobacter pylori in vitro* (MAHADY, G.B. e PENDLAND, S.L., 2000); (DAROCH, F. [et al.], 2001); (MAHADY, G.B. [et al.], 2003); (MURANO, A. [et al.], 2005).

Helicobacter pylori (*H. pylori*) é uma bactéria que habita o muco que cobre a superfície do estômago e tem sido implicada na etiologia de várias patologias gástricas, nomeadamente a gastrite crónica, úlcera péptica, cancro gástrico e linfomas. Recentemente, tem-se verificado que a maioria dos adultos (aproximadamente metade da população mundial) está colonizada por *H. pylori* (DE VRIES, A.C. e KUIPERS, E.J., 2007). Apesar de serem comercializados vários agentes antimicrobianos eficazes contra *H. pylori*, o desenvolvimento de resistência a esses agentes, complica a terapêutica da infecção de *H. pylori* e é a causa mais comum para o insucesso da sua erradicação (THYAGARAJAN, S.P. [et al.], 2003); (TORACCHIO, S. e MARZIO, L., 2003).

Apesar de poucos, os estudos existentes, até à data, têm proposto que o resveratrol inibe efectivamente o crescimento de *H. pylori*, pelo que este composto será particularmente atractivo na quimioprevenção contra as diversas patologias associadas a este microrganismo (MAHADY, G.B. e PENDLAND, S.L., 2000); (DAROCH, F. [et al.], 2001); (ATHAR, M. [et al.], 2007).

Durante o último século, os agentes antimicrobianos (antibióticos e outros fármacos relacionados) reduziram substancialmente a ameaça associada às doenças infecciosas. No entanto, a adaptação dos microrganismos aos agentes antimicrobianos usados fez com que o desenvolvimento, a proliferação e a persistência da resistência antimicrobiana seja, actualmente, um dos maiores problemas de saúde pública, tornando urgente a descoberta de novos fármacos com propriedades antimicrobianas (OVERBYE, K.M. e BARRETT, J.F., 2005); (BUTLER, M.S. e BUSS, A.D., 2006)

O presente trabalho englobou duas partes distintas: por um lado uma vertente analítica e por outro uma vertente microbiológica. Desta forma, os objectivos principais deste estudo foram:

- Desenvolver um método analítico inovador e sensível, com vista a determinar os teores de resveratrol em amostras de vinhos tintos portugueses, na sua maioria de Denominação de Origem Controlada (DOC) provenientes não só, da região da Beira Interior, mas também de outras regiões do país, nomeadamente da região dos Vinhos Verdes, Douro, Alentejo, Ribatejo, Bairrada, Dão e Península de Setúbal.
- Comparar vários procedimentos extractivos recorrendo a uma extracção líquido-líquido (LLE) e uma extracção em fase sólida (SPE), sendo o resveratrol posteriormente detectado e quantificado utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a um detector de díodos (DAD).
- Estudar as propriedades antimicrobianas do resveratrol, avaliando a sua capacidade de inibir o crescimento de alguns microrganismos patogénicos, nomeadamente bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas.
- Analisar a acção do resveratrol em *Bacillus cereus*, recorrendo à microscopia óptica, à microscopia electrónica de varrimento (SEM) e ainda à citometria de fluxo, com o objectivo de tentar compreender o mecanismo de acção deste composto sobre este microrganismo.
- Avaliar a actividade antimicrobiana do resveratrol em estirpes clínicas e de referência de *Helicobacter pylori*.
- Verificar a hipótese do resveratrol e amostras de vinho tinto (devidamente quantificadas na primeira parte deste trabalho), inibirem a actividade da urease de *H. pylori*, considerada um dos principais factores de virulência deste microrganismo.
- Caracterizar cineticamente a actividade da urease na presença do resveratrol.

CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA

1. RESVERATROL

1.1. DESCOBERTA HISTÓRICA

A palavra resveratrol tem origem latina, onde “res” significa “procede de”, “*veratrum*” designa a planta onde foi inicialmente descoberto o composto e “ol” indica a presença de grupos álcool na sua estrutura.

O resveratrol foi identificado pela primeira vez em 1940, nas raízes de um tipo de lírio, denominado por heléboro branco (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) (TAKAOKA, M., 1940) e, posteriormente, nas raízes do *Polygonum cuspidatum* (NONOMURA, S. [et al.], 1963). Esta última planta é utilizada na medicina tradicional chinesa e japonesa no tratamento da dermatite supurativa, gonorréia, pé de atleta (*Tinea pedis*), e dislipidemia (SOLEAS, G.J. [et al.], 1997a). Anos mais tarde, em 1976, o resveratrol foi identificado nas uvas da espécie *Vitis vinifera* (LANGCAKE, P. e PRYCE, R.J., 1976), pelo que vários estudos têm vindo a descrever a presença de resveratrol principalmente na película da uva (CREASY, L.L. e COFFEE, M., 1988); (JEANDET, P. [et al.], 1991).

Porém, se até 1992 o resveratrol atraía pouco interesse da comunidade científica, a partir deste ano, este composto foi identificado como sendo o principal responsável pelos efeitos cardioprotectores do vinho tinto (SIEMANN, E.H. e CREASY, L.L., 1992). Esta descoberta teve lugar no momento em que estudos epidemiológicos evidenciavam que o consumo moderado de vinho diminuía o risco de doenças coronárias, o que levou à compreensão do chamado “Paradoxo Francês”, segundo o qual haveria uma correlação inversa entre o consumo de vinho tinto e a incidência de doenças coronárias, o que explicaria uma taxa de doenças cardiovasculares surpreendentemente baixa, em França (RENAUD, S. e DELORGERIL, M., 1992); (KOPP, P., 1998).

Desde então, dezenas de trabalhos são publicados anualmente demonstrando que o resveratrol pode prevenir ou diminuir a progressão de diversas doenças, nomeadamente, o cancro (JANG, M. [et al.], 1997), as doenças cardiovasculares (BRADAMANTE, S. [et al.], 2004) e neurodegenerativas (JANG, J.H. e SURH, Y.J., 2003); (ZAMIN, L.L. [et al.], 2006). Tem vindo, ainda, a ser evidenciado que o resveratrol pode mimetizar os efeitos da restrição calórica e prevenir diversos

processos de envelhecimento, aumentando a longevidade (BAUR, J.A. e SINCLAIR, D.A., 2006).

1.2. BIOSÍNTESE DO RESVERATROL

Nas uvas, o resveratrol, é normalmente sintetizado na película, sendo o pico da sua síntese alcançado durante o ciclo de formação e maturação das uvas (JEANDET, P. [et al.], 1991); (SUN, B. [et al.], 2006); (MORENO, A. [et al.], 2008). A enzima principal na biossíntese do resveratrol é a estilbeno sintetase (RUPPRICH, N. e KINDL, H., 1978), que é activada em resposta a factores de *stress* exógenos, tais como, radiação ultravioleta, ataque de fungos patogénicos e agentes químicos. Esta enzima catalisa a reacção entre uma molécula de *p*-cumaril-coenzima A e três moléculas de malonil-coenzima A (Figura 1), levando à síntese do resveratrol na área afectada (SOLEAS, G.J. [et al.], 1997a); (JEANDET, P., 2002); (SIGNORELLI, P. e GHIDONI, R., 2005).

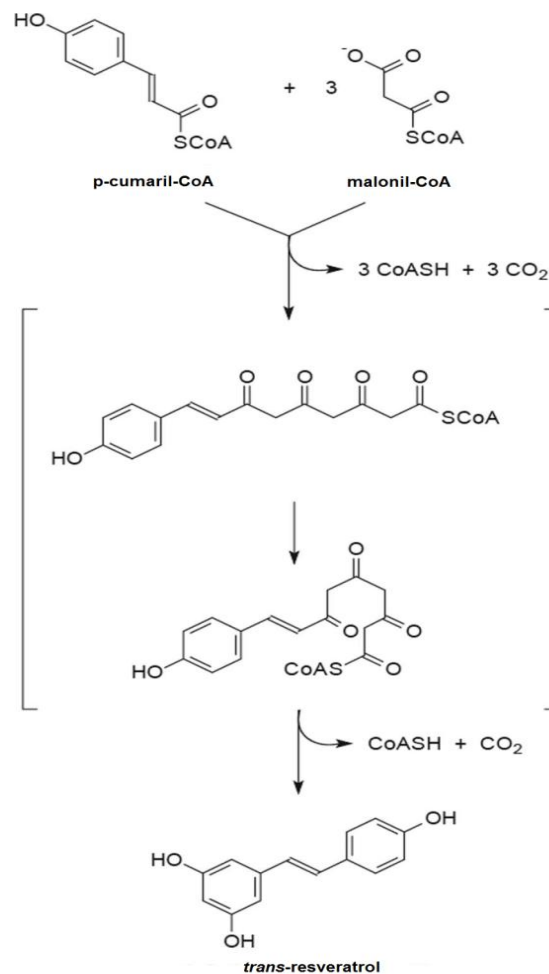


Figura 1- Biossíntese do resveratrol (adaptado de (SIGNORELLI, P. e GHIDONI, R., 2005)).

Na uva, o resveratrol é sintetizado na película do fruto em concentrações que dependem de diversos factores, como o tipo, a intensidade e a duração do *stress* sob o qual se encontra a videira durante a fase frutífera, ou ainda do estágio de desenvolvimento do fruto (PAN, Q.H. [et al.], 2009). O *stress* pode ser originado por factores bióticos como por exemplo lesões na uva decorrentes da acção fúngica, principalmente pela espécie *Botrytis cinerea* e por factores abióticos, como a exposição à radiação ultravioleta (ADRIAN, M. [et al.], 1996); (DOUILLET-BREUIL, A.C. [et al.], 1999) e agentes químicos (ADRIAN, M. [et al.], 1996). Assim, para a obtenção de elevadas concentrações de resveratrol nas uvas são de extrema importância as condições de viticultura, a origem geográfica, os factores ambientais e ainda, as variedades da uva (GOLDBERG, D.M. [et al.], 1995a).

1.3. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Os estilbenos constituem uma das famílias de compostos polifenólicos, presentes nas uvas e conseqüentemente em produtos derivados das mesmas, como o vinho. Estes compostos caracterizam-se por possuírem um esqueleto de carbonos característico $C_6-C_2-C_6$ que comporta dois anéis benzénicos, geralmente ligados por uma cadeia com um etano ou um etileno, sendo o resveratrol um dos principais compostos pertencente à classe dos estilbenos.

Quimicamente o resveratrol é designado por 3, 4', 5, -trihidroxiestilbeno e existe na natureza sob duas formas isoméricas, denominadas por *trans* (A) e por *cis-resveratrol* (B) (Figura 2). O isómero *trans-resveratrol* é convertido em *cis-resveratrol* na presença de radiação ultravioleta (LOPEZ-HERNANDEZ, J. [et al.], 2007), e ambos os isómeros estão presentes em quantidades variáveis nos vinhos comerciais (GOLDBERG, D.M. [et al.], 1995b).

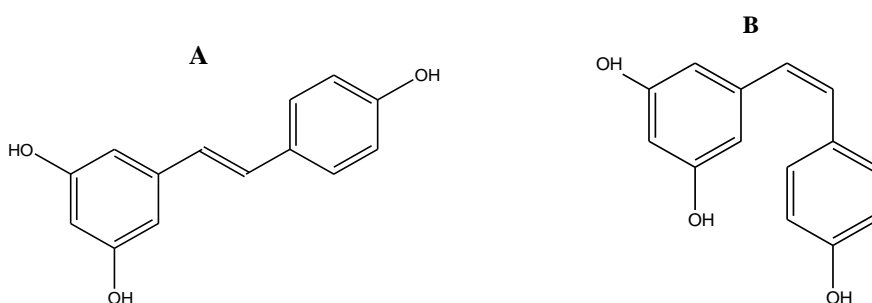


Figura 2- Estrutura química dos isómeros (A) *trans*- e (B) *cis-resveratrol*.

Quanto aos parâmetros físico-químicos, o resveratrol apresenta-se sob a forma de cristal de cor branca, com fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_3$, e respectiva massa molecular de 228 g/mol, ponto de fusão entre 253°C e 255°C, e pKa de 9,14. Possui elevada solubilidade em diversos solventes orgânicos, tais como, etanol, metanol, dimetilsulfóxido, acetona e acetonitrilo, e apresenta uma baixa solubilidade em água (0,03 mg/mL). No que diz respeito à estabilidade, deve ser armazenado entre os 2°C e os 8°C e devidamente protegido da luz (BUDAVARI, S., 1996).

Ambos, o *trans*- e o *cis*-resveratrol podem também ser encontrados nas plantas sob a forma glicosilada (ligados a uma molécula de glucose), como por exemplo o resveratrol-3-O- β -glucósido comumente designado por piceid (SUN, B. [et al.], 2006). Na Figura 3 encontram-se representados alguns dos derivados mais comuns de resveratrol.

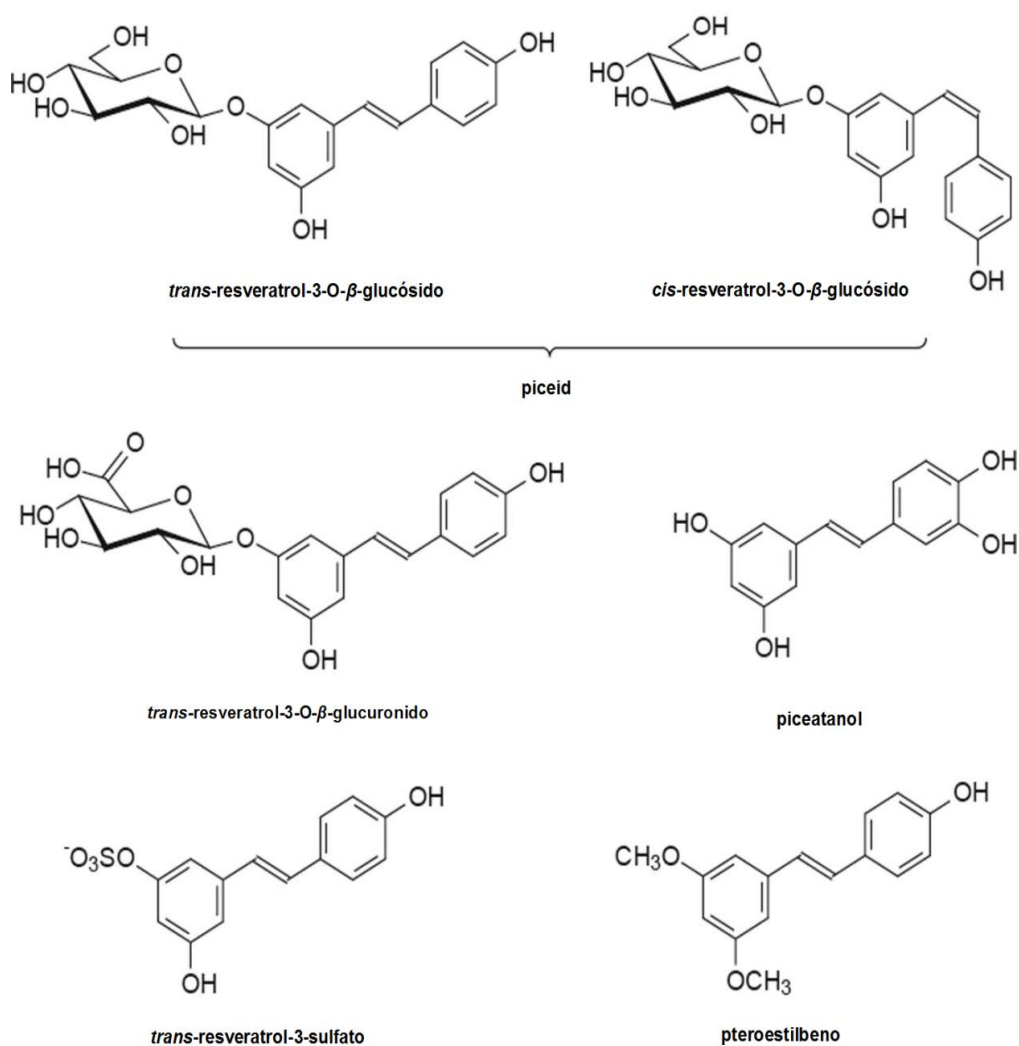


Figura 3- Derivados do resveratrol (adaptado de (TOSUN, I. e INKAYA, A.N., 2010)).

1.4. PRINCIPAIS FONTES DE RESVERATROL

O resveratrol é uma fitoalexina (classe de compostos cuja síntese é induzida em condições de *stress* e em condições ambientais adversas) (LANGCAKE, P. e PRYCE, R.J., 1976); (SOLEAS, G.J. [et al.], 2001), sendo produzido naturalmente por várias famílias de plantas. Aproximadamente 72 espécies de plantas distribuídas por 31 géneros e 12 famílias foram descritas como capazes de sintetizar facilmente o resveratrol (TOSUN, I. e INKAYA, A.N., 2010). Dessas plantas destacam-se, devido aos seus reconhecidos efeitos terapêuticos, o amendoim (*Arachis hypogaea*, Fabaceae) (CHUKWUMAH, Y. [et al.], 2009), o eucalipto (*Eucalyptus wandoo*, Myrtaaceae) (HATHWAY, D.E. e SEAKINS, J.W., 1959), o Kon-jo-kon (*Polygonum cuspidatum*) (DU, F.Y. [et al.], 2007) e a uva (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*, Vitaceae) (LANGCAKE, P. e PRYCE, R.J., 1976); (JEANDET, P. [et al.], 1991); (DOUILLET-BREUIL, A.C. [et al.], 1999); (FREMONT, L., 2000). Na Figura 4 encontram-se representadas algumas espécies de plantas e frutos com capacidade de sintetizar naturalmente o resveratrol.

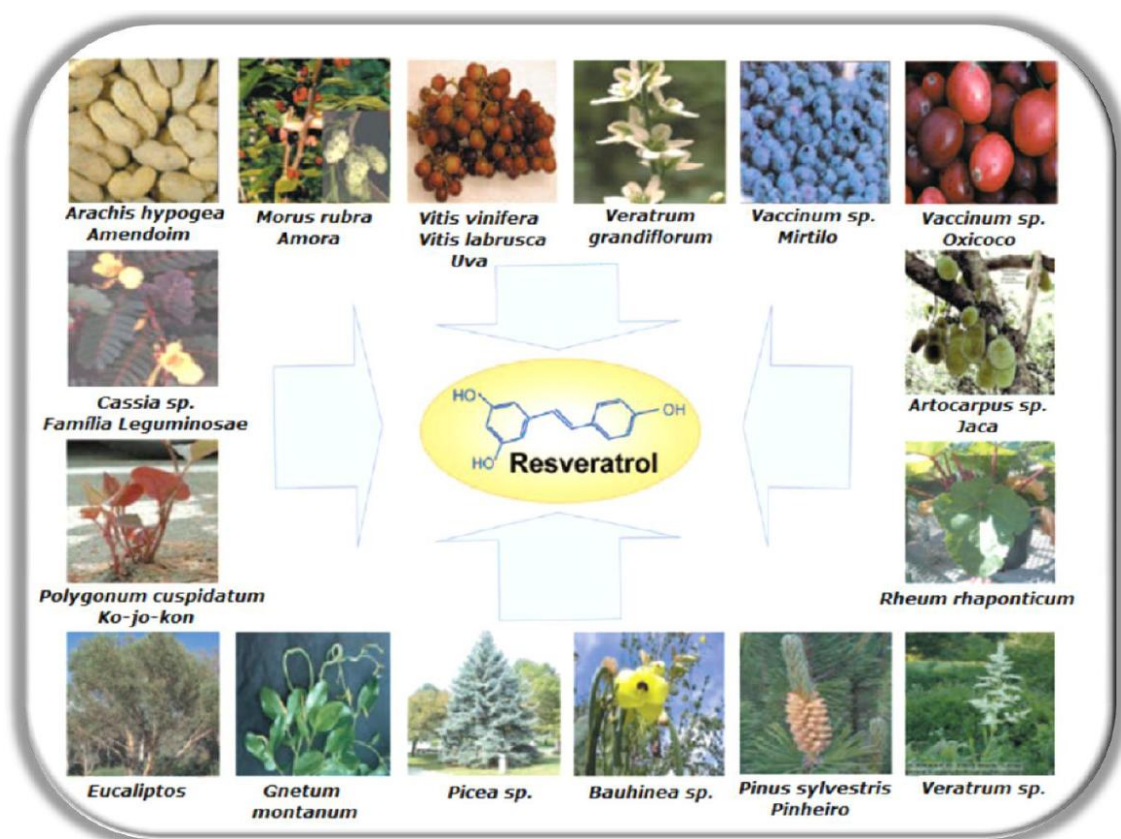


Figura 4- Fontes de resveratrol (adaptado de (SHISHODIA, S. e AGGARWAL, B.B., 2006)).

As espécies de videiras *Vitis vinifera* e *Vitis labrusca* possuem uma elevada capacidade de sintetizar o resveratrol (FREMONT, L., 2000) destacando-se as variedades Pinot Noir, Merlot e Carbenet Sauvignon (GOLDBERG, D.M. [et al.], 1995b); (ROMERO-PEREZ, A.I. [et al.], 2001). Assim, as uvas juntamente com todos os seus produtos industrializados constituem importantes fontes de resveratrol (PAN, Q.H. [et al.], 2009).

Com o crescente desenvolvimento e adaptações das metodologias tem vindo a ser possível isolar e caracterizar o resveratrol em diferentes amostras tais como, produtos alimentares (SOUTO, A.A. [et al.], 2001); (CARERI, M. [et al.], 2003); (WANG, S.Y. [et al.], 2007) e amostras biológicas após administração de alimentos e soluções com elevado teor de resveratrol (WALLE, T. [et al.], 2004).

Na Tabela 1 encontram-se representadas as diferentes concentrações de *trans*-resveratrol, presentes em alimentos que fazem parte da dieta humana.

Tabela 1- Níveis de *trans*- resveratrol presentes em diversos alimentos.

Fonte	Concentração de <i>trans</i> - resveratrol (µg/mL)	Referência
Mirtilo	0,03	(LYONS, M.M. [et al.], 2003)
Uva (Öküzgözü, Tinta)	0,10	(GURBUZ, O. [et al.], 2007)
Morango	0,11	(WANG, S.Y. [et al.], 2007)
Amendoins Torrados (Yeojoo)	0,13	(LEE, S.S. [et al.], 2004)
Uva (Emir, Branco)	0,29	(GURBUZ, O. [et al.], 2007)
Amendoim (Jeokwang)	0,30	(LEE, S.S. [et al.], 2004)
Manteiga de Amendoim	0,30	(BURNS, J. [et al.], 2002)
Amendoim (Virginia NC-18016)	0,31	(SANDERS, T.H. [et al.], 2000)
Chocolate negro	0,40	(COUNET, C. [et al.], 2006)
Vinho (Emir, Branco)	1,20	(GURBUZ, O. [et al.], 2007)
Pistachio (Siirt)	1,53	(TOKUSOGLU, O. [et al.], 2005)
Pistachio (Ohali)	1,67	(TOKUSOGLU, O. [et al.], 2005)
Vinho (Carbenet Sauvignon, Tinto)	1,70	(STERVBO, U. [et al.], 2007)
Amendoim (Espanha)	1,79	(SANDERS, T.H. [et al.], 2000)
Groselha	1,90	(CHIOU, A. [et al.], 2007)
Amendoim (Çerezlik 5025)	1,92	(TOKUSOGLU, O. [et al.], 2005)
Vinho (Merlot, tinto)	2,80	(STERVBO, U. [et al.], 2007)
Vinho (Pinot Noir, tinto)	3,60	(STERVBO, U. [et al.], 2007)
Lúpulo	6,00	(JERKOVIC, V. e COLLIN, S., 2007)

Fonte: (TOSUN, I. e INKAYA, A.N., 2010)

O resveratrol é, pois, uma fitoalexina que se encontra presente em diversos produtos alimentares e a mais amplamente analisada.

1.4.1. VINHO

As bases científicas que permitiram evidenciar as qualidades e potencialidades do vinho tiveram início em 1924, a partir da fundação da *Organization Internacional de la Vigne et du Vin* (OIV). A primeira missão que lhe foi atribuída consistiu na elaboração de um plano de experiências científicas de modo a evidenciar as qualidades higiénicas

do vinho e os seus efeitos benéficos na saúde humana (REGO, D. e RODRIGUES, C., 2005).

Desde então, têm vindo a ser desenvolvidos diversos trabalhos sobre os efeitos do consumo moderado de vinho na saúde humana (SOLEAS, G.J. [et al.], 1997b); (LUZZA, F. [et al.], 1998); (DE LORIMIER, A.A., 2000); (SAVINO, M. [et al.], 2007); (TOSUN, I. e INKAYA, A.N., 2010).

No geral, os principais constituintes do vinho são: água (80-85%), álcoois (10-17%), açúcares (0,1-10%), ácidos orgânicos (0,4-1,0%), polifenóis (0,01-0,5%) e sais (0,2-4,0%). Cada uma destas classes é composta por dezenas, ou até mesmo centenas de compostos químicos. Assim, a obtenção de um vinho de alta qualidade pressupõem um profundo conhecimento dos compostos químicos naturais presentes nas uvas, bem como dos processos envolvidos na elaboração do vinho e dos equipamentos utilizados.

A presença de resveratrol tem vindo a ser detectada em vários tipos de vinho, sendo a sua concentração dependente de vários factores, tais como, tipo de casta utilizada, origem geográfica, tipo de vinho, práticas enológicas, condições climatéricas e grau de contaminação da planta por *Botrytis cinerea*, fungo responsável pela podridão das uvas (STERVBO, U. [et al.], 2007).

As diferentes concentrações de *trans*-resveratrol podem ainda ser influenciadas pela própria capacidade intrínseca de síntese da casta utilizada. Assim, altas concentrações (10 µg/mL) encontram-se, principalmente, em vinhos que tiveram contacto prolongado entre o mosto e a película, e menores concentrações (0,3 µg/mL) geralmente estão presentes em vinhos brancos. Normalmente, o conteúdo de *trans*-resveratrol nos vinhos situa-se entre 0,1 – 14,3 µg/mL, não exercendo influência nas características sensoriais (RODRIGUEZ-DELGADO, M.A. [et al.], 2002); (MARK, L. [et al.], 2005). De salientar que, nos vinhos tintos a concentração de resveratrol é superior à dos vinhos brancos (SIEMANN, E.H. e CREASY, L.L., 1992).

Um artigo de revisão recente (STERVBO, U. [et al.], 2007) descreve um estudo comparativo das concentrações de resveratrol em amostras de vinho tinto provenientes de diversos países. O referido trabalho põe em evidência os diferentes níveis de *trans*- e *cis*-resveratrol, e respectivos glucósidos (*trans*- e *cis*-piceid) baseando-se num total de 31 artigos. Assim, em diferentes vinhos monovarietais, os

níveis de resveratrol mais elevados foram encontrados em vinhos provenientes das castas: Pinot Noir, St. Laurent, Marzemino, Merlot e Blaufrankisch, com níveis de *trans*-resveratrol na ordem dos: 3,6 µg/mL, 3,2 µg/mL, 3,0 µg/mL, 2,8 µg/mL e 2,6 µg/mL, respectivamente (STERVBO, U. [et al.], 2007). No que diz respeito aos vinhos provenientes de várias regiões, neste artigo de revisão, verifica-se que o valor médio dos níveis de *trans*-resveratrol varia substancialmente de região para região. O valor médio da concentração de *trans*-resveratrol, baseado em 511 amostras de 18 países diferentes, foi de 1,9 µg/mL (STERVBO, U. [et al.], 2007), sendo que o teor mais elevado de *trans*-resveratrol foi de 14,3 µg/mL, quantificado num vinho tinto húngaro (MARK, L. [et al.], 2005). No entanto, de acordo com a literatura consultada existe um estudo posterior que obtém um nível de resveratrol de 57,7 µg/mL num vinho tinto português (PAIXAO, N. [et al.], 2008).

As diferenças observadas, quer em termos da variedade de castas, quer em termos das diferentes regiões, poderão ser explicadas tendo em conta factores de *stress* exógenos, bem como as diferentes técnicas de vinificação a que são sujeitas as diferentes amostras de vinho tinto (BAVARESCO, L., 2003). Quanto aos níveis médios da concentração de *cis*-resveratrol verificou-se que são inferiores aos do *trans*-resveratrol (STERVBO, U. [et al.], 2007).

Uma vez que o presente estudo incide sobre a análise do resveratrol em amostras de vinhos tintos portugueses, na Tabela 2 apresenta-se uma revisão bibliográfica de todos os estudos realizados até à data. De salientar que os níveis de *trans*-resveratrol em amostras de vinho tinto português possuem uma média de 1,7 µg/mL, e em Portugal continental uma média de 1,3 µg/mL.

Tabela 2- Níveis de resveratrol presentes em vinhos tintos portugueses.

Número de Amostras	Região	Castas	Ano	Concentração média (µg/mL)		Referência
				<i>trans</i> -resveratrol	<i>cis</i> -resveratrol	
4	Madeira	blend	ND	0,98	ND	(PEREIRA, V. [et al.], 2010)
14	Madeira	blend	ND	0,17	ND	(RUDNITSKAY A, A. [et al.], 2010)
3	Península de Setúbal	blend	2004	0,10	ND	(BRAVO, M.N. [et al.], 2008)
5	Madeira	monovarietal e blend	2004	19,60	ND	(PAIXAO, N. [et al.], 2008)
1	Alentejo	monovarietal	2005	1,47	ND	(NAVE, F. [et al.], 2007)
47	Alentejo	blend	1999	0,69	ND	(RATOLA, N. [et al.], 2004)
36	12 Regiões	monovarietal blend	1993-1998	2,01	0,43	(BAPTISTA, J.A.B. [et al.], 2001)
39	ND	monovarietal blend	ND	1,06	2,50	(LIMA, M.T.R. [et al.], 1999)
1	Porto	ND	ND	2,26	0,60	(GU, X. [et al.], 1999)
26	ND	ND	ND	1,64	ND	(GOLDBERG, D.M. [et al.], 1995c)

ND- Não Determinado

Uma vez que o resveratrol é produzido em resposta a factores exógenos prevê-se que os seus níveis no vinho tinto variem entre regiões e anos de colheita, sendo que várias publicações põem grande ênfase neste facto (GOLDBERG, D.M. [et al.], 1995c); (GOLDBERG, D.M. [et al.], 1996); (MARTINEZ-ORTEGA, M.V. [et al.], 2000). Contudo, durante o processo de produção de vinho vários factores podem afectar os níveis de *trans*-resveratrol no vinho tinto, tais como, um aumento da temperatura, um aumento nos níveis de SO₂ e /ou uma diminuição no pH, o que resulta em elevados níveis de resveratrol (TRELA, B.C. e WATERHOUSE, A.L., 1996); (NETZEL, M. [et al.], 2003); (GAMBUTI, A. [et al.], 2004).

1.5. BIODISPONIBILIDADE

Nos últimos dez anos têm sido realizados vários estudos, *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*, que pretendem esclarecer a disposição, metabolismo e conseqüente biodisponibilidade do resveratrol. Em todos os modelos testados, o resveratrol demonstrou ser rapidamente absorvido após administração oral, sendo que esta absorção não é favorecida por conteúdos alcoólicos semelhantes aos observados no vinho tinto (BERTELLI, A.A. [et al.], 1996); (ANDLAUER, W. [et al.], 2000); (KUHNLE, G. [et al.], 2000); (SOLEAS, G.J. [et al.], 2001); (GOLDBERG, D.M. [et al.], 2003); (MENG, X.F. [et al.], 2004); (WALLE, T. [et al.], 2004). O resveratrol atinge concentrações plasmáticas máximas aos 15 minutos em ratinhos e entre 30 a 60 minutos em humanos (SOLEAS, G.J. [et al.], 2001); (YU, C. [et al.], 2002); (GOLDBERG, D.M. [et al.], 2003); (WALLE, T. [et al.], 2004). Uma vez absorvido, o resveratrol é metabolizado, quer nas células intestinais, quer no fígado, sendo o resveratrol-3-glucurónido e o resveratrol-3-sulfato (Figura 3), os principais metabolitos identificados (DE SANTI, C. [et al.], 2000a); (DE SANTI, C. [et al.], 2000b); (YU, C. [et al.], 2002); (GOLDBERG, D.M. [et al.], 2003); (MENG, X.F. [et al.], 2004); (WALLE, T. [et al.], 2004). Estes constituem as principais formas de resveratrol circulante no plasma.

Em humanos, tem sido sugerida uma recirculação entérica dos metabolitos conjugados após hidrólise intestinal (WALLE, T. [et al.], 2004). Esta hipótese é apoiada por estudos em ratinhos onde se observou que a recirculação entero-hepática é responsável pela exposição sistémica global do resveratrol e dos seus glucurónidos (MARIER, J.F. [et al.], 2002); (WALLE, T. [et al.], 2004). O resveratrol e os seus metabolitos distribuem-se por vários órgãos, nomeadamente o fígado, o coração e os rins (BERTELLI, A.A.E. [et al.], 1998), sendo os rins a principal via de excreção (SOLEAS, G.J. [et al.], 2001); (YU, C. [et al.], 2002); (GOLDBERG, D.M. [et al.], 2003); (WALLE, T. [et al.], 2004). Todos os estudos em humanos foram realizados com um baixo número de indivíduos, o que poderá constituir um problema dada a variabilidade inter-individual na metabolização de xenobióticos. No entanto, a ausência de diferenças significativas nos resultados obtidos entre espécies diferentes, parece reduzir o significado dos resultados obtidos em humanos.

Apesar de vários esforços despendidos na tentativa de obter conhecimentos *in vivo* acerca da absorção, do metabolismo e da distribuição do resveratrol nos diversos tecidos, os estudos debatem-se com diversas dificuldades, tais como, na detecção e quantificação do resveratrol devido à sua rápida absorção pelo intestino, na limitada

estabilidade dos metabolitos, na ampla distribuição pelos órgãos após a ingestão e na rápida eliminação (LEONARD, S.S. [et al.], 2003). Actualmente, existem fortes evidências de que o resveratrol acumulado nas células epiteliais ao longo do tracto gastrointestinal, em conjunto com os metabolitos formados, acarreta benefícios para a saúde (WALLE, T. [et al.], 2004). Contudo, o impacto de componentes da dieta na biodisponibilidade do resveratrol permanece por esclarecer.

2. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RESVERATROL

Uma revisão aprofundada da literatura evidencia os avanços na instrumentação e metodologia analítica aplicadas aos compostos fenólicos, particularmente o resveratrol e respectivos derivados presentes nos vinhos. Nos últimos anos diversos trabalhos têm sido efectuados com vista à optimização das condições de preparação da amostra, nomeadamente no que se refere à utilização de modos de extracção e análise adequados (Figura 5).

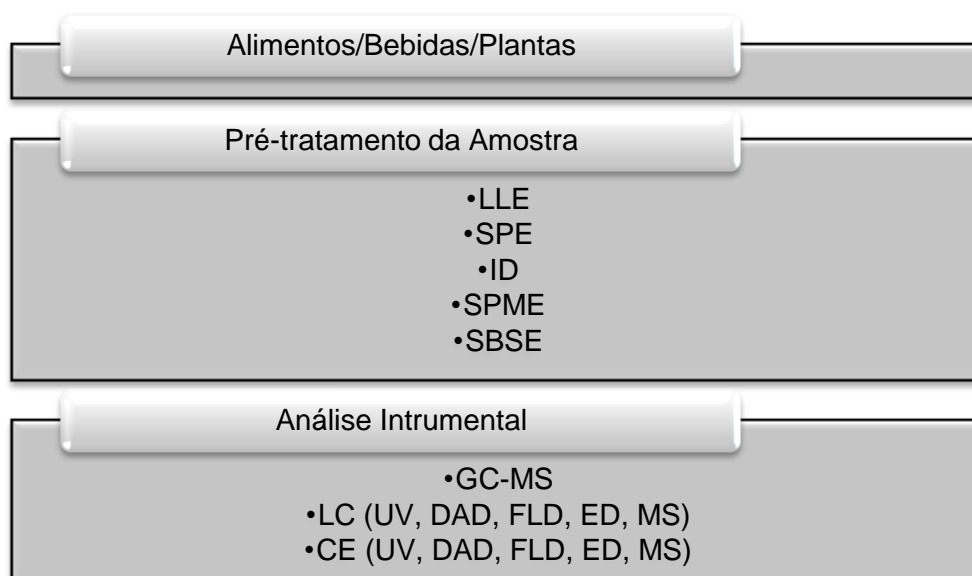


Figura 5- Metodologias utilizadas na determinação de resveratrol em alimentos, bebidas e plantas. Abreviaturas: LLE, extracção líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*); SPE, extracção em fase sólida (*solid-phase extraction*); ID, injeção directa; SPME, microextracção em fase sólida (*solid phase micro-extraction*); SBSE, extracção sortiva em barra de agitação; GC-MS, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (*gas chromatography-mass spectrometry*); LC, cromatografia líquida (*liquid chromatography*); DAD, detector de díodos (*diode array detector*); FLD, detector de fluorescência (*fluorescence detector*); ED, detector electroquímico (*electrochemical detector*); MS, espectrometria de massa (*mass spectrometry*) e CE, electroforese capilar (*capillary electrophoresis*).

Na análise do resveratrol em vinho têm sido utilizadas técnicas de extracção líquido-líquido (LLE) (CELOTTI, E. [et al.], 1996); (RODRIGUEZ-DELGADO, M.A. [et al.], 2001); (DIAZ, T.G. [et al.], 2007); (NAVE, F. [et al.], 2007); (BRAVO, M.N. [et al.], 2008); (FANZONE, M. [et al.], 2010) de extracção em fase sólida (SPE) (GAMOH, K. e NAKASHIMA, K., 1999); (BAPTISTA, J.A.B. [et al.], 2001); (DOMINGUEZ, C. [et al.], 2001); (GEROGIANNAKI-CHRISTOPOULOU, M. [et al.], 2006); (MERCOLINI, L. [et

al.], 2008), injeção directa (sem preparação prévia da amostra) (GOLDBERG, D.M. [et al.], 1996); (LOPEZ, M. [et al.], 2001); (LA TORRE, G.L. [et al.], 2006); (DE QUIROS, A.R.B. [et al.], 2007); (FEIJOO, O. [et al.], 2008) e, mais recentemente, a microextracção em fase sólida (SPME) (VINAS, P. [et al.], 2008); (VINAS, P. [et al.], 2009) e a extracção sortiva em barra de agitação (SBSE) (VINAS, P. [et al.], 2008). De um modo geral, as amostras de vinho são filtradas e/ou centrifugadas e injectadas directamente no sistema de separação, ou mais frequentemente os analitos são isolados utilizando a extracção líquido-líquido (LLE) ou a extracção em fase sólida (SPE). A elevada complexidade das amostras de vinho torna essencial a optimização da sua preparação utilizando nos processos extractivos diferentes solventes como metanol, etanol, isopropanol, acetonitrilo, acetato de etilo, éter dietílico e diclorometano.

Após a preparação da amostra, um dos passos críticos consiste na selecção da metodologia analítica mais adequada para a identificação e quantificação do composto em estudo. Técnicas analíticas modernas, como a micro cromatografia líquida de alta eficiência (μ -HPLC) (DUGO, G. [et al.], 2006); (FAN, E. [et al.], 2008), a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS-MS) (CANTOS, E. [et al.], 2003); (VLASE, L. [et al.], 2009) e/ou a ressonância ciclótronia de iões com transformada de Fourier (FTICR-MS) (JIANG, L.Y. [et al.], 2010), a desadsorção por laser assistida por matriz acoplada à espectrometria de massa (MALDI-MS) (SPACIL, Z. [et al.], 2009), a *laser desorption coupled with resonance-enhanced multiphoton ionization and time-of-flight mass spectrometry detection* (LD-REMPI-TOFMS) (OREA, J.M. [et al.], 2001); (SANCHEZ, J.B.J. [et al.], 2005) e a eletroforese capilar (CE) (DOBIASOVA, Z. [et al.], 2002); (SPANILA, M. [et al.], 2005), têm fornecido dados importantes sobre a detecção do resveratrol em amostras de vinho. Contudo, é importante salientar que a análise deste composto, em amostras de produtos da vinha e do vinho é complicada dada a grande diversidade de compostos e os diferentes teores em que estão presentes. A cromatografia líquida é pois, a técnica de eleição para separar e quantificar o resveratrol em vinhos e seus derivados. A separação cromatográfica é efectuada, na maioria dos trabalhos, com colunas de fase reversa C_{18} com sistemas de solventes binários (eluição por gradiente), usando como eluentes água acidificada e um solvente orgânico polar como o acetonitrilo ou metanol (CANTOS, E. [et al.], 2000); (CANTOS, E. [et al.], 2000); (BELLOMARINO, S.A. [et al.], 2010); (CVEJIC, J.M. [et al.], 2010); (PEREIRA, V. [et al.], 2010). Métodos de detecção espectroscópicos que envolvem radiação da zona UV e visível (RODRIGUEZ-DELGADO, M.A. [et al.], 2001); (VIAN,

M.A. [et al.], 2005); (TAROLA, A.M. [et al.], 2007); (LA TORRE, G.L. [et al.], 2006) têm sido bastante utilizados dado que o resveratrol apresenta absorção característica nesta região do espectro e, deste modo, pode ser facilmente detectado. Outros métodos de detecção utilizados são o detector de fluorescência (SANCHEZ, J.B.J. [et al.], 2005); (DE QUIROS, A.R.B. [et al.], 2007) e o detector electroquímico (ZHU, Y.X. [et al.], 2000); (KOLOUCHOVA-HANZLIKOVÁ, I. [et al.], 2004).

A cromatografia líquida é sem dúvida a técnica analítica mais utilizada devido aos avanços tecnológicos que tem sofrido, nomeadamente o acoplamento com a espectrometria de massa. De facto, esta técnica tem sido aplicada na análise de *trans*-resveratrol não só em amostras de vinho tinto como também nas uvas e em produtos da vinificação (CARERI, M. [et al.], 2003); (BRAVO, M.N. [et al.], 2008); (BUIARELLI, F. [et al.], 2006); (PUSSA, T. [et al.], 2006). No âmbito do presente trabalho, embora inicialmente estivesse previsto comparar duas metodologias analíticas para a quantificação de *cis*- e *trans*-resveratrol em amostras de vinho tinto, foi verificado no caso do LC-MS, o aparecimento de *carryover* no espectrómetro de massa, pelo que após cada injeção era necessário efectuar diversas limpezas, aumentando consideravelmente o tempo entre cada análise. Deste modo, foi utilizada como técnica analítica a cromatografia líquida acoplada a um detector de díodos (HPLC-DAD), sendo esta também uma técnica muito utilizada. De um modo geral, podemos afirmar que a sensibilidade é inferior à demonstrada com um detector de espectrometria de massa, no entanto como se pode verificar no artigo I do capítulo II- parte experimental deste trabalho, para as concentrações normalmente detectadas dos compostos em estudo em amostras de vinho, esta revelou ser uma técnica sensível, sem efeitos de *carryover* e com custos adicionais inferiores.

No que diz respeito, à cromatografia gasosa com espectrometria de massa, embora existam estudos reportados na literatura, este método de análise acarreta alguns inconvenientes na determinação do resveratrol em amostras de vinho. De salientar a necessidade de efectuar uma derivatização prévia da amostra, a fim de aumentar a volatilidade deste composto, e ainda dependendo da metodologia utilizada, poderá resultar numa certa isomerização do *trans*-resveratrol em *cis*-resveratrol (TRELA, B.C. e WATERHOUSE, A.L., 1996).

Na Tabela 3 apresenta-se uma revisão da literatura, dos artigos publicados em revistas com arbitragem científica, das principais metodologias analíticas utilizadas na determinação de resveratrol em amostras de vinho e seus derivados. Para tal,

utilizaram-se as bases de dados de artigos científicos, *Pubmed* e *ISI Web of Knowledge*, com as palavras-chave “*resveratrol*”, “*wine*” e “*analytical methods*”.

Tabela 3- Revisão das metodologias analíticas que visam a determinação de resveratrol em amostras de vinho e derivados.

Amostra	Volume de amostra (mL)	Método de Extração	Eluentes	Fase Estacionária	Fluxo (mL/min)	Técnica Analítica	LOD; LOQ (µg/mL)	Referência
Vinho australiano	0,020	ID	Gradiente: solvente A metanol e solvente B Ácido trifluoroacético (0,1%, v/v)	Chromolith Performance RP-18e (100 mm x4,6 mm); Merck, Kilsyth, Vic., Australia	3,0	HPLC-CID LC-MS	ND	(BELLOMARINO, S.A. [et al.], 2010)
Vinho tinto comercial	0,5	LLE SPE	Isocrático: mistura acetonitrilo-ácido fosfórico (0,04%), (18:82, v/v)	Coluna Nova-Pak C ₁₈ , (150 mmx3,9 mm, 4µm); Waters Millipore	ND	HPLC-DAD HPLC-FLD	0,018/0,030; ND	(GODOY-CABALLERO MDEL, P. [et al.], 2010)
Vinho tinto, branco e rosé de origem sérvia	5	SPE	Gradiente: solvente A: acetonitrilo-ácido acético-água (20:2:78, v/v/v), solvente B: acetonitrilo-ácido acético-água (90:2:8, v/v/v)	Coluna de fase reversa C ₁₈	1,0	HPLC-DAD	0,02	(CVEJIC, J.M. [et al.], 2010)
Vinho argentino	50	LLE	Gradiente: solvente A, água/ácido acético (98:2, v/v) e solvente B, água/acetonitrilo/ácido acético, 78:20:2, v/v/v)	Coluna de fase reversa Nova-Pak C ₁₈ (300 mm x 3,9 mm, 4 µm); Waters Corp.; T= 20 °C	1,0-1,2	HPLC-DAD	ND	(FANZONE, M. [et al.], 2010)
Uvas	1 Kg	LLE	Isocrático: 43% metanol e 57% água	Coluna de fase reversa C ₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	0,7	LC-MS-MS FTICR-MS	ND	(JIANG, L.Y. [et al.], 2010)

Amostra	Volume de amostra (mL)	Método de Extração	Eluentes	Fase Estacionária	Fluxo (mL/min)	Técnica Analítica	LOD; LOQ (µg/mL)	Referência
Vinhos brancos e tintos comerciais	10	SPE	ND	Coluna BP-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	1,2	GC-MS	ND; 0,8 ng/mL	(MONTES, R. [et al.], 2010)
Vinho tinto, branco e rosé da madeira	0,01	ID	Gradiente: solvente A: 10 mM de uma solução de tampão fosfato pH 2,70 com ácido sulfúrico concentrado; solvente B: 100% acetonitrilo	Atlantis C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 µm); Milford, MA, USA	1	HPLC-DAD	0,153; 0,465	(PEREIRA, V. [et al.], 2010)
Vinho da madeira	ND	ID	Gradiente: solvente A: 10 mM de uma solução de tampão fosfato pH 2,70 com ácido sulfúrico concentrado; solvente B: 100% acetonitrilo	Atlantis C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm; 5 µm); Milford, MA, USA	1	HPLC-DAD ET	ND	(RUDNITSKAYA, A. [et al.], 2010)
Vinho tinto, branco e rosé proveniente de diferentes regiões espanholas	5	SPE	Gradiente: solvente A, metanol/ácido acético/água (10:2:88, v/v/v) e solvente B, metanol/ácido acético/água (90:2:8, v/v/v)	A Luna C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); Phenomenex	0,2	HPLC-DAD	0,03; 0,11	(BELISARIO-SANCHEZ, Y.Y. [et al.], 2009)
Uvas suecas e vinhos chilenos e australianos	2	SPE	ND	ND	ND	MALDI-MS	0,10; ND	(SPACIL, Z. [et al.], 2009)
Vinho tinto, branco e rosé de origem espanhola	8	SPME	ND	Coluna DB-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm); Tecnokroma, Spain	1,0	GC-MS	0,09 ng/mL; 0,3 ng/mL	(VINAS, P. [et al.], 2009)

Amostra	Volume de amostra (mL)	Método de Extração	Eluentes	Fase Estacionária	Fluxo (mL/min)	Técnica Analítica	LOD; LOQ (µg/mL)	Referência
Vinho moscatel região de Setúbal	10	LLE	Gradiente: solvente A 0,5 % de ácido fórmico e solvente B acetonitrilo	RP-18 (100 mm x 2,1 mm, 5 µm)	0,25	HPLC-DAD HPLC-FLD HPLC-ED	0,02;0,06 0,01;0,03 0,45;1,35	(BRAVO, M.N. [et al.], 2008)
Vinho e uvas de origem chinesa	20 g	LLE	Gradiente: solvente A acetonitrilo/água e solvente B 0,5 % de ácido fórmico	Coluna C ₁₈ (240 mm x 160 mm, 75 µm); Unimicro Technologies Inc. (Pleasanton, CA)	0,02	µ-HPLC-UV-Vis	ND; 0,062	(FAN, E. [et al.], 2008)
Vinho tinto e branco galego	0,020	ID	Gradiente: solvente A ácido acético (6%) e solvente B ácido acético/acetonitrilo/água, (5:30:65, v/v/v)	Coluna Lichrocart (250 mm x 4mm, 5 µm)	0,3	HPLC-FLD	ND	(FEIJOO, O. [et al.], 2008)
Vinho tinto e branco italiano	0,5	SPE	Isocrático: acetonitrilo (21%, v/v), pH3,0; 50 mM de tampão fosfato contendo 0,2% de trietilamina (79%, v/v)	Coluna Zorbax C ₈ RP (150-4,6 mm, 5 µm)	1,5	HPLC-FLD	1ng/mL; 3 ng/mL	(MERCOLINI, L. [et al.], 2008)
Vinhos das ilhas canárias e Madeira	5	LLE	Gradiente: solvente A água/ácido acético/metanol, (88:2:10, v/v/v) e solvente B água/ácido acético/metanol, (8:2:90, v/v/v)	Coluna Nova-Pak C ₁₈ (150 mm x 3,9 mm, 4 µm), Waters	0,7	HPLC-DAD	0,07; 0,03	(PAIXAO, N. [et al.], 2008)
Vinho tinto, branco e sumo de uva de origem espanhola	7 5	DI-SPME SBSE	Optimização da fase móvel: testaram-se diferentes proporções de água/acetonitrilo (fase móvel I) e diferentes proporções de acetonitrilo 30-70%, v/v/ácido acético 1-5%, v/v (fase móvel II)	Discovery HS PEG, Supelco, Bellefonte, PA, USA	1,0	HPLC-FLD	2 ng/mL; 6,7 ng/mL 0,1 ng/mL, 0,3 ng/mL	(VINAS, P. [et al.], 2008)

Amostra	Volume de amostra (mL)	Método de Extração	Eluentes	Fase Estacionária	Fluxo (mL/min)	Técnica Analítica	LOD; LOQ (µg/mL)	Referência
Vinhos tintos húngaros	0,020	ID	Gradiente: solvente A metanol/água/ácido acético, (10:90:1; v/v/v) e solvente B metanol/água/ácido acético (90:10:1; v/v/v)	Coluna C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 6 µm)	1,5	HPLC-DAD	ND	(AVAR, P. [et al.], 2007)
Vinho tinto e branco italiano	1	SPE	Gradiente: solvente A metanol/1,8 mM +ácido fórmico e solvente B água/1,8 mM ácido fórmico	Coluna C ₁₈ (250 mm x 2,1 mm, 5 µm), Kromasil	0,15	HPLC-MS	0,048; 0,160	(BUIARELLI, F. [et al.], 2007)
Vinho tinto proveniente da região central espanhola	0,020	ID	Gradiente: Solvente A água/acetonitrilo/ácido acético (67:32:1, v/v/v) e solvente B água/ácido acético (99:1, v/v),	Teknokroma, tr-015605 tracer extrasil ODS2 (25-0,4 cm, 5 µm), T=35°C	0,8-1,0	HPLC-UV HPLC-FLD	0,02; ND 0,03; ND	(DE QUIROS, A.R.B. [et al.], 2007)
Uvas de origem italiana	0,020	ID	Gradiente: solvente A metanol/ácido acético (97,5:2,5, v/v) e solvente B água/ácido acético (97,5:2,5, v/v)	Coluna ODS Hypersil (250 mm x 4 mm, 5 µm), Thermo Quest, Hypersil Division	0,4-0,5	HPLC-DAD	ND	(GAMBUTI, A. [et al.], 2007)
Vinho tinto e branco de origem espanhola	0,10 (vinho tinto) 0,20 (vinho branco)	LLE	ND	ND	ND	Espectrofotometria de UV-Vis Espectrofotometria de Fluorescência	0,058; ND 0,018; ND 1,6 ng/mL; ND	(GALEANO DIAZ, T. [et al.], 2007)
Vinho tinto e branco de origem espanhola	0,020	ID	Isocrático: acetonitrilo/4,1 % ácido acético, (19:81, v/v)	Coluna C ₁₈ Nova-Pak (150 mm x 3,9 mm, 4 µm)	0,8	HPLC-FLD	0,29 ng/mL; ND	(GALEANO-DIAZ, T. [et al.], 2007)

Amostra	Volume de amostra (mL)	Método de Extração	Eluentes	Fase Estacionária	Fluxo (mL/min)	Técnica Analítica	LOD; LOQ (µg/mL)	Referência
Vinho tinto espanhol	50	LLE	Gradiente: solvente A água/ácido acético (98:2, v/v) e solvente B água/acetonitrilo/ácido acético (78:20:2, v/v/v)	Coluna Nova-Pak C ₁₈ (300 mm x 3,9 mm, 4 µm)	1,0-1,2	HPLC-DAD	ND	(HERNANDEZ, T. [et al.], 2007)
Vinho tinto, branco e rosé italianos	0,5 µL	ID	Gradiente: solvente A água/ácido acético (95:5, v/v) e solvente B acetonitrilo	Coluna Supelco Discovery Biopeptide C ₁₈ (10 cm x 0,32 mm, 3 µm)	0,004	µ-HPLC-FLD	5 ng/mL; 15 ng/mL	(LOPEZ, R. [et al.], 2007)
Vinho branco espanhol (Galiza)	0,020	ID	Gradiente: solvente A: água / ácido acético (94:6, v/v) e solvente B água / acetonitrilo / ácido acético, (65:30:5, v/v/v)	Tracer Extrasil ODS2 column (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); T= 35°C	0,8-1,0	HPLC-DAD HPLC-FLD LC-MS	0,015; ND 0,022; ND ND	(LOPEZ-HERNANDEZ, J. [et al.], 2007)
Vinho tinto e branco portugueses	10 5	SS-LLE LLE	Gradiente: solvente A água/metanol/ácido fórmico, (97:2,5:0,5, v/v/v) e solvente B metanol	Coluna RP Agilent Zorbax Eclipse XDB-C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	1,0	HPLC-DAD	0,092; 0,383	(NAVE, F. [et al.], 2007)
Uvas de origem grega e francesa	250 g	LLE	Gradiente: solvente A água, solvente B ácido acético e solvente C metanol	Coluna Kromasil 100 C ₁₈ column (250 mm x 4 mm, 5 µm); T=30°C	0,6-0,7	HPLC-DAD	30; ND	(SAKKIADI, A.V. [et al.], 2007)
Vinho tinto italiano	0,64 µL	ID	Gradiente: solvente A água/ácido fórmico, (9:1, v/v) e solvente B água/ácido fórmico/acetonitrilo, (4:1:5, v/v/v)	Coluna Waters Symmetry C ₁₈ (150 mm x 2,1 mm, 3,5 µm)	0,04	µ-HPLC-MS	ND	(DUGO, G. [et al.], 2006)
Vinho tinto e branco grego	0,020	ID	Gradiente: solvente A água/metanol, (5:5, v/v) e solvente B água/acetonitrilo, (7:3, v/v)	Coluna ODS C ₁₈ (250 mm x 4 mm, 5 µm); T= 40°C	0,6	HPLC-DAD	ND	(GEROGIANNAKI-CHRISTOPOULOU, M. [et al.], 2006)

Amostra	Volume de amostra (mL)	Método de Extração	Eluentes	Fase Estacionária	Fluxo (mL/min)	Técnica Analítica	LOD; LOQ (µg/mL)	Referência
Vinho tinto de origem norte africana	0,1	LLE	Gradiente: solvente A 0,025% ácido trifluoroacético em água e solvente B acetonitrilo/solvente A (80:20, v/v)	Coluna Bischoff Prontosil 120-5-C ₁₈ -AQ (250 mm x 4 mm, 5 µm); T= 25°C	1,0	HPLC-DAD MALDI	ND	(GUEBAILIA, H.A. [et al.], 2006)
Vinho tinto italiano	0,005	ID	Gradiente: solvente A ácido fórmico e água (pH 3) e solvente B ácido fórmico e acetonitrilo (pH 3)	Coluna Supelco Discovery C ₁₈ (150 mm x 2,1 mm, 5 µm)	0,2	HPLC-DAD LC-MS	0,001; ND	(LA TORRE, G.L. [et al.], 2006)
Vinho tinto comercial	100	LLE	ND	Coluna DB-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	0,8	GC-MS	0,001–0,008; ND	(MINUTI, L. [et al.], 2006)
Vinho tinto húngaro	0,02	ID	Gradiente: solvente A metanol/água/ácido acético, (10:90:1, v/v/v) e solvente B metanol/água/ácido acético, (90:10:1, v/v/v)	Coluna C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 6 µm)	1,5	HPLC-DAD	ND	(NIKFARDJAM, M.S.P. [et al.], 2006)
Uvas brancas e tintas de origem espanhola	0,5 g	PLE-SPE	Isocrático: solvente A 0,1% de ácido acético e solvente B 0,1% de ácido acético em metanol	Coluna Chromolith Performance PR-18e (100 mm x 4,6 mm)	5	HPLC-DAD HPLC-FLD	0,017; 0,058 0,003; 0,004	(PINEIRO, Z. [et al.], 2006)
Vinho tinto e rosé espanhol	0,1	ID	Gradiente: solvente A ácido acético glacial e solvente B solvente A/acetonitrilo, (20:80, v/v)	Coluna RP Tracer Nucleosil, C ₁₈ 120 (25 cm x 0,4 cm, 5 µm); T= 40 °C	1,5	HPLC-DAD		(ABRIL, M. [et al.], 2005)

Amostra	Volume de amostra (mL)	Método de Extração	Eluentes	Fase Estacionária	Fluxo (mL/min)	Técnica Analítica	LOD; LOQ (µg/mL)	Referência
Vinho tinto e branco húngaro	0,020	ID	Gradiente: solvente A metanol/água/ácido acético (10:90:1, v/v/v) e solvente B metanol/água/ácido acético (90:10:1, v/v/v)	Coluna C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 6 µm)	1,0	HPLC-DAD LC-MS	0,9 pmol; ND 0,3 pmol; ND	(MARK, L. [et al.], 2005)
Vinho tinto espanhol	0,020	ID	Gradiente: solvente A acetonitrilo/ácido acético (95:5, v/v) e solvente B água/ácido acético (95:5, v/v)	Coluna Nova-Pak C ₁₈ (4 µm)	1,0	HPLC-DAD	ND	(PADILLA, E. [et al.], 2005)
Folhas de videira	3 Kg	ND	Gradiente: solvente A metanol / ácido acético / água (10:2:88, v/v/v) e solvente B metanol / ácido acético / água (90:2:8, v/v/v)	Coluna Tecknokroma Cromasyl C ₁₈ (150 mm x 4,6 mm; 5 µm)	1,0	LD-REMPI-TOFMS; HPLC-FLD	2,1; 6,7 µg/L 20; 67	(SANCHEZ, J.B.J. [et al.], 2005)
Vinho australiano	0,35-2,45	SPE	Electrólito borato 25 mM, pH 9,38	Coluna (38,5 cm x 30 cm, 75 µm), Services, The Chase, Hallow, UK	0,3-1,2	CE-DAD	ND	(SPANILA, M. [et al.], 2005)
Vinho francês	0,020	ID	Gradiente: solvente A água / ácido acético (94:6, v/v) e solvente B água / acetonitrilo / ácido acético (65:30:5, v/v/v)	Duas colunas em série: Chromolith Performance RP-18e (100 mm x 4,6 mm) da VWR International	4-7	HPLC-DAD	0,032;0,1	(VIAN, M.A. [et al.], 2005)
Vinho proveniente do Brasil	1,4 L	LLE	Gradiente: solvente A água/ácido acético pH 2,5 e solvente B acetonitrilo/solvente A (80:20, v/v)	Coluna Hewlett-Packard C ₁₈ (250 mm x 4 mm, 5 µm); T= 30°C	0,5	HPLC-UV-Vis	0,2; ND	(VITRAC, X. [et al.], 2005)

Amostra	Volume de amostra (mL)	Método de Extração	Eluentes	Fase Estacionária	Fluxo (mL/min)	Técnica Analítica	LOD; LOQ (µg/mL)	Referência
Vinho tinto espanhol	0,025	ID	Gradiente: solvente A água/0,05% ácido trifluoroacético e solvente B metanol/acetonitrilo (60:40, v/v) com 0,05% de ácido trifluoroacético	Coluna LiChrospher 100 RP-18 (250 mm x 4 mm, 5 µm), Merck	1,0	HPLC-DAD	ND	(MORENO-LABANDA, J.F. [et al.], 2004)
Vinho tinto e branco da região do Alentejo	0,020 (ID)	LLE SPE ID	Isocrático: Mistura água/acetonitrilo/ ácido acético (70:29,9:0,1, v/v/v)	C ₁₈ Lichrocart (250 x 6 mm, 5 µm), Merck	1,0	HPLC-UV	0,06; ND	(RATOLA, N. [et al.], 2004)
Vinho tinto e uvas francesas	5	LLE	Gradiente: solvente A 5% de ácido fórmico e solvente B metanol	Coluna RP C ₁₈ LiChroCART (25 cm x 0,4 cm, 5 µm), Merck	1,0	HPLC-DAD-MS-MS	ND	(CANTOS, E. [et al.], 2003)
Vinho tinto italiano	0,005	ID	Isocrático: Solução aquosa com 1% de ácido fórmico/acetonitrilo/2-propanol, (70:22:8, v/v/v)	Coluna Luna 18 (2) (250 mm x 2,0 mm, 5 µm), Phenomenex, Torrance, CA; T= 30°C	0,2	HPLC-DAD-MS	0,07; 0,3	(CARERI, M. [et al.], 2003)
Vinho tinto chileno, canadiano e americano	0,025	ID	Gradiente: solvente A ácido acético/metanol/água (5:15:80, v/v/v) e solvente B ácido acético/metanol/água (5:20:75, v/v/v) e solvente C ácido acético/metanol/água (5:45:50, v/v/v)	Coluna RP Prodigy (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), Waters/Millipore	0,5	HPLC-UV-Vis	ND	(FAUSTINO, R.S. [et al.], 2003)
Vinho tinto, branco e rosé espanhol	50	LLE	Gradiente: solvente A água/ácido acético (98:2, v/v) e solvente B água/acetonitrilo/ácido acético (78:20:2, v/v/v)	Coluna RP Nova-Pak C ₁₈ (300 mm x 3,9 mm, 4 µm)	1.0	HPLC-DAD	ND	(POZO-BAYON, M.A. [et al.], 2003)

Amostra	Volume de amostra (mL)	Método de Extração	Eluentes	Fase Estacionária	Fluxo (mL/min)	Técnica Analítica	LOD; LOQ (µg/mL)	Referência
Vinho tinto e branco de origem portuguesa e espanhola	0,025	ID	Gradiente: solvente A 0,1 % metanol e 2% ácido acético, pH 2,5 e solvente B 84% metanol e 2% ácido acético	Coluna Luna Phenyl-Hexylm(150 mm x 2 mm, 3 µm), Phenomenex, Inc., Torrance, CA	0,15	HPLC-DAD	ND	(ALONSO, A.M. [et al.], 2002)
Uvas espanholas	0,020	LLE	Gradiente: solvente A 5% de ácido fórmico e solvente B metanol	Coluna RP C ₁₈ LiChroCART (25 cm x 0,4 cm, 5 µm), Merck, Darmstadt, Germany	1,0	HPLC-DAD-MS-MS	ND	(CANTOS, E. [et al.], 2002)
Vinho tinto e branco	0,010	ID	Gradiente: Solvente A metanol-água (2,5:97,5, v/v) a pH 3 com ácido fosfórico e solvente B metanol-água (50:50, v/v) a pH 3 com ácido fosfórico	Chromolith Performance RP-18e (100-4,6 mm) (Merck); T=30°C	2,1	HPLC-DAD	0,01; ND	(CASTELLARI, M. [et al.], 2002)
Vinho tinto e branco francês	2	SPE	ND	Coluna capilar (43,0 cm x 36,5 cm, 75,0 µm)	1,0	CE-UV-Vis	0,04; ND	(DOBIASOVA, Z. [et al.], 2002)
Vinho tinto, branco, rosé e uvas sul de França	20	LLE	Gradiente: solvente A metanol e solvente B água bidestilada	Coluna Nucleosil 100 C ₁₈ (250 mm x 4,0 mm), Hewlett-Packard; T= 30 °C	0,5	HPLC-DAD	ND	(LANDRAULT, N. [et al.], 2002)

Amostra	Volume de amostra (mL)	Método de Extração	Eluentes	Fase Estacionária	Fluxo (mL/min)	Técnica Analítica	LOD; LOQ (µg/mL)	Referência
Vinho e sumo de uva italianos	10	LLE	Gradiente: solvente A metanol e solvente B ácido fórmico 0,5%, v/v	Coluna Hypersil ODS (100 mm x 2,1 mm, 5µm); T= 25°C	0,25	LC-MS	ND; 0,31 pmol	(WANG, Y. [et al.], 2002)
Vinho tinto português	5	SPE	Gradiente: solvente A ácido fosfórico (0,4%, v/v) a pH 2,3 e solvente B acetonitrilo/solvente A, (80:20, v/v)	Coluna ODS Hypersil (100 mm x 4,6 mm, 5 µm); T= 35°C	1,0 0,004	HPLC-UV-Vis LC-MS	ND	(BAPTISTA, J.A.B. [et al.], 2001)
Uvas espanholas	0,020	LLE	Gradiente: solvente A 5% de ácido fórmico e solvente B metanol	Coluna RP-18 Lichrocart, (12 mm x 0,4 cm; 5 µm), Merck	1,0	HPLC-DAD	ND	(CANTOS, E. [et al.], 2001)
Vinho tinto e branco de origem espanhola	5	SPE	Gradiente: solvente A água bidestilada (Milli-Q) com ácido sulfúrico a pH 2,5 e solvente B acetonitrilo	Coluna C ₁₈ (150 mm x 2,1 mm, 5 µm)	0,2	HPLC-DAD-MS	0,95; 3,16 1,20; 4,01	(DOMINGUEZ, C. [et al.], 2001)
Vinho tinto espanhol	0,020	ID	Gradiente: solvente A ácido acético, solvente B metanol e solvente C água	Coluna ODS Hypersil column (250 mm x 34 mm, 5 µm)	0,4-0,5	HPLC-DAD	ND	(LOPEZ, M. [et al.], 2001)
Folhas de videira e uvas	ND	ND	ND	ND	ND	LD-REMPI-TOFMS	1 ng/mL; 4 ng/mL	(OREA, J.M. [et al.], 2001)
Uvas espanholas	3 g	SFE	Isocrático: ácido acético/metanol/água, (5:20:75, v/v/v)	Coluna Lichrocart® 100RP-18 (C ₁₈) (125 mm x 4 mm, 5 µm) e coluna LichroCart® 100RP-8 (C ₈) (12,5 cm x 4 cm, 5 µm)	1,5	HPLC-UV-Vis	0,1; ND 0,1; ND	(PASCUAL-MARTI, M.C. [et al.], 2001)

Amostra	Volume de amostra (mL)	Método de Extração	Eluentes	Fase Estacionária	Fluxo (mL/min)	Técnica Analítica	LOD; LOQ (µg/mL)	Referência
Vinho proveniente das ilhas canárias	5	LLE	Gradiente: Solvente A: metanol/ácido acético/água (10:2:88, v/v/v) e solvente B metanol-ácido acético-água (90:2:8, v/v/v)	Coluna Nova-Pak C ₁₈ (150-3,9 mm, 4 µm); Waters, Mildford, MA, USA	1,0	HPLC-UV-Vis HPLC-FLD	0,02; 0,07 0,003; 0,01	(RODRIGUEZ-DELGADO, M.A. [et al.], 2001)
Vinho tinto brasileiro	0,020	ID	Isocrático: água/acetonitrilo, (75:25, v/v) a pH 3 ajustado com ácido fosfórico	Coluna C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm); Brownlee, Norwalk, U.S.A.	1,5	HPLC-UV-Vis	ND	(SOUTO, A.A. [et al.], 2001)
Vinho proveniente da Austrália, Califórnia e Itália e sumos de uva	0,020 0,005	ID	Gradiente: Solvente A água/metanol/85% ácido fosfórico (90:7,9:21, v/v/v) e solvente B água/tetrahidrofurano/metanol/85% ácido fosfórico (60:26,7:7,9:5,4, v/v/v/v) Para MS a mesma fase móvel mas sem o ácido fosfórico	Coluna Hypersil BDS C ₁₈ (125 mmx4 mm, 3 µm), Grom, Herrenberg-Kayh, Germany; T=50 °C Coluna Phenomenex Luna C ₁₈ (50 mm x 2 mm, 3 µm); T=60°C para HPLC-MS	1,0 0,2	HPLC-DAD HPLC-FLD LC-MS	1,3 ng; ND 0,7 ng; ND 1,3 ng; ND	(STECHEER, G. [et al.], 2001)
Vinho tinto Chile, Califórnia, Bulgária, França, Espanha e Itália	0,010	ID	Isocrático: acetonitrilo/água a pH 1,5 com ácido trifluoroacético (25:75, v/v)	Coluna ODS Hypersil (250 x 4,6 mm, 5 µm), Shandon, Astmoor, U.K.; T=40°C	1,0	HPLC-DAD HPLC-FLD	ND	(BURNS, J. [et al.], 2000)

Amostra	Volume de amostra (mL)	Método de Extração	Eluentes	Fase Estacionária	Fluxo (mL/min)	Técnica Analítica	LOD; LOQ (µg/mL)	Referência
Uvas tintas espanholas	0,1	LLE	Gradiente: solvente A água com 5% de ácido fórmico e solvente B metanol (DAD) Gradiente: solvente A 2,5% ácido acético, solvente B 2,5% ácido acético/acetonitrilo (90:10, v/v) e solvente C acetonitrilo (MS)	Coluna Licrochart RP-18 (25 cm x 0,4 cm, 5 µm), Merck, Darmstadt, Germany (DAD). Coluna Spherisorb S3 ODS2 (150 mm x 4,6mm, 3 µm), Waters, Wexford, Ireland (MS)	1,0 0,5	HPLC-DAD LC-MS	ND	(CANTOS, E. [et al.], 2000)
Vinho tinto branco e jerez sul de espanha	0,050	ID	Gradiente: solvente A ácido acético/água (6:94, v/v) e solvente B ácido acético/água/acetonitrilo (5:65:30, v/v/v)	Coluna LiChrospher 100 RP-18; 5 µm; (250 mm x 4 mm, 5 µm), Merck; T= 22°C	0,5	HPLC-DAD	0,012; ND	(MARTINEZ-ORTEGA, M.V. [et al.], 2000)
Vinho tinto espanhol e uvas (película, sementes e polpa)	0,020	ID	Gradiente: solvente A água/acetonitrilo (95:5, v/v) a pH 1,8 com ácido perclórico e solvente B água/acetonitrilo (50:50, v/v) a pH 1,8 com ácido perclórico	Coluna Waters Nova-Pak C ₁₈ (250 mm x 3,9 mm, 5 µm); T= 40°C	0,6	HPLC-DAD	ND	(REVILLA, E. e RYAN, J.M., 2000)

Amostra	Volume de amostra (mL)	Método de Extração	Eluentes	Fase Estacionária	Fluxo (mL/min)	Técnica Analítica	LOD; LOQ (µg/mL)	Referência
Vinhos e mostos	0,050	ID	Gradiente : solvente A acetonitrilo e solvente B 5% ácido acético	Coluna Supelco (15 cm x 0,4 cm, 5 µm)	1,0	HPLC-DAD HPLC-FLD	0,06; 0,22	(VINAS, P. [et al.], 2000)
Vinho branco e tinto de origem portuguesa e francesa	30	LLE	Gradiente: solvente A ácido acético em H ₂ O pH 2,4 e solvente B 20% fase A com 80% acetonitrilo	Nucleosil 100 C ₁₈ (250 mm x 4,0 mm), Hewlett-Packard; T= 30 °C	0,5	HPLC-DAD	5 ng; ND	(LIMA, M.T.R. [et al.], 1999)
Vinhos tintos	1	SPE	Isocrático: metanol/20 mM acetato de amónio pH 5,5 (55:45, v/v)	Coluna Capcellpak C ₁₈ UG120 (250 mm x 1,5 mm, 5 µm), Shiseido, Yokohama, Japan	0,15	LC-MS	0,2 ng; ND	(GAMOH, K. e NAKASHIMA, K., 1999)
Vinhos tintos	2	SPE	75 mM SDS, 30 mM ácido bórico, 30 mM fosfato de sódio dibásico e 15% de acetonitrilo, pH 9,2	Coluna de sílica (37 cm x 30 cm, 50 µm), 25 kV; T= 20 °C	ND	CE-DAD	0,1 µM; ND	(GU, X. [et al.], 1999)
Sumo de uva branco e tinto	ND	ID	Gradiente: solvente A ácido acético glacial em água (5:95, v/v) e solvente B 20% do solvente A e 80% acetonitrilo	Coluna Tracer Nucleosil C ₁₈ 120 (25 cm x 0,4 cm, 5 µm); T= 40°C	ND	HPLC-DAD	0,003; 0,01	(ROMERO-PEREZ, A.I. [et al.], 1999)

Amostra	Volume de amostra (mL)	Método de Extracção	Eluentes	Fase Estacionária	Fluxo (mL/min)	Técnica Analítica	LOD; LOQ (µg/mL)	Referência
Vinho tinto proveniente da Califórnia	0,03	ID	25 mM borato de sódio, 25 mM fosfato de sódio e 75 mM SDS, pH 9,0	Coluna de sílica (30 cm x 50 µm) 16 kV, Beckman Instrument; T= 20°C ou 20 kV, ISCO instrument; T= 20-25°C	ND	CE-UV; HPLC-DAD	1,25 µM; ND	(CHU, Q. [et al.], 1998)
Vinhos italianos	5	LLE	Isocrático: água/ácido acético/acetoneitrilo (75:5:20, v/v/v)	Coluna Partisphere C ₁₈ (125 mm x 4,6 mm, 5 µm), Whatman	0,5	HPLC-DAD	ND	(CELOTTI, E. [et al.], 1996)
Vinhos tintos, brancos e rosés de origem italiana, francesa, australiana e californiana	0,020	ID	Gradiente: solvente A ácido acético, solvente B metanol e solvente C água	Coluna ODS Hypersil (250 mm x 4 mm, 5 µm), Hewlett Packard, Mississauga, ON, Canada	0,4-0,5	HPLC-DAD	0,03; ND	(GOLDBERG, D.M. [et al.], 1996)
Vinho tinto e branco italiano	50	SPE	Gradiente: solvente A H ₃ PO ₄ 10 mM e solvente B acetoneitrilo	Coluna ODS-Hypersil C ₁₈ (200 mm x 2,1 mm, 5 µm); T= 40°C	0,6	HPLC-DAD	0,1; ND (vinho tinto) 0,01; ND (vinho branco)	(MATTIVI, F., 1993)

Abreviaturas: CE, electroforese capilar (*capillary electrophoresis*); CID, detector de quimioluminescência (*chemiluminescence detection*); DAD, detector de díodos (*diode array detector*); ED, detector electroquímico (*electrochemical detector*); ET, *electronic tongue*; FLD, detector de fluorescência (*fluorescence detector*); FTICR, ressonância ciclotrónica de iões com transformada de Fourier (*Fourier-transform ion cyclotron resonance*); GC-MS, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (*gas chromatography-mass spectrometry*); HPLC, cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*); ID, injeção directa; LC, cromatografia líquida (*liquid chromatography*); LD-REMPI-TOFMS, *laser desorption coupled with resonance-enhanced multiphoton ionization and time-of-flight mass spectrometry detection*; LLE, extracção líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*); LOD, limite de detecção (*limit of detection*); LOQ, limite de quantificação (*limit of quantitation*); MALDI, desadsorção com laser assistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption/ionization*); MS, espectrometria de massa (*mass spectrometry*); MS-MS, espectrometria de massa tandem (*mass spectrometry tandem*); ND, não determinado; PLE, extracção líquida pressurizada (*pressurised liquid extraction*); RP, fase reversa (*reverse phase*); SBSE, extracção sortiva em barra de agitação (*stir bar sorptive extraction*); SFE, extracção de fluídos supercríticos (*supercritical fluid extraction*); SPE, extracção em fase sólida (*solid-phase extraction*); SPME, microextracção em fase sólida (*solid phase micro-extraction*); SS, suporte sólido (*solid supported*); UV, ultravioleta; Vis, visível.

3. BENEFÍCIOS DO RESVERATROL NA SAÚDE HUMANA

A descoberta do resveratrol, de acordo com o que foi anteriormente mencionado, ocorreu na década de 40, contudo apenas nos anos 90 foram realizados os primeiros estudos evidenciando os efeitos benéficos do resveratrol na saúde humana. Desde então, são publicados anualmente diversos trabalhos elucidativos dos efeitos benéficos desta molécula.

Assim sendo, o resveratrol pode prevenir ou diminuir a progressão de várias doenças, incluindo doenças cardiovasculares (BRADAMANTE, S. [et al.], 2004), cancerígenas (JANG, M. [et al.], 1997); (ATHAR, M. [et al.], 2007), e neurodegenerativas (JANG, J.H. e SURH, Y.J., 2003); (ZAMIN, L.L. [et al.], 2006), bem como prevenir diversos processos de envelhecimento, aumentando a longevidade (BAUR, J.A. e SINCLAIR, D.A., 2006), possui ainda propriedades anti-inflamatórias (LEIRO, J.M. [et al.], 2010), antioxidantes (FILIP, V. [et al.], 2003) e antimicrobianas (DOCHERTY, J.J. [et al.], 2007) (Figura 6).

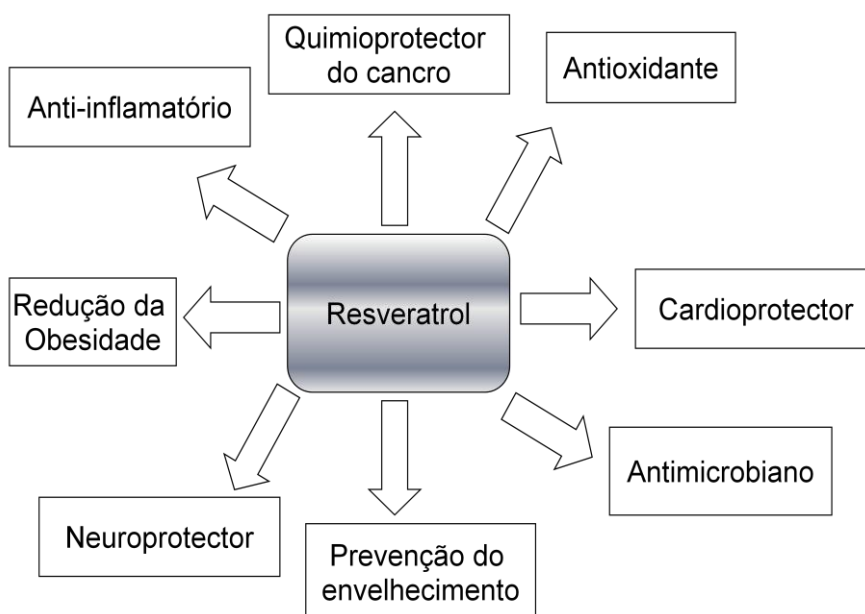


Figura 6- Efeitos benéficos do resveratrol na saúde humana.

De seguida, serão descritos alguns dos efeitos benéficos do resveratrol na saúde humana, com particular ênfase na sua actividade antimicrobiana, sendo esta um dos objectivos do presente trabalho.

3.1. EFEITO CARDIOPROTECTOR

Os efeitos cardioprotectores do resveratrol têm sido atribuídos às suas actividades biológicas, tais como actividade antioxidante, actividade anti-proliferativa, actividade anti-plaquetar e actividade anti-inflamatória.

Frankel e colaboradores foram os primeiros a estudar a capacidade antioxidante do resveratrol, tendo verificado que o resveratrol protege as lipoproteínas humanas de baixa densidade (LDL) da oxidação catalisada pelo cobre (FRANKEL, E.N. [et al.], 1993). Desde então, vários estudos demonstraram que a actividade antioxidante do resveratrol se deve essencialmente à sua capacidade em quelatar o cobre e captar radicais livres (FAUCONNEAU, B. [et al.], 1997); (FREMONT, L. [et al.], 1999). No que diz respeito à relação estrutura-actividade, os estudos apontam para a importância do grupo hidroxilo em posição *para* na capacidade em captar radicais livres e conseqüentemente na prevenção de peroxidações lipídicas catalisadas por metais (FAUCONNEAU, B. [et al.], 1997); (STOJANOVIC, S. [et al.], 2001); (LEONARD, S.S. [et al.], 2003). De salientar que, de entre os efeitos exercidos pela actividade antioxidante do resveratrol, o efeito cardioprotector tem vindo a ser amplamente estudado, pois resulta de uma variedade de efeitos antioxidantes, tais como: a prevenção da oxidação de LDL (LEONARD, S.S. [et al.], 2003), inibição da agregação plaquetária (OLAS, B. [et al.], 2008), actividade de vasorelaxamento e vasodilatação (NADERALI, E.K., 2009), protecção do endotélio vascular contra disfunções e danos decorrentes de dietas inadequadas (CHAVES, A.A. [et al.], 2009), actividade estrogénica (GEHM, B.D. [et al.], 1997) e redução da obesidade (NADERALI, E.K., 2009).

Por sua vez, Tedesco e colaboradores avaliaram as propriedades antioxidantes de polifenóis de vinhos tintos em eritrócitos humanos susceptíveis à peroxidação lipídica (TEDESCO, I. [et al.], 2000). Os resultados demonstraram que os compostos testados são potentes antioxidantes, sustentando a ideia de que o vinho tinto possui efeitos benéficos em casos de *stress* oxidativo.

No que diz respeito às propriedades anti-inflamatórias do resveratrol, diversos estudos publicados indicam que poderá melhorar a inflamação subjacente à aterosclerose (FERRERO, M.E. [et al.], 1998); (NORATA, G.D. [et al.], 2007); (BERTELLI, A.A. [et al.], 2001).

3.2. EFEITO ANTICANCERÍGENO

Desde os primeiros trabalhos com o resveratrol que se destaca o carácter inibitório deste composto na formação de lesões pré-neoplásicas (JANG, M. [et al.], 1997). Diversos estudos têm vindo a ser realizados adicionando mais evidências e reforçando o efeito anticarcinogénico deste composto (DAMIANAKI, A. [et al.], 2000); (AZIZ, M.H. [et al.], 2003); (KUNDU, J.K. e SURH, Y.J., 2008).

O resveratrol possui capacidade para suprimir, *in vitro* e *in vivo*, a proliferação de linhagens tumorais de diversos órgãos (SHAKIBAEI, M. [et al.], 2009) como: cérebro (MILOSO, M. [et al.], 1999), pulmão (WHYTE, L. [et al.], 2007), estômago (ATTEN, M.J. [et al.], 2005), fígado (BISHAYEE, A. [et al.], 2010), pâncreas (GOLKAR, L. [et al.], 2007), ovário (OPIPARI, A.W., JR. [et al.], 2004), próstata (LIN, H.Y. [et al.], 2002), intestino (SGAMBATO, A. [et al.], 2001) e pele (ASENSI, M. [et al.], 2002), incluindo leucemias e linfomas (WIEDER, T. [et al.], 2001).

No que diz respeito aos complexos mecanismos de inibição do crescimento tumoral promovidos pelo resveratrol, destacam-se: a activação da apoptose (WIEDER, T. [et al.], 2001), alteração das principais etapas da carcinogénese (PERVAIZ, S., 2004) e a actividade antioxidante (LEONARD, S.S. [et al.], 2003). A carcinogénese é um processo de múltiplas etapas que envolvem: primeiramente a mutação (Iniciação), seguida pelo desenvolvimento dessa mutação na célula estabelecendo-se o fenótipo neoplásico (Diferenciação/Promoção) e por fim, o crescimento tumoral (Progressão) (PERVAIZ, S., 2004). Assim, a busca por agentes químicos capazes de interromper essas etapas, impedindo a aquisição do fenótipo anormal, tem vindo a pôr em evidência alguns dos inúmeros mecanismos de acção do resveratrol que actuam na prevenção e no controle das neoplasias já instaladas (AZIZ, M.H. [et al.], 2003).

3.3. ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os compostos com actividade antimicrobiana podem ser incluídos em dois grupos: quando são produzidos por microrganismos, denominam-se por antibióticos, enquanto as moléculas de síntese química com propriedades idênticas, designam-se por quimioterápicos (FERREIRA, W.F.C. e SOUSA, J.C.F., 1998). Actualmente, dado o número crescente de moléculas de síntese, o termo antibiótico engloba todos os

compostos naturais ou de síntese com propriedades antimicrobianas (SOUSA, J.C., 2006).

O termo antibiótico foi criado por Waksman, em 1942, denominando todos os compostos naturais, produzidos por microrganismos, que inibem o crescimento microbiano ou que têm efeito microbicida (SOUSA, J.C., 2006). Além disso, para poderem ser utilizados na terapêutica, estes compostos não devem ter efeitos deletérios significativos para o hospedeiro infectado.

O mundo assistiu ao nascimento de uma nova era no tratamento das infecções, com a descoberta da penicilina por Fleming, em 1945, dando-se início à era da antibioterapia (FERREIRA, W.F.C. e SOUSA, J.C.F., 1998).

O estudo bioquímico dos antibióticos naturais permitiu o conhecimento das respectivas fórmulas de estrutura possibilitando a obtenção de alguns deles por síntese laboratorial. Este estudo conduziu, recentemente, a novas perspectivas no campo da antibioterapia com o desenvolvimento de antibióticos semi-sintéticos. Estas substâncias são obtidas por modificações estruturais a partir do antibiótico natural, podendo apresentar propriedades diferentes da substância natural. Desta forma, a descoberta de novas vias sintéticas para a obtenção de fármacos com propriedades mais selectivas e menor toxicidade para o paciente continuam a ser alvo da investigação dos cientistas, pois desde o início da era da antibioterapia o aparecimento de microrganismos resistentes aos fármacos antimicrobianos foi e continua a ser uma realidade (SOUSA, J.C., 2006); (WILEY, J.M. [et al.], 2009).

Durante o último século, os agentes antimicrobianos reduziram substancialmente a ameaça associada às doenças infecciosas. O uso destes fármacos, combinado com a melhoria das condições sanitárias, de alojamento e de nutrição e a existência de programas de imunização abrangentes, permitiu uma diminuição radical das doenças infecciosas não tratáveis, frequentemente fatais, contribuindo para o aumento da esperança média de vida. Contudo, a adaptação das próprias defesas dos microrganismos contra os agentes antimicrobianos usados fez com que o desenvolvimento, a proliferação e a persistência da resistência antimicrobiana, seja actualmente um dos maiores problemas de saúde pública, tornando urgente a descoberta de novos fármacos dotados de actividade antimicrobiana (OVERBYE, K.M. e BARRETT, J.F., 2005); (BUTLER, M.S. e BUSS, A.D., 2006).

É fundamental ter em conta que, para além da importância de descobrir novos antibióticos, para serem utilizados como medicamentos, existe também uma enorme pesquisa no desenvolvimento de novos conservantes na indústria alimentar. Assim, apesar da maioria dos conservantes sintéticos serem eficazes, há uma maior preocupação com a saúde por parte dos consumidores, o que faz com que haja um interesse crescente em novos compostos antimicrobianos obtidos a partir de fontes naturais (SHAN, B. [et al.], 2008). Nos últimos anos, tem-se desenvolvido um interesse crescente por compostos biologicamente activos incluindo antioxidantes de plantas e outras fontes naturais (TOMBOLA, F. [et al.], 2003).

Assim, o resveratrol, para além das actividades biológicas acima descritas, tem vindo a ser objecto de estudo relativamente à sua capacidade de inibir o crescimento de alguns microrganismos patogénicos, tais como, bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e fungos (MAHADY, G.B. e PENDLAND, S.L., 2000); (DOCHERTY, J.J. [et al.], 2001); (CHAN, M.M.Y., 2002); (TEGOS, G. [et al.], 2002). Na Tabela 4 apresenta-se uma revisão bibliográfica dos trabalhos publicados acerca da actividade antimicrobiana deste composto.

Tabela 4- Revisão da literatura relativamente à actividade antimicrobiana do resveratrol.

Amostra	Microrganismo	Estirpe	Métodos	Referência
Resveratrol	Bactérias Gram-Negativas	<i>Cronobacter sakazakii</i> Fec39	Diluição em caldo	(KIM, T.J. [et al.], 2010)
		<i>Cronobacter sakazakii</i> MSDH		
Resveratrol	Bactérias Gram-Negativas	<i>Xylella fastidiosa</i> Temecula	Diluição em agar	(MADDOX, C.E. [et al.], 2010)
		<i>Xylella fastidiosa</i> Conn Creek		
		<i>Xylella fastidiosa</i> Dixon Almond		
		<i>Xylella fastidiosa</i> Tulare		
Resveratrol extraído de vinho	Bactérias Gram-Negativas	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13076	Curvas de Morte	(BOBAN, N. [et al.], 2010a); (BOBAN, N. [et al.], 2010b)
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		
Resveratrol isolado a partir de sementes de melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.)	Bactérias Gram-Positivas, Bactérias Gram-Negativas e Fungos	<i>Bacillus subtilis</i> Marburg 168	Diluição em agar	(KATO, E. [et al.], 2009)
		<i>Luconostoc mesenteroides</i> 9a4		
		<i>Lactobacillus plantarum</i> NRIC1067		
		<i>Escherichia coli</i> IFO3301		
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO2347		
	<i>Penicillium expansum</i> IFO6096			

Amostra	Microrganismo	Estirpe	Métodos	Referência
		<i>Clostridium perfringens</i> NCT8238		
		<i>Bifidobacterium bifidum</i> NRBC100015		
Resveratrol isolado a partir de uvas	Bactérias Gram-Negativas	<i>Helicobacter pylori</i> clínica G21, <i>cagA</i> negative (<i>cagA</i> ⁻) <i>Helicobacter pylori</i> clínica 10K, <i>cagA</i> positive (<i>cagA</i> ⁺)	Microdiluição	(MARTINI, S. [et al.], 2009)
		<i>Candida albicans</i> ATCC 90028		
		<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90112		
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213		
		<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6303		
Resveratrol	Bactérias Gram-Positivas, Bactérias Gram-Negativas e Leveduras	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 <i>Micrococcus luteus</i> Presque Isle 456 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 49226	Difusão em Disco e Microdiluição	(PETTIT, R.K. [et al.], 2009)
Resveratrol	Leveduras	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Diluição em agar	(WEBER, K. [et al.], 2009)

Amostra	Microrganismo	Estirpe	Métodos	Referência
		<i>Candida albicans</i> ATCC 76615		
		<i>Candida albicans</i> SC 5314		
		<i>Candida dubliniensis</i> CBS 8500		
		<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750		
		<i>Candida tropicalis</i> ATCC 90874		
		<i>Candida parapsilosis</i> Y 05.01		
		<i>Candida glabrata</i> Y 33.90		
		<i>Candida krusei</i> ATCC 90878		
		<i>Bacillus cereus</i>		
		<i>Listeria monocytogenes</i>		
Resveratrol	Bactérias Gram-Positivas e Bactérias Gram-Negativas	<i>Staphylococcus aureus</i>	Diluição em agar e Microdiluição	(SHAN, B. [et al.], 2008)
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		
		<i>Salmonella anatum</i>		
Resveratrol	Bactérias Gram-Positivas	<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 25746	Diluição em caldo	(DOCHERTY, J.J. [et al.], 2007)
		<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 29399		

Amostra	Microrganismo	Estirpe	Métodos	Referência
		<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 33179		
Resveratrol extraído de uvas	Levedura	<i>Candida albicans</i> TIMM 1768	Curvas de Morte	(JUNG, H.J. [et al.], 2007)
Resveratrol	Bactérias Gram-Negativas	<i>Proteus mirabilis</i> P19, WT <i>Proteus mirabilis</i> P1100 <i>Proteus mirabilis</i> Pc	Diluição em agar	(WANG, W.B. [et al.], 2006)
Protykin® (contém 50% de resveratrol)	Bactéria Gram-Negativa	<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503	Diluição em caldo	(CHATTERJEE, A. [et al.], 2005)
Resveratrol	Leveduras e Fungo	<i>Aspergillus flavus</i> KCTC 1375 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC 7296 <i>Trichosporon beigelii</i> KCTC 7707 <i>Candida albicans</i> TIMM 1768	Microdiluição e Curvas de Morte	(JUNG, H.J. [et al.], 2005)
Resveratrol	Bactéria Gram-Negativa	<i>Helicobacter pylori</i> OMU 89-362	Curvas de Morte	(MURANO, A. [et al.], 2005)
Protykin® (contém 50% de resveratrol) e resveratrol	Bactéria Gram-Negativa	<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 49503	Diluição em caldo	(CHATTERJEE, A. [et al.], 2003)

Amostra	Microrganismo	Estirpe	Métodos	Referência
Resveratrol	Fungos Filamentosos e Levedura	<i>Penicillium expansum</i> DBM 4061	Diluição em caldo	(FILIP, V. [et al.], 2003)
		<i>Aspergillus niger</i> DMF 0801		
		<i>Botrytis cinerea</i> DBM 4111		
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DBM 181		
Dois extractos de vinho tinto e resveratrol	Bactérias Gram-Negativas	<i>Helicobacter pylori cagA⁺</i> M23-3	Diluição em agar	(MAHADY, G.B. [et al.], 2003)
		<i>Helicobacter pylori cagA⁺</i> GTD7-13		
		<i>Helicobacter pylori cagA⁺</i> G1-1		
		<i>Helicobacter pylori cagA⁺</i> SS1		
		<i>Helicobacter pylori</i> ATCC43504		
Resveratrol	Bactérias Gram-Positivas, Bactérias Gram-Negativas e Leveduras	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Microdiluição	(PETTIT, G.R. [et al.], 2002)
		<i>Micrococcus luteus</i>		
		<i>Staphylococcus aureus</i>		
		<i>Escherichia coli</i>		
		<i>Enterobacter cloacae</i>		
		<i>Enterococcus faecalis</i>		

Amostra	Microrganismo	Estirpe	Métodos	Referência
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
		<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		
		<i>Candida albicans</i>		
		<i>Cryptococcus neoformans</i>		
		<i>Staphylococcus aureus</i> 8325-4 WT		
		<i>Staphylococcus aureus</i> 1758		
		<i>Escherichia coli</i> K-12 WT		
		<i>Escherichia coli</i> KLE701		
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA767 WT		
Resveratrol	Bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K1119	Microdiluição	(TEGOS, G. [et al.], 2002)
		<i>Salmonella enterica</i> ST329 WT		
		<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> ES4326 WT		
		<i>Xanthomonas campestris</i> XCC528 WT		
		<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 WT		
		<i>Erwinia rhapontici</i> Er1 WT		

Amostra	Microrganismo	Estirpe	Métodos	Referência
		<i>Erwinia carotovora</i> ATCC 358 WT		
		<i>Sinorhizobium meliloti</i> Rm1021 WT		
		<i>Bacillus megaterium</i> 11561 WT		
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213		
		<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		
Resveratrol	Bactérias Gram-Positivas, Bactérias Gram-Negativas e Fungos Filamentosos	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 18748	Microdiluição	(CHAN, M.M.Y., 2002)
		<i>Trichophyton tonsurans</i> ATCC 28942		
		<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 18762		
		<i>Epidermophyton floccosum</i> ATCC 52066		
		<i>Microsporum gypseum</i> ATCC 14683		
16 vinhos chilenos, 2 extractos seleccionados e resveratrol	Bactérias Gram-Negativas	5 estirpes clínicas de <i>Helicobacter pylori</i>	Difusão em disco	(DAROCH, F. [et al.], 2001)
		<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504		
Resveratrol	Bactérias Gram-Positivas,	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Diluição em agar	(DOCHERTY, J.J. [et al.], 2001)

Amostra	Microrganismo	Estirpe	Métodos	Referência
	Bactérias Gram-Negativas e Levedura	<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13090		
		<i>Escherichia coli</i>		
		<i>Staphylococcus aureus</i>		
		<i>Streptococcus pyogenes</i>		
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
		<i>Candida albicans</i>		
Extracto de vinho tinto e resveratrol	Bactérias Gram-Negativas	15 isolados clínicos de <i>Helicobacter pylori</i> <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504	Diluição em agar	(MAHADY, G.B. e PENDLAND, S.L., 2000)

MSSA *Staphylococcus aureus* metilina-sensível (*Methicillin-Sensitive Staphylococcus aureus*); MRSA *Staphylococcus aureus* metilina-resistente (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*); ATCC *American Type Culture Collection*; WT- estirpe selvagem (*wild type*)

Tendo em conta a revisão da literatura, o resveratrol apresenta potencial quanto às suas propriedades antimicrobianas, podendo no futuro ser utilizado no tratamento e prevenção de infecções causadas por alguns microrganismos patogénicos.

De acordo com o plano de trabalhos, estudou-se a actividade antimicrobiana do resveratrol contra diversos microrganismos, nomeadamente bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*), encontrando-se estes resultados descritos no capítulo II- Parte Experimental (Artigo II). No prosseguimento do trabalho desenvolvido realizou-se o estudo para a determinação da actividade anti-*Helicobacter pylori* do resveratrol e amostras de vinho tinto em diferentes estirpes (com factores de virulência e susceptibilidade a antibióticos diferentes) deste microrganismo. Além disso, avaliou-se a hipótese do resveratrol e amostras de vinho inibirem a urease de *H. pylori*, considerada um factor de virulência e agregação deste microrganismo. Este trabalho encontra-se descrito no capítulo II-Parte Experimental (Artigo III).

4. *HELICOBACTER PYLORI*

4.1. ENQUADRAMENTO HISTÓRICO

A presença de bactérias espiraladas na mucosa gástrica foi descrita há mais de um século, mas não alcançou grande importância até final dos anos 70. Contudo, esta visão mudou drasticamente nos anos 80 com os trabalhos desenvolvidos por Barry Marshall e Robin Warren, que descreveram e isolaram estas bactérias espiraladas a partir de amostras gástricas (WARREN, J.R. e MARSHALL, B.J., 1983); (MARSHALL, B.J. e WARREN, J.R., 1984), que mais tarde foram denominadas por *Helicobacter pylori*. Com a ingestão de suspensões da bactéria pelo próprio Marshall e por outros voluntários, provou-se a associação entre a úlcera péptica e a bactéria. Os dois autores efectuaram um conjunto de experiências onde demonstraram que: os doentes com a bactéria tinham anticorpos anti-*H. pylori*; a terapia com antibióticos curava a doença; e ainda, os quatro postulados de Koch (i) a bactéria terá de estar presente em todos os casos de doença; ii) a bactéria terá de ser isolada do hospedeiro e cultivada num meio de cultura; iii) a doença específica terá de ser reproduzida quando a cultura pura da bactéria é inoculada num hospedeiro susceptível e saudável; iv) a bactéria terá de ser recuperada do hospedeiro experimentalmente infectado (MARSHALL, B.J. [et al.], 1985); (HELLSTROM, P.M., 2006); (KUSTERS, J.G. [et al.], 2006); (MARSHALL, B., 2006). A publicação da experiência, embora difícil, fez com que a comunidade científica desse mais atenção a esta bactéria e à etiologia da úlcera péptica. Assim sendo, lentamente, o trabalho dos dois pioneiros, Marshall e Warren, foi sendo reconhecido junto da comunidade científica, tendo culminado com a atribuição, em 2005, do prémio Nobel de Fisiologia e Medicina.

Após a descoberta de *H. pylori*, verificaram-se diversos avanços nas várias vertentes relacionadas com esta bactéria, de que é exemplo, a cura da doença ulcerosa péptica causada por *H. pylori*. No entanto, se esta afirmação é consensual, muitos outros temas relacionados com esta bactéria continuam a suscitar forte controvérsia, por exemplo, o papel desta bactéria noutras doenças ainda se encontra sob grande debate, bem como a via de transmissão entre a população humana. Assim, *H. pylori* continua ser alvo de intensa investigação. Entre 1990 e 2010, obtém-se uma média superior a 2000 artigos publicados, anualmente, em revistas e jornais internacionais com arbitragem científica (Figura 7). Para esta pesquisa, utilizou-se a base de dados de artigos científicos, *ISI Web of Knowledge*, com a palavra-chave *Helicobacter pylori*.

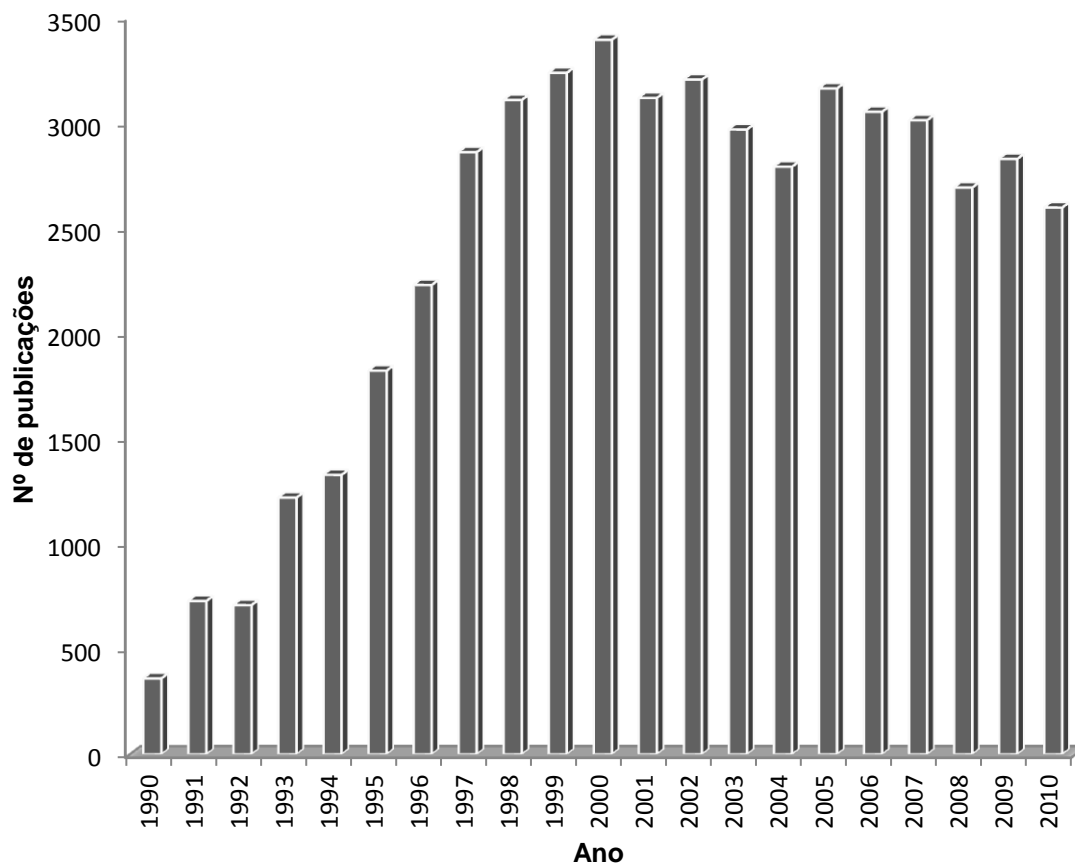


Figura 7- Representação gráfica do número de publicações por ano em revistas e jornais internacionais, subordinados ao tema *Helicobacter pylori*.

De referir que, *H. pylori* foi a primeira bactéria a ter dois genomas sequenciados e comparados a partir de isolados independentes, das estirpes 26695 (TOMB, J.F. [et al.], 1997) e J99 (ALM, R.A. [et al.], 1999).

4.2. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Taxonomicamente, a bactéria *H. pylori* é uma proteobactéria pertencente à subdivisão epsilon, ordem *Campylobacterales*, família *Helicobacteraceae*, género *Helicobacter*, que actualmente engloba mais de vinte espécies diferentes (KUSTERS, J.G. [et al.], 2006). Inicialmente, após ter sido identificada, suspeitou-se que a bactéria pertencia ao género *Campylobacter*, uma vez que apresentava algumas características comuns, de salientar as condições de crescimento microaerofílicas em meios ricos, morfologia espiralada e sensibilidade ao metronidazol, apoiando a hipótese de se tratar de uma

nova espécie do género *Campylobacter* (SOLNICK, J.V. e P., V., 2001). Posteriormente, estudos demonstraram que estas bactérias diferiam em termos morfológicos, ultraestruturais e até mesmo no conteúdo de ácidos gordos, o que desencadeou a criação de um novo género. Assim em 1989, criou-se o género *Helicobacter* (GOODWIN, C.S. [et al.], 1989).

H. pylori é responsável por gastrites e, juntamente com outros factores, pela úlcera gastroduodenal e pelo cancro gástrico. Caracteriza-se por ser uma bactéria Gram-negativa com 2,5 a 3,5 µm de comprimento e 0,5 a 1,0 µm de diâmetro (FERREIRA, W.F.C. e SOUSA, J.C.S., 2000), habitualmente com uma morfologia espiralada, mas que tende a assumir uma morfologia cocóide em condições adversas, com um diâmetro de 1,0 a 2,0 µm, não cultivável *in vitro* (KUSTERS, J.G. [et al.], 1997). Desta forma, o microrganismo pode apresentar duas formas distintas, a de bacilo espiralado ou a forma cocóide (Figura 8 (a) e (c)). A conversão morfológica do microrganismo ocorre através de uma etapa intermediária em que a bactéria passa pela forma de “U” (Figura 8 (b)), antes de adquirir a forma cocóide (SORBERG, M. [et al.], 1996). As formas cocóides não são cultiváveis *in vitro*, podendo ser representativas da morte celular (KUSTERS, J.G. [et al.], 1997), embora já tenha sido sugerido que apesar de não cultiváveis possam permanecer viáveis (ANDERSEN, L.P. [et al.], 2000); (BARDAKHCH'IAN, E.A. [et al.], 2003); (KUSTERS, J.G. [et al.], 2006).

Apesar da forma espiralada de *H. pylori* ser normalmente considerada como a responsável pela patogenicidade, ambas as formas podem ser encontradas no estômago humano (Figura 8 (d)).

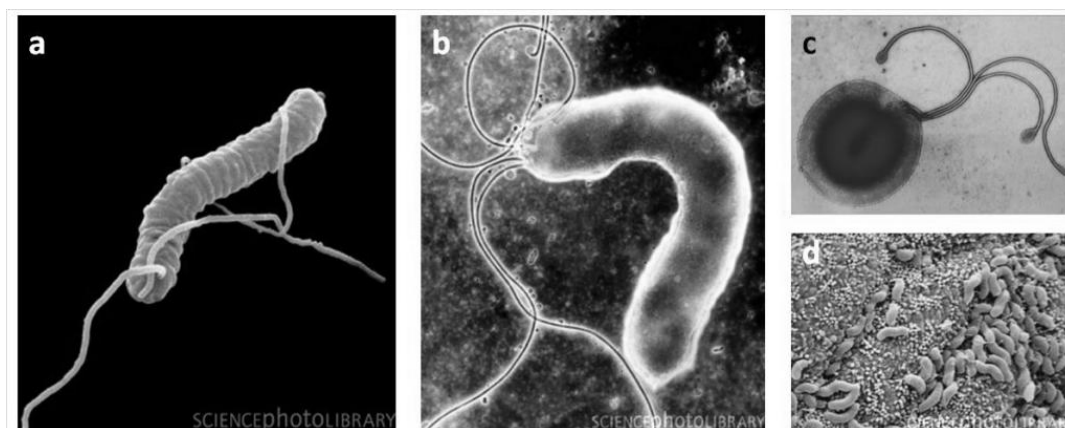


Figura 8- As três formas fisiologicamente possíveis de *H. pylori*: espiral (a); forma de “U” (b) e cocóide (c). *H. pylori* no estômago humano (d) (adaptado de Science Photo Library).

A bactéria apresenta mobilidade por flagelos, dois a seis flagelos unipolares com 3,0 µm de comprimento e com uma estrutura bulbar na extremidade (O'TOOLE, P.W. [et al.], 2000). Estes flagelos são responsáveis pela morfologia curvilinear da bactéria e pelo movimento polar, características estas que auxiliam a bactéria a colonizar a mucosa gástrica (KUSTERS, J.G. [et al.], 2006).

H. pylori é uma bactéria muito adaptada ao seu habitat e de crescimento lento, sendo muito difícil cultivá-la *in vitro*. Coloniza o estômago humano, é microaerofílica e fastidiosa requerendo meios de cultura complexos para o crescimento, geralmente suplementados com sangue (KUSTERS, J.G. [et al.], 2006). Em meio líquido, *H. pylori* cresce muito lentamente, pelo que o risco de contaminação é elevado, sendo por isso preferível a utilização de meios de cultura sólidos. A incubação ocorre em condições de microaerofilia, com um crescimento óptimo com 2 a 5% de oxigénio e 5 a 10% de dióxido de carbono (KUSTERS, J.G. [et al.], 2006). O crescimento é efectuado entre 34 a 40°C, com um óptimo de 37°C. Apesar do seu habitat ser a mucosa gástrica, *H. pylori* é um neutrófilo, com um pH óptimo de crescimento entre 5,5 e 8,0, tolerando no entanto exposições breves a pH<4,0. As colónias são pequenas, lisas e translúcidas. A bactéria é produtora de urease, catalase e oxidase, que são habitualmente pesquisadas com o objectivo da identificação de *H. pylori* (KUSTERS, J.G. [et al.], 2006).

4.3. EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO

A infecção por *H. pylori* é umas das infecções crónicas mais difundidas a nível mundial, estimando-se que cerca de metade da população mundial esteja colonizada pela bactéria (MCCOLL, K.E., 1999), contudo esta incidência tem vindo a diminuir ao longo dos anos (KUSTERS, J.G. [et al.], 2006).

A prevalência da infecção é variável em termos geográficos (Figura 9) – nos países em vias de desenvolvimento atinge cerca de 80% da população e a taxa de infecção tem-se mantido constante; nos países desenvolvidos atinge cerca de 40%, observando-se um declínio da prevalência provavelmente devido às melhorias das condições de higiene e saneamento (KUSTERS, J.G. [et al.], 2006).

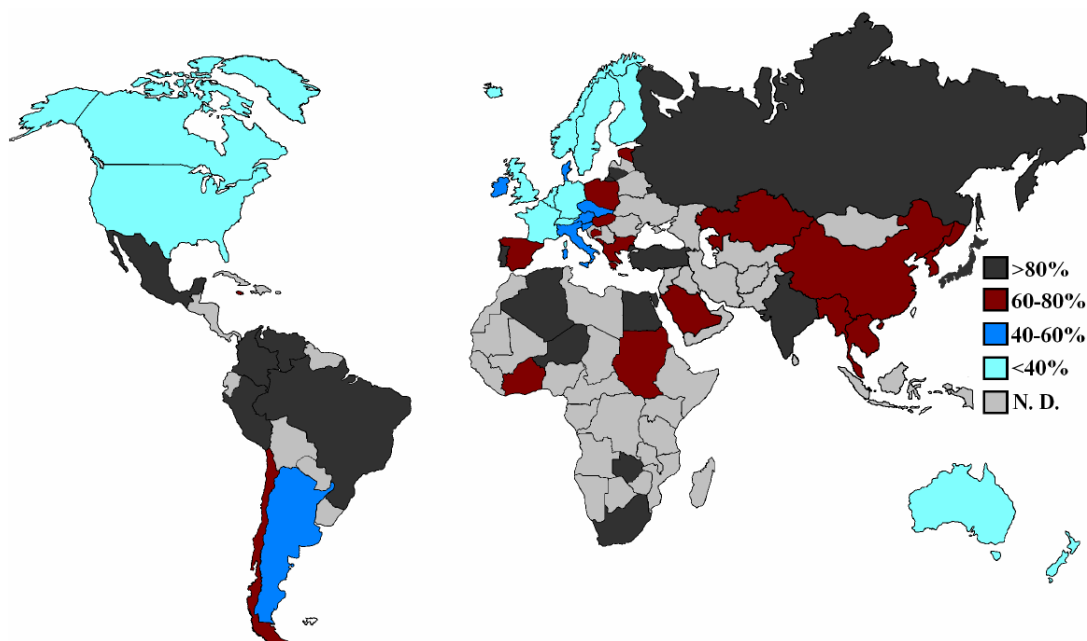


Figura 9- Prevalência de *H. pylori* no mundo (adaptado de (AZEVEDO, N.F. [et al.], 2007)).

A aquisição da infecção por *H. pylori* ocorre majoritariamente na infância e uma vez instalada na mucosa gástrica, a bactéria pode permanecer durante toda a vida (AZEVEDO, N.F. [et al.], 2009). Os principais factores de risco para a infecção são: viver num país em desenvolvimento, habitar numa casa sobrelotada, pertencer a um nível socioeconómico desfavorecido ou possuir uma predisposição étnica ou genética (DAS, J.C. e PAUL, N., 2007); (AZEVEDO, N.F. [et al.], 2009); (VALE, F.F. e VITOR, J.M.B., 2010).

Os mecanismos exactos de transmissão são ainda desconhecidos, mas considera-se que as principais vias são a oral-oral e a fecal-oral e que a aquisição ocorre durante a infância através de membros da família e pessoas próximas (Tabela 5) (KUSTERS, J.G. [et al.], 2006).

Tabela 5- Vias de transmissão possíveis de *H. pylori* em humanos.

Vias de Transmissão	Modo de Transmissão
Indivíduo-Indivíduo	
Amamentação	As mães que amamentam podem passar para os bebés através do leite, mas é mais provável que aumente a imunidade nos filhos
Oral-Oral	Beijar, usar os mesmos talheres, alimentos pré-mastigados
Fecal-Oral	Contacto com as fezes
Gastro-Oral	Contacto com gotas do suco gástrico durante a endoscopia, vômitos e refluxo gastroesofágico
Iatrogénica	Mediada pelo endoscópio durante a endoscopia digestiva
Água	Ingestão de água contaminada
Alimentos	Consumo de vegetais crus, leite e seus derivados, carne, entre outros
Zoonóticos	Consumo de leite cru e carne, contacto com animais

Fonte: (VELAZQUEZ, M. e FEIRTAG, J.M., 1999); (GOMES, B.C. e DE MARTINIS, E.C.P., 2004); (AZEVEDO, N.F. [et al.], 2007)

Alguns estudos levantaram ainda a possibilidade de transmissão através de animais, designando-se por zoonose, de alimentos e de água (VELAZQUEZ, M. e FEIRTAG, J.M., 1999); (GOMES, B.C. e DE MARTINIS, E.C.P., 2004); (AZEVEDO, N.F. [et al.], 2007). Contudo, a transmissão de *H. pylori* indivíduo-indivíduo é a forma mais provável de transmissão, apesar de não ser claro se se trata de uma transmissão oral-oral (gastro-oral) ou fecal-oral (MITCHELLK, H.M., 2001).

4.4. FACTORES DE PATOGENICIDADE

H. pylori, contribui para o desenvolvimento de gastrite aguda e crónica, úlcera péptica, metaplasia e neoplasia intestinal e linfoma do tecido linfóide associado à mucosa (MALT- *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*). O risco de desenvolvimento destas patologias depende de diversos factores, tais como, a estirpe, o hospedeiro e o meio ambiente, observando-se na história natural da doença uma progressão gradual de gastrite até à neoplasia (COSTA, A.C. [et al.], 2009). Quanto aos factores de

patogenicidade deste microrganismo estão relacionados com factores de colonização, de persistência e de acção tóxica (Figura 10).

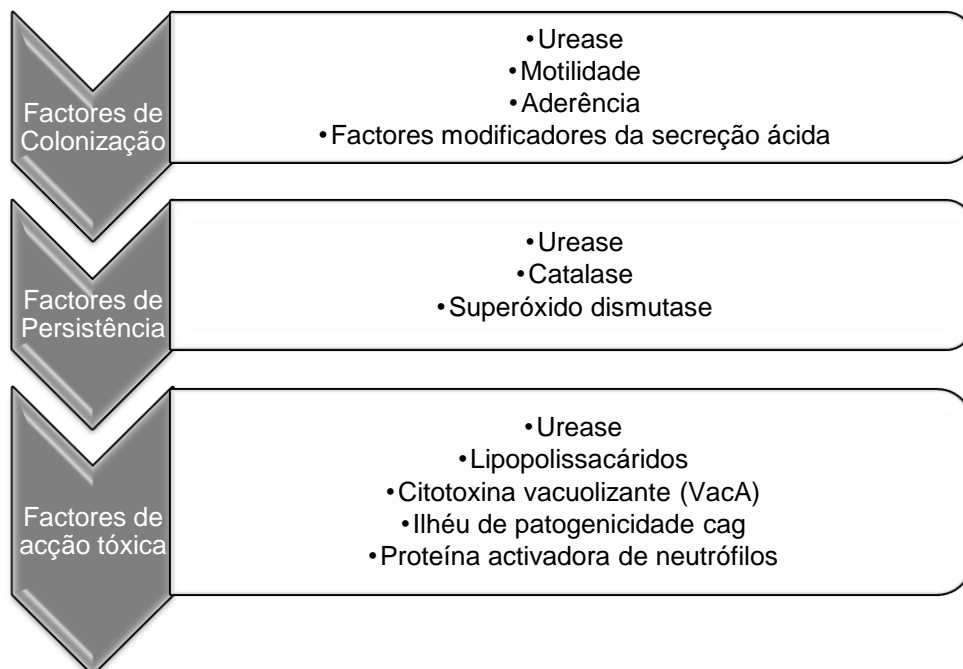


Figura 10- Factores de patogenicidade de *H. pylori* (adaptado de (OLEASTRO, M. e MONTEIRO, L., 2001)).

A enzima urease é uma proteína chave para a sobrevivência de *H. pylori* ao pH ácido do estômago, uma vez que possibilita a existência de um pH neutro em torno da bactéria. A acção desta enzima consiste na hidrólise da ureia, que se encontra presente no estômago, libertando-se dióxido de carbono e amoníaco, que neutralizam o pH do estômago (Figura 11) (VOLAND, P. [et al.], 2003). Estudos com estirpes mutantes de *H. pylori*, sem actividade ureásica, demonstraram que estas são incapazes de sobreviver *in vitro* em meio ácido, mesmo na presença de ureia e de colonizar a mucosa gástrica de animais experimentalmente infectados (EATON, K.A. [et al.], 1991); (CLYNE, M. [et al.], 1995).

um elevado relevo no desenvolvimento de doenças gástricas. A região *cag* PAI é multigénica, está presente nas estirpes virulentas e pode ser associada ao risco de doenças gastrointestinais em diversas populações (COSTA, A.C. [et al.], 2009); (MOLNAR, B. [et al.], 2010).

Durante a colonização do hospedeiro humano, a bactéria *H. pylori* estabelece um equilíbrio entre a capacidade de sobrevivência num nicho particular e a fuga à acção do sistema imunitário do hospedeiro. Assim sendo, factores genéticos da bactéria, ou do hospedeiro, ou factores ambientais, podem perturbar este equilíbrio, ocorrendo lesões no epitélio gástrico, que conduzem à ulceração e à neoplasia (HOCKER, M. e HOHENBERGER, P., 2003); (COSTA, A.C. [et al.], 2009).

4.5. DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA

O diagnóstico da infecção por *H. pylori* pode realizar-se recorrendo a métodos invasivos (realização de uma biópsia gástrica obtida por endoscopia digestiva alta, teste da urease, histologia e cultura) e a métodos não invasivos (serologia e teste respiratório com ureia marcada com isótopos de carbono) (KUSTERS, J.G. [et al.], 2006); (COSTA, A.C. [et al.], 2009). Nenhum dos métodos, desenvolvido até hoje, constitui o método ideal. Todos eles possuem as suas vantagens e desvantagens consoante a situação em que são aplicados.

A terapia da infecção por *H. pylori* baseia-se no recurso a antibióticos e supressores da secreção gástrica. Os antibióticos mais utilizados são a amoxicilina, a tetraciclina, os imidazóis (metronidazol e tinidazol) e alguns macrólidos (claritromicina e azitromicina). O tratamento é geralmente efectuado a partir de terapias triplas combinadas contendo claritromicina e/ou metronidazol, e com um inibidor da bomba de protões, conseguindo-se assim uma taxa de erradicação de cerca de 80% (KUSTERS, J.G. [et al.], 2006). Uma alternativa mais moderna é a terapia quádrupla, que combina sais de bismuto, um inibidor de bomba de protões e dois antimicrobianos (KUSTERS, J.G. [et al.], 2006).

4.6. TERAPIAS ALTERNATIVAS

Os antibióticos e os inibidores da bomba de prótons constituem o modelo terapêutico de eleição na erradicação de *H. pylori* (KUSTERS, J.G. [et al.], 2006); (COSTA, A.C. [et al.], 2009). Contudo, nas últimas duas décadas surgiram diversos problemas de multiresistência bacteriana a antibióticos em diferentes espécies bacterianas (KRAUSE, M., 2002); (GERRITS, M.M. [et al.], 2006). Neste contexto, a utilização do antibiótico perde a sua eficácia, sendo a principal causa de insucesso da terapia (MEGRAUD, F., 2004), atingindo 10 a 23% dos doentes submetidos a tratamento (PARENTE, F. [et al.], 2003).

Torna-se preocupante a resistência à claritromicina e ao metronidazol, podendo estender-se à maioria dos antibióticos (KRAUSE, M., 2002); (GERRITS, M.M. [et al.], 2006). A resistência a estes dois fármacos conduz à utilização de outras combinações, como a amoxicilina e levofloxacina, amoxicilina e rifabutina ou amoxicilina e furazolidona. No entanto, é fundamental ter em conta que existe uma limitação prática de disponibilidade de fármacos em alguns países. Assim sendo, embora teoricamente seja possível curar estirpes multiresistentes, há uma necessidade crescente de descoberta de novos agentes antibacterianos (MEGRAUD, F., 2004).

Considera-se cada vez mais necessário a pesquisa de novos métodos terapêuticos para a erradicação da bactéria, de salientar: o recurso a uma vacina anti-*H. pylori*, a utilização de probióticos e a utilização de fitoterapia.

Em termos de saúde pública a vacina apresenta diversas vantagens em relação aos antibióticos, como sejam, vantagens económicas, permite fazer prevenção, evita a re-infecção que pode ocorrer no caso de terapêuticas à base de antibióticos e elimina a resistência ao tratamento. Assim, no futuro, a utilização de vacinas, que se encontram actualmente em desenvolvimento (KABIR, S., 2007); (DEL GIUDICE, G. [et al.], 2009), parece ser bastante promissora no controlo da infecção por *H. pylori*.

Quanto à utilização de probióticos, podem contribuir para evitar a infecção por bactérias patogénicas, por activação do sistema imunitário e competição directa entre a bactéria probiótica e a patogénica. A investigação acerca da temática dos probióticos na erradicação de *H. pylori* encontra-se actualmente em curso (HAMILTON-MILLER, J.M., 2003); (LESBROS-PANTOFLICKOVA, D. [et al.], 2007); (YASAR, B. [et al.], 2010).

No que diz respeito à fitoterapia, esta é uma terapia tradicional recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como forma de ajuda às acções de apoio primário à saúde (COWAN, M.M., 1999).

Assim, nos últimos anos tem-se desenvolvido um interesse crescente por compostos biologicamente activos incluindo antioxidantes de plantas e outras fontes naturais. Alguns estudos epidemiológicos revelaram uma correlação entre a seropositividade ao *H. pylori* e factores ambientais, incluindo a dieta, verificando-se uma baixa incidência de infecção por este microrganismo com o consumo de vegetais, vinho e chá verde (TOMBOLA, F. [et al.], 2003); (RUGGIERO, P. [et al.], 2007).

Vários produtos naturais têm vindo a demonstrar actividade antimicrobiana contra *H. pylori* (ADENIYI, B.A. e ANYIAM, F.M., 2004); (NARAYAN, S. [et al.], 2007); (ADENIYI, B.A. [et al.], 2009); (BROWN, J.C. [et al.], 2009), dos quais podemos destacar o resveratrol (descrito em 3.3. Actividade Antimicrobiana) que constitui um dos pontos-chave do presente trabalho.

Diversos estudos sugerem que o vinho possui actividade antimicrobiana contra diferentes microrganismos patogénicos (DAROCH, F. [et al.], 2001); (PAPADOPOULOU, C. [et al.], 2005); (MARTINI, S. [et al.], 2009); (BOBAN, N. [et al.], 2010a). O vinho é constituído por diversos compostos fenólicos, nos quais se inclui o resveratrol. Assim, a actividade antioxidante e antibacteriana de diferentes vinhos poderá estar relacionada com este composto. Como tal, vários autores têm demonstrado que o vinho e alguns dos seus constituintes são eficazes contra microrganismos relacionados com o tracto gastrointestinal (MAHADY, G.B. e PENDLAND, S.L., 2000); (DAROCH, F. [et al.], 2001); (MORETRO, T. e DAESCHEL, M.A., 2004); (PAPADOPOULOU, C. [et al.], 2005); (WAITE, J.G. e DAESCHEL, M.A., 2007); (GANAN, M. [et al.], 2009). Por esta razão, tem vindo a ser proposto que as qualidades digestivas do vinho estão relacionadas com as suas propriedades antimicrobianas (WEISSE, M.E. [et al.], 1995).

Devido ao alto índice de resistência relativamente à terapêutica tradicional utilizada na erradicação de *H. pylori*, métodos alternativos têm vindo a ser amplamente estudados com a finalidade de aumentar a eficácia de erradicação da bactéria, fornecendo uma alternativa de tratamento para os doentes onde não é erradicado o microrganismo utilizando as terapias clássicas, descritas anteriormente. Assim, é importante procurar novos fármacos anti-*H. pylori*, sendo a fitoterapia um recurso com elevado potencial.

CAPÍTULO II – PARTE EXPERIMENTAL

ARTIGO I

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR THE DETERMINATION OF *TRANS*- AND *CIS*- RESVERATROL IN WINE: ANALYSIS OF ITS CONTENTS IN 186 PORTUGUESE RED WINES

Luísa Paulo, Fernanda Domingues, João António Queiroz, Eugenia Gallardo

Journal of Agricultural and Food Chemistry (2011), 59(6): 2157-2168.

Development and Validation of an Analytical Method for the Determination of *trans*- and *cis*-Resveratrol in Wine: Analysis of Its Contents in 186 Portuguese Red Wines

Lúisa Paulo, Fernanda Domingues, João António Queiroz, and Eugenia Gallardo*

CICS-UBI—Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6201-556 Covilhã, Portugal

ABSTRACT: A simple procedure based on solid-phase extraction and high performance liquid chromatography coupled to diode array detector has been developed and validated for the qualitative and quantitative analysis of *cis*- and *trans*-resveratrol in wines.

The method was linear from 0.025 (lower limit of quantitation, LLOQ) to 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *trans*-resveratrol and from 0.023 (LLOQ) to 0.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *cis*-resveratrol, with correlation coefficients higher than 0.99 for both isomers. Intra- and interday precision and accuracy were in conformity with the criteria normally accepted in method validation, that is, CVs inferior to 15% and mean relative errors within a $\pm 14\%$ interval. The extraction presented mean efficiencies close to 100% for both analytes.

The validated methodology was applied to 186 Portuguese red wines from different regions, grape varieties and vintage. The results obtained showed that the content of *trans*-resveratrol in red wines ranged from 0.05 to 10.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, while the concentrations of *cis*-resveratrol ranged from 0.04 to 8.71 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

KEYWORDS: resveratrol, SPE, HPLC-DAD, red wine

INTRODUCTION

Portugal has a long tradition as a wine producing country, and there are several registered regions which produce quality wines with designation of origin (DO) recognized by the European Union. Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) has been identified as the major active biological compound of the stilbene phytoalexins in wine.^{1–3} It can be found in wines, grapes, legumes, berries, peanuts and pistachios.^{4–8} Chemically, resveratrol can exist as two isomers, *trans*-resveratrol and *cis*-resveratrol. The concentrations of each isomer in different grape cultivars and the respective wines are extremely variable, depending also on geographical origin, winemaking processes, climate and fungal presence.⁹ *trans*-Resveratrol isomerizes to *cis*-resveratrol when exposed to UV light⁸ and this process causes changes in the respective concentrations in grapes, must and wine, despite the fact that is usually found at higher concentrations in wine.

Positive effects of resveratrol on health include cardiovascular protection and risk reduction concerning heart diseases, anticancer and anti-inflammatory properties and antioxidant and antibacterial activities.^{10–16}

Since resveratrol is well-known as one of the most important compounds present in wine, numerous analytical procedures have been published for its determination. The most commonly used techniques are high performance thin-layer chromatography (HPTLC)¹⁷ and high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to UV,^{18–21} fluorescence (FLD)^{22,23} or electrochemical²⁴ detection. LC coupled to mass spectrometry (LC–MS) has also been successfully applied to analyze resveratrol in different foodstuffs.^{25–27} Gas chromatography (GC) has also been used for this purpose, but this technique presents a drawback: a derivatization step is essential,^{7,28} involving a long and tedious treatment prior to

the analysis. In addition, the high temperatures achieved may cause the isomerization and degradation of the analyte.^{14,23} Capillary electrophoresis (CE) has also been used for the analysis of these compounds.^{29,30}

Wine samples can be analyzed by direct injection^{21,23,31} or after pretreatment by means of either liquid–liquid extraction (LLE),^{19,32–34} solid phase extraction (SPE)^{35–38} or, more recently, solid-phase microextraction (SPME).³⁹

This paper describes a novel procedure for the determination of *trans*- and *cis*-resveratrol in wine using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). It should be noted that, to the best of our knowledge, this is the first time that a C_8 column with a new procedure for SPE is used with high extraction efficiencies and low limits of quantification (LLOQ).

The average levels of *trans*-resveratrol in red wines vary greatly from one region to another or between varieties or vintages.⁹ An average red wine can be expected to contain $1.9 \pm 1.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ of *trans*-resveratrol, with nondetectable levels as the lower limit.^{9,35,37}

Thus, the aim of this study was the development and validation of an analytical method based on SPE and HPLC with diode array detector for the determination of *trans*- and *cis*-resveratrol in different kinds of Portuguese red wines, 186 samples being analyzed. To our knowledge, this work is the first to produce a detailed analysis of the resveratrol contents in such a high number of wine samples.

Received: October 8, 2010

Accepted: January 24, 2011

Published: March 01, 2011

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Standards. Acetonitrile, diethyl ether, methanol and dichromethane were obtained from Merck Co. (Darmstadt, Germany), all with 99.9% purity (HPLC grade). Ethyl acetate and *n*-hexane were obtained from JT Baker (Deventer, The Netherlands) both with 99.9% purity. Acetic acid (99.9% purity), isopropanol (99.8% purity) and ammonium (99.5% purity) were obtained from VWR (Fonteray-sous-Bois, France), José M. Vaz Pereira (Sintra, Portugal) and Fluka (Steinheim, Switzerland), respectively. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q system (Millipore, Billerica, MA, USA). *trans*-Resveratrol (3,4,5-trihydroxystilbene) (99.9% purity) was purchased from Extrasynthèse (Genay, France), and carbamazepine [internal standard (IS), 99.9% purity] was purchased from Sigma Aldrich Química (Sintra, Portugal). Stock solutions (1 mg/mL) of *trans*-resveratrol and the internal standard were prepared by dissolving each pure substance in methanol. Subsequent working solutions at 1, 10, and 100 µg/mL were also prepared by proper dilution in methanol. Solutions of *cis*-resveratrol, since its commercial standard is not available, were prepared from working standard solutions of *trans*-resveratrol as follows. A *trans*-resveratrol stock solution (4 µg/mL) was placed in a UV box (Vilber Loumart, Mame la Vallée, France) and was exposed at a distance of 20 cm to UV light (365 nm, potency equal to or higher than 8 W) for 30 min, obtaining an efficiency of 92%. All solutions were stored at 4 °C, avoiding exposure to direct light.

Wine Samples. Wine samples from different vintages, grape varieties, and from different Portuguese regions were kindly donated by winemakers.

Instrumentation. SPE was carried out on BondElut LRC certify C₈ cartridges (300 mg) (Varian B.V., Middelburg, The Netherlands). The HPLC system includes a quaternary pump with controller (model 600), a manual injector (Rheodyne 7725i), an in-line degasser (AF) and a diode array detector (DAD-2996) from Waters (Milford, MA, USA). Chromatographic separation was achieved using a 5 µm particle size XTerra MS C₁₈ ODS reversed-phase analytical column (150 × 4.6 mm i.d.) from Waters (Milford, MA, USA). All the injections were made with a rheodyne valve, equipped with a 20 µL sample loop.

Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis was performed using an HP 6890N gas chromatograph (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany), equipped with a model 5973 mass selective detector (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany). A capillary column (30 m × 0.25-mm i.d., 0.25 µm film thickness) with 5% phenylmethylsiloxane (HP-5 MS), supplied by J & W Scientific (Folsom, CA, USA), was used.

Chromatographic and Detection Conditions. The mobile phase consisted of a mixture of water, acetonitrile and acetic acid (66:33.9:0.1, v/v/v, pH 3.4) and was filtered through a 0.20 µm pore size membrane, degassed ultrasonically and pumped in isocratic mode through the chromatographic system at 0.5 mL/min. The eluate was monitored at three different wavelengths: 306, 284, and 211 nm, where *trans*- and *cis*-isomers of resveratrol and carbamazepine (internal standard, IS)⁴⁰ have maximum absorbance, respectively. The retention times were 7.1, 9.1, and 11.0 min for *trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol and IS respectively, obtaining a good separation of all compounds. Carbamazepine was used as internal standard because the same extraction and chromatographic conditions, as well as detection wavelength, could be used. In addition, this compound is usually not found in wine samples.

Gas chromatographic conditions were as follows: initial oven temperature was 90 °C for 2 min, which was increased by 20 °C min⁻¹ to 300 °C and held for 3 min. The temperatures of the injection port and detector were set at 220 and 280 °C, respectively. The split injection mode was used (split ratio of 1:5), and helium with a flow rate of 0.8 mL min⁻¹ was used as the carrier gas. The mass spectrometer was operated with a filament current of 300 µA and electron energy of 70 eV in the electron ionization (EI) mode.

Extraction Procedure. The extraction procedure was optimized previously (see below), and the final conditions were as follows. A 2 mL wine sample was diluted with 2 mL of water and 1 mL of phosphate buffer 0.1 M (pH 6.0) and spiked with 100 µL of the IS solution (100 µg/mL). The mixture was agitated in the roller mixer for 5 min. The mixture was loaded onto a BondElut LRC certify cartridge, previously conditioned with 1 mL of methanol and 1 mL of KH₂PO₄ 0.1 M (pH 6).

After the sample had passed through, the column was washed sequentially with 3 mL of water, 1 mL of 0.1 M acetic acid and 2 mL of *n*-hexane, and dried under full vacuum for 10 min. The analytes were eluted with 3 mL of a mixture of dichloromethane:isopropanol:ammonium [78:20:2 (v/v/v)], which was afterward evaporated to dryness at 30 °C under a gentle stream of nitrogen. The dry extract was dissolved in 100 µL of mobile phase, and 20 µL was injected into the HPLC system. The whole extraction procedure was carried out in subdued light to avoid the light-induced isomerization of *trans*-resveratrol to the *cis*-isomer during sample handling.

RESULTS AND DISCUSSION

Preparation of the *cis*-Resveratrol Standard. Several ways of transforming a standard solution of *trans*-resveratrol into the *cis* form have been reported in the literature: exposure to daylight¹⁸ and UV light at 360 and 254 nm.⁸ The ideal conditions of irradiation to transform the *trans* into the *cis* form were established. The parameters that could influence the transformation of isomeric compound, such as UV radiation at 254 and 365 nm, time profiles (10, 20, and 30 min), the initial concentration of *trans*-resveratrol (4 µg/mL and 1 mg/mL), different solvents (methanol and 12% ethanol) and several distances between the lamp and the solution (10, 20, and 60 cm), were optimized. This optimization was performed employing a univariate approach, that is, each factor was evaluated while all other factors were kept constant. First, a 4 µg/mL solution of *trans*-resveratrol was used and the distance to the UV light was fixed at 20 cm; three exposition times were studied (10, 20, and 30 min). These experiments were performed at 254 and 365 nm. The maximum process efficiency was obtained for an exposition of 30 min at 365 nm (about 90%), while at 254 nm only 40% efficiency was obtained. Following these experiments, the wavelength and exposition time were fixed at 365 nm and 30 min respectively. Three distances to the UV source were evaluated (10, 20, and 60 cm). The best results were obtained for a distance of 20 cm (around 90%), while efficiencies of 68 and 26% were obtained at 10 and 60 cm respectively. Under these optimized conditions, further experiments were performed, in order to find the concentration of the *trans*-resveratrol solution which yielded the highest process efficiency (4 µg/mL versus 1 mg/mL). The best results were obtained for a 4 µg/mL solution. Finally it was tried to find the best solvent for this solution, and both methanol and a 12% ethanol solution (to simulate wine samples) were used. Higher process efficiencies were obtained when methanol was used (90 versus 45%), and therefore this solvent was used in this work.

The final optimized conditions for *trans*-resveratrol conversion were therefore as follows: a stock solution at 4 µg/mL in methanol was exposed at 20 cm to UV light (365 nm) for 30 min. Process efficiency was calculated by the difference between *trans*-resveratrol peak areas before and after the treatment with UV light ($n = 6$), and a value of $92.39 \pm 0.27\%$ was obtained. The quantity of *cis*-resveratrol was therefore considered to be 92% of

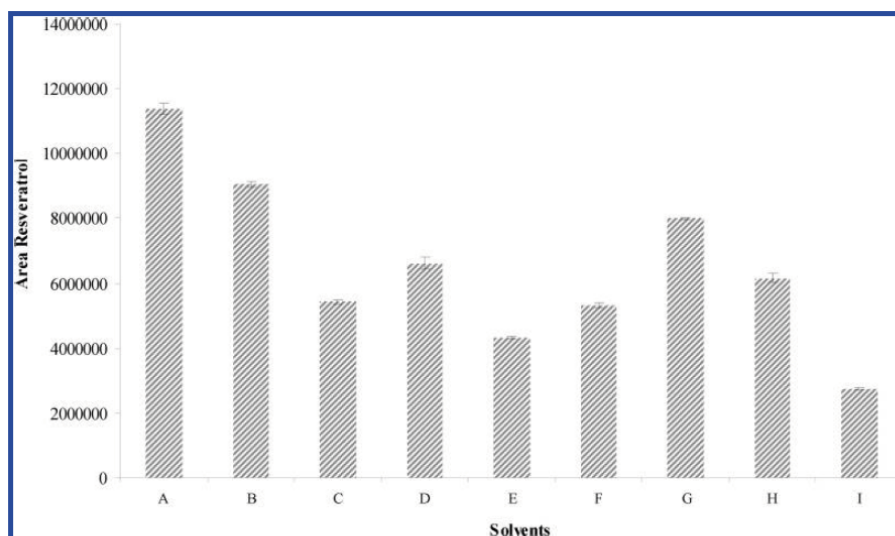


Figure 1. Influence of the extracting solvent on the peak area of *trans*-resveratrol: (A) diethyl ether, (B) ethyl acetate, (C) ethyl acetate:*n*-hexane (50:50), (D) ethyl acetate:*n*-hexane (90:10), (E) ethyl acetate:*n*-hexane (10:90), (F) dichloromethane:ethyl acetate (50:50), (G) dichloromethane:ethyl acetate (90:10), (H) dichloromethane:ethyl acetate (10:90), (I) acidic methanol:ethyl acetate (50:50).

the initial concentration of the *trans*-isomer. Those isomerization conditions are usually not described in detail in the literature, and variable recoveries have been reported. Indeed, Trela et al.⁴¹ had conversion rates of 67% (exposure at 254 nm for 10 h), while Vian¹⁸ and Romero-Perez⁴² reported rates of 80–90% by exposing *trans*-resveratrol solutions to sunlight for 1 h¹⁶ and for 10 min.⁴² However, these latter methods present the disadvantage that sunlight is not constant throughout the day or on successive days, and therefore the conditions are difficult to reproduce adequately.

Optimization of Extraction Procedure. Red wines are highly complex and variable matrices, thus an extraction procedure is often deemed necessary to obtain adequate sample purification and to enhance the chromatographic column performance and lifetime.

Before the application of the extraction technique to the wine samples, several experiments with a simulated wine ("blank" matrix) were carried out in order to select the optimum extraction process. For the optimization of the extraction procedure several kinds of simulated wine were tried ($n = 3$): an aqueous solution pH 3.4 with 1 M HCl and an aqueous solution containing ethanol (88:12 v/v) and tartaric acid (5 g/L) and bringing the apparent pH to 3.6 with 2 M NaOH.^{36,43,44} The obtained results for *trans*-resveratrol peak areas using each of these solutions did not vary significantly, and therefore we have decided to use the one which could be more easily prepared. We could not use authentic wine, since resveratrol was always present. Due to the huge number of samples analyzed, to use the standard addition method would not have been practical.

The first approach to extract the compound was LLE as described elsewhere.^{19,32–34} Several organic solvents and extraction times were tested. Although the most common extraction solvents are diethyl ether and ethyl acetate, in this study we also tested a mixture of ethyl acetate:*n*-hexane at different proportions (50:50, 90:10 and 10:90), dichloromethane with ethyl acetate (50:50, 90:10 and 10:90) and acidic methanol with ethyl acetate

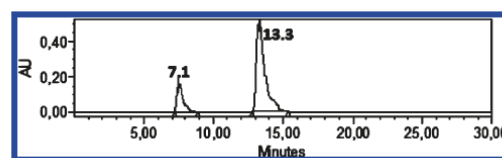


Figure 2. Chromatogram of a simulated wine sample after LLE with diethyl ether.

(50:50). The best results were obtained with diethyl ether (Figure 1). However, this solvent also extracted other monomeric phenols (e.g., catechins and gallic acid) from wines. Even when simulated wine was used, a new peak appeared (Figure 2). To try to identify this peak, the extracts were derivatized with *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) containing 5% trimethylchlorosilane (TMCS)^{7,28} and analyzed by GC–MS in the full scan mode (Figure 3A–C). This unknown compound seemed to be generated by reaction of *trans*-resveratrol with diethyl ether, and the formation of a resveratrol dimer may have occurred. So we tested solid-phase extraction (SPE) as an alternative to LLE. With SPE many of the problems associated with LLE can be prevented, such as incomplete phase separations, poor recoveries, and large solvent consumption. SPE is in general more efficient than LLE, as it yields a quantitative extraction that is easy to perform, and solvent use and laboratory time are reduced. Several types of cartridges were tested: Oasis HLB (60 mg) and MCX (60 mg), and BondElut C₈ (300 mg). Several extraction protocols were used, two for HLB and BondElut cartridges [first a standard protocol (PT1) and a second protocol promoting strong cation exchange (PT2)] and one to MCX cartridges.

Sample preparation was the same for the three protocols consisting of the following: a 2 mL wine sample was diluted with 2 mL of water and 1 mL of phosphate buffer 0.1 M (pH 6.0), and spiked with 100 μ L of IS. The mixture was agitated in the roller mixer for 5 min.

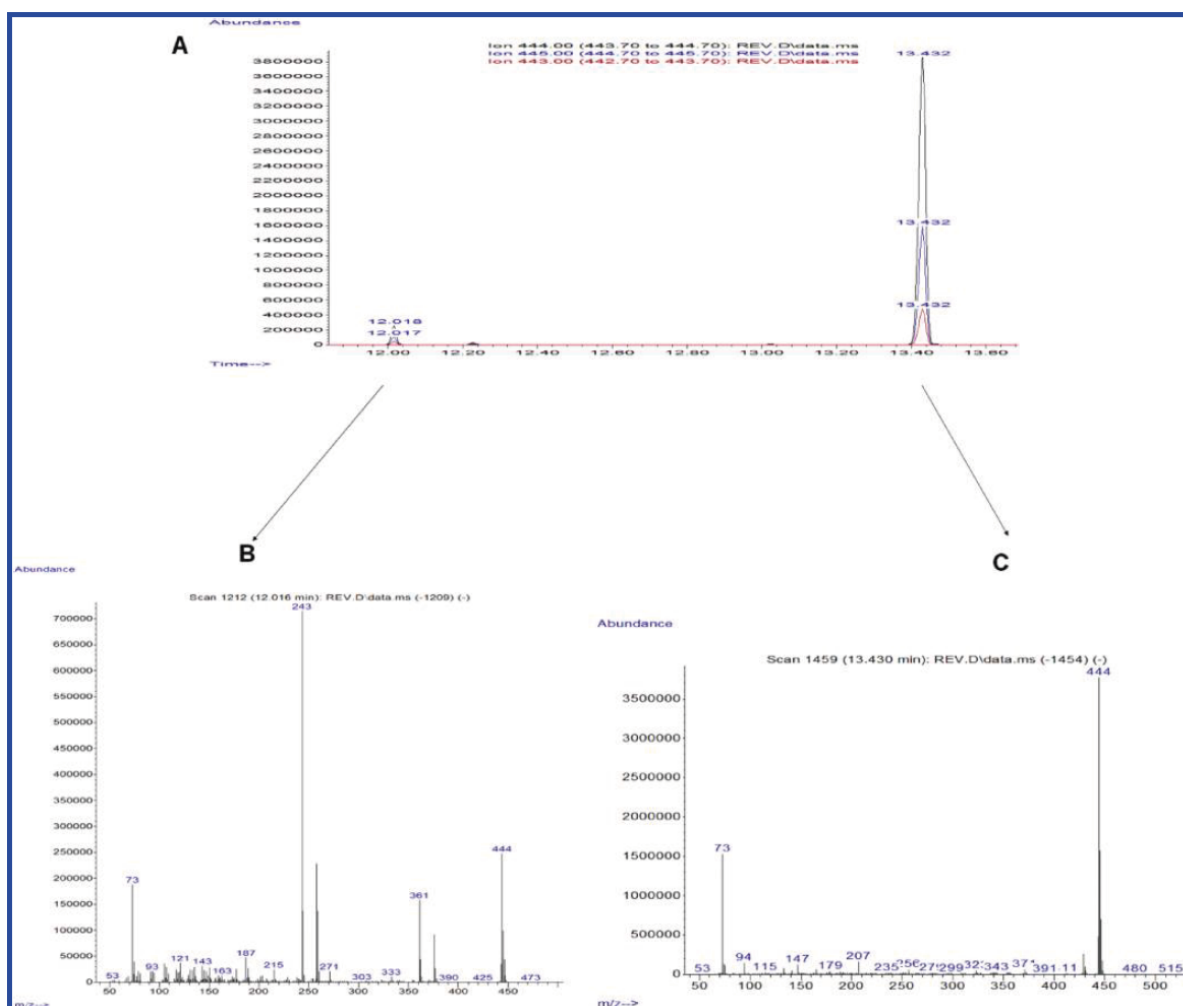


Figure 3. GC–MS chromatogram of a LLE of *trans*-resveratrol (5 $\mu\text{g/mL}$) with diethyl ether (A). Mass spectrum of the TMS-derivative of *trans*-resveratrol (B) and mass spectrum of the unknown compound (C).

Three different SPE protocols were tested, and in all of them the extracts were evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream. All the experiments were performed in triplicate at three different concentrations.

For Oasis HLB or BondElut Certify extraction cartridges, two different protocols were used, with differences in the conditioning, washing and elution steps. In the first protocol the mixture was loaded onto the cartridges, which had been previously conditioned with 2 mL of methanol and 2 mL of water. After the sample had passed through, the cartridge was rinsed with 2 mL of 5% of methanol, and dried for 10 min under vacuum. The analytes were then eluted with 2 mL of methanol. In the second protocol the mixture was loaded onto the cartridges, previously conditioned with 2 mL of methanol and 2 mL of 0.1 M KH_2PO_4 . After the sample had passed through, the columns were washed sequentially with 2 mL of water, 2 mL of 0.1 M acetic acid and 2 mL of *n*-hexane, and dried under full vacuum for 10 min. The analytes were eluted with 2 mL of a mixture of dichloromethane:isopropanol:ammonium [78:20:2 (v/v/v)].

In the third protocol, mixed-mode (Oasis MCX) cartridges were used, which were previously conditioned with 2 mL of methanol and 2 mL of water. After the sample had passed through, the cartridge was then rinsed with 2 mL of HCl 0.1 M, 2 mL of methanol and 2 mL of *n*-hexane, and then dried for 10 min under vacuum. The analytes were then eluted with 2 mL of a mixture of dichloromethane:isopropanol:ammonium [78:20:2 (v/v/v)].

In all protocols the dry extract was dissolved in 100 μL of mobile phase, and 20 μL was injected into the HPLC system. The whole extraction procedure was carried out in subdued light to avoid the light-induced isomerization of *trans*-resveratrol to the *cis*-isomer during sample handling.

Figure 4 illustrates the obtained results, and as can be seen, the BondElut cartridge with the PT2 protocol originated better extraction yields. Therefore, it was chosen to perform the remaining experiments.

Method Validation. The analytical validation was performed according to the guiding principles of the FDA⁴⁵ and ICH.⁴⁶ The procedure was validated in terms of selectivity, linearity, limits of

detection and quantification, precision, accuracy, stability in processed samples and extraction efficiency.

Specificity. The method's specificity was checked by chromatographic analysis of other substances that might be present in an authentic sample [other polyphenols, such as catechin (peak resolution of 2.9), epicatechin (peak resolution of 2.6), rutin (peak resolution of 2.5) and gallic acid (peak resolution of 3.4), and vitamins, such as retinol (peak resolution of 2.6), thiamine (peak resolution of 3.6) and ascorbic acid (peak resolution of 3.0)]. Since it is not possible to test for all the possible interferences, only the most frequent were tested. It was found that any influence could be excluded due to different retention times and/or absorbance spectra, as no interfering peaks were observed at the retention times and selected wavelength for *trans*- and *cis*-resveratrol. In addition, in all the analyzed wine samples the UV spectra of the tested analytes were compared to those obtained in a quality control sample analyzed contemporaneously. A match

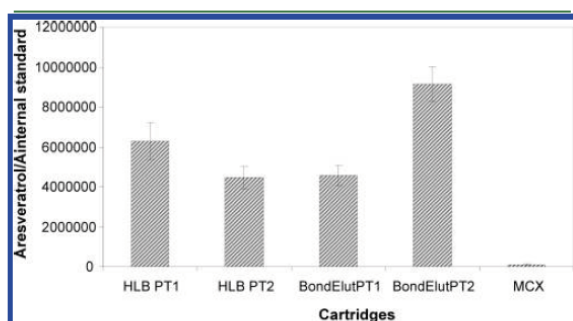


Figure 4. Comparison of different SPE cartridges with three distinct protocols. Vertical bars represent the standard deviation ($n = 3$).

Table 1. Linearity Parameters

compound	calibration range ($\mu\text{g/mL}$)	linearity		R^2 values
		slope	intercept	
<i>trans</i> -resveratrol	0.025–1.00	0.131	0.0008	0.9999
	1.00–15.00	0.129	0.008	0.9993
<i>cis</i> -resveratrol	0.023–0.92	0.057	0.0003	0.9999

Table 2. Precision, Accuracy and Extraction Efficiency Results

concn ($\mu\text{g/mL}$)	efficiency mean (%)	SD ^a	intraday precision				interday precision			
			concn ($\mu\text{g/mL}$)	measd concn mean ($\mu\text{g/mL}$)	CV ^b (%)	bias ^c (%)	concn ($\mu\text{g/mL}$)	measd concn mean ($\mu\text{g/mL}$)	CV ^b (%)	bias ^c (%)
<i>trans</i> -Resveratrol										
0.025	102.03	5.59	0.025	0.03	8.95	7.82	0.30	0.28	10.56	-4.78
1.00	100.02	9.47	1.00	1.03	7.07	3.41	4.50	4.60	8.84	1.96
15.00	99.27	6.62	15.00	14.31	3.84	-6.10	12.50	12.66	4.71	1.94
<i>cis</i> -Resveratrol										
0.023	101.03	11.61	0.023	0.03	14.21	13.71	0.28	0.30	6.80	8.70
0.092	100.15	15.34	0.092	0.08	15.05	8.16				
0.92	99.98	8.34	0.92	0.97	9.82	5.01	0.74	0.79	8.50	7.60

^a Standard deviation. ^b Coefficient of variation. ^c Bias: $[(\text{measured concentration}) - (\text{nominal concentration})]/(\text{nominal concentration}) \times 100$.

quality higher than 90% was obtained for both compounds in all the tested wine samples, and therefore the method was considered specific.

Calibration Curves and Limits. Calibration curves for both resveratrol isomers were performed separately, in order to avoid the influence of the small percentage of *trans*-resveratrol present in the solution of *cis*-resveratrol standard.

For *trans*-resveratrol we determined the linearity of the method at concentrations ranging from 0.025 to 15.00 $\mu\text{g/mL}$. Sixteen calibrators were prepared in simulated wine and analyzed using the described procedure. It was necessary to divide the calibration range in two linear ranges, 0.025–1.00 $\mu\text{g/mL}$ and 1.00–15.00 $\mu\text{g/mL}$. For *cis*-resveratrol the linearity range was shortened, from 0.023 to 0.92 $\mu\text{g/mL}$ with eight calibrators. The calibration curves were obtained by plotting the peak-area ratio between each analyte and the IS versus analyte concentration (Table 1). Calibrator's accuracy [mean relative error (bias) between measured and spiked concentrations] was within $\pm 15\%$ of the true values for all concentration levels. The limit of quantitation (LLOQ), defined as the lowest concentration that could be measured reproducibly and accurately, was 0.025 $\mu\text{g/mL}$ for *trans*-resveratrol and 0.023 for *cis*-resveratrol, and these were also the method's limits of detection, since at concentrations below the LLOQ the reliable identification of the analytes was not possible. These limits are comparable to those obtained by other authors; however, in those papers the limits were assessed mathematically,^{35,37,47–49} while in our work the limits were determined by the analysis of samples with decreasing concentrations of the compounds, obtaining adequate precision (coefficient of variation of less than 20%) and accuracy (bias within a $\pm 20\%$ interval of the true concentration).⁴⁶

Precision and Accuracy. Precision and accuracy were evaluated at three concentration levels (0.30, 4.50, and 12.50 $\mu\text{g/mL}$) for *trans*-resveratrol and at two concentration levels for *cis*-resveratrol (0.28 and 0.74 $\mu\text{g/mL}$), analyzing for six replicates for each concentration in the same day (intraday precision) and on different days over seven days (interday precision). The obtained CVs did not exceed 15% for all studied concentrations. These values for precision fell well within the criteria normally accepted in bioanalytical method validation.^{45,46} The values obtained for accuracy (in terms of bias) were within a $\pm 15\%$ interval of the nominal concentration, and were considered acceptable (Table 2).

Table 3. Resveratrol Levels ($\mu\text{g/mL}$) for 186 Red Wines from Portugal

wine sample	region	varieties	vintage	concn ($\mu\text{g/mL}$)	
				<i>trans</i> -resveratrol	<i>cis</i> -resveratrol
#1	Douro	blend	2008	2.89 ± 0.003	0.17 ± 0.001
#2	Douro	NA	NA	0.80 ± 0.004	<LLOQ
#3	Douro	NA	2001	1.33 ± 0.008	0.45 ± 3 × 10 ⁻⁴
#4	Douro	NA	NA	0.05 ± 0.001	0.19 ± 2 × 10 ⁻⁴
#5	Douro	NA	NA	1.22 ± 0.021	<LLOQ
#6	Douro	NA	NA	1.13 ± 0.021	0.21 ± 0.001
#7	Alentejo	blend	2003	1.12 ± 0.010	0.13 ± 0.001
#8	Douro	NA	1991	1.98 ± 0.004	0.15 ± 0.001
#9	Douro	blend	1991	1.91 ± 3 × 10 ⁻⁴	0.81 ± 0.040
#10	Ribatejo	NA	2008	2.22 ± 0.011	0.73 ± 0.005
#11	Beira Interior	blend	2006	0.50 ± 3 × 10 ⁻⁵	<LLOQ
#12	Península de Setúbal	blend	2005	1.69 ± 0.003	0.33 ± 6 × 10 ⁻⁵
#13	Alentejo	NA	2008	0.95 ± 0.027	<LLOQ
#14	Península de Setúbal	blend	2006	3.09 ± 0.019	0.67 ± 0.005
#15	Douro	blend	2006	2.56 ± 0.018	1.06 ± 0.005
#16	Alentejo	blend	2008	2.04 ± 0.012	0.14 ± 0.001
#17	Beira Interior	blend	2005	0.68 ± 0.007	0.09 ± 2 × 10 ⁻⁴
#18	Beira Interior	blend	NA	2.83 ± 0.003	0.12 ± 0.001
#19	Beira Interior	blend	2001	3.84 ± 0.009	0.32 ± 4 × 10 ⁻⁴
#20	Beira Interior	blend	2005	1.21 ± 0.001	0.14 ± 0.001
#21	Beira Interior	blend	2005	0.70 ± 0.012	<LLOQ
#22	Beira Interior	monovarietal	2004	1.26 ± 0.013	<LLOQ
#23	Bairrada	blend	2006	3.30 ± 0.068	0.34 ± 0.004
#24	Alentejo	blend	2005	1.93 ± 0.007	0.35 ± 9 × 10 ⁻⁵
#25	Beira Interior	blend	2006	1.60 ± 0.010	0.24 ± 0.003
#26	Beira Interior	blend	2007	3.44 ± 0.019	1.03 ± 0.004
#27	Dão	blend	1987	0.23 ± 5 × 10 ⁻⁴	0.43 ± 0.002
#28	Alentejo	blend	2008	1.74 ± 0.013	0.69 ± 0.007
#29	Alentejo	blend	2008	2.80 ± 0.072	0.91 ± 0.010
#30	Beira Interior	blend	2008	3.38 ± 0.035	1.31 ± 0.003
#31	Ribatejo	blend	2008	0.61 ± 0.001	1.02 ± 0.003
#32	Ribatejo	blend	2007	1.27 ± 0.008	0.71 ± 0.001
#33	Ribatejo	blend	2007	2.14 ± 0.009	4.86 ± 2 × 10 ⁻⁴
#34	Ribatejo	blend	2007	4.98 ± 0.086	2.39 ± 0.002
#35	Ribatejo	monovarietal	2007	1.60 ± 0.002	1.20 ± 0.001
#36	Ribatejo	blend	2008	2.63 ± 0.003	1.87 ± 0.003
#37	Ribatejo	monovarietal	2008	4.32 ± 0.007	1.53 ± 0.002
#38	Ribatejo	blend	2007	7.05 ± 0.004	5.27 ± 0.004
#39	Ribatejo	blend	2002	0.47 ± 4 × 10 ⁻⁴	0.44 ± 4 × 10 ⁻⁴
#40	Ribatejo	blend	2008	6.96 ± 0.005	8.91 ± 0.009
#41	Ribatejo	blend	2008	3.55 ± 0.001	1.93 ± 0.002
#42	Ribatejo	blend	2007	1.22 ± 0.006	0.46 ± 2 × 10 ⁻⁴
#43	Ribatejo	blend	2007	3.19 ± 0.012	1.13 ± 0.002
#44	Ribatejo	blend	2007	2.83 ± 2 × 10 ⁻⁴	2.04 ± 0.008
#45	Ribatejo	blend	2006	0.67 ± 0.003	0.35 ± 4 × 10 ⁻⁴
#46	Ribatejo	blend	2008	1.87 ± 0.006	1.53 ± 0.003
#47	Ribatejo	blend	2007	1.65 ± 0.007	0.88 ± 1 × 10 ⁻⁵
#48	Ribatejo	blend	2007	3.32 ± 0.012	1.86 ± 0.003
#49	Ribatejo	blend	2006	3.42 ± 0.005	1.07 ± 0.006
#50	Ribatejo	blend	2008	3.68 ± 0.013	1.48 ± 0.001
#51	Ribatejo	blend	2005	0.79 ± 0.004	0.65 ± 0.003
#52	Ribatejo	blend	2008	2.52 ± 0.006	4.45 ± 0.002
#53	Ribatejo	blend	2007	3.99 ± 0.043	2.82 ± 0.010
#54	Ribatejo	blend	2007	1.19 ± 3 × 10 ⁻⁴	0.68 ± 3 × 10 ⁻⁴
#55	Ribatejo	blend	2007	1.62 ± 0.009	0.40 ± 0.001
#56	Ribatejo	blend	2007	4.18 ± 0.012	3.35 ± 4 × 10 ⁻⁴
#57	Ribatejo	blend	2008	2.16 ± 0.011	1.19 ± 0.006
#58	Ribatejo	blend	2009	1.42 ± 0.008	0.04 ± 5 × 10 ⁻⁵
#59	Ribatejo	blend	2005	2.20 ± 0.001	1.14 ± 0.002
#60	Ribatejo	blend	2007	3.42 ± 0.021	2.43 ± 0.001
#61	Ribatejo	blend	2007	4.17 ± 0.008	2.15 ± 0.002
#62	Ribatejo	blend	2008	2.51 ± 0.006	1.82 ± 0.003

Table 3. Continued

wine sample	region	varieties	vintage	concn ($\mu\text{g/mL}$)	
				<i>trans</i> -resveratrol	<i>cis</i> -resveratrol
#63	Ribatejo	blend	2008	3.28 ± 0.007	0.97 ± 0.005
#64	Ribatejo	blend	2007	4.56 ± 0.007	3.42 ± 0.003
#65	Ribatejo	blend	2007	0.98 ± 0.002	0.69 ± 0.002
#66	Ribatejo	blend	2001	0.91 ± 0.003	1.05 ± 0.001
#67	Ribatejo	blend	2006	0.34 ± 1 × 10 ⁻⁵	0.34 ± 0.001
#68	Beira Interior	monovarietal	2008	6.46 ± 0.027	4.33 ± 0.006
#69	Beira Interior	blend	2008	6.14 ± 0.032	2.22 ± 0.002
#70	Beira Interior	blend	2008	8.09 ± 0.006	4.59 ± 0.005
#71	Beira Interior	blend	2008	5.94 ± 0.019	0.85 ± 0.005
#72	Beira Interior	blend	2008	3.40 ± 0.013	0.71 ± 0.004
#73	Beira Interior	blend	2008	3.68 ± 0.010	1.35 ± 0.001
#74	Beira Interior	monovarietal	2004	3.46 ± 0.024	2.38 ± 0.008
#75	Beira Interior	monovarietal	2004	4.15 ± 0.019	2.87 ± 0.002
#76	Beira Interior	blend	2003	1.15 ± 0.018	0.56 ± 0.002
#77	Beira Interior	blend	2005	4.54 ± 0.028	4.78 ± 0.016
#78	Beira Interior	NA	2005	0.55 ± 0.004	0.23 ± 2 × 10 ⁻⁴
#79	Beira Interior	blend	2006	2.36 ± 0.005	1.68 ± 0.020
#80	Beira Interior	blend	2007	3.55 ± 0.023	1.56 ± 0.013
#81	Beira Interior	blend	2006	1.89 ± 0.003	1.46 ± 0.002
#82	Beira Interior	blend	2006	1.06 ± 0.012	0.29 ± 0.001
#83	Beira Interior	blend	2006	2.05 ± 0.019	0.58 ± 4 × 10 ⁻⁴
#84	Beira Interior	blend	2006	1.64 ± 0.004	0.57 ± 0.002
#85	Beira Interior	blend	2006	3.46 ± 0.006	0.56 ± 0.002
#86	Alentejo	blend	1999	0.77 ± 0.009	0.11 ± 0.001
#87	Douro	blend	2007	4.11 ± 0.008	0.33 ± 0.002
#88	Douro	blend	2002	0.85 ± 0.014	0.14 ± 2 × 10 ⁻⁴
#89	Beira Interior	blend	2008	8.69 ± 0.066	0.65 ± 0.003
#90	Beira Interior	monovarietal	2007	10.46 ± 0.058	0.07 ± 0.001
#91	Ribatejo	monovarietal	2006	1.31 ± 0.004	0.51 ± 0.004
#92	Beira Interior	blend	2007	8.61 ± 0.079	3.78 ± 0.036
#93	Beira Interior	blend	2007	7.29 ± 0.095	5.43 ± 0.040
#94	Beira Interior	blend	2008	0.62 ± 3 × 10 ⁻⁵	0.95 ± 0.001
#95	Beira Interior	blend	2008	1.13 ± 0.006	0.49 ± 0.002
#96	Beira Interior	blend	2008	8.12 ± 0.120	6.39 ± 0.047
#97	Beira Interior	blend	2008	6.16 ± 0.012	4.87 ± 0.010
#98	Beira Interior	blend	2005	0.80 ± 0.003	0.07 ± 0.001
#99	Beira Interior	blend	2007	3.73 ± 0.002	1.35 ± 0.002
#100	Beira Interior	blend	2005	0.23 ± 0.003	0.08 ± 0.001
#101	Beira Interior	blend	2007	6.66 ± 0.009	3.18 ± 0.004
#102	Beira Interior	blend	2007	4.60 ± 0.023	1.81 ± 0.003
#103	Beira Interior	blend	2007	1.48 ± 0.011	3.33 ± 0.001
#104	Beira Interior	blend	2007	0.83 ± 0.004	1.95 ± 0.008
#105	Beira Interior	blend	2007	2.01 ± 0.008	3.00 ± 2 × 10 ⁻⁴
#106	Beira Interior	monovarietal	2008	5.17 ± 0.067	5.25 ± 0.026
#107	Beira Interior	blend	2008	3.77 ± 0.005	3.26 ± 0.001
#108	Beira Interior	blend	2008	0.99 ± 0.001	0.73 ± 0.001
#109	Beira Interior	blend	2007	4.87 ± 0.078	3.91 ± 0.015
#110	Beira Interior	monovarietal	2007	2.86 ± 0.001	8.71 ± 0.012
#111	Beira Interior	blend	2007	1.44 ± 0.017	1.43 ± 0.004
#112	Beira Interior	monovarietal	2007	1.23 ± 0.002	5.18 ± 0.339
#113	Beira Interior	blend	2008	1.97 ± 0.009	1.73 ± 0.003
#114	Beira Interior	blend	2008	1.63 ± 0.004	0.92 ± 0.004
#115	Beira Interior	monovarietal	2007	5.26 ± 3 × 10 ⁻⁴	2.53 ± 0.001
#116	Beira Interior	blend	2007	5.97 ± 0.006	4.60 ± 0.002
#117	Beira Interior	blend	2008	1.68 ± 0.005	1.27 ± 0.004
#118	Beira Interior	blend	2007	5.08 ± 0.006	3.22 ± 0.004
#119	Beira Interior	blend	2007	8.80 ± 0.032	4.86 ± 0.003
#120	Beira Interior	blend	2007	6.68 ± 0.048	5.92 ± 3 × 10 ⁻⁴
#121	Beira Interior	blend	2007	5.41 ± 0.017	3.22 ± 0.001
#122	Beira Interior	blend	2005	0.63 ± 0.011	0.31 ± 0.003
#123	Beira Interior	monovarietal	2005	0.45 ± 0.009	0.16 ± 1 × 10 ⁻⁴
#124	Beira Interior	NA	NA	0.87 ± 0.007	0.46 ± 4 × 10 ⁻⁴
#125	Beira Interior	blend	2005	1.90 ± 0.020	0.50 ± 0.001

Table 3. Continued

wine sample	region	varieties	vintage	concn ($\mu\text{g/mL}$)	
				<i>trans</i> -resveratrol	<i>cis</i> -resveratrol
#126	Beira Interior	blend	2005	1.41 \pm 0.027	0.33 \pm 0.002
#127	Beira Interior	monovarietal	2007	3.02 \pm 0.003	2.78 \pm 0.002
#128	Beira Interior	monovarietal	2007	3.80 \pm 0.015	3.08 \pm 0.004
#129	Beira Interior	monovarietal	2007	10.87 \pm 0.051	7.53 \pm 0.004
#130	Beira Interior	blend	2006	0.54 \pm 0.015	0.87 \pm 0.009
#131	Beira Interior	blend	2006	2.76 \pm 0.009	0.65 \pm 0.002
#132	Beira Interior	blend	2006	3.37 \pm 0.003	1.84 \pm 0.001
#133	Beira Interior	blend	2005	3.21 \pm 0.048	0.32 \pm 0.004
#134	Beira Interior	monovarietal	2006	9.77 \pm 0.014	2.70 \pm 0.001
#135	Beira Interior	monovarietal	2006	0.80 \pm 0.014	0.35 \pm 0.003
#136	Beira Interior	monovarietal	2006	2.70 \pm 0.005	0.24 \pm 5 \times 10 ⁻⁴
#137	Beira Interior	blend	2006	9.42 \pm 0.051	2.04 \pm 0.003
#138	Beira Interior	blend	2005	2.85 \pm 0.005	1.02 \pm 0.001
#139	Beira Interior	blend	2008	4.74 \pm 0.019	4.43 \pm 0.005
#140	Douro	blend	2007	4.93 \pm 0.027	2.10 \pm 0.007
#141	Dão	blend	2006	3.71 \pm 0.022	2.65 \pm 0.005
#142	Beira Interior	blend	2008	5.25 \pm 0.005	3.06 \pm 0.008
#143	Douro	NA	2008	4.37 \pm 0.027	2.53 \pm 0.004
#144	Beira Interior	NA	1995	1.36 \pm 0.010	<LLOQ
#145	Beira Interior	blend	2003	1.50 \pm 0.003	0.30 \pm 7 \times 10 ⁻⁴
#146	Beira Interior	blend	2004	0.80 \pm 0.026	0.30 \pm 0.001
#147	Beira Interior	blend	2008	5.51 \pm 0.009	1.48 \pm 0.002
#148	Vinhos Verdes	monovarietal	2009	0.20 \pm 3 \times 10 ⁻⁶	4.40 \pm 0.001
#149	Vinhos Verdes	blend	NA	1.98 \pm 0.004	1.21 \pm 4 \times 10 ⁻⁴
#150	Vinhos Verdes	blend	2009	2.88 \pm 0.014	3.20 \pm 2 \times 10 ⁻⁴
#151	Vinhos Verdes	monovarietal	2009	1.17 \pm 0.001	0.92 \pm 1 \times 10 ⁻⁴
#152	Vinhos Verdes	monovarietal	2009	1.48 \pm 0.002	3.72 \pm 0.005
#153	Vinhos Verdes	blend	2009	1.33 \pm 0.009	0.82 \pm 0.001
#154	Vinhos Verdes	monovarietal	2009	0.71 \pm 0.004	3.76 \pm 0.003
#155	Vinhos Verdes	blend	2009	1.81 \pm 0.011	3.95 \pm 0.013
#156	Vinhos Verdes	blend	2008	3.88 \pm 0.005	1.77 \pm 0.001
#157	Vinhos Verdes	blend	2009	4.84 \pm 0.040	6.45 \pm 0.005
#158	Vinhos Verdes	blend	2009	0.50 \pm 0.013	4.62 \pm 0.015
#159	Vinhos Verdes	monovarietal	2009	3.77 \pm 0.018	1.99 \pm 0.004
#160	Vinhos Verdes	monovarietal	2009	0.58 \pm 0.010	3.78 \pm 0.001
#161	Vinhos Verdes	monovarietal	2009	0.49 \pm 0.007	2.09 \pm 0.010
#162	Vinhos Verdes	blend	2009	4.36 \pm 0.011	5.10 \pm 0.006
#163	Vinhos Verdes	monovarietal	2009	3.69 \pm 0.001	2.28 \pm 0.006
#164	Vinhos Verdes	blend	2009	8.59 \pm 0.006	4.88 \pm 0.005
#165	Vinhos Verdes	blend	2009	6.76 \pm 0.014	3.42 \pm 0.005
#166	Vinhos Verdes	monovarietal	2009	3.12 \pm 0.007	1.20 \pm 0.002
#167	Vinhos Verdes	blend	2009	4.92 \pm 0.011	1.65 \pm 0.005
#168	Vinhos Verdes	blend	NA	0.43 \pm 0.003	3.09 \pm 0.004
#169	Vinhos Verdes	monovarietal	2009	2.85 \pm 0.004	1.98 \pm 0.001
#170	Vinhos Verdes	blend	NA	1.93 \pm 0.016	1.36 \pm 0.005
#171	Dão	blend	2007	4.32 \pm 0.017	2.07 \pm 0.002
#172	Dão	blend	2000	3.90 \pm 0.070	2.03 \pm 0.011
#173	Dão	NA	NA	5.92 \pm 0.031	6.71 \pm 0.005
#174	Península de Setúbal	blend	NA	2.26 \pm 0.006	1.31 \pm 0.001
#175	Península de Setúbal	monovarietal	2008	6.03 \pm 0.001	2.04 \pm 0.023
#176	Bairrada	blend	2007	6.20 \pm 0.006	2.30 \pm 5 \times 10 ⁻⁴
#177	Bairrada	blend	2006	4.58 \pm 0.021	1.21 \pm 0.001
#178	Dão	blend	2008	2.26 \pm 0.001	0.74 \pm 0.001
#179	Península de Setúbal	NA	NA	6.67 \pm 0.032	1.26 \pm 0.001
#180	Dão	blend	2005	4.57 \pm 0.002	3.28 \pm 0.001
#181	Península de Setúbal	blend	2008	2.56 \pm 0.008	1.62 \pm 0.005
#182	Península de Setúbal	monovarietal	2009	1.55 \pm 0.003	1.10 \pm 0.002
#183	Bairrada	blend	2005	2.98 \pm 0.008	0.80 \pm 0.001
#184	Bairrada	blend	2006	2.81 \pm 0.014	0.77 \pm 0.002
#185	Bairrada	blend	2005	3.08 \pm 0.002	0.74 \pm 0.002
#186	Bairrada	blend	2006	3.09 \pm 0.001	1.35 \pm 0.005

NA - not available; Concerning the samples presenting values higher than the upper limit of quantitation (ULOQ), those were diluted and reanalyzed.

The method's precision using authentic samples was not systematically evaluated, but all wine samples were analyzed in duplicate, presenting good precision.

Stability. In order to study stability in processed samples at three concentration levels, simulated wine was spiked with 0.025, 1.00, and 15.00 $\mu\text{g/mL}$ of *trans*-resveratrol and 0.023, 0.092, and 0.92 for *cis*-resveratrol, and extracted using the above-mentioned

procedure ($n = 3$). After extraction, the samples were evaporated and resuspended on 100 μL of mobile phase and left at 4 °C for 18 h. These samples were injected with another set of samples, which had been freshly prepared. The measured concentrations of both sets of samples did not deviate more than 15% from the nominal concentration. Stability was evaluated in authentic wine samples as well, wine extracts being reanalyzed after 18 h at 4 °C. The obtained results were consistent with those which had been previously obtained.

Extraction Efficiency. This parameter was determined by replicate analysis ($n = 6$) of simulated wine samples spiked at 0.025, 1, and 15 $\mu\text{g/mL}$ for *trans*-resveratrol and at 0.023, 0.092, and 0.920 $\mu\text{g/mL}$ for *cis*-resveratrol; a second set of simulated wine samples (nonspiked samples) was also prepared and analyzed. After SPE, the internal standard was added to both sets of samples, while the second set of samples was further spiked with the same amounts of resveratrol isomers (100% efficiency). The obtained peak area ratios were compared, and extraction efficiency was thus calculated.

The mean calculated values were 100.44% for *trans*-resveratrol and 100.39% for *cis*-resveratrol (Table 2). The obtained efficiency values were higher than those normally seen in SPE methods,^{35–38} in LLE^{19,32–34} or when direct injection is used.^{21,23,31}

Application of the Method to Wine Samples. To demonstrate the applicability of this method, 186 commercially available red wines from different geographical regions, grape varieties and vintage were analyzed in duplicate and the obtained results are presented in Table 3. *trans*- and *cis*-resveratrol were identified by their retention times and by the wavelength corresponding to the maximum absorbance of each compound (Figure 5). A typical chromatogram of a red wine sample [#129] is shown in Figure 6. The values found are higher than those reported in the literature for most of the Portuguese red wines,^{33,34,37,47,48,50–52} which could be due to the different geographical origins of the wine or grape variety, since the content of these compounds depends on the climate and on the temperature.⁹

The obtained results follow a normal distribution, and homogeneity of variance between each group of data was tested with the *F* test. The comparison between grouped data was performed using Student's two-tailed *t* test assuming nonhomogeneous variance between the compared sets ($p \leq 0.05$). The lowest

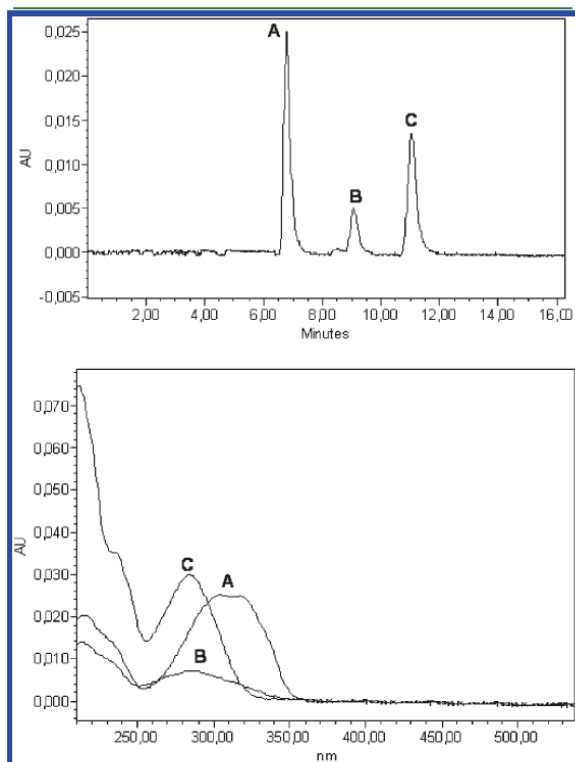


Figure 5. (top) Chromatogram of a standard mixture of (A) *trans*-resveratrol (retention time 7.1 min), (B) *cis*-resveratrol (retention time 9.1 min) and (C) carbamazepine (retention time 11 min) at 306 nm and (bottom) respective absorption spectra obtained by photodiode array detection.

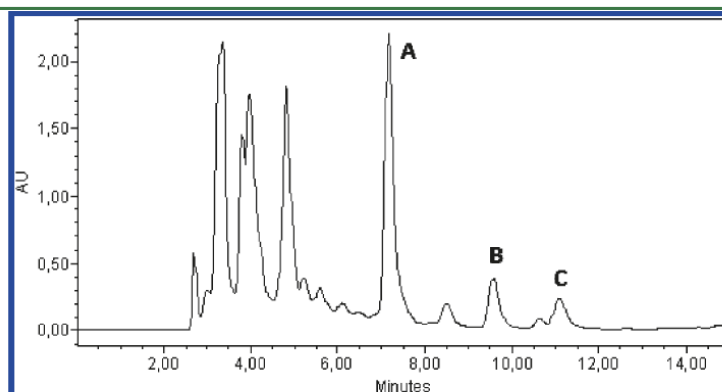


Figure 6. Chromatogram obtained by injection of a processed wine sample [#129], 306 nm: (A) *trans*-resveratrol, (B) *cis*-resveratrol and (C) internal standard.

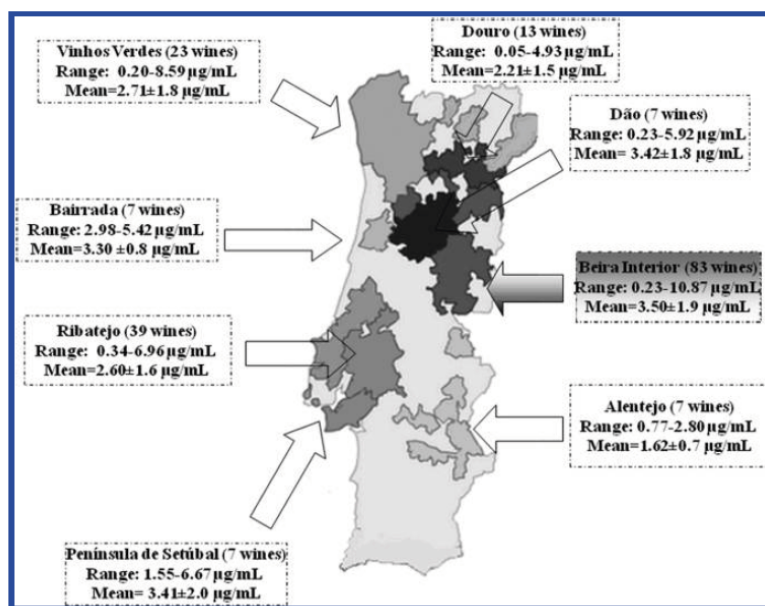


Figure 7. Map of Portugal mainland with average of *trans*-resveratrol levels in different wine regions (concentration ranges, mean values \pm standard deviations).

average level of *trans*-resveratrol was found in wines from the Alentejo region ($1.62 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$), while Beira Interior presented the highest level ($3.50 \pm 1.9 \mu\text{g/mL}$). Although some regions were found to be significantly different from other regions, such as, e.g., Alentejo compared to Beira Interior, Dão and Vinhos Verdes, there are situations in which resveratrol contents in wine do not differ significantly between regions, such as in the comparison of wines from the Península de Setúbal region to the remaining regions. These data are presented in Figure 7.

According to the literature Canada produced red wines with the highest average level of *trans*-resveratrol of $3.2 \pm 1.5 \mu\text{g/mL}$ with Greece and Japan at the other hand with $1.0 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$ and $1.0 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$, respectively.⁹ Furthermore, the highest *trans*-resveratrol levels reported in the literature were $11.9 \mu\text{g/mL}$ in a 1997 Swiss wine made from the Pinot Noir grape⁵³ and $14.3 \mu\text{g/mL}$ in a Hungarian, 2002 Merlot.⁵⁴ According to the literature, levels of *cis*-resveratrol in red wines follow the same trend as seen for *trans*-resveratrol. The highest average level of *cis*-resveratrol has been found in wines from Canada $1.9 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$.⁹ In the present work the highest *trans*-resveratrol value was $10.9 \mu\text{g/mL}$ in a 2007 Beira Interior denomination of origin made from the Touriga Nacional grape, while the highest value obtained for the *cis*-isomer was observed in a wine from the Beira Interior region ($8.71 \mu\text{g/mL}$). By using this method, the presence of *trans*- and *cis*-resveratrol was confirmed in all the red wine samples analyzed.

In conclusion, we have developed a simple and rapid method for the quantification of *trans*- and *cis*-resveratrol in wine samples. The procedure is sensitive and specific, presenting low limits of detection and quantification. The sample pretreatment procedure, based on SPE with C_{18} cartridges, has granted excellent extraction efficiencies for both isomers. The method has been completely validated, including stability tests, showing excellent results for all

the studied parameters. The present work contributes definitely to a better scientific knowledge of Portuguese wines.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: egallardo@fcsaude.ubi.pt.

Funding Sources

The authors acknowledge the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) for supporting this work in the form of a doctoral fellowship to L. Paulo (SFRH/BD/28168/2006) and a postdoctoral fellowship to E. Gallardo (SFRH/BPD/34733/2007).

ACKNOWLEDGMENT

We express our gratitude to Comissão Vitivinícola Regional da Beira Interior, Comissão Vitivinícola Regional dos Vinhos Verdes and Comissão Vitivinícola Regional do Tejo, for providing wine samples from their production regions.

REFERENCES

- (1) Jeandet, P.; Bessis, R.; Gautheron, B. The Production of Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilbene) by Grape Berries in Different Developmental Stages. *Am. J. Enol. Vitic.* 1991, 42 (1), 41–46.
- (2) Jeandet, P.; Bessis, R.; Maume, B. F.; Meunier, P.; Peyron, D.; Trollat, P. Effect of Enological Practices on the Resveratrol Isomer Content of Wine. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43 (2), 316–319.
- (3) Goldberg, D. M.; Yan, J.; Ng, E.; Diamandis, E. P.; Karumanchiri, A.; Soleas, G.; Waterhouse, A. L. A Global Survey of *Trans*-Resveratrol Concentrations in Commercial Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 1995, 46 (2), 159–165.
- (4) Gocan, S. Analysis of Stilbenes in Wine by HPLC: Recent Approaches. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2009, 32 (11–12), 1598–1643.
- (5) Abril, M.; Negueruela, A. I.; Perez, C.; Juan, T.; Estopanan, G. Preliminary study of resveratrol content in Aragon red and rose wines. *Food Chem.* 2005, 92 (4), 729–736.

- (6) Roldan, A.; Palacios, V.; Caro, I.; Perez, L. Evolution of Resveratrol and Piceid Contents during the Industrial Winemaking Process of Sherry Wine. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (7), 4268–4273.
- (7) Tokusoglu, O.; Unal, M. K.; Yemis, F. Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass Spectrometry (GC-MS). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (12), 5003–5009.
- (8) Lopez-Hernandez, J.; Paseiro-Losada, P.; Sanches-Silva, A. T.; Lage-Yusty, M. A. Study of the changes of *trans*-resveratrol caused by ultraviolet light and determination of *trans*- and *cis*-resveratrol in Spanish white wines. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, *225* (5–6), 789–796.
- (9) Stervbo, U.; Vang, O.; Bonnesen, C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chem.* **2007**, *101* (2), 449–457.
- (10) Renaud, S.; Delorgeril, M. Wine, Alcohol, Platelets, and the French Paradox for Coronary Heart-Disease. *Lancet* **1992**, *339* (8808), 1523–1526.
- (11) Athar, M.; Back, J. H.; Tang, X.; Kim, K. H.; Kopelovich, L.; Bickers, D. R.; Kim, A. L. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, *224* (3), 274–83.
- (12) Baur, J. A.; Sinclair, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5* (6), 493–506.
- (13) Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G. O.; Slowing, K. V.; Thomas, C. F.; Beecher, C. W.; Fong, H. H.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D.; Mehta, R. G.; Moon, R. C.; Pezzuto, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **1997**, *275* (5297), 218–220.
- (14) Aggarwal, B.; Shishodia, S. *Resveratrol in health and disease*; CRC Press: Boca Raton, 2006.
- (15) Paulo, L.; Ferreira, S.; Gallardo, E.; Queiroz, J. A.; Domingues, F. Antimicrobial activity and effects of resveratrol on human pathogenic bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *26* (8), 1533–1538.
- (16) Bertelli, A. A. A.; Das, D. K. Grapes, Wines, Resveratrol, and Heart Health. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2009**, *54* (6), 468–476.
- (17) Babu, S. K.; Kumar, K. V.; Subbaraju, G. V. Estimation of *trans*-resveratrol in herbal extracts and dosage forms by high-performance thin-layer chromatography. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2005**, *53* (6), 691–693.
- (18) Vian, M. A.; Tomao, V.; Gallet, S.; Coulomb, P. O.; Lacombe, J. M. Simple and rapid method for *cis*- and *trans*-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1085* (2), 224–229.
- (19) Rodriguez-Delgado, M. A.; Malovana, S.; Perez, J. P.; Borges, T.; Montelongo, F. J. G. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *J. Chromatogr., A* **2001**, *912* (2), 249–257.
- (20) Tarola, A. M.; Milano, F.; Giannetti, V. Simultaneous determination of phenolic compounds in red wines by HPLC-UV. *Anal. Lett.* **2007**, *40* (12), 2433–2445.
- (21) La Torre, G. L.; Saitta, M.; Vilasi, F.; Pellicano, T.; Dugo, G. Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection. *Food Chem.* **2006**, *94* (4), 640–650.
- (22) Sanchez, J. B. J.; Corral, E. C.; Delgado, M. J. S.; Orea, J. M.; Urena, A. G. Analysis of *trans*-resveratrol by laser ionization mass spectrometry and HPLC with fluorescence detection - Comparison between both techniques. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1074* (1–2), 133–138.
- (23) de Quiros, A. R. B.; Lopez-Hernandez, J.; Ferraces-Casais, P.; Lage-Yusty, M. A. Analysis of non-anthocyanin phenolic compounds in wine samples using high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30* (9), 1262–1266.
- (24) Zhu, Y. X.; Coury, L. A.; Long, H.; Duda, C. T.; Kissinger, C. B.; Kissinger, P. T. Liquid chromatography with multichannel electrochemical detection for the determination of resveratrol in wine, grape juice, and grape seed capsules with automated solid phase extraction. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2000**, *23* (10), 1555–1564.
- (25) Dominguez, C.; Guillen, D. A.; Barroso, C. G. Automated solid-phase extraction for sample preparation followed by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for the analysis of resveratrol derivatives in wine. *J. Chromatogr., A* **2001**, *918* (2), 303–310.
- (26) Urpi-Sarda, M.; Zamora-Ros, R.; Lamuela-Raventos, R.; Cherubini, A.; Jauregui, O.; De la Torre, R.; Covas, M. I.; Estruch, R.; Jaeger, W.; Andres-Lacueva, C. HPLC-tandem mass spectrometric method to characterize resveratrol metabolism in humans. *Clin. Chem.* **2007**, *53* (2), 292–299.
- (27) Vlase, L.; Kiss, B.; Leucuta, S. E.; Gocan, S.; Rapid, A. Method for Determination of Resveratrol in Wines by HPLC-MS. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2009**, *32* (14), 2105–2121.
- (28) Vinas, P.; Campillo, N.; Martinez-Castillo, N.; Hernandez-Cordoba, M. Solid-phase microextraction on-fiber derivatization for the analysis of some polyphenols in wine and grapes using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216* (9), 1279–1284.
- (29) Peres, R. G.; Micke, G. A.; Tavares, M. F. M.; Rodriguez-Amaya, D. B. Multivariate optimization, validation, and application of capillary electrophoresis for simultaneous determination of polyphenols and phenolic acids in Brazilian wines. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32* (21), 3822–3828.
- (30) Gu, X. L.; Chub, Q. Y.; O'Dwyer, M.; Zeece, M. Analysis of resveratrol in wine by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr., A* **2000**, *881* (1–2), 471–481.
- (31) Feijoo, O.; Moreno, A.; Falque, E. Content of *trans*- and *cis*-resveratrol in Galician white and red wines. *J. Food Compos. Anal.* **2008**, *21* (8), 608–613.
- (32) Diaz, T. G.; Meras, I. D.; Rodriguez, D. A. Determination of resveratrol in wine by photochemically induced second-derivative fluorescence coupled with liquid-liquid extraction. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387* (6), 1999–2007.
- (33) Bravo, M. N.; Feliciano, R.; Silva, S.; Coelho, A. V.; Boas, L. V.; Bronze, M. R. Analysis of *trans*-resveratrol: Comparison of methods and contents in Muscatel fortified wines from Setubal region in Portugal. *J. Food Compos. Anal.* **2008**, *21* (8), 634–643.
- (34) Nave, F.; Cabrita, M. J.; da Costa, C. T. Use of solid-supported liquid-liquid extraction in the analysis of polyphenols in wine. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1169* (1–2), 23–30.
- (35) Gerogiannaki-Christopoulou, M.; Athanasopoulos, P.; Kyriakidis, N.; Gerogiannaki, I. A.; Spanos, M. *trans*-resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties. *Food Control* **2006**, *17* (9), 700–706.
- (36) Mercolini, L.; Saracino, M. A.; Bugamelli, F.; Ferranti, A.; Malaguti, M.; Hrelia, S.; Raggi, M. A. HPLC-F analysis of melatonin and resveratrol isomers in wine using an SPE procedure. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31* (6–7), 1007–1014.
- (37) Baptista, J. A. B.; Tavares, J. F. D.; Carvalho, R. C. B. Comparison of polyphenols and aroma in red wines from Portuguese mainland versus Azores Islands. *Food Res. Int.* **2001**, *34* (4), 345–355.
- (38) Gamoh, K.; Nakashima, K. Liquid chromatography/mass spectrometric determination of *trans*-resveratrol in wine using a tandem solid-phase extraction method. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13* (12), 1112–1115.
- (39) Vinas, P.; Campillo, N.; Hernandez-Perez, M.; Hernandez-Cordoba, M. A comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction coupled to liquid chromatography for the rapid analysis of resveratrol isomers in wines, musts and fruit juices. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *611* (1), 119–125.
- (40) Katsagonis, A.; Atta-Politou, J.; Koupparis, M. A. HPLC method with UV detection for the determination of *trans*-resveratrol in plasma. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2005**, *28* (9), 1393–1405.
- (41) Trela, B. C.; Waterhouse, A. L. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44* (5), 1253–1257.

(42) Romero-Perez, A. I.; Lamuela-Raventos, R. M.; Waterhouse, A. L.; De La Torre-Boronat, M. C. Levels of *cis*- and *trans*-resveratrol and their glucosides in white and rose *Vitis vinifera* wines from Spain. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44 (8), 2124–2128.

(43) Duran-Meras, I.; Galeano-Diaz, T.; Alrado-Rodriguez, D. Post-column on-line photochemical derivatization for the direct isocratic-LC-FLD analysis of resveratrol and piceid isomers in wine. *Food Chem.* 2008, 109 (4), 825–833.

(44) Katalinic, V.; Ljubenkovic, I.; Pezo, I.; Generalic, I.; Stricevic, O.; Milos, M.; Modun, D.; Boban, M. Free resveratrol monomers in varietal red and white wines from Dalmatia (Croatia). *Period. Biol.* 2008, 110 (1), 77–83.

(45) Food and Drug Administration: US Department of Health and Human Services, guidance for industry, bioanalytical method validation. FDA. Available from URL: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf> (accessed Jun 30, 2010).

(46) International conference on harmonization (ICH), validation of analytical procedures: methodology ICH Q2. ICH. Available from URL: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf> (accessed Jun 30, 2010).

(47) de Lima, M. T. R.; Waffo-Teguo, P.; Teissedre, P. L.; Pujolas, A.; Vercauteren, J.; Cabanis, J. C.; Merillon, J. M. Determination of stilbenes (*trans*-astringin, *cis*- and *trans*-piceid, and *cis*- and *trans*-resveratrol) in Portuguese wines. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47 (7), 2666–2670.

(48) Pereira, V.; Camara, J. S.; Cacho, J.; Marques, J. C. HPLC-DAD methodology for the quantification of organic acids, furans and polyphenols by direct injection of wine samples. *J. Sep. Sci.* 2010, 33 (9), 1204–1215.

(49) Castellari, M.; Sartini, E.; Fabiani, A.; Arfelli, G.; Amati, A. Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. *J. Chromatogr., A* 2002, 973 (1–2), 221–227.

(50) Ratola, N.; Faria, J. L.; Alves, A. Analysis and quantification of *trans*-resveratrol in wines from Alentejo region (Portugal). *Food Technol. Biotechnol.* 2004, 42 (2), 125–130.

(51) Paixao, N.; Pereira, V.; Marques, J. C.; Camara, J. S. Quantification of polyphenols with potential antioxidant properties in wines using reverse phase HPLC. *J. Sep. Sci.* 2008, 31 (12), 2189–2198.

(52) 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. *Anal. Chim. Acta* 2006, 563 (1–2), 382–390.

(53) Adrian, M.; Jeandet, P.; Breuil, A. C.; Levite, D.; Debord, S.; Bessis, R. Assay of resveratrol and derivative stilbenes in wines by direct injection high performance liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.* 2000, 51 (1), 37–41.

(54) Mark, L.; Nikfardjam, M. S.; Avar, P.; Ohmacht, R. A validated HPLC method for the quantitative analysis of *trans*-resveratrol and *trans*-piceid in Hungarian wines. *J. Chromatogr. Sci.* 2005, 43 (9), 445–449.

ARTIGO II

ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND EFFECTS OF RESVERATROL ON HUMAN PATHOGENIC BACTERIA

Luísa Paulo, Susana Ferreira, Eugenia Gallardo, João António Queiroz,
Fernanda Domingues

World Journal of Microbiology & Biotechnology (2010) 26:1533–1538

Antimicrobial activity and effects of resveratrol on human pathogenic bacteria

Luísa Paulo · Susana Ferreira · Eugenia Gallardo ·
João António Queiroz · Fernanda Domingues

Received: 2 November 2009 / Accepted: 18 January 2010 / Published online: 13 February 2010
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) is a phytoalexin commonly found in food and drinks, which is thought to possess antimicrobial activity. These effects together with its well known antioxidant properties are beneficial for the prevention of some diseases, e.g. cancer. In this study we have verified that resveratrol has antibacterial activity against all tested Gram-positive bacteria using both the disk diffusion and broth microdilution methods. Time kill assays of this compound against Gram-positive bacteria showed that its effects on the growth of bacterial cells were due to bacteriostatic action. The addition of resveratrol has allowed the identification of changes in cell morphology and DNA contents, which have been assessed through microscopic analysis and flow cytometry; this suggests that the cell cycle is affected by resveratrol. This study indicates that this compound may have potential as a natural antibacterial agent for both food preservation and medicinal use.

Keywords Resveratrol · Antimicrobial activity · Bacteriostatic effect · Gram-positive bacteria · Bacterial cell cycle

Introduction

Antibacterial therapy is a powerful tool for the treatment of several diseases, and is a keystone of modern medicinal

practice. However, the increased resistance of microorganisms to the currently used antimicrobials has led to the evaluation of other agents that might have antimicrobial activity.

Phytoalexins are low molecular weight compounds which have been shown to possess biological activity against a wide range of plant and human pathogens (Jeandet et al. 2002; Mahady 2006). Amongst these substances, stilbene phytoalexins (from the Vitaceae and other plant families) have been subjected to intense investigation over the past decade, because of their potential implications on human health (Mahady 2006).

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) is a phytoalexin commonly encountered in several foodstuffs and drinks, including red wine, grapes, peanuts, berries, etc. This compound has been thought to possess antimicrobial effects which, together with antioxidant properties, is beneficial for the prevention of some diseases, such as cancer and coronary heart disease (Jang et al. 1997; Baur and Sinclair 2006; Sadruddin and Arora 2009).

The aim of this work was to demonstrate the antimicrobial properties of resveratrol towards both Gram-positive and Gram-negative bacteria. The microorganisms' sensitivity to resveratrol was determined by means of the disk diffusion method, while the broth microdilution method was used to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal bactericidal concentration (MBC) of the compound. Time kill curves were used to assess the effect of resveratrol on the growth of bacterial strains as a function of time. *Bacillus cereus* morphology was also evaluated by light microscopy and scanning electron microscopy (SEM). Finally, flow cytometry was used in order to better understand the mechanism of action of resveratrol against *Bacillus cereus*.

L. Paulo · S. Ferreira · E. Gallardo · J. A. Queiroz ·
F. Domingues (✉)
CICS, Health Sciences Research Centre, University of Beira
Interior, Av. Infante D. Henrique, 6201-556 Covilhã, Portugal
e-mail: fdomingues@ubi.pt

Materials and methods

Microorganisms and growth media

Gram-positive bacteria: *Bacillus cereus* ATCC 11778; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; clinical methicillin-resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* (MRSA and MSSA) and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Gram negative-bacteria: *Escherichia coli* ATCC 25922; clinical *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883; clinical *Klebsiella pneumoniae*; *Salmonella typhimurium* ATCC 13311; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and clinical *Pseudomonas aeruginosa*. All the strains were cultured at 37°C on nutrient agar (NA) medium; the Mueller–Hinton broth medium (MHB) and Mueller–Hinton agar medium (MHA) have been used in the antibacterial activity assay.

Antimicrobial agent and chemicals

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) was purchased from Extrasynthèse (Genay, France). The solutions which were used in the disk diffusion method were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO), whereas the remaining solutions have been prepared in culture medium with DMSO. The reagents' purity was suitable for these studies.

Agar disk diffusion assay

The antibacterial activity of resveratrol was determined using the procedure of the diffusion test from the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS 2003a), protocol M2-A8. Six millimetre diameter disks have been impregnated with 10 µL of a resveratrol solution in DMSO. Tetracycline was used as a positive control to determine the sensitivity of the bacteria under study. The inoculum was prepared by direct suspension of colonies in sterile solution of 0.85% sodium chloride, and the optical density has been adjusted to 0.5 McFarland turbidity standard [$1-2 \times 10^8$ colony forming units/mL (CFU/mL)]. The plates were incubated at 37°C for 16–18 h. Antimicrobial activity was evaluated in triplicate via the measurement of the diameter of the inhibition zone (DIZ).

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)

The MIC of resveratrol was determined by the method of broth microdilution assay from the NCCLS 2003b, protocol M7-A6. The method which has been described for the disk diffusion assays was also used for the preparation of the inoculum. Resveratrol was diluted twice to obtain

concentrations in the range 400–3.125 µg/mL, and the MIC was determined after 17 h of incubation at 37°C. The plates were read in the microplate reader at 595 nm, and the percentage of growth inhibition of microorganisms as regards the resveratrol concentration was assessed. The MBC, the lowest resveratrol concentration capable of causing a reduction higher than 99.9% of the initial inoculum growth, was determined in triplicate by subculture on agar plate.

Time-kill curves

A standardized inoculum of the bacterial isolate was grown with, and without the antimicrobial agent at different concentrations (1×, 2× and 3× MIC) for a period of 24 h at 37°C (Eliopoulos 2005). Bacterial cultures have been sampled by collection at regular time intervals (0, 2, 4, 6, 8 and 24 h). Serial ten-fold dilutions ($10-10^7$) of the bacterial suspension have been performed in a 0.85% sodium chloride solution, and 25 µL was inoculated onto plate count agar (PCA) ($n = 3$). After 24 h of incubation at 37°C, CFU were counted, and the limits of count detection were of 5–50 CFU. The killing rate was determined by plotting the total number of viable cells as \log_{10} CFU/mL versus time. Bacteriostatic and bactericidal activities have been defined respectively, as <99.9% kill (<3log₁₀) and as a >3log₁₀ decrease in CFU/mL (99.9% kill).

To evaluate these parameters, three independent experiments were performed.

Bacterial morphology

Bacterial morphology was studied by inoculation of MHB with a suspension of *Bacillus cereus*, and a culture without resveratrol was used as control. The influence of this compound on bacterial morphology was evaluated using light and scanning electron microscopy (SEM).

Flow cytometry

DRAQ5 (Biostatus Limited, Leicestershire, UK) stock solution (5 mM) was diluted 1:50 with sterile distilled water and stored at 4°C. Samples were run on a BD Biosciences FACSCalibur flow cytometer. Acquisition and analysis were performed using the CellQuest™ Pro Software and were based on light-scatter and fluorescence signals produced from 15 mW laser illumination at 488 and 635 nm. The signals corresponding to forward and side scatter (FSC and SSC) and fluorescence were accumulated, and the latter have been screened by a FL-4 at 661 nm long pass filter.

Results and discussion

From the results of the disk diffusion assay we have observed that resveratrol presented antibacterial activity against all tested Gram-positive bacteria (Table 1), and thus prevented the growth of 11 (84.6%) from the 13 tested microorganisms; as regards the Gram negative bacteria, the compound has shown antimicrobial activity on five of the seven tested strains. These differences that have been

observed between Gram-positive and Gram-negative bacteria may be explained by the fact that the latter microorganisms are more complex from a structural and chemical point of view, which is consistent with previous studies using similar (Chan 2002) or different strains (Mahady and Pendland 2000; Docherty et al. 2001; Wang et al. 2006; Docherty et al. 2007; Shan et al. 2008).

In this work, resveratrol concentrations ranging from 3.125 to 400 µg/mL have been tested, and its MIC for all

Table 1 Screening of antimicrobial activity of resveratrol using the disk diffusion test and broth microdilution method

Microorganisms	Diameter of the inhibition zone (DIZ-mm)	Broth Microdilution
	Resveratrol (10 µL/disk)*	MIC resveratrol 400–3.125 µg/mL
Gram-positive bacteria		
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	9.8 ± 1.5 (+)	50
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	9.6 ± 0.6 (+)	100
MSSA <i>Staphylococcus aureus</i>	11 ± 1.0 (+)	100
MRSA <i>Staphylococcus aureus</i> (1st)	9 ± 1.4 (+)	200
MRSA <i>Staphylococcus aureus</i> (2nd)	9 ± 0.7 (+)	200
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	7.0 ± 0 (+)	100
Gram-negative bacteria		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	8.2 ± 1.5 (+)	>400
Clinical <i>Escherichia coli</i>	7.7 ± 0.6 (+)	>400
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	7.0 ± 0 (+)	>400
Clinical <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7.7 ± 0.6 (+)	>400
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	8.0 ± 1.4 (+)	>400
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	(–)	>400
Clinical <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(–)	>400

* (–): not active; (+): active (diameter of inhibition zone greater than 6 mm)

Fig. 1 Time-kill curves of resveratrol at 1×, 2× and 3× the MIC of *B. cereus* ATCC 11778 (a), *S. aureus* ATCC 25923 (b) and *E. faecalis* ATCC 29212 (c). Untreated control, open squares; 1× MIC, filled triangles; 2× MIC filled circles and 3× MIC, filled squares. Effect of resveratrol (3× MIC) at the various growth stages of *B. cereus* ATCC 11778 (d). Resveratrol was added at 0 h, open circles; 2 h, filled open triangles; 3 h, filled circles; 4 h open triangles and 6 h, filled squares. Positive control, open squares. The results are presented as mean ± standard deviations (n = 3), and the coefficients of variation for all concentrations are ≤5%

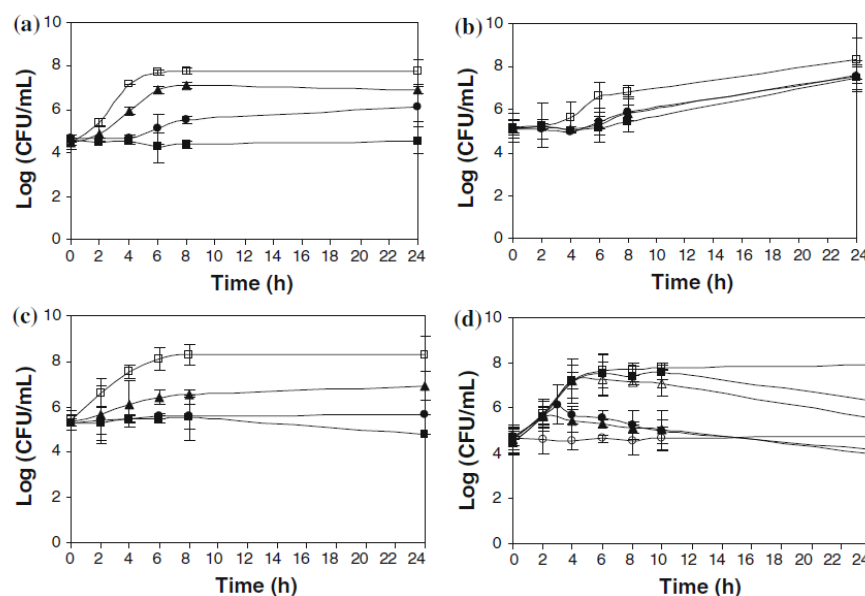
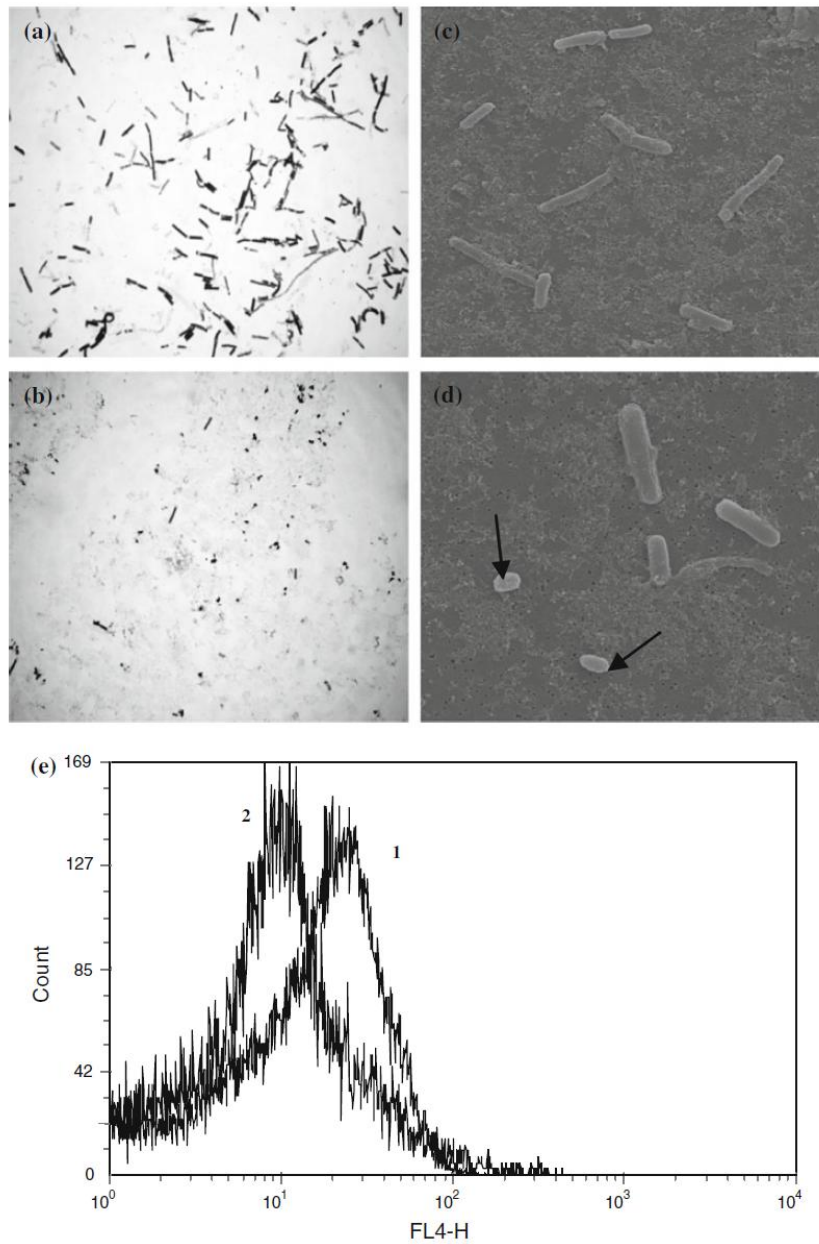


Fig. 2 The effect of resveratrol on *B. cereus* ATCC 11778 morphology by light microscopy ((a) and (b)) and scanning electron microscopy ((c) and (d)). The cells in positive control (a) and (c) and exposure of *B. cereus* to a concentration of resveratrol of 200 µg/mL (b) and (d). Fluorescence histogram of *B. cereus* ATCC 11778 stained with DRAQ5 (e) positive control (1) and exposure to 200 µg/mL of resveratrol (2)



Gram-positive bacteria (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*) was determined. The microorganism that presented highest sensitivity towards resveratrol was *Bacillus cereus* ATCC 11778 (MIC 50 µg/mL), followed by *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, which have presented a MIC of 100 µg/mL (Table 1).

It was not possible to obtain resveratrol concentrations higher than 400 µg/mL due to its poor solubility (Jeandet et al. 2002), and therefore its MIC on Gram-negative

bacteria was not determined. Consequently, the efficacy of inhibition (in terms of percentage) presented by different concentrations of resveratrol was used to evaluate its activity against these bacteria. At a concentration of 400 µg/mL, the inhibition percentages observed for *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae* were respectively, 81, 80 and 58%. In addition, it was not possible to determine the MBCs, since the maximum tested concentration was 400 µg/mL.

Gram-negative strains cultured in the presence of resveratrol have presented a decrease in their growth, whereas for Gram-positive bacteria the division of the organisms has stopped. However, when the bacteria are placed in PCA, their growth may be resumed.

Time-kill curves have been used to determine whether resveratrol effects are either bacteriostatic or bactericidal. According to our results, resveratrol shows bacteriostatic activity against the tested Gram-positive bacteria, since their growth was prevented as compared to a positive control (Fig. 1a–c).

In contrast, Docherty et al. (2007) have shown in an in vitro study that resveratrol inhibited *Propionibacterium acnes*, and presented bactericidal activity at the highest tested concentration (200 µg/mL). Furthermore, Jung et al. (Jung et al. 2005) have observed fungicidal activity of resveratrol against human pathogenic fungi.

Considering both the results obtained by these authors and those obtained in this work, we may suggest that resveratrol presents different effects, depending on the involved microorganisms and respective strains.

In the treatment of bacterial infections caused by Gram-positive organisms, the assumption that the action in vivo is bactericidal and not bacteriostatic is intuitive rather than based on rigorous scientific research (Pankey and Sabath 2004). Moreover, several authors agree in the fact that the possible superiority of bactericidal over bacteriostatic agents may be of little relevance for the treatment of most Gram-positive provoked infections, particularly in those patients with uncomplicated infections in which the immune system is not impaired.

The time kill curve study has demonstrated that resveratrol presented bacteriostatic activity against *Bacillus cereus* at any stage of growth (Fig. 1d), considering that a reduction $\geq 99.9\%$ of the inoculum was not observed. When the compound was added at the beginning of the assay ($t = 0$ h), the number of viable cells remained constant. However, when this addition took place at any stage of the exponential phase, or at the beginning of the stationary phase, a decrease in the number of viable cells was observed. These data may suggest that bacterial growth is inhibited by resveratrol, but also that it may kill a specific fraction of the cell population. This fraction would be probably those cells which are actively growing, since a less pronounced reduction of the number of viable cells was observed when resveratrol was added at the beginning of the stationary phase.

The treatment of *Bacillus cereus* with increasing concentrations of resveratrol (200 µg/mL) has led to a morphological change in the cells, from the typical long rod shape to short rods or even to a coccus-like shape (Fig. 2b, d). This has also been observed by Si et al. (Si et al. 2006)

as regards the use of other compounds, e.g. epicatechin gallate (ECG) and epigallocatechin gallate (EGCG).

Flow cytometry and the fluorescent dye DRAQ5, a novel far-red fluorescent DNA dye which can be used in living cells (Smith et al. 2000), were used to investigate the effect of resveratrol. As can be seen in Fig. 2e, the fluorescence histogram of resveratrol-treated cells has shifted towards left when compared to the control assay, and this indicates a decrease in the fluorescence intensity. These results have shown that resveratrol has decreased the intracellular DNA contents, taking into account the capacity of stoichiometric binding of DRAQ5 to DNA. These data and SEM suggest that cell growth is inhibited, which may in turn stop cell division. These results further suggest that resveratrol do affect the bacterial cell cycle.

In conclusion, the results obtained in this study have pointed out the antimicrobial activity of resveratrol against some human pathogenic bacteria. The antimicrobial activity towards some microorganisms presented by this compound, as well as its effect on Gram-positive bacteria, provides useful information for potential therapeutic use. In addition, the bacteriostatic effect of resveratrol might justify its possible use against Gram-positive bacteria, e.g. *Bacillus cereus* or *Staphylococcus aureus*. Despite of the fact that the exact mechanism of the antibacterial action of resveratrol has not yet been fully elucidated, our results suggest that the antibacterial effects are related to the cellular growth.

Resveratrol has draught attention not only for being a possible natural antimicrobial but also for its potential functional and therapeutic applications. Therefore, its significant potential for use both in clinical practice and food preservation deserves further investigation in the future.

Acknowledgments This work was supported by the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) (SFRH/BD/28168/2006). We are grateful to Eng A. Gomes, Dr. F. Silva and Prof. O. Lourenço for helpful advice and assistance in the performance of SEM and flow cytometry assays. We thank Biostatus Limited, Leicestershire, UK, for supplying DRAQ5.

References

- Baur JA, Sinclair DA (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5:493–506. doi:10.1038/nrd2060
- Chan MMY (2002) Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochem Pharmacol* 63:99–104. doi:10.1016/S0006-2952(01)00886-3
- Docherty JJ, Fu MM, Tsai M (2001) Resveratrol selectively inhibits *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *J Antimicrob Chemother* 47:243–244
- Docherty JJ, McEwen HA, Sweet TJ, Bailey E, Booth TD (2007) Resveratrol inhibition of *Propionibacterium acnes*. *J Antimicrob Chemother* 59:1182–1184. doi:10.1093/jac/dkm099

- Eliopoulos GM (2005) Antimicrobial combinations. In: Lorian V (ed) Antibiotics in laboratory medicine. Lippincott Williams & Wilkins, New York, pp 365–440
- Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275:218–220. doi:10.1126/science.275.5297.218
- Jeandet P, Douillt-Breuil AC, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M (2002) Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J Agric Food Chem* 50:2731–2741. doi:10.1021/jf011429s
- Jung HJ, Hwang IA, Sung WS, Kang H, Kang BS, Seu YB, Lee DG (2005) Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi. *Arch Pharm Res* 28:557–560
- Mahady G (2006) Resveratrol as an antibacterial agent. In: Aggarwal B, Shishodia S (eds) Resveratrol in health and disease. CRC Press, Boca Raton, pp 465–474
- Mahady GB, Pendland SL (2000) Resveratrol inhibits the growth of *Helicobacter pylori* in vitro. *Am J Gastroenterol* 95:1849. doi:10.1111/j.1572-0241.2000.02146.x
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003a) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests—eighth edition: approved standard M2-A8. NCCLS, Wayne PA, USA
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003b) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically—sixth edition: approved standard M7-A6. NCCLS, Wayne PA, USA
- Pankey GA, Sabath LD (2004) Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Infect Dis* 38:864–870. doi:10.1086/381972
- Sadruddin S, Arora R (2009) Resveratrol: biologic and therapeutic implications. *J Cardimetab Syndr* 4:102–106. doi:10.1111/j.1559-4572.2008.00039.x
- Shan B, Cai YZ, Brooks JD, Corke H (2008) Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents. *Food Chem* 109:530–537. doi:10.1055/s-2007-993759
- Si W, Gong J, Tsao R, Kalab M, Yang R, Yin Y (2006) Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *J Chromatogr A* 1125:204–210. doi:10.1016/j.chroma.2006.05.061
- Smith PJ, Blunt N, Wiltshire M, Hoy T, Teesdale-Spittle P, Craven MR, Watson JV, Amos WB, Errington RJ, Patterson LH (2000) Characteristics of a novel deep red/infrared fluorescent cell-permeant DNA probe, DRAQ5, in intact human cells analyzed by flow cytometry, confocal and multiphoton microscopy. *Cytometry* 40:280–291. doi:10.1002/1097-0320(20000801)40:4<280:AID-CYTO4>3.0.CO;2-7
- Wang WB, Lai HC, Hsueh PR, Chiou RYY, Lin SB, Liaw SJ (2006) Inhibition of swarming and virulence factor expression in *Proteus mirabilis* by resveratrol. *J Med Microbiol* 55:1313–1321. doi:10.1099/jmm.0.46661-0

ARTIGO III

ANTI-*HELICOBACTER PYLORI* AND UREASE INHIBITORY ACTIVITIES OF RESVERATROL AND RED WINE

Luísa Paulo, Mónica Oleastro, Eugenia Gallardo, João António Queiroz and
Fernanda Domingues

Food Research International (2011), doi: 10.1016/j.foodres.2011.02.017

Anti-*Helicobacter pylori* and urease inhibitory activities of resveratrol and red wine

Luísa Paulo,[†] Mónica Oleastro[‡], Eugenia Gallardo,[†] João António Queiroz[†] and Fernanda Domingues^{*,†}

[†]*CICS-UBI- Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6201-556 Covilhã, Portugal*

[‡]*Unidade Helicobacter/Campylobacter, Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais, Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional Saúde Dr Ricardo Jorge, I. P., Lisboa, Portugal*

* Corresponding author:

Fernanda da Conceição Domingues

CICS-UBI- Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior

Av. Infante D. Henrique

6201-556 Covilhã

Portugal

Telephone: +351 275 329 002

Fax: +351 275 329 099

E-mail:fdomingues@ubi.pt

Abstract

There is considerable interest in alternative approaches for the eradication of *Helicobacter pylori* using biologically active compounds including antioxidants from a wide range of natural sources. In this work we have investigated the antibacterial properties of resveratrol towards different *Helicobacter pylori* strains. In addition we studied the inhibition of *Helicobacter pylori* urease by resveratrol and red wine. In those assays, resveratrol inhibited the growth of all the 17 *H. pylori* strains tested, with inhibition diameters ranging from 16 to 28 mm and minimum inhibitory concentration values varying from 25 to 100 µg/mL, confirming its antimicrobial properties. Moreover, resveratrol and red wines showed an inhibitory effect on *H. pylori* urease activity, which is considered a virulence factor of this organism and essential for colonization and establishment of the infection. Further kinetic analysis revealed that inhibition occurred in a non-competitive and concentration-dependent manner. Overall, the results suggest that resveratrol and red wine may have potential for new therapy schemes that include natural products as an alternative therapeutic approach.

Keywords: resveratrol, *Helicobacter pylori*, urease, wine

1. Introduction

Helicobacter pylori is a Gram-negative spiral-shaped, fastidious, microaerophilic bacillus which rapidly hydrolyses urea as part of its adapted survival methods (Montecucco & Rappuoli, 2001; Vale & Vitor, 2010). It has been implicated as the etiologic agent of chronic gastritis, peptic ulcer, gastric adenocarcinoma and related gastroduodenal disorders (Graham, 1994). Several potential virulence factors may be responsible for the pathogenicity of *H. pylori*, such as *cagA*, *vacA* and urease (Montecucco & Rappuoli, 2001). The *cagA* and *vacA* genes are the two major *H. pylori* virulence markers. The *cagA* gene is a strain-specific gene, belonging to the *cag* pathogenicity island, which has been associated with severe gastric disease (Blaser et al., 1995; Censini et al., 1996). The *vacA* gene encodes for a vacuolating toxin and is characterized by a mosaic structure for which different alleles have been identified in the signal (s), middle and intermediate regions of the gene (Atherton et al., 1995; Rhead et al., 2007). Only the *vacA* s1 type has been associated with *in vitro* cytotoxin activity (McClain et al., 2001). The bacterium produces high levels of the enzyme urease which converts urea into ammonia, producing a local alkaline environment that enables the organism to survive on the acidic environment of the stomach as well as aids its initial colonization of the gastric mucosa (Mobley, Cortesia, Rosenthal, & Jones, 1988; Nagata, Satoh, Iwahi, Shimoyama, & Tamura, 1993). Successful treatment of chronic *H. pylori* infections leads to the resolution of gastritis and a decrease of ulcer recurrence. Unfortunately, eradication of *H. pylori* has proved to be difficult, and an optimal regimen has not yet been defined (O'Connor, Gisbert, & O'Morain, 2009). Triple therapy using at least two antibiotics and either bismuth or a proton pump inhibitor results in eradication rates of 90% (Marshall, 1993). However, these regimens are complicated, have significant side effects and compliance problems, often leading to relapse. Since complete cure is not always achieved with triple therapy, alternative therapeutic agents are sought. It is why the search for new antimicrobial agents to eradicate *H. pylori* and yield better therapeutic results is of critical importance, especially in developing countries where the rates of *H. pylori* infections are high. Thus, in recent years a growing interest in biologically active compounds, including antioxidants from plants and other natural sources, has been observed, as some epidemiological studies have shown a correlation between seropositivity to *H. pylori* and environmental factors, including diet (Brenner, Berg et al., 1999; Ruggiero et al., 2007). Indeed, a low incidence of infection has been associated with the consumption of vegetables, wine and green tea. The phytoalexin resveratrol (3,4',5-

trihydroxistilbene) has been attributed to numerous beneficial biological effects (Anastasiadi, Pratsinis, Kletsas, Skaltsounis, & Haroutounian, 2010; Bertelli & Das, 2009; Jang et al., 1997), including potent antimicrobial activity (Chan, 2002; Daroch et al., 2001; Dochertyl, McEwen, Sweet, Bailey, & Booth, 2007; Mahady & Pendland, 2000; Mahady, Pendland, & Chadwick, 2003; Paulo, Ferreira, Gallardo, Queiroz, & Domingues, 2010; Shan, Cai, Brooks, & Corke, 2008; Wang et al., 2006). In addition, some studies also suggest that wine possesses antimicrobial activity against various pathogens (Boban et al., 2010; Daroch et al., 2001; Martini et al., 2009; Papadopoulou, Soulti, & Roussis, 2005). Wine consists of different phenolic compounds, such as resveratrol, and the antioxidant and antibacterial activities of different wines can be related to this compound.

Likewise, it has been shown that wine and some of its components are effective against some gastrointestinal pathogens such as *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria* and *H. pylori* (Daroch et al., 2001; Ganan, Martinez-Rodriguez, & Carrascosa, 2009; Mahady, Pendland, & Chadwick, 2003; Martini et al., 2009; Moretro & Daeschel, 2004; Papadopoulou, Soulti, & Roussis, 2005; Waite & Daeschel, 2007), and it has been proposed that the digestive qualities of wine are to a great extent the result of its antibacterial properties (Weisse, Eberly, & Person, 1995).

The aim of this work was to evaluate the antibacterial properties of resveratrol towards different *Helicobacter pylori* clinical strains, presenting different virulence profiles and different susceptibility patterns against the antibiotics that are usually used in anti-*H. pylori* therapy. The disk diffusion method was used to determine the susceptibility to resveratrol and the minimum inhibitory concentration (MIC) of this compound was assessed by the agar dilution method. Moreover, considering the crucial role that urease plays in *H. pylori* survival and gastric colonization, the urease inhibitory activity of resveratrol and of two different red wines was also evaluated. Finally, the anti-urease activity of resveratrol was kinetically characterized.

2. Materials and Methods

2.1. Microorganisms and growth media

A total of 17 *H. pylori* strains were studied, two reference strains 26695 (ATCC 700392) and J99 (ATCC 700824), and 15 clinical isolates obtained from the collection of bacterial strains of the Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) (Table 1).

These strains were previously genotyped concerning the two major *H. pylori* virulence genes, *cagA* and *vacA* genes, i.e. characterized for the presence or absence of *cagA* and for the *vacA* s allele. Strains carrying the toxigenic *vacA* s1 allele were classified as *vacA* positive and strains carrying the nontoxigenic allele s2 were classified as *vacA* negative. The strains were also tested against the antibiotics metronidazole, clarithromycin and ciprofloxacin (Table 1).

Strains were cultured on *H. pylori* selective agar (Wilkins-Chalgren agar supplemented with 10% defibrinated horse blood), vancomycin [10 mg/L], cefsulodin [2 mg/L], trimethoprin lactate [5 mg/L], and fungizona [1 mg/L] (Biogerm, Maia, Portugal) and incubated at 37°C for 24 h in a anaerobic jar (Oxoid, Cambridge, United Kingdom) with a gas generator system (CampyGen; Oxoid), under microaerobic conditions. For the antibacterial activity assays, strains were cultured in Mueller-Hinton agar medium (MHA) (LiofilChem, Milan Italy) with 10% of defibrinated horse blood (ProBiologica, Belas, Portugal), at 37°C.

2.2. Antimicrobial agent and chemicals

Resveratrol (3,4',5-trihydroxistilbene) was obtained from Extrasynthèse (Genay, France). Acetohydroxamic acid (AHA) was purchased from Sigma Aldrich (Steineheim, Germany). The solutions used in disk diffusion method were prepared in 1.5% of dimethyl sulfoxide (DMSO) with a concentration of 400 µg/disk. The solutions used in the agar dilution method and in the urease inhibition assay were prepared in culture medium with DMSO, resveratrol and AHA concentrations ranging from 6.25 to 400 µg/mL. The reagents' purity was suitable for these studies.

2.3. Wine samples

Commercial samples of two red wines (controlled denomination of origin-DOC-Beira Interior, Portugal) were used, having different amounts of resveratrol (wine 1 with 10.46

µg/mL and wine 2 with 1.26 µg/mL), from the same geographic region (Beira Interior) and grape variety (Touriga Nacional), having also the same ethanol content (13.5%) and pH (3.4).

2.4. Agar disk diffusion assay

The antibacterial activity of resveratrol was determined by disk diffusion, according to the procedures of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), protocol M45-A (CLSI/NCCLS M45-A, 2006). Disks of 6 mm diameter were impregnated with 20 µL of resveratrol in DMSO, with a concentration of 400 µg/disk. Disks impregnated with 20 µL of clarithromycin and 20 µL of amoxicilin were used in parallel, with concentrations of 15 µg/disk and 10 µg/disk, respectively. A disk containing only DMSO was also used in order to exclude a possible antibacterial activity of this compound. The inoculum was prepared by direct suspension of colonies in sterile solution of sodium chloride 0.85% and optical density was adjusted to 2 McFarland turbidity standard (1×10^7 - 1×10^8 colony forming units/mL- CFU/mL). MHA plates with 10% horse blood were inoculated by flooding the agar surface with the inoculum suspension and the excess fluid was air-dried. Four disks by plate were applied at equidistant points on top of the agar medium and the agar plates were incubated at 37°C for 72h, under microaerobic conditions.

Antimicrobial activity was evaluated by measuring the diameter of the inhibition zone around the disk. At least three independent experiments were performed in duplicate.

2.5. Agar Dilution Method

The MIC of resveratrol was determined by the agar dilution method, according to the procedures of the CLSI, protocols M45-A and M100-S19 (Table 2L) (CLSI/NCCLS M45-A, 2006; CLSI/NCCLS M100-S19, 2009). Resveratrol was serially diluted twofold and 45 µL of each dilution was incorporated in 2955 µL of appropriate melted agar medium (MHA) with 10% defibrinated horse blood and poured in a Petri dish (capacity 3 mL). The final concentrations of resveratrol in the medium ranged from 6.25 to 400 µg/mL, which is in accordance with values described in literature (Langcake & Pryce, 1976; Shan, Cai, Brooks, & Corke, 2008). The inoculum was prepared in the same way as in the case of disk diffusion, adjusting the optical density to 2.0 McFarland (1×10^7 - 1×10^8 CFU/mL). Agar plates were inoculated with 2 µL of bacterial suspension and the plates were incubated for 3 days at 37°C under microaerophilic conditions. The MIC was defined as the lowest concentration of resveratrol that will inhibit the visible growth

of a microorganism. At least three independent experiments were performed in duplicate, in parallel with two growth controls consisting of medium with or without DMSO.

2.6. Preparation of *Helicobacter pylori* urease

For urease inhibition assays bacterial suspension of three *H. pylori* strains (26695, 1692/05 and 553A/02) were prepared in a 0.85% sodium chloride solution. These two last strains were selected because 1692/05 is the most virulent and resistance strain, and 553 A/02 is negative in both virulence factors and susceptible to all antibiotics tested. Suspended cells were collected by centrifugation (4.600 rpm, 15 min, 4°C), washed twice with a 0.85% sodium chloride solution, followed by a final wash with phosphate buffered saline (pH 7.4) solution. Then water with protease inhibitors was added to the pellet and sonication was performed for one minute. Following centrifugation (15,000g , 10 min, 4°C), the supernatant was desalted using a centrifugal filter device 10.000 MWCO PES (Vivaspin 6 Lab Technology Products, Goettingen, Germany) at 4°C, samples were washed twice with water and further concentrated.

2.7. Urease Inhibition Assay

Several concentrations of resveratrol and AHA (positive control), both ranging from 6.25 to 400 µg/mL, two different red wines and water (negative control) were tested in this assay. For each test, the following reagents were added in a 1.5 mL microtube: 10 µL of phosphate buffer (100 mM, pH 7.4), 15 µL of each of the previous compounds and 25 µL of urease solution (final concentration 2 U) were mixed and pre-incubated at 37°C for 10 min. The urease reaction was started by adding 25 µL of urea solution 25 mM to each tube and incubated for 30 min. The ammonia concentration was determined with a colorimeter at 636 nm after coloration with the phenol hypochloride assay (Witte & Medina-Escobar, 2001). Calibration curves were prepared with ammonium chloride solutions. The protein content was determined by a commercial Bradford assay (BioRad) using Bovine Serum Albumin as a standard.

3. Results and Discussion

3.1. Antibacterial Activity

Resveratrol has attracted attention as potential antimicrobial for food protection or even for therapeutic purposes. This report describes the antibacterial activity and urease inhibitory activity of resveratrol and red wines samples against *H. pylori*.

Resveratrol, a polyphenol found in wine, is known to exhibit potent inhibitory activity against *H. pylori* (Mahady & Pendland, 2000; Mahady, Pendland, & Chadwick, 2003). In this study, the antibacterial activity of resveratrol against 17 strains of *H. pylori* was examined. The diameter of inhibition zone and the minimum inhibitory concentration (MIC) were evaluated, and the results are reported in Figure 1 and Figure 2, respectively. From the results of the disk diffusion assay we observe that resveratrol (at 400 µg/disk) prevented the growth of all tested strains, with the inhibition diameters of growth ranging from 16 to 28 mm (Figure 1), indicating a variable susceptibility of the strains to resveratrol. The observed differences may be explained by the fact that the strains are very heterogeneous, presenting different virulence profiles and diverse antibiotics susceptibility patterns (Mahady, Pendland, & Chadwick, 2003; Martini et al., 2009).

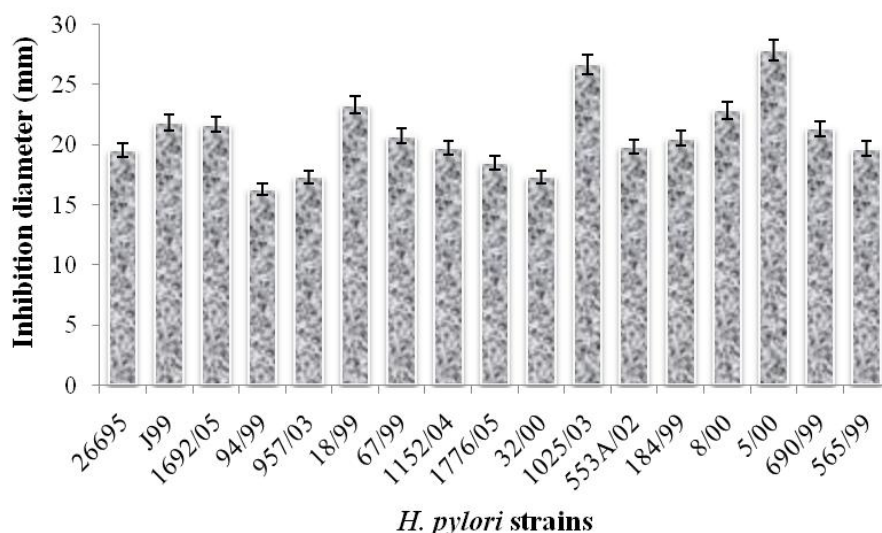


Figure 1. Antibacterial activity of resveratrol against several *Helicobacter pylori* strains, using the disk diffusion test. The results are presented as mean \pm standard deviations ($n=3$), and the coefficients of variation were $\leq 5\%$.

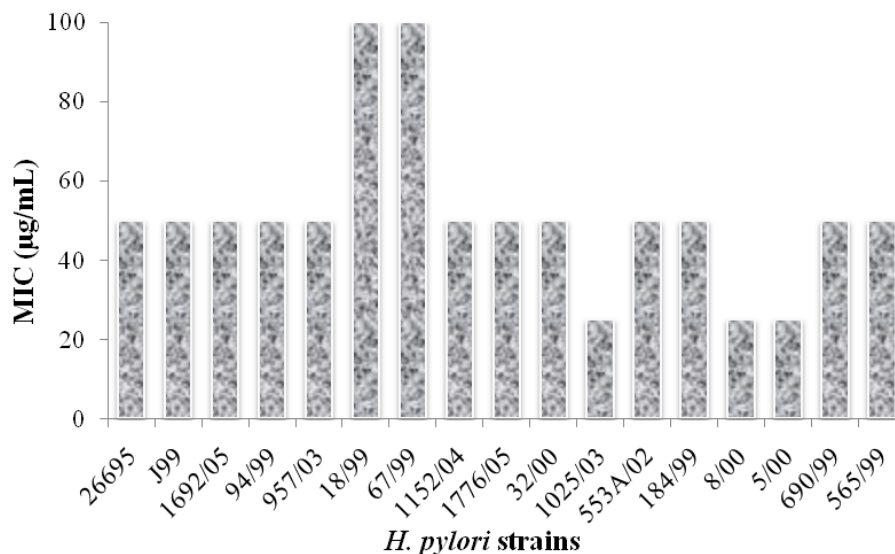


Figure 2. Antibacterial activity of resveratrol against various *Helicobacter pylori* strains, using the agar dilution method. Each experiment consisted of two replicates repeated three times with different resveratrol concentrations (6.25-400 µg/mL).

Resveratrol concentrations ranging from 6.25 to 400 µg/mL were tested by agar dilution method, and the corresponding MIC was determined for all strains. The MIC ranged between 25 and 100 µg/mL, with the majority of the strains presenting a similar susceptibility pattern (MIC=50 µg/mL) (Figure 2). The three *H. pylori* strains that were inhibited with the lowest resveratrol concentration were susceptible to all the antibiotics tested, two of them (strains 8/00 and 5/00) were negative for both *cagA* and *vacA* genes and the third strain (1025/03) was positive for *cagA* negative for *vacA*. In contrast, resveratrol showed less activity against strains 67/99 and 18/99 (MIC= 100 µg/mL), which were positive for both virulence factors and resistant to metronidazole (Table 1 and Figure 2). These results were consistent with previous studies demonstrating that resveratrol has different antibacterial activity against various *H. pylori* strains (Chatterjee, Bagchi, Yasmin, & Stohs, 2005; Chatterjee, Yasmin, Bagchi, & Stohs, 2003; Daroch et al., 2001; Lee, Shin, & Hahm, 2008; Mahady & Pendland, 2000; Mahady, Pendland, & Chadwick, 2003; Martini et al., 2009; Murano et al., 2005; Ralhan, Pandey, & Aggarwal, 2009; Zaidi et al., 2009). According to the literature, resveratrol exhibits the most potent inhibitory activity on *H. pylori* infection under neutral conditions (Murano et al., 2005).

Recent studies conducted *in vivo* suggest that resveratrol is well tolerated and has non-toxic effects (Boocock et al., 2007; Williams, Burdock, Edwards, Beck, & Bausch, 2009). In addition, it was previously demonstrated that resveratrol and red wine extracts inhibited the growth of *H. pylori cagA* positive strains (Mahady, Pendland, & Chadwick, 2003). The antibacterial activity of Chilean red wines and the active extracts of two randomly selected wines were assayed for their antibacterial activity on *H. pylori* strains (Daroch et al., 2001). All the red wines studied showed some antibacterial activity on the strains tested, although the strains were heterogeneous in their susceptibility to each particular wine. The results indicate that Chilean red wines might have an antibacterial activity on *H. pylori*, which depends mainly on the presence of resveratrol in the specific wine. Furthermore, the red wine significantly prevented gastritis and limited the localization of bacteria and VacA to the surface of the gastric epithelium in *H. pylori*-infected mice (Ruggiero et al., 2007; Tombola et al., 2003). All these facts suggest that polyphenols or polyphenol derivatives from wine could be useful in the prevention or treatment of *H. pylori*-associated gastric diseases.

Table 1. *Helicobacter pylori* strains characterization regarding virulence factors and antibiotic susceptibility.

Strain Number ^a	Virulence factor		Antibiotic susceptibility					
	<i>cagA</i>	<i>vacA</i> ^c	Metronidazole	Clarithromycin	Ciprofloxacin	MIC or inhibition diameter ^b		
			MIC	MIC				
1692/05	+	+	24	R	>256	R	46 ^b	S
94/99	+	+	0.5	S	257	R	0.094	S
957/03	+	+	24	R	0.016	S	40 ^b	S
18/99	+	+	257	R	0.032	S	0.125	S
67/99	+	+	257	R	0.032	S	0.016	S
1152/04	+	+	0.094	S	<0.016	S	55 ^b	S
1776/05	+	+	0.19	S	0.016	S	42 ^b	S
32/00	+	+	0.5	S	0.5	S	0.125	S
1025/03	+	-	0.19	S	< 0.016	S	50 ^b	S
553A/02	-	-	0.047	S	0.023	S	51 ^b	S
184/99	-	-	0.19	S	0.016	S	0.064	S
8/00	-	-	0.19	S	0.016	S	0.023	S
5/00	-	-	0.064	S	0.015	S	0.032	S
690/99	-	-	0.38	S	0.032	S	0.032	S
565/99	-	-	0.094	S	257	R	0.094	S

MIC - Minimum inhibitory concentration (µg/mL), - , negative; +, positive; S- sensitive; R- resistant.

^a *H. pylori* strains are indicated by their collection number.

^b The inhibition diameter is measured in mm; disk diffusion method.

^c The *vacA* status was determined according to the presence of the s1 allele (*vacA* positive) or s2 allele (*vacA* negative).

In addition to these *in vitro* results, there have been several cross-sectional population studies on wine consumption and *H. pylori* infection eradication (Brenner, Rothenbacher, Bode, & Adler, 1999; Murray et al., 2002). Notwithstanding its cross-sectional design, these studies seem to support the hypothesis that wine consumption may reduce the odds of active infection with *H. pylori*. A recent study demonstrated that wine affects the viability of *Campylobacter jejuni*, and red and rosé wines are more effective than white wine. Considering that differences in pH or in alcohol content cannot account for the differences between the microorganisms counts after treatment with white, rosé and red wines, the former may be attributed to some compounds like resveratrol (Ganan, Martinez-Rodriguez, & Carrascosa, 2009). It is known that the average concentration of resveratrol in white wines is lower than in red wines (Goldberg et al., 1995).

Some reports have described the indirect effect of a moderate wine intake has on the colonization of the human intestine by intestinal pathogens (Brenner, Rothenbacher, Bode, & Adler, 1999; Murray et al., 2002). For similar reasons, it has been proposed that this intake limits the infective capacity of intestinal pathogens, including *H. pylori*.

3.2. Urease Inhibition

H. pylori is a unique bacteria that can survive in the acidic environment of animal stomach since it has the ability to neutralize gastric acids with ammonia produced by urease. In this study, the inhibitory urease activity of resveratrol, AHA (as positive control) and two red wine samples with different amounts of resveratrol was tested. The studied concentrations of resveratrol and AHA ranged from 6.25 to 400 µg/mL (Figure 3). Our results demonstrate that the addition of resveratrol decreased urease activity in the three *H. pylori* strains tested, and this inhibitory effect was proportional to the concentration of resveratrol. For the three strains tested, a decrease of 90% in the urease activity was observed for a concentration of 400 µg/mL of resveratrol. In identical concentrations, AHA exhibited lower urease inhibitory activity, 72, 49 and 73%, for strains 26695, 1692/05 and 553A/02, respectively. According to these results, resveratrol exhibited higher *in vitro* urease inhibitory activity than AHA. Considering the slopes and shapes of the semilog curves of resveratrol it appears that resveratrol effect is more pronounced against the strain 26695, followed by 1692/05 strain and finally 553A/02 strain. These results suggest that different strains of *Helicobacter pylori* react differently to the presence of resveratrol.

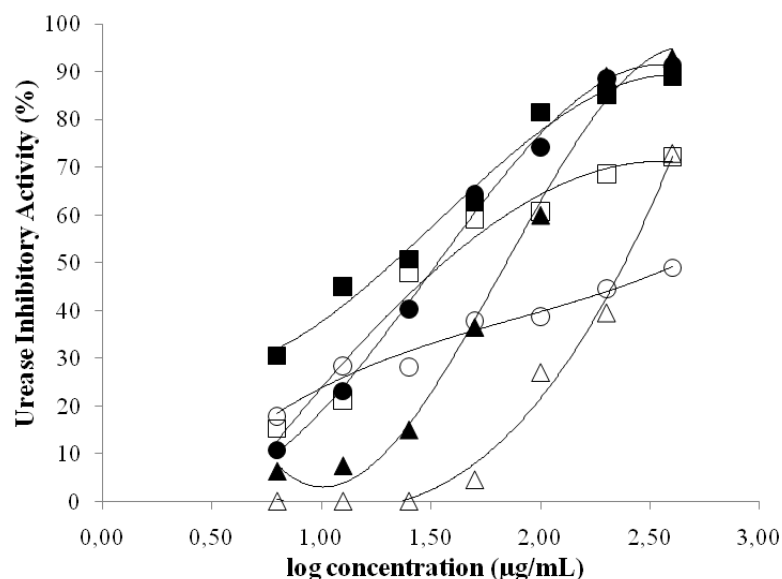


Figure 3. Inhibitory effect of various concentrations (6.25-400 µg/mL) of resveratrol and acetoxyhydroxamic acid on the urease activity. Resveratrol, filled symbols, and AHA, open symbols, in three *Helicobacter pylori* strains: 26695, squares, 1692/05 circles and 553A/02 triangles. Data corresponds to the average of three experiments.

Although the antimicrobial activity of wines has been described by several authors (Daroch et al., 2001; Ganan, Martinez-Rodriguez, & Carrascosa, 2009; Marimon, Bujanda, Gutierrez-Stampa, Cosme, & Arenas, 1998; Mahady & Pendland, 2000; Moretro & Daeschel, 2004; Papadopoulou, Soulti, & Roussis, 2005; Romero, Medina, Vargas, Brenes, & De Castro, 2007; Waite & Daeschel, 2007), the inhibition of urease activity on *H. pylori* strains was not reported until now. Therefore in the present work, the inhibition of urease activity by two red wines in three *H. pylori* strains was evaluated. These wines had the same alcoholic content (13.5%) and pH (3.4), grape variety (100% Touriga Nacional) and geographic region (Beira Interior) with controlled designation of origin, but with different vintages (wine 1 2007, wine 2 2004) and different resveratrol concentrations. The wines were obtained from a study conducted by our group in which an analytical method was completely developed and validated for the determination of resveratrol concentrations in different kinds of Portuguese red wines (data not shown). Thus the wine 1 (10.46 µg/mL) has a concentration of resveratrol ten times that of wine 2 (1.26 µg/mL). The results presented in Figure 4 demonstrate that red wine with the highest resveratrol concentration (wine 1) exhibited a more pronounced inhibitory effect of urease activity in the three *H. pylori* tested

strains than wine 2. Moreover, it was observed that wine 1 showed the highest inhibition against strain 553A/02, negative for virulence factors and susceptible to antibiotics, followed by the reference strain, 26695, and finally the more virulent and resistant strain (1692/05). These results suggest that resveratrol and red wine have an inhibitory effect on activity of *H. pylori* urease, though variable according to the virulence and antibiotic susceptibility of the strains. When compared to the pure compound, resveratrol from wine required lower concentrations to produce the same results. Therefore, it is probable that red wine contains other compounds (procyanidins, anthocyanins, organic acids, ethanol...) that act synergistically with resveratrol. On the other hand, the combined wine polyphenols, at higher concentrations might be acting by diverse mechanisms.

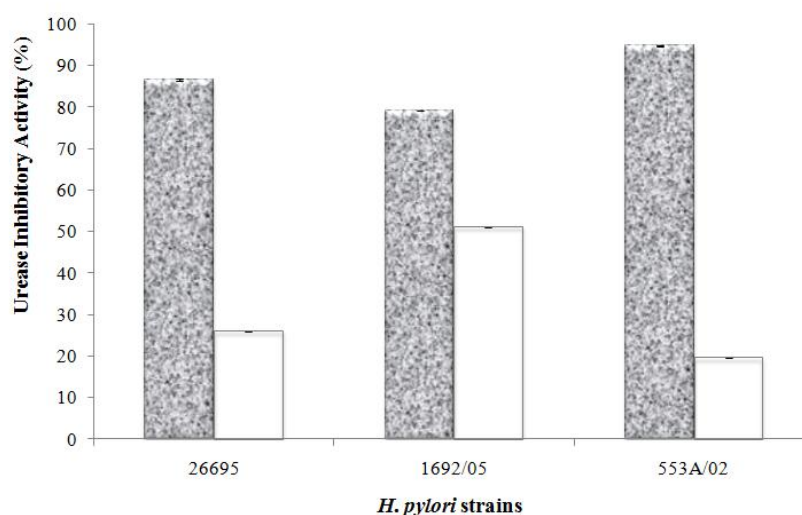


Figure 4. Inhibitory effect of two red wine samples containing different concentrations of resveratrol in the activity of urease extracted from three *Helicobacter pylori* strains . Wine 1 (10.46 µg/mL) filled bars and Wine 2 (1.26 µg/mL) open bars. Data corresponds to the average of three experiments; the error bars indicate the standard deviations and the coefficients of variation were $\leq 5\%$.

Further kinetic analysis revealed that *Helicobacter pylori* urease follows a Michaelis-Menten kinetics in the presence of resveratrol. Lineweaver-Burk plot (Figure 5) indicated that resveratrol is a non-competitive and reversible inhibitor of *Helicobacter pylori* urease. The samples were preincubated at different times (1, 5, 10, 20, 30, 45 and 70 min) and inhibition remained (data not shown). Therefore, the urease-inhibitory

effect was independent of the incubation time. There are very few studies describing the anti-urease activity of low molecular weight phenolic compounds. Xiao and co-workers (Xiao et al., 2007) synthesized and evaluated twenty polyphenols for their effects on *Helicobacter pylori* urease. Two of these compounds inhibited *Helicobacter pylori* urease in a time-dependent mode. In contrast, more recently Pastene and collaborators (Pastene, Troncoso, Figueroa, Alarcon, & Speisky, 2009) demonstrated that the urease inhibitory effect of apple peel polyphenols was concentration-dependent and reversible. The results obtained in this work suggested that resveratrol is an inhibitor of *Helicobacter pylori* urease not time-dependent.

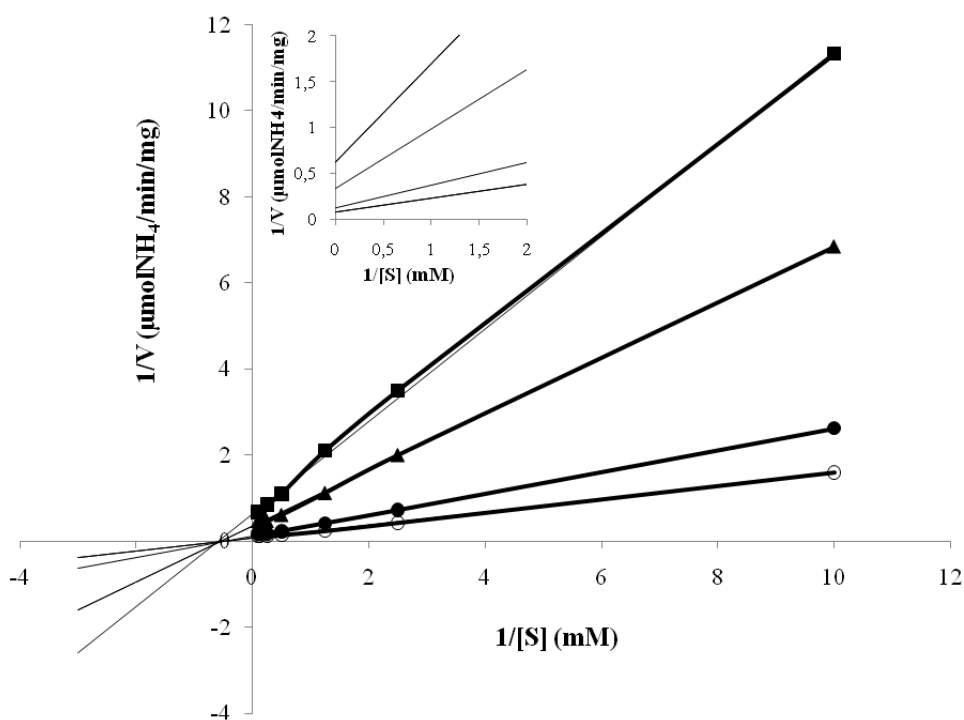


Figure 5. Lineweaver-Burk plot of the reciprocal of urease activity vs. reciprocal of substrate concentration in absence (open circle) and presence (filled symbols) of 400 µg/mL (squares), 150 µg/mL (triangles) and 30 µg/mL (circles) of resveratrol. Data corresponds to the average of three experiments.

4. Conclusions

Overall, the results obtained in this work demonstrate the antibacterial activity of resveratrol against different *H. pylori* strains. The antimicrobial activity shown by this compound on various strains of *H. pylori* provides useful information for a potential use of resveratrol. To our knowledge, this work is the first to describe the inhibition of urease activity in *H. pylori* bacteria by resveratrol and red wines. Based on these results, one can speculate that the antibacterial activity of resveratrol on *H. pylori* is through inhibition of urease, by limiting the survival of the bacteria on the stomach. To further support these results, it would be interesting to perform the urease inhibition assay on acidic conditions. The kinetic data suggests that resveratrol is an urease inhibitor that acts in a non-competitive way.

In conclusion, this report is encouraging to find new therapy schemes that include natural products as alternative approaches to treat *H. pylori* infection or new alimentary regimen consisting on the intake of foods, like wines, rich on compounds with chemoprotective and chemopreventive effects.

Acknowledgments

This work was supported by FCT, the Portuguese Foundation for Science and Technology (SFRH/BD/28168/2006). We express our gratitude to Comissão Vitivinícola Regional da Beira Interior for providing wine samples.

References

- Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A. L., & Haroutounian, S. A. (2010). Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. *Food Research International*, 43 (3), 805-813.
- Atherton, J. C., Cao, P., Peek, R. M., Jr., Tummuru, M. K., Blaser, M. J., & Cover, T. L. (1995). Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (30), 17771-17777.
- Bertelli, A. A. A., & Das, D. K. (2009). Grapes, Wines, Resveratrol, and Heart Health. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54 (6), 468-476.
- Blaser, M. J., Perez-Perez, G. I., Kleanthous, H., Cover, T. L., Peek, R. M., Chyou, P. H., Stemmermann, G. N., & Nomura, A. (1995). Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Research*, 55 (10), 2111-2115.
- Boban, N., Tonkic, M., Budimir, D., Modun, D., Sutlovic, D., Punda-Polic, V., & Boban, M. (2010). Antimicrobial Effects of Wine: Separating the Role of Polyphenols, pH, Ethanol, and Other Wine Components. *Journal of Food Science*, 75 (5), M322-M326.
- Boocock, D. J., Faust, G. E., Patel, K. R., Schinas, A. M., Brown, V. A., Ducharme, M. P., Booth, T. D., Crowell, J. A., Perloff, M., Gescher, A. J., Steward, W. P., & Brenner, D. E. (2007). Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 16 (6), 1246-1252.
- Brenner, H., Berg, G., Lappus, N., Kliebsch, U., Bode, G., & Boeing, H. (1999). Alcohol consumption and *Helicobacter pylori* infection: Results from the German National Health and Nutrition Survey. *Epidemiology*, 10 (3), 214-218.
- Brenner, H., Rothenbacher, D., Bode, G., & Adler, G. (1999). Inverse graded relation between alcohol consumption and active infection with *Helicobacter pylori*. *American Journal of Epidemiology*, 149 (6), 571-576.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J. E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R., & Covacci, A. (1996). cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (25), 14648-14653.

Chan, M. M. Y. (2002). Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochemical Pharmacology*, 63 (2), 99-104.

Chatterjee, A., Bagchi, D., Yasmin, T., & Stohs, S. J. (2005). Antimicrobial effects of antioxidants with and without clarithromycin on *Helicobacter pylori*. *Molecular Cellular Biochemistry*, 270 (1-2), 125-130.

Chatterjee, A., Yasmin, T., Bagchi, D., & Stohs, S. J. (2003). The bactericidal effects of *Lactobacillus acidophilus*, garcinol and Protargin compared to clarithromycin, on *Helicobacter pylori*. *Molecular Cellular Biochemistry*, 243 (1-2), 29-35.

CLSI/NCCLS. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. In *Approved Guideline M45-A*, Wayne, PA, 2006.

CLSI/NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Nineteenth Informational Supplement M100-S19*, Wayne, PA, 2009.

Daroch, F., Hoeneisen, M., Gonzalez, C. L., Kawaguchi, F., Salgado, F., Solar, H., & Garcia, A. (2001). *In vitro* antibacterial activity of Chilean red wines against *Helicobacter pylori*. *Microbios*, 104 (408), 79-85.

Dochertyl, J. J., McEwen, H. A., Sweet, T. J., Bailey, E., & Booth, T. D. (2007). Resveratrol inhibition of *Propionibacterium acnes*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59 (6), 1182-1184.

Ganan, M., Martinez-Rodriguez, A. J., & Carrascosa, A. V. (2009). Antimicrobial activity of phenolic compounds of wine against *Campylobacter jejuni*. *Food Control*, 20 (8), 739-742.

Goldberg, D. M., Yan, J., Ng, E., Diamandis, E. P., Karumanchiri, A., Soleas, G., & Waterhouse, A. L. (1995). A Global Survey of *trans*-Resveratrol Concentrations in Commercial Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46 (2), 159-165.

Graham, D. Y. (1994). Benefits from Elimination of *Helicobacter pylori* Infection Include Major Reduction in the Incidence of Peptic-Ulcer Disease, Gastric-Cancer, and Primary Gastric Lymphoma. *Preventive Medicine*, 23 (5), 712-716.

Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., & Pezzuto, J. M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275 (5297), 218-220.

- Langcake, P., & Pryce, R. J. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*, 9, 77-86.
- Lee, S. Y., Shin, Y. W., & Hahm, K. B. (2008). Phytochemicals: Mighty but ignored weapons against *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Digestive Diseases*, 9 (3), 129-139.
- Mahady, G. B., & Pendland, S. L. (2000). Resveratrol inhibits the growth of *Helicobacter pylori* *in vitro*. *American Journal of Gastroenterology*, 95 (7), 1849.
- Mahady, G. B., Pendland, S. L., & Chadwick, L. R. (2003). Resveratrol and red wine extracts inhibit the growth of *cagA* plus strains of *Helicobacter pylori* *in vitro*. *American Journal of Gastroenterology*, 98 (6), 1440-1441.
- Marimon, J. M., Bujanda, L., Gutierrez-Stampa, M. A., Cosme, A., & Arenas, J. I. (1998). *In vitro* bactericidal effect of wine against *Helicobacter pylori*. *American Journal of Gastroenterology*, 93 (8), 1392.
- Marshall, B. J. (1993). Treatment Strategies for *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology Clinics of North America*, 22 (1), 183-198.
- Martini, S., D'Addario, C., Braconi, D., Bernardini, G., Salvini, L., Bonechi, C., Figura, N., Santucci, A., & Rossi, C. (2009). Antibacterial Activity of Grape Extracts on *cagA*-Positive and -Negative *Helicobacter pylori* Clinical Isolates. *Journal of Chemotherapy*, 21 (5), 507-513.
- McClain, M. S., Cao, P., Iwamoto, H., Vinion-Dubiel, A. D., Szabo, G., Shao, Z., & Cover, T. L. (2001). A 12-amino-acid segment, present in type s2 but not type s1 *Helicobacter pylori* VacA proteins, abolishes cytotoxin activity and alters membrane channel formation. *Journal of Bacteriology*, 183 (22), 6499-6508.
- Mobley, H. L. T., Cortesia, M. J., Rosenthal, L. E., & Jones, B. D. (1988). Characterization of Urease from *Campylobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*, 26 (5), 831-836.
- Montecucco, C., & Rappuoli, R. (2001). Living dangerously: How *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2 (6), 457-466.
- Moretro, T., & Daeschel, M. A. (2004). Wine is bactericidal to foodborne pathogens. *Journal of Food Science*, 69 (9), M251-M257.
- Murano, A., Morinaga, N., Iwamaru, Y., Yahiro, K., Tagashira, M., Moss, J., Tanzawa, H., & Noda, M. (2005). Acidic conditions enhance bactericidal effects of sodium bisulfite on *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 10 (2), 132-135.

Murray, L. J., Lane, A. J., Harvey, I. M., Donovan, J. L., Nair, P., & Harvey, R. F. (2002). Inverse relationship between alcohol consumption and active *Helicobacter pylori* infection: the Bristol Helicobacter project. *American Journal of Gastroenterology*, 97 (11), 2750-2755.

Nagata, K., Satoh, H., Iwahi, T., Shimoyama, T., & Tamura, T. (1993). Potent inhibitory action of the gastric proton pump inhibitor lansoprazole against urease activity of *Helicobacter pylori*: unique action selective for *H. pylori* cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37 (4), 769-774.

O'Connor, A., Gisbert, J., & O'Morain, C. (2009). Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 14, 46-51.

Papadopoulou, C., Soulti, K., & Roussis, I. G. (2005). Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technology and Biotechnology*, 43 (1), 41-46.

Pastene, E., Troncoso, M., Figueroa, G., Alarcon, J., & Speisky, H. (2009). Association between Polymerization Degree of Apple Peel Polyphenols and Inhibition of *Helicobacter pylori* Urease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (2), 416-424.

Paulo, L., Ferreira, S., Gallardo, E., Queiroz, J. A., & Domingues, F. (2010). Antimicrobial activity and effects of resveratrol on human pathogenic bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 26 (8), 1533-1538.

Ralhan, R., Pandey, M. K., & Aggarwal, B. B. (2009). Nuclear factor-kappa B links carcinogenic and chemopreventive agents. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 1, 45-60.

Rhead, J. L., Letley, D. P., Mohammadi, M., Hussein, N., Mohagheghi, M. A., Eshagh Hosseini, M., & Atherton, J. C. (2007). A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*, 133 (3), 926-936.

Romero, C., Medina, E., Vargas, J., Brenes, M., & De Castro, A. (2007). *In vitro* activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (3), 680-686.

Ruggiero, P., Rossi, G., Tombola, F., Pancotto, L., Lauretti, L., Del Giudice, G., & Zoratti, M. (2007). Red wine and green tea reduce *Helicobacter pylori*- or *vacA*-induced gastritis in a mouse model. *World Journal of Gastroenterology*, 13 (3), 349-354.

Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2008). Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents. *Food Chemistry*, 109 (3), 530-537.

Tombola, F., Campello, S., De Luca, L., Ruggiero, P., Del Giudice, G., Papini, E., & Zoratti, M. (2003). Plant polyphenols inhibit *vacA*, a toxin secreted by the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *FEBS Letters*, 543 (1-3), 184-189.

Vale, F. F., & Vitor, J. M. B. (2010). Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: Does food play a role in rural and urban areas? *International Journal of Food Microbiology*, 138 (1-2), 1-12.

Waite, J. G., & Daeschel, M. A. (2007). Contribution of wine components to inactivation of food-borne pathogens. *Journal of Food Science*, 72 (7), M286-M291.

Wang, W. B., Lai, H. C., Hsueh, P. R., Chiou, R. Y. Y., Lin, S. B., & Liaw, S. J. (2006). Inhibition of swarming and virulence factor expression in *Proteus mirabilis* by resveratrol. *Journal of Medical Microbiology*, 55 (10), 1313-1321.

Weisse, M. E., Eberly, B., & Person, D. A. (1995). Wine as a digestive aid: comparative antimicrobial effects of bismuth salicylate and red and white wine. *British Medical Journal*, 311 (7021), 1657-1660.

Williams, L. D., Burdock, G. A., Edwards, J. A., Beck, M., & Bausch, J. (2009). Safety studies conducted on high-purity *trans*-resveratrol in experimental animals. *Food and Chemical Toxicology*, 47 (9), 2170-2182.

Witte, C. P., & Medina-Escobar, N. (2001). In-gel detection of urease with nitroblue tetrazolium and quantification of the enzyme from different crop plants using the indophenol reaction. *Analytical Biochemistry*, 290 (1), 102-107.

Xiao, Z. P., Shi, D. H., Li, H. Q., Zhang, L. N., Xu, C., & Zhu, H. L. (2007). Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of *Helicobacter pylori* urease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15 (11), 3703-3710.

Zaidi, S. F., Ahmed, K., Yamamoto, T., Kondo, T., Usmanhany, K., Kadowaki, M., & Sugiyama, T. (2009). Effect of resveratrol on *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 secretion, reactive oxygen species generation and morphological changes in human gastric epithelial cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32 (11), 1931-1935.

CAPÍTULO III – DISCUSSÃO GERAL

Portugal tem uma longa tradição enquanto produtor de vinho, e existem várias regiões que produzem vinhos de qualidade com Denominação de Origem Controlada (DOC) reconhecidas pela União Europeia. O resveratrol tem vindo a ser identificado como o principal composto biologicamente activo presente no vinho (JEANDET, P. [et al.], 1991); (JEANDET, P. [et al.], 1995); (GOLDBERG, D.M. [et al.], 1995c). As concentrações de resveratrol em diferentes castas e os respectivos vinhos são extremamente variáveis, dependendo de vários factores, tais como, origem geográfica, processos de vinificação, clima e presença de fungos (STERVBO, U. [et al.], 2007).

No artigo I descreve-se uma nova metodologia para a determinação do *trans*- e *cis*-resveratrol em diferentes tipos de vinhos portugueses (186 amostras), utilizando a extracção em fase sólida (SPE) e a cromatografia líquida acoplada a um detector de díodos (HPLC-DAD). De acordo com a literatura consultada, este trabalho é o primeiro a efectuar uma análise detalhada dos níveis de resveratrol num número tão elevado de amostras de vinho. Pelo que, de seguida, será efectuada uma discussão detalhada dos resultados apresentados neste primeiro artigo.

Embora o isómero *trans*-resveratrol se encontre comercialmente disponível, o mesmo não acontece com o isómero *cis*-resveratrol. Assim, foi necessário estabelecer as condições ideais de transformação da forma *trans*- na *cis*-resveratrol.

Diversos métodos de transformação do isómero *trans*-resveratrol em *cis*-resveratrol têm vindo a ser descritos na literatura, sendo os mais comumente utilizados: a exposição à luz do dia (VIAN, M.A. [et al.], 2005) e à luz ultravioleta (UV) aos comprimentos de onda 360 nm e 254 nm (LOPEZ-HERNANDEZ, J. [et al.], 2007).

No presente trabalho, com o intuito de maximizar o rendimento de transformação, foram optimizados diferentes parâmetros que podem influenciar este processo, tais como: radiação UV a dois comprimentos de onda (254 nm e 365 nm), tempo de exposição (10, 20 e 30 minutos), concentração inicial do *trans*-resveratrol (4 µg/mL e 1 mg/mL), diferentes solventes nos quais o resveratrol possui elevada solubilidade (metanol e etanol 12%) e várias distâncias entre a luz e a solução (10, 20 e 60 cm). Esta optimização foi realizada utilizando-se uma abordagem univariada, ou seja, cada factor foi avaliado enquanto todos os outros factores foram mantidos constantes (n=3).

Os melhores resultados para a conversão do *trans*-resveratrol foram obtidos com uma solução padrão de 4 µg/mL em metanol exposta a 20 cm da luz UV (365 nm) durante

30 minutos. A eficiência do processo foi calculada pela diferença entre as áreas dos picos do *trans*-resveratrol antes e após exposição à radiação UV ($n = 6$), obtendo-se o valor de $92,39 \pm 0,27\%$. Desta forma, podemos assumir que a quantidade de *cis*-resveratrol foi 92% da concentração inicial do isómero *trans*. É fundamental ter em conta que, normalmente, as condições de isomerização não são descritas de forma detalhada na literatura, sendo as recuperações obtidas muito variáveis. Trela e colaboradores (TRELA, B.C. e WATERHOUSE, A.L., 1996) obtiveram uma taxa de conversão de 67% (exposição a 254 nm durante 10 h), enquanto Vian (VIAN, M.A. [et al.], 2005) e Romero-Perez (ROMERO-PEREZ, A.I. [et al.], 1996) descreveram taxas de 80-90%, expondo soluções de *trans*-resveratrol à luz solar durante uma hora e durante 10 minutos, respectivamente. No entanto, estes dois últimos métodos são pouco vantajosos, uma vez que a luz solar não é constante ao longo do dia ou em dias consecutivos, o que implica que as condições são extremamente difíceis de reproduzir.

Como os vinhos são matrizes altamente complexas e variáveis, é muitas vezes necessária a aplicação de um passo de extracção para a obtenção e purificação dos analitos em estudo. No entanto, antes da aplicação da técnica de extracção às amostras de vinho, foram efectuados vários testes com um vinho ao qual denominamos por “branco” (amostra que não contém nenhum dos analitos em estudo). Por um lado não seria exequível utilizar uma amostra real, já que o resveratrol está sempre presente e, por outro, o método de adição de padrão não seria prático devido ao elevado número de amostras analisadas o que implicaria a validação do método para cada vinho analisado.

Desta forma, para a obtenção desta amostra branca foram testados dois tipos de vinho “branco”: (1) solução aquosa de pH 3,4 com ácido clorídrico 1 M e (2) solução aquosa de etanol (88:12, v/v) e ácido tartárico (5 g/L) com pH 3,6 com hidróxido de sódio 2 M (MERCOLINI, L. [et al.], 2008), sendo cada uma das análises efectuada em triplicado. Os resultados obtidos para as áreas do pico do *trans*-resveratrol, utilizando cada uma destas soluções, não variaram significativamente. Desta forma, foi escolhido o vinho “branco” constituído por uma solução aquosa de pH 3,4 com ácido clorídrico 1 M sendo esta uma solução fácil e rápida de preparar.

Numa primeira abordagem, para efectuar a extracção do composto recorreu-se à extracção líquido-líquido (LLE) conforme descrito por diversos autores (RODRIGUEZ-DELGADO, M.A. [et al.], 2001); (DIAZ, T.G. [et al.], 2007); (NAVE, F. [et al.], 2007);

(BRAVO, M.N. [et al.], 2008). Foram testados vários solventes de extracção, tais como, éter dietílico, acetato de etilo, e misturas com diferentes proporções de acetato de etilo e *n*-hexano (50:50; 90:10 e 10:90, v/v), diclorometano e acetato de etilo (50:50; 90:10 e 10:90, v/v) e metanol ácido e acetato de etilo (50:50, v/v). De acordo com os resultados obtidos, o éter dietílico revelou ser o melhor solvente de extracção, contudo, mesmo quando foi utilizado o vinho “branco” surgiu um novo pico no cromatograma. A fim de conseguir identificar-se o referido pico, os extractos foram derivatizados e analisados por GC-MS. Por análise do espectro de massa, os dados obtidos sugeriram que o composto desconhecido seria o produto da reacção do *trans*-resveratrol com o éter dietílico, originando a dimerização da molécula de resveratrol.

Como alternativa à LLE, foi então utilizada a extracção em fase sólida (SPE). Esta técnica possui vantagens quando comparada com a LLE, de forma a que alguns dos problemas associados podem ser evitados e/ou minimizados, nomeadamente a separação de fases, a formação de emulsões e o elevado consumo de solventes orgânicos. Como tal, foram testadas diferentes tipos de colunas: Oasis[®] HLB (60 mg), BondElut Certify C₈ (300 mg) e Oasis[®] MCX (60 mg), assim como diversos procedimentos de extracção. Dois dos quais, para colunas HLB e BondElut: um primeiro procedimento padrão (Protocolo 1), normalmente utilizado em colunas de fase reversa, e um segundo procedimento promovendo o intercâmbio catiónico (Protocolo 2). Um terceiro procedimento foi utilizado, com o mecanismo misto de retenção, para as colunas MCX. É de referir que, a preparação da amostra foi a mesma para os três procedimentos, sendo constituída por 2 mL de vinho diluído com 2 mL de água e 1 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 6), e com adição de 100 µL de padrão interno (carbamazepina) e que todas as experiências foram realizadas em triplicado.

O processo de extracção para ambas as colunas de fase reversa, foi optimizado quanto às etapas de acondicionamento, lavagem e eluição.

De ressaltar que, durante o manuseamento da amostra, todos os procedimentos de extracção foram realizados em condições de luz reduzida de forma a evitar a isomerização do *trans*-resveratrol para o *cis*-resveratrol.

O melhor rendimento de extracção foi obtido com as colunas BondElut[®] C₈ (Protocolo 2), pelo que foram seleccionadas para prosseguir os ensaios. Assim, o procedimento final optimizado consistiu no seguinte: a coluna foi acondicionada com 1 mL de metanol e 1 mL de dihidrogenofosfato de potássio 0,1 M (pH 6), seguindo-se a adição

da amostra, cuja preparação foi previamente descrita, e posterior lavagem com 3 mL de água, 1 mL de ácido acético 0,1 M e 2 mL de *n*-hexano permanecendo sob vácuo durante 10 minutos. Os analitos foram eluidos com 3 mL de uma mistura de diclorometano:isopropanol:amónia (78:20:2, v/v/v). Seguidamente evaporou-se o extracto a 30°C, sob um fluxo de azoto, sendo ressuspendido em 100 µL da fase móvel.

A metodologia foi validada segundo normas internacionalmente aceites da *Food and Drug Administration* (FDA) (FDA, 2001) e da *International Conference on Harmonization* (ICH) (ICH, 2005), em termos de especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exactidão, estabilidade e eficiência de extracção.

A especificidade do método foi avaliada por análise cromatográfica de outros compostos que pudessem estar presentes numa amostra de vinho autêntica. Não sendo possível testar todos os interferentes presentes numa amostra de vinho, uma vez que este constitui uma matriz muito complexa, analisaram-se apenas os mais frequentes. Assim, foram analisados outros polifenóis (catequina, epicatequina, rutina e ácido gálico), vitaminas (retinol e tiamina) e ácido ascórbico. Após comparação dos tempos de retenção e dos respectivos espectros de absorção (comprimento de onda máximo), para cada um dos compostos, não foram observados picos interferentes aos tempos de retenção e comprimentos de onda do *trans*- e *cis*-resveratrol. Além disso, em todas as amostras de vinho analisadas, os espectros de absorção dos analitos testados foram comparados simultaneamente com uma amostra controlo. Esta foi superior a 90% para ambos os compostos em todas as amostras de vinho testadas, pelo que se pode afirmar que o método é específico.

No que diz respeito às curvas de calibração, estas foram realizadas separadamente para ambos os isómeros, a fim de evitar a interferência da pequena percentagem de *trans*-resveratrol presente na solução de *cis*-resveratrol. Pelo que foram utilizadas amostras de vinho “branco” fortificadas com concentrações crescentes de cada um dos analitos em estudo, extraídas e analisadas de acordo com a metodologia previamente descrita. Para o *trans*-resveratrol, foi avaliado um intervalo de concentração de 0,025 a 15,00 µg/mL com doze calibradores e quatro controlos. No entanto, após terem sido testadas diferentes ponderações foi necessário dividir o intervalo de calibração em dois intervalos de concentração: 0,025 a 1,00 µg/mL e de 1,00 a 15,00 µg/mL, de forma a que os valores de *bias* para todos os calibradores, no intervalo de concentrações em estudo, se situassem no intervalo de ± 20%, como

descrito nas normas de validação (FDA, 2001); (ICH, 2005). Para o *cis*-resveratrol, o intervalo de linearidade foi de 0,023 a 0,92 µg/ml, com seis calibradores e dois controlos (n=6). De referir que o método descrito mostrou-se linear dentro da gama de trabalho adoptada para cada um dos analitos em estudo, obtendo-se coeficientes de correlação linear superiores a 0,99. Neste caso, os parâmetros de precisão e exactidão para os diferentes níveis de concentração foram considerados adequados, já que se situavam dentro dos limites aconselhados pelas normas de validação anteriormente citadas (FDA, 2001); (ICH, 2005).

Os limites de quantificação (LOQ) e de detecção (LOD) foram de 0,025 µg/mL para o *trans*-resveratrol e de 0,023 µg/mL para o *cis*-resveratrol. Estes valores são inferiores aos descritos por outros autores, onde são utilizados inclusive maiores volumes de amostra, 30 mL (LIMA, M.T.R. [et al.], 1999), 10 mL e 5 mL (NAVE, F. [et al.], 2007), 10 mL (BRAVO, M.N. [et al.], 2008) e 5 mL (BAPTISTA, J.A.B. [et al.], 2001); (PAIXAO, N. [et al.], 2008); (BELISARIO-SANCHEZ, Y.Y. [et al.], 2009). Nestes trabalhos, os limites foram calculados matematicamente, enquanto no presente estudo os limites foram determinados analisando amostras com concentrações decrescentes dos analitos em estudo, obtendo-se em todos os casos coeficientes de variação inferiores a 20% e *bias* num intervalo de ± 20% da concentração nominal.

Os parâmetros, precisão e exactidão foram avaliados a três níveis de concentração (0,30, 4,50 e 12,50 µg/mL) para o *trans*-resveratrol e a dois níveis de concentração (0,28 e 0,74 µg/mL) para o *cis*-resveratrol. Para cada concentração foram realizadas seis réplicas no mesmo dia (precisão intradia) e em dias diferentes durante sete dias (precisão interdia). Os coeficientes de variação não excederam os 15% para todas as concentrações em estudo. Estes resultados estão de acordo com os critérios internacionalmente aceites na validação de métodos bioanalíticos (FDA, 2001); (ICH, 2005). Quanto aos valores obtidos para a exactidão (em termos de *bias*) encontram-se entre o intervalo de ± 15% da concentração nominal, sendo considerados aceitáveis.

Com o objectivo de estudar a estabilidade das amostras, estas foram processadas a três concentrações diferentes, 0,025, 1,00 e 15,00 µg/mL para o *trans*-resveratrol e 0,023, 0,092 e 0,92 µg/mL para o *cis*-resveratrol. Cada uma das amostras (n=3), foi extraída utilizando o procedimento de extracção anteriormente descrito. Após extracção, as amostras foram evaporadas, ressuspendidas em 100 µL de fase móvel e armazenadas a 4°C durante 18 h. Transcorrido este período, as amostras foram

injectadas e as áreas comparadas com extracções preparadas no próprio dia às mesmas concentrações. Os resultados obtidos estão de acordo com as normas internacionalmente aceites (FDA, 2001); (ICH, 2005), sendo que os coeficientes de variação não excederam os 15% para todas as concentrações em estudo e os valores obtidos encontram-se entre o intervalo de $\pm 15\%$ da concentração nominal, pelo que são considerados aceitáveis. A estabilidade foi ainda avaliada de igual forma em amostras de vinho autênticas, sendo os resultados consistentes com os anteriores.

A fim de calcular a eficiência de extracção do método, fortificaram-se amostras de vinho “branco” a três níveis de concentrações diferentes (n=6) 0,025, 1,00 e 15,00 $\mu\text{g/mL}$ para o *trans*-resveratrol e 0,023, 0,092 e 0,920 $\mu\text{g/mL}$ para o *cis*-resveratrol, após a SPE, o padrão interno foi adicionado. Estes resultados foram comparados com extractos de vinho “branco” fortificados após extracção com os analitos em estudo e respectivo padrão interno (correspondendo a uma eficiência de 100%). Após injeção no sistema cromatográfico calculou-se a eficiência para ambos os analitos. Os valores de eficiência médios para o *trans*-resveratrol foram de 100,44% e de 100,39% para o *cis*-resveratrol. Quando comparados os resultados obtidos com outros métodos descritos na literatura, verificou-se que são superiores aos descritos por diversos autores (GAMOH, K. e NAKASHIMA, K., 1999); (BAPTISTA, J.A.B. [et al.], 2001); (GEROGIANNAKI-CHRISTOPOULOU, M. [et al.], 2006); (MERCOLINI, L. [et al.], 2008), LLE (RODRIGUEZ-DELGADO, M.A. [et al.], 2001); (DIAZ, T.G. [et al.], 2007); (NAVE, F. [et al.], 2007); (BRAVO, M.N. [et al.], 2008), mesmo quando é efectuada uma injeção directa (LA TORRE, G.L. [et al.], 2006); (DE QUIROS, A.R.B. [et al.], 2007); (FEIJOO, O. [et al.], 2008).

A aplicabilidade do método foi demonstrada, analisando em duplicado 186 amostras de vinho tinto de origem portuguesa. Estas amostras eram provenientes de diferentes regiões, castas e anos, obtendo-se um valor médio de resveratrol de 2,9 $\mu\text{g/mL}$. O valor médio obtido é superior aos referidos na literatura para vinhos tintos de Portugal continental (GOLDBERG, D.M. [et al.], 1995c); (GU, X. [et al.], 1999); (LIMA, M.T.R. [et al.], 1999); (BAPTISTA, J.A.B. [et al.], 2001); (RATOLA, N. [et al.], 2004); (NAVE, F. [et al.], 2007); (BRAVO, M.N. [et al.], 2008) onde a média dos níveis de *trans*-resveratrol foi de 1,3 $\mu\text{g/mL}$. De acordo com um artigo de revisão (STERVBO, U. [et al.], 2007), baseado em 511 amostras provenientes de 18 países diferentes, o valor médio da concentração de *trans*-resveratrol foi de 1,9 $\mu\text{g/mL}$.

Analisando estatisticamente os resultados obtidos, por aplicação do teste F e do teste T de *Student*, verificou-se que o menor valor médio de *trans*-resveratrol encontra-se em vinhos da região do Alentejo ($1,62 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$), enquanto a região da Beira Interior apresentou uma média de $3,50 \pm 1,9 \mu\text{g/mL}$. Comparando as diferentes regiões em estudo, observou-se que os valores de resveratrol do Alentejo relativamente à Beira Interior são significativamente diferentes. Contudo, há regiões cujos valores não são significativamente diferentes, como é o exemplo da Península de Setúbal relativamente a todas as regiões em estudo.

Quando comparados estes resultados com os de trabalhos publicados sobre outros vinhos, verificou-se que os níveis de *trans*-resveratrol, mais elevados, foram de $11,9 \mu\text{g/mL}$ num vinho suíço de 1997 obtido a partir da casta Pinot Noir (ADRIAN, M. [et al.], 2000) e $14,3 \mu\text{g/mL}$ num vinho húngaro de 2002, com a casta Merlot (MARK, L. [et al.], 2005). Recentemente, Paixão e colaboradores obtiveram um nível de resveratrol no vinho da madeira de $57,7 \mu\text{g/mL}$, do ano 2005 e com as castas Touriga Nacional, Carbenet Sauvignon, Merlot e Touriga Barroca (PAIXAO, N. [et al.], 2008). No presente trabalho, o maior valor quantificado de *trans*-resveratrol foi de $10,9 \mu\text{g/mL}$ num vinho da colheita de 2007, com Denominação de Origem Controlada Beira Interior, elaborado a partir da casta Touriga Nacional. Segundo a bibliografia e de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, os níveis de *cis*-resveratrol em vinhos tintos seguem a mesma tendência que o isómero *trans*-.

Na segunda parte do presente trabalho, implementaram-se técnicas que permitiram avaliar *in vitro* a actividade antimicrobiana do resveratrol contra diversos microrganismos, nomeadamente bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*). Este trabalho possibilitou, ainda, a optimização e o desenvolvimento de uma metodologia adequada no manuseamento de soluções de resveratrol, relacionado com os problemas de solubilidade do composto nos meios de cultura microbiana. Os dados existentes na literatura acerca deste assunto são muito discrepantes, no entanto Jeandet e colaboradores num artigo de revisão centram-se sobre esta problemática, salientando a importância da solubilidade do resveratrol (JEANDET, P. [et al.], 2002).

Para analisar a sensibilidade dos microrganismos ao resveratrol recorreu-se ao método de difusão em disco (DIZ- diâmetro da zona de inibição) e ao método da

microdiluição, para determinar a concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração mínima bactericida (MBC).

Os resultados de testes de susceptibilidade antimicrobiana, obtidos com o método de difusão em disco demonstraram que o resveratrol inibiu o crescimento sobretudo nas bactérias Gram-positivas. Assim, das treze estirpes testadas, o resveratrol inibiu o crescimento de onze (84,6%), sendo que das sete bactérias Gram-negativas em estudo inibiu cinco. Uma possível explicação para estes resultados poderá estar relacionada com a complexidade do ponto de vista químico e estrutural das bactérias Gram-negativas relativamente às bactérias Gram-positivas. Esta observação é consistente com estudos anteriores em que foram utilizadas estirpes semelhantes (CHAN, M.M.Y., 2002) ou diferentes (DOCHERTY, J.J. [et al.], 2001); (WANG, W.B. [et al.], 2006); (DOCHERTY, J.J. [et al.], 2007); (SHAN, B. [et al.], 2008).

Os resultados de susceptibilidade ao resveratrol, obtidos através do método da microdiluição, corroboraram os resultados anteriores, sendo o *Bacillus cereus* a estirpe sobre a qual existiu uma maior actividade antimicrobiana (MIC 50 µg/mL), seguido do *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* ambos com uma MIC de 100 µg/mL. Uma vez que a concentração máxima de resveratrol testada foi de 400 µg/mL (JEANDET, P. [et al.], 2002), não foi possível determinar a MIC para as bactérias Gram-negativas. Como alternativa determinaram-se as percentagens de inibição para avaliar a actividade do resveratrol contra estas bactérias. Assim, numa concentração de 400 µg/mL, as percentagens de inibição foram de 81, 80 e 58% para *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Klebsiella pneumoniae*, respectivamente.

A fim de investigar se o resveratrol actua como um agente bactericida ou bacteriostático sobre as bactérias Gram-positivas em estudo recorreu-se às curvas de morte. Estes microrganismos foram incubados a 37°C na presença de concentrações crescentes de resveratrol. Os resultados demonstraram que o resveratrol tem um efeito bacteriostático que afecta o crescimento da célula bacteriana em todas as estirpes testadas. Docherty e colaboradores demonstraram num estudo *in vitro* que o resveratrol inibiu o *Propionibacterium acnes*, apresentando actividade bactericida na concentração mais elevada (200 µg/mL) (DOCHERTY, J.J. [et al.], 2007). Além disso, Jung et al. (2005) analisaram a actividade antifúngica do resveratrol contra fungos patogénicos para o ser humano (JUNG, H.J. [et al.], 2005). Considerando os resultados obtidos neste trabalho juntamente com os obtidos por estes autores, pode-se sugerir que o resveratrol apresenta efeitos diferentes, dependendo dos microrganismos em estudo e respectivas estirpes.

As curvas de morte demonstraram ainda, que o resveratrol apresenta actividade bacteriostática contra *Bacillus cereus*, em qualquer fase do crescimento bacteriano. Assim, quando o composto foi adicionado no início do ensaio, o número de células viáveis permaneceu constante. No entanto, quando esta adição ocorreu na fase exponencial, ou no início da fase estacionária, uma diminuição no número de células foi observada. Estes resultados sugerem que o crescimento bacteriano foi inibido pelo resveratrol, podendo este composto eliminar uma fracção específica da população celular. Esta fracção, provavelmente, diz respeito às células que se encontram em crescimento activo, pois observou-se uma redução menos acentuada do número de células viáveis, quando o resveratrol foi adicionado no início da fase estacionária.

Com o objectivo de identificar alterações de morfologia em *Bacillus cereus* recorreu-se ao microscópio óptico composto (MOC) e à microscopia electrónica de varrimento (SEM). A uma concentração de resveratrol de 200 µg/mL, observaram-se alterações morfológicas nas células bacterianas que passaram da sua forma típica em bastonete para a forma de cocos. Este resultado está de acordo com Si e colaboradores que observaram um efeito idêntico com outros polifenóis, nomeadamente o galato de epicatequina e o galato de epigallocatequina (Si, W. [et al.], 2006).

Finalmente, utilizou-se a citometria de fluxo a fim de se tentar compreender o mecanismo de acção do resveratrol no *Bacillus cereus*. Com este objectivo utilizou-se o corante fluorescente DRAQ5 (SMITH, P.J. [et al.], 2000), e os resultados obtidos demonstraram que o resveratrol diminuiu a quantidade de DNA intracelular. Assim, estes dados juntamente com os de SEM sugeriram que o crescimento celular foi inibido, o que por sua vez terá levado à paragem da divisão celular. Resta apenas referir que os resultados obtidos indicaram que o resveratrol afecta a divisão celular do *Bacillus cereus*.

Avaliou-se ainda, a actividade anti-*Helicobacter pylori* do resveratrol e fez-se o estudo da inibição da actividade da urease, o qual originou um terceiro artigo.

Neste artigo, avaliou-se a actividade antibacteriana do resveratrol em dezassete estirpes de *H. pylori*. Para isso, utilizou-se o método de difusão em disco e o método de diluição em agar, a fim de determinar o diâmetro da zona de inibição (DIZ) e a concentração mínima inibitória (MIC), respectivamente.

Analisando os resultados obtidos, com o método de difusão em disco, pode-se observar que o resveratrol, a uma concentração de 400 µg/disco, inibiu o crescimento

de todas as estirpes em estudo. Os respectivos diâmetros dos halos de inibição estão entre 16 a 28 mm, o que indicou uma susceptibilidade variável do resveratrol nas diferentes estirpes. Assim, as diferenças observadas podem ser explicadas pelo facto das estirpes em estudo serem muito heterogêneas, ou seja, apresentam diferentes factores de virulência, bem como, diferentes susceptibilidades aos antibióticos testados. Tal facto está inteiramente de acordo com estudos anteriores que colocam grande ênfase neste assunto (MAHADY, G.B. [et al.], 2003); (MARTINI, S. [et al.], 2009).

No método de diluição em agar, testou-se um intervalo de concentração de resveratrol entre 6,25 e 400 µg/mL, tendo sido possível determinar a respectiva MIC para todas as estirpes em estudo. A MIC variou entre 25 e 100 µg/mL, sendo que a maioria das estirpes apresentou uma MIC de 50 µg/mL. De salientar, que as três estirpes (8/00, 5/00 e 1025/03) que foram inibidas com uma menor concentração de resveratrol (25 µg/mL), eram sensíveis a todos os antibióticos testados. Contudo, as estirpes 8/00 e 5/00 eram negativas para ambos os genes *cagA* e *vacA*, enquanto a 1025/03 era positiva para o gene *cagA* e negativa para o gene *vacA*. Por sua vez, o resveratrol apresentou uma menor actividade antibacteriana com as estirpes 67/99 e 18/99 (MIC 100 µg/mL), sendo positivas para ambos os factores de virulência e resistentes ao metronidazol. Estes resultados são concordantes com estudos anteriores que testaram a actividade antibacteriana do resveratrol contra diversas estirpes de *H. pylori* (MAHADY, G.B. e PENDLAND, S.L., 2000); (DAROCH, F. [et al.], 2001); (MAHADY, G.B. [et al.], 2003); (CHATTERJEE, A. [et al.], 2003); (CHATTERJEE, A. [et al.], 2005); (MURANO, A. [et al.], 2005); (LEE, S.Y. [et al.], 2008); (MARTINI, S. [et al.], 2009); (RALHAN, R. [et al.], 2009); (ZAIDI, S.F. [et al.], 2009).

Tem vindo a ser demonstrado que o resveratrol extraído do vinho tinto inibe o crescimento de estirpes de *H. pylori* *cagA* positivas (MAHADY, G.B. [et al.], 2003). Para além disso, o vinho tinto chileno e os extractos de dois vinhos seleccionados aleatoriamente foram analisados quanto à sua actividade antibacteriana em estirpes de *H. pylori* (DAROCH, F. [et al.], 2001). Todos os vinhos tintos analisados apresentaram actividade antibacteriana nas estirpes testadas, contudo as amostras são muito heterogêneas relativamente à sua susceptibilidade a cada vinho. Os resultados deste estudo indicam, ainda, que a actividade antibacteriana dos vinhos tintos chilenos em *H. pylori*, depende principalmente da presença de resveratrol na amostra de vinho tinto. De acordo com a literatura (TOMBOLA, F. [et al.], 2003);

(RUGGIERO, P. [et al.], 2007), o vinho tinto preveniu significativamente a gastrite e limitou a localização de bactérias e da citotoxina vacuolizante VacA, à superfície do epitélio gástrico nas infecções por *H. pylori*. Todos estes factos sugerem que os polifenóis ou derivados presentes no vinho poderão ser úteis na prevenção ou tratamento de colonizações por *H. pylori*.

Além destes estudos *in vitro*, têm vindo a ser desenvolvidos estudos epidemiológicos acerca do consumo de vinho e conseqüente erradicação da bactéria *H. pylori* (BRENNER, H. [et al.], 1999); (MURRAY, L.J. [et al.], 2002). Estes estudos suportam a hipótese de que o consumo de vinho pode reduzir a possibilidade de infecção activa por *H. pylori*. Um estudo recente demonstrou, ainda, que o vinho afecta a viabilidade de *Campylobacter jejuni* e verificou que vinhos tintos e vinhos rosés são mais eficazes comparativamente com o vinho branco (GANAN, M. [et al.], 2009). Tendo em conta que as diferenças no pH ou no teor alcoólico não explicam as discrepâncias entre as contagens dos microrganismos após tratamento com vinhos brancos, rosés e tintos, estas diferenças podem ser atribuídas a alguns compostos presentes no vinho, como o resveratrol. É fundamental ter em atenção que, a concentração média de resveratrol presente nos vinhos brancos é inferior à dos vinhos tintos (GOLDBERG, D.M. [et al.], 1995c). Vários artigos têm vindo a descrever o efeito indirecto do consumo moderado de vinho na colonização do intestino humano por microrganismos intestinais (BRENNER, H. [et al.], 1999); (MURRAY, L.J. [et al.], 2002).

Como foi referido ao longo do presente trabalho, *H. pylori* é uma bactéria única que sobrevive ao ambiente ácido do estômago, tendo a capacidade de neutralizar os ácidos gástricos através da acção da enzima urease. Neste trabalho, analisou-se a inibição do resveratrol, ácido hidroxâmico (controlo positivo) e duas amostras de vinho tinto com diferentes quantidades de resveratrol, na actividade da urease. No que diz respeito às concentrações de resveratrol e do ácido hidroxâmico variaram entre 6,25 e 400 µg/mL. Assim, de acordo com os resultados obtidos verificou-se que a adição de resveratrol reduziu a actividade da urease nas três estirpes de *H. pylori* testadas, sendo este efeito proporcional à concentração de resveratrol. Para as três estirpes em estudo (26695, 1692/05 e 553A/02), ocorreu uma redução de 90% na actividade da urease, quando expostas a uma concentração de 400 µg/mL de resveratrol, enquanto que, na mesma concentração o ácido hidroxâmico apresentou uma menor inibição na actividade da urease: 72, 49 e 73% para as estirpes 26695, 1692/05 e 553A/02, respectivamente. Assim, estes resultados, *in vitro*, demonstraram que o resveratrol apresentou maior inibição da actividade da urease, comparativamente com o ácido

hidroxâmico (controlo positivo). Estes resultados sugerem, ainda, que o resveratrol teve diferentes inibições dependendo das estirpes de *H. pylori* em estudo.

A actividade antimicrobiana do vinho tem vindo a ser estudada por diversos autores (MARIMON, J.M. [et al.], 1998); (MAHADY, G.B. e PENDLAND, S.L., 2000); (DAROCH, F. [et al.], 2001); (MORETRO, T. e DAESCHEL, M.A., 2004); (PAPADOPOULOU, C. [et al.], 2005); (WAITE, J.G. e DAESCHEL, M.A., 2007); (GANAN, M. [et al.], 2009), contudo a inibição da urease em estirpes de *H. pylori* ainda não tinha sido descrita.

Uma vez que, na primeira parte deste trabalho, foi completamente desenvolvido e validado um método analítico para a determinação das concentrações de resveratrol em amostras de vinho tinto, com o objectivo de se poder estabelecer uma ligação com a sua aplicação como antimicrobiano, avaliou-se a capacidade de dois vinhos tintos inibirem a actividade da urease de três estirpes de *H. pylori* (26695, 1692/05 e 553A/02). Os vinhos utilizados tinham em comum as seguintes características: grau alcoólico (13,5%), pH (3,4), casta (100% Touriga Nacional) e região geográfica (Beira Interior), diferindo apenas no ano de colheita (vinho 1 de 2007 e vinho 2 de 2004) e nas concentrações de resveratrol. De acordo com os resultados, o vinho 1 tem uma concentração de resveratrol dez vezes mais elevada que o vinho 2, ou seja, 10,46 µg/mL (vinho 1) e 1,26 µg/mL (vinho 2). Assim, a inibição do vinho 1 na actividade da urease nas três estirpes de *H. pylori* em estudo, foi superior à do vinho 2. Observou-se ainda que o vinho 1 apresentava uma maior inibição na estirpe 553/02 (negativa para ambos os factores de virulência- *cagA* e *vacA*- e susceptível a todos os antibióticos testados), seguida da estirpe de referência 26695 e, finalmente, da estirpe mais virulenta e resistente (1692/05). Estes resultados sugerem que o resveratrol e o vinho tinto têm um efeito inibitório na actividade da urease de *H. pylori*, sendo este efeito variável de acordo com a virulência e susceptibilidade aos antibióticos de cada uma das estirpes testadas. No entanto, é de realçar que para a mesma concentração de resveratrol, o vinho apresenta uma maior percentagem de inibição da urease, quando comparada com a do composto puro. Os resultados obtidos sugerem que o vinho tinto contém outros compostos (procianidinas, antocianinas, ácidos orgânicos, etanol...) que actuam sinergicamente com o resveratrol.

Para se complementar o estudo analisou-se cineticamente a actividade da urease de *H. pylori*. Assim, verificou-se que a urease na presença de resveratrol segue uma cinética de Michaelis-Menten, sendo o resveratrol um inibidor não competitivo e

reversível. Poucos trabalhos têm vindo a ser desenvolvidos para estudar a actividade anti-urease de compostos de baixo peso molecular, nomeadamente Xiao e colaboradores, sintetizaram vinte polifenóis e avaliaram os efeitos destes na urease de *H. pylori* (XIAO, Z.P. [et al.], 2007). Apenas dois desses compostos inibiram a urease de *H. pylori*, sendo a sua inibição dependente do tempo de incubação. Por outro lado, recentemente, Pastene et al. (2009) demonstraram que o efeito inibitório dos polifenóis presentes na casca da maçã na urease do *H. pylori*, era independente do tempo (PASTENE, E. [et al.], 2009). Quanto aos resultados obtidos, sugerem que o resveratrol é um inibidor da actividade da urease independente do tempo.

Resta apenas referir que este trabalho contribuiu para o melhor conhecimento científico dos vinhos portugueses quanto aos níveis de resveratrol e demonstrou, ainda, que o resveratrol é uma molécula promissora revelando potencial quanto às suas propriedades antimicrobianas, podendo no futuro ser utilizado na conservação dos alimentos e no tratamento de infecções causadas por alguns microrganismos patogénicos, nomeadamente *Helicobacter pylori*. Além disso, este trabalho possui um elevado interesse económico e social sobretudo para os países vitivinícolas, no qual se inclui Portugal.

CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES

1. Foi desenvolvido um método analítico sensível e específico para a quantificação dos isómeros *trans*- e *cis*-resveratrol com recurso à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de díodos (HPLC-DAD). A metodologia foi aplicada a amostras de vinho tinto na sua maioria de Denominação de Origem Controlada (DOC) provenientes de diferentes regiões vitivinícolas portuguesas, nomeadamente da região da Beira Interior, Vinhos Verdes, Douro, Dão, Alentejo, Ribatejo, Bairrada e Península de Setúbal.
2. Foram desenvolvidos e comparados diversos procedimentos extractivos, nomeadamente a extracção líquido-líquido (LLE) e a extracção em fase sólida (SPE). Todo o processo de pré-tratamento da amostra foi previamente optimizado, verificando-se que as colunas de extracção em fase sólida (C₈) demonstraram ser mais adequadas para a determinação de ambos os isómeros em amostras de vinho tinto, uma vez que a eficiência do processo de extracção foi superior a 99%.
3. O método foi completamente validado, segundo critérios internacionalmente aceites, incluindo estudos de estabilidade, apresentando resultados adequados para todos os parâmetros estudados.
4. Foram analisadas as propriedades antimicrobianas do resveratrol contra diferentes microrganismos patogénicos, nomeadamente bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Verificou-se o efeito bacteriostático do resveratrol em *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. Os resultados obtidos sugerem que o efeito antibacteriano do resveratrol em *Bacillus cereus* está relacionado com a inibição da divisão celular.
5. Foi avaliada a actividade antimicrobiana do resveratrol, expandindo o estudo para a determinação da actividade anti-*Helicobacter pylori*. Segundo o nosso conhecimento, este trabalho é o primeiro a descrever a inibição da actividade da urease pelo resveratrol e por amostras de vinho tinto, em diferentes estirpes de *H. pylori*. Os resultados sugerem que o resveratrol possa ser fundamental

no controlo do crescimento de *H. pylori* no ambiente ácido do estômago, através da inibição da urease. Os dados cinéticos indicam que o resveratrol é um inibidor da urease, com efeito não-competitivo e reversível.

6. Por tudo o exposto anteriormente, o presente trabalho, o primeiro desta natureza, contribui não só para o melhor conhecimento científico dos vinhos tintos portugueses relativamente aos teores de resveratrol, como também para a possível utilização deste composto na prevenção de doenças associadas aos diversos microrganismos, nomeadamente as doenças gástricas relacionadas com *Helicobacter pylori*, o que poderá possibilitar, no futuro, o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

CAPÍTULO V – PERSPECTIVAS FUTURAS

Não podemos terminar este trabalho sem referir possíveis estudos de investigações a realizar no futuro. No que diz respeito à vertente analítica seria interessante recorrer à aplicação da metodologia analítica validada, neste trabalho, a novos estudos para a determinação não só de ambos os isómeros de resveratrol, como de outros estilbenos, como o piceid e para polifenóis em geral, quer em amostras de vinho tinto, como em amostras de vinho branco e rosé. Poder-se-á agrupar e ampliar a amostragem de vinhos por região, casta e ano para avaliar se a quantidade de resveratrol se encontra relacionada com cada um destes parâmetros. E ainda, quantificar o resveratrol nas diferentes etapas do processo da vinificação, desde a uva até ao produto final (vinho) comparando os níveis de resveratrol ao longo do processo de vinificação.

Relativamente à componente microbiológica poder-se-á analisar a actividade antimicrobiana de outros compostos presentes nos vinhos (por exemplo procianidinas, antocianinas, ácidos orgânicos, etanol...) isoladamente e em associação com o resveratrol. Seria ainda interessante avaliar a morfologia e estrutura de *Helicobacter pylori* na presença de diferentes concentrações de resveratrol e tentar elucidar o mecanismo de acção deste composto. Como complemento, poder-se-á efectuar um estudo cinético de outros compostos presentes nos vinhos, na inibição da urease de *Helicobacter pylori*.

Por fim, como um dos principais problemas do resveratrol está relacionado com a sua baixa solubilidade em meio aquoso e a sua instabilidade, o estudo de novos compostos que possam aumentar a solubilidade e estabilidade do resveratrol seria fundamental. Poder-se-á estudar o uso de ciclodextrinas, compostos cíclicos não-tóxicos, que formam complexos com várias substâncias que passam a apresentar maior solubilidade e maior estabilidade térmica.

CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRIL, M.; NEGUERUELA, A. I.; PEREZ, C.; JUAN, T.; ESTOPANAN, G. - Preliminary study of resveratrol content in Aragon red and rose wines. *Food Chemistry*. Vol. 92. n.º 4 (2005). p. 729-36.
- ADENIYI, B. A.; ANYIAM, F. M. - In vitro anti-*Helicobacter pylori* potential of methanol extract of *Allium ascalonicum* Linn. (Liliaceae) leaf: susceptibility and effect on urease activity. *Phytotherapy Research*. Vol. 18. n.º 5 (2004). p. 358-61.
- ADENIYI, B. A.; ONWUBUCHE, B. C.; ANYIAM, R. A.; EKUNDAYO, O.; MAHADY, G. B. - Anti-*Helicobacter pylori* activities of *Eucalyptus grandis*: Effects on susceptibility, urease activity and cell surface hydrophobicity. *Pharmaceutical Biology*. Vol. 47. n.º 1 (2009). p. 13-7.
- ADRIAN, M.; JEANDET, P.; BESSIS, R.; JOUBERT, J. M. - Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminum chloride (AlCl₃). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 44. n.º 8 (1996). p. 1979-81.
- ADRIAN, M.; JEANDET, P.; BREUIL, A. C.; LEVITE, D.; DEBORD, S.; BESSIS, R. - Assay of resveratrol and derivative stilbenes in wines by direct injection high performance liquid chromatography. *American Journal of Enology and Viticulture*. Vol. 51. n.º 1 (2000). p. 37-41.
- ALM, R. A.; LING, L. S.; MOIR, D. T.; KING, B. L.; BROWN, E. D.; DOIG, P. C.; SMITH, D. R.; NOONAN, B.; GUILD, B. C.; DEJONGE, B. L.; CARMEL, G.; TUMMINO, P. J.; CARUSO, A.; URIA-NICKELSEN, M.; MILLS, D. M.; IVES, C.; GIBSON, R.; MERBERG, D.; MILLS, S. D.; JIANG, Q.; TAYLOR, D. E.; VOVIS, G. F.; TRUST, T. J. - Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. Vol. 397. n.º 6715 (1999). p. 176-80.
- ALONSO, A. M.; DOMINGUEZ, C.; GUILLEN, D. A.; BARROSO, C. G. - Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 50. n.º 11 (2002). p. 3112-5.
- ANDERSEN, L. P.; DORLAND, A.; KARACAN, H.; COLDING, H.; NILSSON, H. O.; WADSTROM, T.; BLOM, J. - Possible clinical importance of the transformation of *Helicobacter pylori* into coccoid forms. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. Vol. 35. n.º 9 (2000). p. 897-903.

- ANDLAUER, W.; KOLB, J.; SIEBERT, K.; FURST, P. - Assessment of resveratrol bioavailability in the perfused small intestine of the rat. *Drugs under Experimental and Clinical Research*. Vol. 26. n.º 2 (2000). p. 47-55.
- ASENSI, M.; MEDINA, I.; ORTEGA, A.; CARRETERO, J.; BANO, M. C.; OBRADOR, E.; ESTRELA, J. M. - Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radical Biology & Medicine*. Vol. 33. n.º 3 (2002). p. 387-98.
- ATHAR, M.; BACK, J. H.; TANG, X.; KIM, K. H.; KOPELOVICH, L.; BICKERS, D. R.; KIM, A. L. - Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Vol. 224. n.º 3 (2007). p. 274-83.
- ATTEN, M. J.; GODOY-ROMERO, E.; ATTAR, B. M.; MILSON, T.; ZOPEL, M.; HOLIAN, O. - Resveratrol regulates cellular PKC alpha and delta to inhibit growth and induce apoptosis in gastric cancer cells. *Investigational New Drugs*. Vol. 23. n.º 2 (2005). p. 111-9.
- AVAR, P.; NIKFARDJAM, M. S. P.; KUNSAGI-MATE, S.; MONTSKO, G.; SZABO, Z.; BODDI, K.; OHMACHT, R.; MARK, L. - Investigation of phenolic components of Hungarian wines. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 8. n.º 10 (2007). p. 1028-38.
- AZEVEDO, N. F.; GUIMARAES, N.; FIGUEIREDO, C.; KEEVIL, C. W.; VIEIRA, M. J. - A new model for the transmission of *Helicobacter pylori*: role of environmental reservoirs as gene pools to increase strain diversity. *Critical Reviews in Microbiology*. Vol. 33. n.º 3 (2007). p. 157-69.
- AZEVEDO, N. F.; HUNTINGTON, J.; GOODMAN, K. J. - The epidemiology of *Helicobacter pylori* and public health implications. *Helicobacter*. Vol. 14 Suppl 1. (2009). p. 1-7.
- AZIZ, M. H.; KUMAR, R.; AHMAD, N. - Cancer chemoprevention by resveratrol: *in vitro* and *in vivo* studies and the underlying mechanisms (review). *International Journal of Oncology*. Vol. 23. n.º 1 (2003). p. 17-28.
- BAPTISTA, J. A. B.; TAVARES, J. F. D.; CARVALHO, R. C. B. - Comparison of polyphenols and aroma in red wines from Portuguese mainland versus Azores Islands. *Food Research International*. Vol. 34. n.º 4 (2001). p. 345-55.
- BARDAKHCH'IAN, E. A.; KHARLANOVA, N. G.; KAMNEVA, N. V.; LOMOV, SIU; SAIAMOV, S. R.; GOLUBEV, B. P. - Coccoid forms of *Helicobacter pylori* and their role in human pathology. *Experimental & Clinical Gastroenterology*. n.º 6 (2003). p. 11-5.

- BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. - Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Vol. 5. n.º 6 (2006). p. 493-506.
- BAVARESCO, L. - Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. *Drugs under Experimental and Clinical Research*. Vol. 29. n.º 5-6 (2003). p. 181-7.
- BELISARIO-SANCHEZ, Y. Y.; TABOADA-RODRIGUEZ, A.; MARIN-INIESTA, F.; LOPEZ-GOMEZ, A. - Dealcoholized Wines by Spinning Cone Column Distillation: Phenolic Compounds and Antioxidant Activity Measured by the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 57. n.º 15 (2009). p. 6770-8.
- BELLOMARINO, S. A.; PARKER, R. M.; CONLAN, X. A.; BARNETT, N. W.; ADAMS, M. J. - Partial least squares and principal components analysis of wine vintage by high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 678. n.º 1 (2010). p. 34-8.
- BERTELLI, A. A.; BACCALINI, R.; BATTAGLIA, E.; FALCHI, M.; FERRERO, M. E. - Resveratrol inhibits TNF alpha-induced endothelial cell activation. *Therapie*. Vol. 56. n.º 5 (2001). p. 613-6.
- BERTELLI, A. A. E.; GIOVANNINI, L.; STRADI, R.; URIEN, S.; TILLEMENT, J. P.; BERTELLI, A. - Evaluation of kinetic parameters of natural phytoalexin in resveratrol orally administered in wine to rats. *Drugs under Experimental and Clinical Research*. Vol. 24. n.º 1 (1998). p. 51-5.
- BERTELLI, A. A.; GIOVANNINI, L.; STRADI, R.; BERTELLI, A.; TILLEMENT, J. P. - Plasma, urine and tissue levels of *trans*- and *cis*-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats. *International Journal of Tissue Reactions*. Vol. 18. n.º 2-3 (1996). p. 67-71.
- BISHAYEE, A.; POLITIS, T.; DARVESH, A. S. - Resveratrol in the chemoprevention and treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Treatment Reviews*. Vol. 36. n.º 1 (2010). p. 43-53.
- BOBAN, N.; TONKIC, M.; BUDIMIR, D.; MODUN, D.; SUTLOVIC, D.; PUNDA-POLIC, V.; BOBAN, M. - Antimicrobial Effects of Wine: Separating the Role of Polyphenols, pH, Ethanol, and Other Wine Components. *Journal of Food Science*. Vol. 75. n.º 5 (2010a). p. M322-M6.

- BOBAN, N.; TONKIC, M.; MODUN, D.; BUDIMIR, D.; MUDNIC, I.; SUTLOVIC, D.; PUNDA-POLIC, V.; BOBAN, M. - Thermally treated wine retains antibacterial effects to food-born pathogens. *Food Control*. Vol. 21. n.º 8 (2010b). p. 1161-5.
- BRADAMANTE, S.; BARENGHI, L.; VILLA, A. - Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovascular Drug Reviews*. Vol. 22. n.º 3 (2004). p. 169-88.
- BRAVO, M. N.; FELICIANO, R.; SILVA, S.; COELHO, A. V.; BOAS, L. V.; BRONZE, M. R. - Analysis of *trans*-resveratrol: Comparison of methods and contents in Muscatel fortified wines from Setúbal region in Portugal. *Journal of Food Composition and Analysis*. Vol. 21. n.º 8 (2008). p. 634-43.
- BRENNER, H.; BERG, G.; LAPPUS, N.; KLIEBSCH, U.; BODE, G.; BOEING, H. - Alcohol consumption and *Helicobacter pylori* infection: Results from the German National Health and Nutrition Survey. *Epidemiology*. Vol. 10. n.º 3 (1999). p. 214-8.
- BROWN, J. C.; HUANG, G. H.; HALEY-ZITLIN, V.; JIANG, X. P. - Antibacterial Effects of Grape Extracts on *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 75. n.º 3 (2009). p. 848-52.
- BUDAVARI, S. - The Merck Index. 12th ed. Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc., 1996.
- BUIARELLI, F.; COCCIOLI, F.; JASIONOWSKA, R.; MEROLLE, M.; TERRACCIANO, A. - Chromatographic analysis of *trans*-resveratrol in Italian wines: Comparisons between FL, UV and MS detection. *Chromatographia*. Vol. 64. n.º 7-8 (2006). p. 475-81.
- BUIARELLI, F.; COCCIOLI, F.; JASIONOWSKA, R.; MEROLLE, M.; TERRACCIANO, A. - Analysis of some stilbenes in Italian wines by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. Vol. 21. n.º 18 (2007). p. 2955-64.
- BURNS, J.; GARDNER, P. T.; O'NEIL, J.; CRAWFORD, S.; MORECROFT, I.; MCPHAIL, D. B.; LISTER, C.; MATTHEWS, D.; MACLEAN, M. R.; LEAN, M. E.; DUTHIE, G. G.; CROZIER, A. - Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 48. n.º 2 (2000). p. 220-30.
- BURNS, J.; YOKOTA, T.; ASHIHARA, H.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. - Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 50. n.º 11 (2002). p. 3337-40.

- BUTLER, M. S.; BUSS, A. D. - Natural products--the future scaffolds for novel antibiotics? *Biochemical Pharmacology*. Vol. 71. n.º 7 (2006). p. 919-29.
- CANTOS, E.; ESPIN, J. C.; FERNANDEZ, M. J.; OLIVA, J.; TOMAS-BARBERAN, F. A. - Postharvest UV-C-irradiated grapes as a potential source for producing stilbene-enriched red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 51. n.º 5 (2003). p. 1208-14.
- CANTOS, E.; ESPIN, J. C.; TOMAS-BARBERAN, F. A. - Postharvest induction modeling method using UV irradiation pulses for obtaining resveratrol-enriched table grapes: a new "functional" fruit? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 49. n.º 10 (2001). p. 5052-8.
- CANTOS, E.; ESPIN, J. C.; TOMAS-BARBERAN, F. A. - Postharvest stilbene-enrichment of red and white table grape varieties using UV-C irradiation pulses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 50. n.º 22 (2002). p. 6322-9.
- CANTOS, E.; GARCIA-VIGUERA, C.; DE PASCUAL-TERESA, S.; TOMAS-BARBERAN, F. A. - Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 48. n.º 10 (2000). p. 4606-12.
- 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*. Vol. 51. n.º 18 (2003). p. 5226-31.
- CASTELLARI, M.; SARTINI, E.; FABIANI, A.; ARFELLI, G.; AMATI, A. - Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. *Journal of Chromatography A*. Vol. 973. n.º 1-2 (2002). p. 221-7.
- CELOTTI, E.; FERRARINI, R.; ZIRONI, R.; CONTE, L. S. - Resveratrol content of some wines obtained from dried Valpolicella grapes: Recioto and Amarone. *Journal of Chromatography A*. Vol. 730. n.º 1-2 (1996). p. 47-52.
- CHAN, M. M. Y. - Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochemical Pharmacology*. Vol. 63. n.º 2 (2002). p. 99-104.
- CHATTERJEE, A.; BAGCHI, D.; YASMIN, T.; STOHS, S. J. - Antimicrobial effects of antioxidants with and without clarithromycin on *Helicobacter pylori*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. Vol. 270. n.º 1-2 (2005). p. 125-30.

- CHATTERJEE, A.; YASMIN, T.; BAGCHI, D.; STOHS, S. J. - The bactericidal effects of *Lactobacillus acidophilus*, garcinol and Protokin compared to clarithromycin, on *Helicobacter pylori*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. Vol. 243. n.º 1-2 (2003). p. 29-35.
- CHAVES, A. A.; JOSHI, M. S.; COYLE, C. M.; BRADY, J. E.; DECH, S. J.; SCHANBACHER, B. L.; BALIGA, R.; BASURAY, A.; BAUER, J. A. - Vasoprotective endothelial effects of a standardized grape product in humans. *Vascular Pharmacology*. Vol. 50. n.º 1-2 (2009). p. 20-6.
- CHIOU, A.; KARATHANOS, V. T.; MYLONA, A.; SALTA, F. N.; PREVENTI, F.; ANDRIKOPOULOS, N. K. - Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity. *Food Chemistry*. Vol. 102. n.º 2 (2007). p. 516-22.
- CHU, Q.; O'DWYER, M.; ZEECE, M. G. - Direct Analysis of Resveratrol in Wine by Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 46. n.º 2 (1998). p. 509-13.
- CHUKWUMAH, Y.; WALKER, L. T.; VERGHESE, M. - Peanut skin color: a biomarker for total polyphenolic content and antioxidative capacities of peanut cultivars. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 10. n.º 11 (2009). p. 4941-52.
- CLYNE, M.; LABIGNE, A.; DRUMM, B. - *Helicobacter pylori* requires an acidic environment to survive in the presence of urea. *Infection and Immunity*. Vol. 63. n.º 5 (1995). p. 1669-73.
- COSTA, A. C.; FIGUEIREDO, C.; TOUATI, E. - Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. Vol. 14 Suppl 1. (2009). p. 15-20.
- CUNET, C.; CALLEMIEN, D.; COLLIN, S. - Chocolate and cocoa: New sources of *trans*-resveratrol and *trans*-piceid. *Food Chemistry*. Vol. 98. n.º 4 (2006). p. 649-57.
- COWAN, M. M. - Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 12. n.º 4 (1999). p. 564-82.
- CREASY, L.L.; COFFEE, M. - Phytoalexin production potential of grape berries. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. Vol. 113. (1988). p. 230.
- CVEJIC, J. M.; DJEKIC, S. V.; PETROVIC, A. V.; ATANACKOVIC, M. T.; JOVIC, S. M.; BRCESKI, I. D.; GOJKOVIC-BUKARICA, L. C. - Determination of *trans*- and *cis*-resveratrol in Serbian commercial wines. *Journal of Chromatographic Science*. Vol. 48. n.º 3 (2010). p. 229-34.

- DAMIANAKI, A.; BAKOGEORGOU, E.; KAMPA, M.; NOTAS, G.; HATZOGLU, A.; PANAGIOTOU, S.; GEMETZI, C.; KOUROUMALIS, E.; MARTIN, P. M.; CASTANAS, E. - Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. Vol. 78. n.º 3 (2000). p. 429-41.
- DAROCH, F.; HOENEISEN, M.; GONZALEZ, C. L.; KAWAGUCHI, F.; SALGADO, F.; SOLAR, H.; GARCIA, A. - In vitro antibacterial activity of Chilean red wines against *Helicobacter pylori*. *Microbios*. Vol. 104. n.º 408 (2001). p. 79-85.
- DAS, J. C.; PAUL, N. - Epidemiology and pathophysiology of *Helicobacter pylori* infection in children. *Indian Journal of Pediatrics*. Vol. 74. n.º 3 (2007). p. 287-90.
- DE LORIMIER, A. A. - Alcohol, wine, and health. *American Journal of Surgery*. Vol. 180. n.º 5 (2000). p. 357-61.
- DE QUIROS, A. R. B.; LOPEZ-HERNANDEZ, J.; FERRACES-CASAI, P.; LAGE-YUSTY, M. A. - Analysis of non-anthocyanin phenolic compounds in wine samples using high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *Journal of Separation Science*. Vol. 30. n.º 9 (2007). p. 1262-6.
- DE SANTI, C.; PIETRABISSA, A.; MOSCA, F.; PACIFICI, G. M. - Glucuronidation of resveratrol, a natural product present in grape and wine, in the human liver. *Xenobiotica*. Vol. 30. n.º 11 (2000a). p. 1047-54.
- DE SANTI, C.; PIETRABISSA, A.; SPISNI, R.; MOSCA, F.; PACIFICI, G. M. - Sulphation of resveratrol, a natural product present in grapes and wine, in the human liver and duodenum. *Xenobiotica*. Vol. 30. n.º 6 (2000b). p. 609-17.
- DE VRIES, A. C.; KUIPERS, E. J. - Review article: *Helicobacter pylori* eradication for the prevention of gastric cancer. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. Vol. 26 Suppl 2. (2007). p. 25-35.
- DEL GIUDICE, G.; MALFERTHEINER, P.; RAPPUOLI, R. - Development of vaccines against *Helicobacter pylori*. *Expert Review of Vaccines*. Vol. 8. n.º 8 (2009). p. 1037-49.
- DIAZ, T. G.; MERAS, I. D.; RODRIGUEZ, D. A. - Determination of resveratrol in wine by photochemically induced second-derivative fluorescence coupled with liquid-liquid extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Vol. 387. n.º 6 (2007). p. 1999-2007.
- DOBIASOVA, Z.; PAZOUREK, J.; HAVEL, J. - Simultaneous determination of *trans*-resveratrol and sorbic acid in wine by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*. Vol. 23. n.º 2 (2002). p. 263-7.

- DOCHERTY, J. J.; FU, M. M.; TSAI, M. - Resveratrol selectively inhibits *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 47. n.º 2 (2001). p. 243-4.
- DOCHERTY, J. J.; MCEWEN, H. A.; SWEET, T. J.; BAILEY, E.; BOOTH, T. D. - Resveratrol inhibition of *Propionibacterium acnes*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 59. n.º 6 (2007). p. 1182-4.
- DOMINGUEZ, C.; GUILLEN, D. A.; BARROSO, C. G. - Automated solid-phase extraction for sample preparation followed by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for the analysis of resveratrol derivatives in wine. *Journal of Chromatography A*. Vol. 918. n.º 2 (2001). p. 303-10.
- DOUILLET-BREUIL, A. C.; JEANDET, P.; ADRIAN, M.; BESSIS, R. - Changes in the phytoalexin content of various *Vitis spp.* in response to ultraviolet C elicitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 47. n.º 10 (1999). p. 4456-61.
- DU, F. Y.; XIAO, X. H.; LI, G. K. - Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of *trans-resveratrol* from *Rhizma Polygoni Cuspidati*. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1140. n.º 1-2 (2007). p. 56-62.
- DUGO, G.; DUGO, P.; VILASI, F.; MAGNISI, R.; MONDELLO, L.; LA TORRE, G. L. - Determination of the polyphenolic content in Sicilian red wines of protected geographical indication. *Italian Journal of Food Science*. Vol. 18. n.º 4 (2006). p. 409-22.
- EATON, K. A.; BROOKS, C. L.; MORGAN, D. R.; KRAKOWKA, S. - Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infection and Immunity*. Vol. 59. n.º 7 (1991). p. 2470-5.
- FAN, E.; ZHANG, K.; JIANG, S.; YAN, C.; BAI, Y. - Analysis of *trans-resveratrol* in grapes by micro-high performance liquid chromatography. *Analytical Sciences*. Vol. 24. n.º 8 (2008). p. 1019-23.
- FANZONE, M.; PENA-NEIRA, A.; JOFRE, V.; ASSOF, M.; ZAMORA, F. - Phenolic characterization of malbec wines from mendoza province (Argentina). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 58. n.º 4 (2010). p. 2388-97.
- FAUCONNEAU, B.; WAFFO-TEGUO, P.; HUGUET, F.; BARRIER, L.; DECENDIT, A.; MERILLON, J. M. - Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties

- of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using *in vitro* tests. *Life Sciences*. Vol. 61. n.º 21 (1997). p. 2103-10.
- FAUSTINO, R. S.; SOBRATTEE, S.; EDEL, A. L.; PIERCE, G. N. - Comparative analysis of the phenolic content of selected Chilean, Canadian and American Merlot red wines. *Molecular and Cellular Biochemistry*. Vol. 249. n.º 1-2 (2003). p. 11-9.
- FEIJOO, O.; MORENO, A.; FALQUE, E. - Content of *trans*- and *cis*-resveratrol in Galician white and red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*. Vol. 21. n.º 8 (2008). p. 608-13.
- FERREIRA, W. F. C.; SOUSA, J. C. F. - Microbiologia Volume 1. LIDEL, 1998.
- FERREIRA, W. F. C.; SOUSA, J. C. S. - Microbiologia Volume 2. LIDEL, 2000.
- FERRERO, M. E.; BERTELLI, A. A.; PELLEGGATTA, F.; FULGENZI, A.; CORSI, M. M.; BERTELLI, A. - Phytoalexin resveratrol (3-4'-5-trihydroxystilbene) modulates granulocyte and monocyte endothelial adhesion. *Transplantation Proceedings*. Vol. 30. n.º 8 (1998). p. 4191-3.
- FILIP, V.; PLOCKOVA, M.; SMIDRKAL, J.; SPICKOVA, Z.; MELZUCH, K.; SCHMIDT, S. - Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. *Food Chemistry*. Vol. 83. n.º 4 (2003). p. 585-93.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION: US Department of Health and Human Services, guidance for industry, bioanalytical method validation. FDA (2001). Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf> (consultado em 30 de Junho de 2010).
- FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; KINSELLA, J. E. - Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*. Vol. 341. n.º 8852 (1993). p. 1103-4.
- FREMONT, L. - Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*. Vol. 66. n.º 8 (2000). p. 663-73.
- FREMONT, L.; BELGUENDOUZ, L.; DELPAL, S. - Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sciences*. Vol. 64. n.º 26 (1999). p. 2511-21.
- GALEANO-DIAZ, T.; DURDN-MERAS, I.; AIRADO-RODRIGUEZ, D. - Isocratic chromatography of resveratrol and piceid after previous generation of fluorescent photoproducts: Wine analysis without sample preparation. *Journal of Separation Science*. Vol. 30. n.º 18 (2007). p. 3110-9.

- GALEANO DIAZ, T.; DURAN MERAS, I.; AIRADO RODRIGUEZ, D. - Determination of resveratrol in wine by photochemically induced second-derivative fluorescence coupled with liquid-liquid extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Vol. 387. n.º 6 (2007). p. 1999-2007.
- GAMBUTI, A.; STROLLO, D.; ERBAGGIO, A.; LECCE, L.; MOIO, L. - Effect of winemaking practices on color indexes and selected bioactive phenolics of aglianico wine. *Journal of Food Science*. Vol. 72. n.º 9 (2007). p. S623-S8.
- GAMBUTI, A.; STROLLO, D.; UGLIANO, M.; LECCE, L.; MOIO, L. - trans-Resveratrol, quercetin,(+)-catechin, and (-)-epicatechin content in south Italian monovarietal wines: relationship with maceration time and marc pressing during winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 52. n.º 18 (2004). p. 5747-51.
- GAMOH, K.; NAKASHIMA, K. - Liquid chromatography/mass spectrometric determination of trans-resveratrol in wine using a tandem solid-phase extraction method. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. Vol. 13. n.º 12 (1999). p. 1112-5.
- GANAN, M.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, A. J.; CARRASCOSA, A. V. - Antimicrobial activity of phenolic compounds of wine against *Campylobacter jejuni*. *Food Control*. Vol. 20. n.º 8 (2009). p. 739-42.
- GEHM, B. D.; MCANDREWS, J. M.; CHIEN, P. Y.; JAMESON, J. L. - Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 94. n.º 25 (1997). p. 14138-43.
- GEROGIANNAKI-CHRISTOPOULOU, M.; ATHANASOPOULOS, P.; KYRIAKIDIS, N.; GEROGIANNAKI, I. A.; SPANOS, M. - trans-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties. *Food Control*. Vol. 17. n.º 9 (2006). p. 700-6.
- GERRITS, M. M.; VAN VLIET, A. H.; KUIPERS, E. J.; KUSTERS, J. G. - Helicobacter pylori and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *The Lancet Infectious Diseases*. Vol. 6. n.º 11 (2006). p. 699-709.
- GODOY-CABALLERO MDEL, P.; AIRADO-RODRIGUEZ, D.; DURAN-MERAS, I.; GALEANO-DIAZ, T. - Sensitized synchronous fluorimetric determination of trans-resveratrol and trans-piceid in red wine based on their immobilization on nylon membranes. *Talanta*. Vol. 82. n.º 5 (2010). p. 1733-41.

- GOLDBERG, D. M.; KARUMANCHIRI, A.; NG, E.; YAN, J.; DIAMANDIS, E. P.; SOLEAS, G. J. - Direct gas chromatographic-mass spectrometric method to assay cis-resveratrol in wines: preliminary survey of its concentration in commercial wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 43. n.º 5 (1995a). p. 1245-50.
- GOLDBERG, D. M.; NG, E.; KARUMANCHIRI, A.; YAN, J.; DIAMANDIS, E. P.; SOLEAS, G. J. - Assay of resveratrol glucosides and isomers in wine by direct-injection high-performance liquid-chromatography. *Journal of Chromatography A*. Vol. 708. n.º 1 (1995b). p. 89-98.
- GOLDBERG, D. M.; TSANG, E.; KARUMANCHIRI, A.; DIAMANDIS, E.; SOLEAS, G.; NG, E. - Method to assay the concentrations of phenolic constituents of biological interest in wines. *Analytical Chemistry*. Vol. 68. n.º 10 (1996). p. 1688-94.
- GOLDBERG, D. M.; YAN, J.; NG, E.; DIAMANDIS, E. P.; KARUMANCHIRI, A.; SOLEAS, G.; WATERHOUSE, A. L. - A Global Survey of Trans-Resveratrol Concentrations in Commercial Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. Vol. 46. n.º 2 (1995c). p. 159-65.
- GOLDBERG, D. M.; YAN, J.; SOLEAS, G. J. - Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clinical Biochemistry*. Vol. 36. n.º 1 (2003). p. 79-87.
- GOLKAR, L.; DING, X. Z.; UJIKI, M. B.; SALABAT, M. R.; KELLY, D. L.; SCHOLTENS, D.; FOUGHT, A. J.; BENTREM, D. J.; TALAMONTI, M. S.; BELL, R. H.; ADRIAN, T. E. - Resveratrol inhibits pancreatic cancer cell proliferation through transcriptional induction of macrophage inhibitory cytokine-1. *The Journal of Surgical Research*. Vol. 138. n.º 2 (2007). p. 163-9.
- GOMES, B. C.; DE MARTINIS, E. C. P. - The significance of Helicobacter pylori in water, food and environmental samples. *Food Control*. Vol. 15. n.º 5 (2004). p. 397-403.
- GOODWIN, C. S.; ARMSTRONG, J. A.; CHILVERS, T.; PETERS, M.; COLLINS, M. D.; SLY, L.; MCCONNELL, W.; HARPER, W. E. S. - Transfer of Campylobacter pylori and Campylobacter mustelae to Helicobacter gen. nov. as Helicobacter pylori comb. nov. and Helicobacter mustelae comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 39. n.º 4 (1989). p. 397.
- GU, X.; CREASY, L.; KESTER, A.; ZEECE, M. - Capillary electrophoretic determination of resveratrol in wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 47. n.º 8 (1999). p. 3223-7.

- GUEBAILIA, H. A.; CHIRA, K.; RICHARD, T.; MABROUK, T.; FURIGA, A.; VITRAC, X.; MONTI, J. P.; DELAUNAY, J. C.; MERILLON, J. M. - Hopeaphenol: The first resveratrol tetramer in wines from North Africa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 54. n.º 25 (2006). p. 9559-64.
- GURBUZ, O.; GOCMEN, D.; DAGDELEN, F.; GURSOY, M.; AYDIN, S.; SAHIN, I.; BUYUKUYSAL, L.; USTA, M. - Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*. Vol. 100. n.º 2 (2007). p. 518-25.
- HAMILTON-MILLER, J. M. - The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 22. n.º 4 (2003). p. 360-6.
- HATHWAY, D. E.; SEAKINS, J. W. - Hydroxystilbenes of *Eucalyptus wandoo*. *The Biochemical Journal*. Vol. 72. (1959). p. 369-74.
- HELLSTROM, P. M. - This year's Nobel Prize to gastroenterology: Robin Warren and Barry Marshall awarded for their discovery of *Helicobacter pylori* as pathogen in the gastrointestinal tract. *World Journal of Gastroenterology*. Vol. 12. n.º 19 (2006). p. 3126-7.
- HERNANDEZ, T.; ESTRELLA, I.; PEREZ-GORDO, M.; ALEGRIA, E. G.; TENORIO, C.; RUIZ-LARRREA, F.; MORENO-ARRIBAS, M. V. - Contribution of malolactic fermentation by *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* to the changes in the nonanthocyanin polyphenolic composition of red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 55. n.º 13 (2007). p. 5260-6.
- HOCKER, M.; HOHENBERGER, P. - *Helicobacter pylori* virulence factors--one part of a big picture. *Lancet*. Vol. 362. n.º 9391 (2003). p. 1231-3.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). ICH (2005). Disponível em: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf> (consultado em 30 de Junho de 2010).
- JANG, J. H.; SURH, Y. J. - Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death. *Free radical Biology & Medicine*. Vol. 34. n.º 8 (2003). p. 1100-10.
- JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G. O.; SLOWING, K. V.; THOMAS, C. F.; BEECHER, C. W.; FONG, H. H.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; MEHTA, R. G.; MOON, R. C.;

- PEZZUTO, J. M. - Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. Vol. 275. n.º 5297 (1997). p. 218-20.
- JEANDET, P. - Phytoalexins from the Vitaceae: Current problems and future prospects. *Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin*. Vol. 36. n.º 3 (2002). p. 107-.
- JEANDET, P.; BESSIS, R.; GAUTHERON, B. - The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by Grape Berries in Different Developmental Stages. *American Journal of Enology and Viticulture*. Vol. 42. n.º 1 (1991). p. 41-6.
- JEANDET, P.; BESSIS, R.; MAUME, B. F.; MEUNIER, P.; PEYRON, D.; TROLLAT, P. - Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 43. n.º 2 (1995). p. 316-9.
- JEANDET, P.; DOUILLT-BREUIL, A. C.; BESSIS, R.; DEBORD, S.; SBAGHI, M.; ADRIAN, M. - Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 50. n.º 10 (2002). p. 2731-41.
- JERKOVIC, V.; COLLIN, S. - Occurrence of resveratrol and piceid in American and European hop cones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 55. n.º 21 (2007). p. 8754-8.
- JIANG, L. Y.; HE, S.; JIANG, K. Z.; SUN, C. R.; PAN, Y. J. - Resveratrol and its oligomers from wine grapes are selective (1)O(2) quenchers: mechanistic implication by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry and theoretical calculation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 58. n.º 16 (2010). p. 9020-7.
- JUNG, H. J.; HWANG, I. A.; SUNG, W. S.; KANG, H.; KANG, B. S.; SEU, Y. B.; LEE, D. G. - Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi. *Archives of Pharmacal Research*. Vol. 28. n.º 5 (2005). p. 557-60.
- JUNG, H. J.; SEU, Y. B.; LEE, D. G. - Candididal action of resveratrol isolated from grapes on human pathogenic yeast *C. albicans*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 17. n.º 8 (2007). p. 1324-9.
- KABIR, S. - The current status of *Helicobacter pylori* vaccines: a review. *Helicobacter*. Vol. 12. n.º 2 (2007). p. 89-102.

- KATO, E.; TOKUNAGA, Y.; SAKAN, F. - Stilbenoids isolated from the seeds of Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) and their biological activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 57. n.º 6 (2009). p. 2544-9.
- KIM, T. J.; WENG, W. L.; SILVA, J. L.; JUNG, Y. S.; MARSHALL, D. - Identification of natural antimicrobial substances in red muscadine juice against *Cronobacter sakazakii*. *Journal of Food Science*. Vol. 75. n.º 3 (2010). p. M150-4.
- KOLOUCHOVA-HANZLIKOVA, I.; MELZOCH, K.; FILIP, V. - Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines. *Food Chemistry*. Vol. 87. n.º 1 (2004). p. 151-8.
- KOPP, P. - Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. Vol. 138. n.º 6 (1998). p. 619-20.
- KRAUSE, M. - Resistance problems in gastrointestinal infections. *Therapeutische Umschau*. Vol. 59. n.º 1 (2002). p. 36-40.
- KUHNLE, G.; SPENCER, J. P. E.; CHOWRIMOOTO, G.; SCHROETER, H.; DEBNAM, E. S.; SRAI, S. K. S.; RICE-EVANS, C.; HAHN, U. - Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 272. n.º 1 (2000). p. 212-7.
- KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. - Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. *Cancer Letters*. Vol. 269. n.º 2 (2008). p. 243-61.
- KUSTERS, J. G.; GERRITS, M. M.; VAN STRIJP, J. A.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. - Cocoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infection and Immunity*. Vol. 65. n.º 9 (1997). p. 3672-9.
- KUSTERS, J. G.; VAN VLIET, A. H.; KUIPERS, E. J. - Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 19. n.º 3 (2006). p. 449-90.
- LA TORRE, G. L.; SAITTA, M.; VILASI, F.; PELLICANO, T.; DUGO, G. - Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection. *Food Chemistry*. Vol. 94. n.º 4 (2006). p. 640-50.
- LANDRAULT, N.; LARRONDE, F.; DELAUNAY, J. C.; CASTAGNINO, C.; VERCAUTEREN, J.; MERILLON, J. M.; GASC, F.; CROS, G.; TEISSEDRE, P. L. - Levels of stilbene oligomers and astilbin in French varietal wines and in grapes during noble rot

- development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 50. n.º 7 (2002). p. 2046-52.
- 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*. Vol. 9. (1976). p. 77-86.
- LEE, S. S.; LEE, S. M.; KIM, M.; CHUN, J.; CHEONG, Y. K.; LEE, J. - Analysis of *trans*-resveratrol in peanuts and peanut butters consumed in Korea. *Food Research International*. Vol. 37. n.º 3 (2004). p. 247-51.
- LEE, S. Y.; SHIN, Y. W.; HAHM, K. B. - Phytoceuticals: mighty but ignored weapons against *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Digestive Diseases*. Vol. 9. n.º 3 (2008). p. 129-39.
- LEIRO, J. M.; VARELA, M.; PIAZZON, M. C.; ARRANZ, J. A.; NOYA, M.; LAMAS, J. - The anti-inflammatory activity of the polyphenol resveratrol may be partially related to inhibition of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) pre-mRNA splicing. *Molecular Immunology*. Vol. 47. n.º 5 (2010). p. 1114-20.
- LEONARD, S. S.; XIA, C.; JIANG, B. H.; STINEFELT, B.; KLANDORF, H.; HARRIS, G. K.; SHI, X. - Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 309. n.º 4 (2003). p. 1017-26.
- LESBROS-PANTOFlickOVA, D.; CORTHEsy-THEULAZ, I.; BLUM, A. L. - *Helicobacter pylori* and probiotics. *The Journal of Nutrition*. Vol. 137. n.º 3 Suppl 2 (2007). p. 812S-8S.
- LIMA, M. T. R.; WAFFO-TEGUO, P.; TEISSEdRE, P. L.; PUJOLAS, A.; VERCAUTEREN, J.; CABANIS, J. C.; MERILLON, J. M. - Determination of stilbenes (*trans*-astringin, *cis*- and *trans*-piceid, and *cis*- and *trans*-resveratrol) in Portuguese wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 47. n.º 7 (1999). p. 2666-70.
- LIN, H. Y.; SHIH, A.; DAVIS, F. B.; TANG, H. Y.; MARTINO, L. J.; BENNETT, J. A.; DAVIS, P. J. - Resveratrol induced serine phosphorylation of p53 causes apoptosis in a mutant p53 prostate cancer cell line. *The Journal of Urology*. Vol. 168. n.º 2 (2002). p. 748-55.
- LOPEZ-HERNANDEZ, J.; PASEIRO-LOSADA, P.; SANCHES-SILVA, A. T.; LAGE-YUSTY, M. A. - Study of the changes of *trans*-resveratrol caused by ultraviolet light and determination of *trans*- and *cis*-resveratrol in Spanish white wines. *European Food Research and Technology*. Vol. 225. n.º 5-6 (2007). p. 789-96.

- LOPEZ, M.; MARTINEZ, F.; DEL VALLE, C.; ORTE, C.; MIRO, M. - Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. Vol. 922. n.º 1-2 (2001). p. 359-63.
- LOPEZ, R.; DUGO, P.; MONDELLO, L. - Determination of *trans*-resveratrol in wine by micro-HPLC with fluorescence detection. *Journal of Separation Science*. Vol. 30. n.º 5 (2007). p. 669-72.
- LUZZA, F.; IMENEO, M.; MALETTA, M.; PALLONE, F. - Smoking, alcohol and coffee consumption, and *H pylori* infection. Alcohol consumption eliminates rather than prevents infection with *H pylori*. *British Medical Journal*. Vol. 316. n.º 7136 (1998). p. 1019.
- LYONS, M. M.; YU, C.; TOMA, R. B.; CHO, S. Y.; REIBOLDT, W.; LEE, J.; VAN BREEMEN, R. B. - Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 51. n.º 20 (2003). p. 5867-70.
- MADDOX, C. E.; LAUR, L. M.; TIAN, L. - Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Current Microbiology*. Vol. 60. n.º 1 (2010). p. 53-8.
- MAHADY, G. B.; PENDLAND, S. L. - Resveratrol inhibits the growth of *Helicobacter pylori* in vitro. *American Journal of Gastroenterology*. Vol. 95. n.º 7 (2000). p. 1849.
- MAHADY, G. B.; PENDLAND, S. L.; CHADWICK, L. R. - Resveratrol and red wine extracts inhibit the growth of CagA plus strains of *Helicobacter pylori* in vitro. *American Journal of Gastroenterology*. Vol. 98. n.º 6 (2003). p. 1440-1.
- MAHDAVI, J.; SONDEN, B.; HURTIG, M.; OLFAT, F. O.; FORSBERG, L.; ROCHE, N.; ANGSTROM, J.; LARSSON, T.; TENEBERG, S.; KARLSSON, K. A.; ALTRAJA, S.; WADSTROM, T.; KERSULYTE, D.; BERG, D. E.; DUBOIS, A.; PETERSSON, C.; MAGNUSSON, K. E.; NORBERG, T.; LINDH, F.; LUNDSKOG, B. B.; ARNQVIST, A.; HAMMARSTROM, L.; BOREN, T. - *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*. Vol. 297. n.º 5581 (2002). p. 573-8.
- MARIER, J. F.; VACHON, P.; GRITSAS, A.; ZHANG, J.; MOREAU, J. P.; DUCHARME, M. P. - Metabolism and disposition of resveratrol in rats: Extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Vol. 302. n.º 1 (2002). p. 369-73.

- MARIMON, J. M.; BUJANDA, L.; GUTIERREZ-STAMPA, M. A.; COSME, A.; ARENAS, J. I. - In vitro bactericidal effect of wine against *Helicobacter pylori*. *The American Journal of Gastroenterology*. Vol. 93. n.º 8 (1998). p. 1392.
- MARK, L.; NIKFARDJAM, M. S.; AVAR, P.; OHMACHT, R. - A validated HPLC method for the quantitative analysis of *trans*-resveratrol and *trans*-piceid in Hungarian wines. *Journal of Chromatographic Science*. Vol. 43. n.º 9 (2005). p. 445-9.
- MARSHALL, B. - Helicobacter connections. *ChemMedChem*. Vol. 1. n.º 8 (2006). p. 783-802.
- MARSHALL, B. J.; ARMSTRONG, J. A.; MCGECHIE, D. B.; GLANCY, R. J. - Attempt to fulfill Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *The Medical Journal of Australia*. Vol. 142. n.º 8 (1985). p. 436-9.
- MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. - Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. Vol. 1. n.º 8390 (1984). p. 1311-5.
- MARTINEZ-ORTEGA, M. V.; CARCIA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. - Resveratrol content in wines and musts from the south of Spain. *Die Nahrung*. Vol. 44. n.º 4 (2000). p. 253-6.
- MARTINI, S.; D'ADDARIO, C.; BRACONI, D.; BERNARDINI, G.; SALVINI, L.; BONECHI, C.; FIGURA, N.; SANTUCCI, A.; ROSSI, C. - Antibacterial Activity of Grape Extracts on *cagA*-Positive and -Negative *Helicobacter pylori* Clinical Isolates. *Journal of Chemotherapy*. Vol. 21. n.º 5 (2009). p. 507-13.
- MATTIVI, F. - Solid phase extraction of *trans*-resveratrol from wines for HPLC analysis. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. Vol. 196. n.º 6 (1993). p. 522-5.
- MCCOLL, K. E. - *Helicobacter pylori* 1988-1998. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. Vol. 11. n.º 1 (1999). p. 13-6.
- MEGRAUD, F. - Basis for the management of drug-resistant *Helicobacter pylori* infection. *Drugs*. Vol. 64. n.º 17 (2004). p. 1893-904.
- MENG, X. F.; MALIAKAL, P.; LU, H.; LEE, M. J.; YANG, C. S. - Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 52. n.º 4 (2004). p. 935-42.

- MERCOLINI, L.; SARACINO, M. A.; BUGAMELLI, F.; FERRANTI, A.; MALAGUTI, M.; HRELIA, S.; RAGGI, M. A. - HPLC-F analysis of melatonin and resveratrol isomers in wine using an SPE procedure. *Journal of Separation Science*. Vol. 31. n.º 6-7 (2008). p. 1007-14.
- MILOSO, M.; BERTELLI, A. A.; NICOLINI, G.; TREDICI, G. - Resveratrol-induced activation of the mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2, in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters*. Vol. 264. n.º 1-3 (1999). p. 141-4.
- MINUTI, L.; PELLEGRINO, R. M.; TESEI, I. - Simple extraction method and gas chromatography-mass spectrometry in the selective ion monitoring mode for the determination of phenols in wine. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1114. n.º 2 (2006). p. 263-8.
- MITCHELL, H. M. - Epidemiology of Infection. In MOBLEY H. L. T.; MENDZ G. L.; HAZELL S. L. Helicobacter pylori physiology and genetics. Washington: ASM, 2001.
- MOLNAR, B.; GALAMB, O.; SIPOS, F.; LEISZTER, K.; TULASSAY, Z. - Molecular pathogenesis of Helicobacter pylori infection: the role of bacterial virulence factors. *Digestive Diseases*. Vol. 28. n.º 4-5 (2010). p. 604-08.
- MONTECUCCO, C.; RAPPUOLI, R. - Living dangerously: How Helicobacter pylori survives in the human stomach. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Vol. 2. n.º 6 (2001). p. 457-66.
- MONTES, R.; GARCIA-LOPEZ, M.; RODRIGUEZ, I.; CELA, R. - Mixed-mode solid-phase extraction followed by acetylation and gas chromatography mass spectrometry for the reliable determination of trans-resveratrol in wine samples. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 673. n.º 1 (2010). p. 47-53.
- MORENO-LABANDA, J. F.; MALLAVIA, R.; PEREZ-FONS, L.; LIZAMA, V.; SAURA, D.; MICOL, V. - Determination of piceid and resveratrol in Spanish wines deriving from Monastrell (Vitis vinifera L.) grape variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 52. n.º 17 (2004). p. 5396-403.
- MORENO, A.; CASTRO, M.; FALQUE, E. - Evolution of trans- and cis-resveratrol content in red grapes (Vitis vinifera L. cv Mencia, Albarello and Merenzao) during ripening. *European Food Research and Technology*. Vol. 227. n.º 3 (2008). p. 667-74.
- MORETTO, T.; DAESCHEL, M. A. - Wine is bactericidal to foodborne pathogens. *Journal of Food Science*. Vol. 69. n.º 9 (2004). p. M251-M7.

- MURANO, A.; MORINAGA, N.; IWAMARU, Y.; YAHIRO, K.; TAGASHIRA, M.; MOSS, J.; TANZAWA, H.; NODA, M. - Acidic conditions enhance bactericidal effects of sodium bisulfite on *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. Vol. 10. n.º 2 (2005). p. 132-5.
- MURRAY, L. J.; LANE, A. J.; HARVEY, I. M.; DONOVAN, J. L.; NAIR, P.; HARVEY, R. F. - Inverse relationship between alcohol consumption and active *Helicobacter pylori* infection: the Bristol Helicobacter project. *The American Journal of Gastroenterology*. Vol. 97. n.º 11 (2002). p. 2750-5.
- NADERALI, E. K. - Obesity and cardiovascular dysfunction: A role for resveratrol? *Obesity Research & Clinical Practice*. Vol. 3. n.º 1 (2009). p. 45-52.
- NARAYAN, S.; VEERARAGHAVAN, M.; DEVI, C. S. - *Pterocarpus santalinus*: an in vitro study on its anti-*Helicobacter pylori* effect. *Phytotherapy Research*. Vol. 21. n.º 2 (2007). p. 190-3.
- NAVE, F.; CABRITA, M. J.; DA COSTA, C. T. - Use of solid-supported liquid-liquid extraction in the analysis of polyphenols in wine. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1169. n.º 1-2 (2007). p. 23-30.
- NETZEL, M.; STRASS, G.; BITSCH, I.; KÖNITZ, R.; CHRISTMANN, M.; BITSCH, R. - Effect of grape processing on selected antioxidant phenolics in red wine. *Journal of Food Engineering*. Vol. 56. n.º 2-3 (2003). p. 223-8.
- NIKFARDJAM, M. S. P.; MARK, L.; AVAR, P.; FIGLER, M.; OHMACHT, R. - Polyphenols, anthocyanins, and *trans*-resveratrol in red wines from the Hungarian Villany region. *Food Chemistry*. Vol. 98. n.º 3 (2006). p. 453-62.
- NONOMURA, S.; KANAGAWA, H.; MAKIMOTO, A. - Chemical Constituents of Polygonaceous Plants. I. Studies on the Components of Ko-J O-Kon. (*Polygonum Cuspidatum* Sieb. Et Zucc.). *Yakugaku Zasshi*. Vol. 83. (1963). p. 988-90.
- NORATA, G. D.; MARCHESI, P.; PASSAMONTI, S.; PIRILLO, A.; VIOLI, F.; CATAPANO, A. L. - Anti-inflammatory and anti-atherogenic effects of catechin, caffeic acid and *trans*-resveratrol in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis*. Vol. 191. n.º 2 (2007). p. 265-71.
- O'TOOLE, P. W.; LANE, M. C.; PORWOLLIK, S. - *Helicobacter pylori* motility. *Microbes and Infection*. Vol. 2. n.º 10 (2000). p. 1207-14.
- OLAS, B.; WACHOWICZ, B.; NOWAK, P.; STOCHMAL, A.; OLESZEK, W.; GLOWACKI, R.; BALD, E. - Comparative studies of the antioxidant effects of a naturally occurring

- resveratrol analogue -- trans-3,3',5,5'-tetrahydroxy-4'-methoxystilbene and resveratrol -- against oxidation and nitration of biomolecules in blood platelets. *Cell Biology and Toxicology*. Vol. 24. n.º 4 (2008). p. 331-40.
- OLEASTRO, M.; MONTEIRO, L. - *Helicobacter pylori*: patogénese. In CHAVES, F. *Helicobacter pylori* da infecção à clínica. Lisboa: Permanyer Portugal, 2001.
- OPIPARI, A. W., JR.; TAN, L.; BOITANO, A. E.; SORENSON, D. R.; AURORA, A.; LIU, J. R. - Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer Research*. Vol. 64. n.º 2 (2004). p. 696-703.
- OREA, J. M.; MONTERO, C.; JIMENEZ, J. B.; URENA, A. G. - Analysis of trans-resveratrol by laser desorption coupled with resonant ionization spectrometry. Application to trans-resveratrol content in vine leaves and grape skin. *Analytical Chemistry*. Vol. 73. n.º 24 (2001). p. 5921-9.
- OVERBYE, K. M.; BARRETT, J. F. - Antibiotics: Where did we go wrong? *Drug Discovery*. Vol. 10. n.º 1 (2005). p. 45-52.
- PADILLA, E.; RUIZ, E.; REDONDO, S.; GORDILLO-MOSCOSO, A.; SLOWING, K.; TEJERINA, T. - Relationship between vasodilation capacity and phenolic content of Spanish wines. *European Journal of Pharmacology*. Vol. 517. n.º 1-2 (2005). p. 84-91.
- PAIXAO, N.; PEREIRA, V.; MARQUES, J. C.; CAMARA, J. S. - Quantification of polyphenols with potential antioxidant properties in wines using reverse phase HPLC. *Journal of Separation Science*. Vol. 31. n.º 12 (2008). p. 2189-98.
- PAN, Q. H.; WANG, L.; LI, J. M. - Amounts and subcellular localization of stilbene synthase in response of grape berries to UV irradiation. *Plant Science*. Vol. 176. n.º 3 (2009). p. 360-6.
- PAPADOPOULOU, C.; SOULTI, K.; ROUSSIS, I. G. - Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technology and Biotechnology*. Vol. 43. n.º 1 (2005). p. 41-6.
- PARENTE, F.; CUCINO, C.; BIANCHI PORRO, G. - Treatment options for patients with *Helicobacter pylori* infection resistant to one or more eradication attempts. *Digestive and Liver Disease*. Vol. 35. n.º 8 (2003). p. 523-8.

- PASCUAL-MARTI, M. C.; SALVADOR, A.; CHAFER, A.; BERNA, A. - Supercritical fluid extraction of resveratrol from grape skin of *Vitis vinifera* and determination by HPLC. *Talanta*. Vol. 54. n.º 4 (2001). p. 735-40.
- PASTENE, E.; TRONCOSO, M.; FIGUEROA, G.; ALARCON, J.; SPEISKY, H. - Association between polymerization degree of apple peel polyphenols and inhibition of *Helicobacter pylori* urease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 57. n.º 2 (2009). p. 416-24.
- PAULO, L.; FERREIRA, S.; GALLARDO, E.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. - Antimicrobial activity and effects of resveratrol on human pathogenic bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. Vol. 26. n.º 8 (2010). p. 1533-8.
- PEREIRA, V.; CAMARA, J. S.; CACHO, J.; MARQUES, J. C. - HPLC-DAD methodology for the quantification of organic acids, furans and polyphenols by direct injection of wine samples. *Journal of Separation Science*. Vol. 33. n.º 9 (2010). p. 1204-15.
- PERVAIZ, S. - Chemotherapeutic potential of the chemopreventive phytoalexin resveratrol. *Drug Resistance Updates*. Vol. 7. n.º 6 (2004). p. 333-44.
- PETTIT, G. R.; GREALISH, M. P.; JUNG, M. K.; HAMEL, E.; PETTIT, R. K.; CHAPUIS, J. C.; SCHMIDT, J. M. - Antineoplastic agents. 465. Structural modification of resveratrol: sodium resverastatin phosphate. *Journal of Medicinal Chemistry*. Vol. 45. n.º 12 (2002). p. 2534-42.
- PETTIT, R. K.; PETTIT, G. R.; HAMEL, E.; HOGAN, F.; MOSER, B. R.; WOLF, S.; PON, S.; CHAPUIS, J. C.; SCHMIDT, J. M. - E-Combretastatin and E-resveratrol structural modifications: antimicrobial and cancer cell growth inhibitory beta-E-nitrostyrenes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Vol. 17. n.º 18 (2009). p. 6606-12.
- PINEIRO, Z.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. - Determination of *trans*-resveratrol in grapes by pressurised liquid extraction and fast high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1110. n.º 1-2 (2006). p. 61-5.
- POZO-BAYON, M. A.; HERNANDEZ, M. T.; MARTIN-ALVAREZ, P. J.; POLO, M. C. - Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 51. n.º 7 (2003). p. 2089-95.
- PUSSA, T.; FLOREN, J.; KULDKEPP, P.; RAAL, A. - Survey of grapevine *Vitis vinifera* stem polyphenols by liquid chromatography-diode array detection-tandem mass

- spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 54. n.º 20 (2006). p. 7488-94.
- RALHAN, R.; PANDEY, M. K.; AGGARWAL, B. B. - Nuclear factor-kappa B links carcinogenic and chemopreventive agents. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*. Vol. 1. (2009). p. 45-60.
- RATOLA, N.; FARIA, J. L.; ALVES, A. - Analysis and quantification of trans-resveratrol in wines from Alentejo region (Portugal). *Food Technology and Biotechnology*. Vol. 42. n.º 2 (2004). p. 125-30.
- REGO, D.; RODRIGUES, C. - Influência dos compostos fenólicos do vinho na saúde humana. *Enologia*. Vol. 45. (2005). p. 34-44.
- RENAUD, S.; DELORGERIL, M. - Wine, alcohol, platelets, and the french paradox for coronary heart-disease. *Lancet*. Vol. 339. n.º 8808 (1992). p. 1523-6.
- REVILLA, E.; RYAN, J. M. - Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. *Journal of Chromatography A*. Vol. 881. n.º 1-2 (2000). p. 461-9.
- RODRIGUEZ-DELGADO, M. A.; GONZALEZ, G.; PEREZ-TRUJILLO, J. P.; GARCIA-MONTELONGO, F. J. - trans-Resveratrol in wines from the Canary Islands (Spain). Analysis by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. Vol. 76. n.º 3 (2002). p. 371-5.
- RODRIGUEZ-DELGADO, M. A.; MALOVANA, S.; PEREZ, J. P.; BORGES, T.; MONTELONGO, F. J. G. - Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*. Vol. 912. n.º 2 (2001). p. 249-57.
- ROMERO-PEREZ, A. I.; IBERN-GOMEZ, M.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; DE LA TORRE-BORONAT, M. C. - Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 47. n.º 4 (1999). p. 1533-6.
- ROMERO-PEREZ, A. I.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; ANDRES-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*. Vol. 49. n.º 1 (2001). p. 210-5.

- ROMERO-PEREZ, A. I.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; WATERHOUSE, A. L.; DE LA TORRE-BORONAT, M. C. - Levels of *cis*- and *trans*-resveratrol and their glucosides in white and rose *Vitis vinifera* wines from Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 44. n.º 8 (1996). p. 2124-8.
- RUDNITSKAYA, A.; ROCHA, S. M.; LEGIN, A.; PEREIRA, V.; MARQUES, J. C. - Evaluation of the feasibility of the electronic tongue as a rapid analytical tool for wine age prediction and quantification of the organic acids and phenolic compounds. The case-study of Madeira wine. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 662. n.º 1 (2010). p. 82-9.
- RUGGIERO, P.; ROSSI, G.; TOMBOLA, F.; PANCOTTO, L.; LAURETTI, L.; DEL GIUDICE, G.; ZORATTI, M. - Red wine and green tea reduce *H pylori*- or *VacA*-induced gastritis in a mouse model. *World Journal of Gastroenterology*. Vol. 13. n.º 3 (2007). p. 349-54.
- RUPPRICH, N.; KINDL, H. - Stilbene synthases and stilbenecarboxylate synthases, I Enzymatic synthesis of 3,5,4-trihydroxystilbene from *p*-coumaroyl coenzyme A and malonyl coenzyme A. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie*. Vol. 359. n.º 2 (1978). p. 165-72.
- SAKKIADI, A. V.; GEORGIU, C. A.; HAROUTOUNIAN, S. A. - A standard addition method to assay the concentration of biologically interesting polyphenols in grape berries by reversed-phase HPLC. *Molecules*. Vol. 12. n.º 9 (2007). p. 2259-69.
- SANCHEZ, J. B. J.; CORRAL, E. C.; DELGADO, M. J. S.; OREA, J. M.; URENA, A. G. - Analysis of *trans*-resveratrol by laser ionization mass spectrometry and HPLC with fluorescence detection - Comparison between both techniques. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1074. n.º 1-2 (2005). p. 133-8.
- SANDERS, T. H.; MCMICHAEL, R. W.; HENDRIX, K. W. - Occurrence of resveratrol in edible peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 48. n.º 4 (2000). p. 1243-6.
- SAVINO, M.; SURIANO, S.; LOVINO, R.; TAMBORRA, P. - Screening for some secondary metabolites, important for human health, in different South Italian wines. *Proceedings of the International Workshop on Advances in Grapevine and Wine Research*. n.º 754 (2007). p. 587-92.
- SCIENCE PHOTO LIBRARY. Disponível em WWW: <<http://www.sciencephoto.com/index.html>> (consultado em setembro 2010).

- SGAMBATO, A.; ARDITO, R.; FARAGLIA, B.; BONINSEGNA, A.; WOLF, F. I.; CITTADINI, A. - Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutation Research*. Vol. 496. n.º 1-2 (2001). p. 171-80.
- SHAKIBAEI, M.; HARIKUMAR, K. B.; AGGARWAL, B. B. - Resveratrol addiction: to die or not to die. *Molecular Nutrition & Food Research*. Vol. 53. n.º 1 (2009). p. 115-28.
- SHAN, B.; CAI, Y. Z.; BROOKS, J. D.; CORKE, H. - Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents. *Food Chemistry*. Vol. 109. n.º 3 (2008). p. 530-7.
- SHISHODIA, S.; AGGARWAL, B. B. - Resveratrol in health and disease. Boca Raton: CRC Press, 2006.
- SI, W.; GONG, J.; TSAO, R.; KALAB, M.; YANG, R.; YIN, Y. - Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1125. n.º 2 (2006). p. 204-10.
- SIEMANN, E. H.; CREASY, L. L. - Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. Vol. 43. (1992). p. 49-52.
- SIGNORELLI, P.; GHIDONI, R. - Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. Vol. 16. n.º 8 (2005). p. 449-66.
- SMITH, P. J.; BLUNT, N.; WILTSHIRE, M.; HOY, T.; TEESDALE-SPITTLE, P.; CRAVEN, M. R.; WATSON, J. V.; AMOS, W. B.; ERRINGTON, R. J.; PATTERSON, L. H. - Characteristics of a novel deep red/infrared fluorescent cell-permeant DNA probe, DRAQ5, in intact human cells analyzed by flow cytometry, confocal and multiphoton microscopy. *Cytometry*. Vol. 40. n.º 4 (2000). p. 280-91.
- SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. - Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry*. Vol. 30. n.º 2 (1997a). p. 91-113.
- SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. - Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. Vol. 11. n.º 5 (1997b). p. 287-313.
- SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. - The world of resveratrol. *Nutrition and Cancer Prevention*. Vol. 492. (2001). p. 159-82.

- SOLNICK, J.V.; P., VANDAMME - Taxonomy of *Helicobacter* Genus In MOBLEY H. L. T.; MENDZ G. L.; HAZELL S. L. *Helicobacter pylori* physiology and genetics. Washington: ASM, 2001.
- SORBERG, M.; NILSSON, M.; HANBERGER, H.; NILSSON, L. E. - Morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid form. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. Vol. 15. n.º 3 (1996). p. 216-9.
- SOUSA, J. C. - Manual de Antibióticos Antibacterianos. 2ªEdição. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, 2006.
- SOUTO, A. A.; CARNEIRO, M. C.; SEFERIN, M.; SENNA, M. J. H.; CONZ, A.; GOBBI, K. - Determination of *trans*-resveratrol concentrations in Brazilian red wines by HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*. Vol. 14. n.º 4 (2001). p. 441-5.
- SPACIL, Z.; SHARIATGORJI, M.; AMINI, N.; SOLICH, P.; ILAG, L. L. - Matrix-less laser desorption/ionisation mass spectrometry of polyphenols in red wine. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. Vol. 23. n.º 12 (2009). p. 1834-40.
- SPANILA, M.; PAZOUREK, J.; FARKOVA, M.; HAVEL, J. - Optimization of solid-phase extraction using artificial neural networks in combination with experimental design for determination of resveratrol by capillary zone electrophoresis in wines. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1084. n.º 1-2 (2005). p. 180-5.
- SPRANGER, I.; SUN, B. - Polifenóis, qualidade do vinho e saúde humana. *Vida Rural*. Vol. 1723. (2007). p. 32-4.
- STECHEER, G.; HUCK, C. W.; POPP, M.; BONN, G. K. - Determination of flavonoids and stilbenes in red wine and related biological products by HPLC and HPLC-ESI-MS-MS. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. Vol. 371. n.º 1 (2001). p. 73-80.
- STERVBO, U.; VANG, O.; BONNESEN, C. - A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chemistry*. Vol. 101. n.º 2 (2007). p. 449-57.
- STOJANOVIC, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. - Efficiency and mechanism of the antioxidant action of *trans*-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 391. n.º 1 (2001). p. 79-89.
- 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*. Vol. 563. n.º 1-2 (2006). p. 382-90.
- TAKAOKA, M. - Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). *Journal of the Faculty of Science Hokkaido Imperial University, Series III*. Vol. 3. n.º 1 (1940). p. 1-16.
- TAROLA, A. M.; MILANO, F.; GIANNETTI, V. - Simultaneous determination of phenolic compounds in red wines by HPLC-UV. *Analytical Letters*. Vol. 40. n.º 12 (2007). p. 2433-45.
- TEDESCO, I.; RUSSO, M.; RUSSO, P.; IACOMINO, G.; RUSSO, G. L.; CARRATURO, A.; FARUOLO, C.; MOIO, L.; PALUMBO, R. - Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. Vol. 11. n.º 2 (2000). p. 114-9.
- TEGOS, G.; STERMITZ, F. R.; LOMOVSKAYA, O.; LEWIS, K. - Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 46. n.º 10 (2002). p. 3133-41.
- THYAGARAJAN, S. P.; RAY, P.; DAS, B. K.; AYYAGARI, A.; KHAN, A. A.; DHARMALINGAM, S.; RAO, U. A.; RAJASAMBANDAM, P.; RAMATHILAGAM, B.; BHASIN, D.; SHARMA, M. P.; NAIK, S. R.; HABIBULLAH, C. M. - Geographical difference in antimicrobial resistance pattern of *Helicobacter pylori* clinical isolates from Indian patients: Multicentric study. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. Vol. 18. n.º 12 (2003). p. 1373-8.
- TOKUSOGLU, O.; UNAL, M. K.; YEMIS, F. - Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass Spectrometry (GC-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 53. n.º 12 (2005). p. 5003-9.
- TOMB, J. F.; WHITE, O.; KERLAVAGE, A. R.; CLAYTON, R. A.; SUTTON, G. G.; FLEISCHMANN, R. D.; KETCHUM, K. A.; KLENK, H. P.; GILL, S.; DOUGHERTY, B. A.; NELSON, K.; QUACKENBUSH, J.; ZHOU, L.; KIRKNESS, E. F.; PETERSON, S.; LOFTUS, B.; RICHARDSON, D.; DODSON, R.; KHALAK, H. G.; GLODEK, A.; MCKENNEY, K.; FITZGERALD, L. M.; LEE, N.; ADAMS, M. D.; HICKEY, E. K.; BERG, D. E.; GOCAYNE, J. D.; UTTERBACK, T. R.; PETERSON, J. D.; KELLEY, J. M.; COTTON, M. D.; WEIDMAN, J. M.; FUJII, C.; BOWMAN, C.; WATTHEY, L.; WALLIN, E.; HAYES, W. S.; BORODOVSKY, M.; KARP, P. D.; SMITH, H. O.;

- FRASER, C. M.; VENTER, J. C. - The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. Vol. 388. n.º 6642 (1997). p. 539-47.
- TOMBOLA, F.; CAMPELLO, S.; DE LUCA, L.; RUGGIERO, P.; DEL GIUDICE, G.; PAPINI, E.; ZORATTI, M. - Plant polyphenols inhibit VacA, a toxin secreted by the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *FEBS Letters*. Vol. 543. n.º 1-3 (2003). p. 184-9.
- TORACCHIO, S.; MARZIO, L. - Primary and secondary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated in central Italy during the years 1998-2002. *Digestive and Liver Disease*. Vol. 35. n.º 8 (2003). p. 541-5.
- TOSUN, I.; INKAYA, A. N. - Resveratrol as a health and disease benefit Agent. *Food Reviews International*. Vol. 26. n.º 1 (2010). p. 85-101.
- TRELA, B. C.; WATERHOUSE, A. L. - Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 44. n.º 5 (1996). p. 1253-7.
- VALE, F. F.; VITOR, J. M. B. - Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: Does food play a role in rural and urban areas? *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 138. n.º 1-2 (2010). p. 1-12.
- VELAZQUEZ, M.; FEIRTAG, J. M. - *Helicobacter pylori*: characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating foods and water. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 53. n.º 2-3 (1999). p. 95-104.
- VIAN, M. A.; TOMAO, V.; GALLET, S.; COULOMB, P. O.; LACOMBE, J. M. - Simple and rapid method for *cis*- and *trans*-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using chromolith columns. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1085. n.º 2 (2005). p. 224-9.
- VINAS, P.; CAMPILLO, N.; HERNANDEZ-PEREZ, M.; HERNANDEZ-CORDOBA, M. - A comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction coupled to liquid chromatography for the rapid analysis of resveratrol isomers in wines, musts and fruit juices. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 611. n.º 1 (2008). p. 119-25.
- VINAS, P.; CAMPILLO, N.; MARTINEZ-CASTILLO, N.; HERNANDEZ-CORDOBA, M. - Solid-phase microextraction on-fiber derivatization for the analysis of some polyphenols in wine and grapes using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1216. n.º 9 (2009). p. 1279-84.
- VINAS, P.; LOPEZ-ERROZ, C.; MARIN-HERNANDEZ, J. J.; HERNANDEZ-CORDOBA, M. - Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and
-

- fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. Vol. 871. n.º 1-2 (2000). p. 85-93.
- VITRAC, X.; BORNET, A.; VANDERLINDE, R.; VALLS, J.; RICHARD, T.; DELAUNAY, J. C.; MERILLON, J. M.; TEISSEDE, P. L. - Determination of stilbenes (delta-viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, epsilon-viniferin) in Brazilian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 53. n.º 14 (2005). p. 5664-9.
- VLASE, L.; KISS, B.; LEUCUTA, S. E.; GOCAN, S. - A rapid method for determination of resveratrol in wines by HPLC-MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. Vol. 32. n.º 14 (2009). p. 2105-21.
- VOLAND, P.; WEEKS, D. L.; MARCUS, E. A.; PRINZ, C.; SACHS, G.; SCOTT, D. - Interactions among the seven *Helicobacter pylori* proteins encoded by the urease gene cluster. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. Vol. 284. n.º 1 (2003). p. G96-G106.
- WAITE, J. G.; DAESCHEL, M. A. - Contribution of wine components to inactivation of food-borne pathogens. *Journal of Food Science*. Vol. 72. n.º 7 (2007). p. M286-M91.
- WALLE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M. H.; OATIS, J. E., JR.; WALLE, U. K. - High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition*. Vol. 32. n.º 12 (2004). p. 1377-82.
- WANG, S. Y.; CHEN, C. T.; WANG, C. Y.; CHEN, P. - Resveratrol content in strawberry fruit is affected by preharvest conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 55. n.º 20 (2007). p. 8269-74.
- WANG, W. B.; LAI, H. C.; HSUEH, P. R.; CHIOU, R. Y. Y.; LIN, S. B.; LIAW, S. J. - Inhibition of swarming and virulence factor expression in *Proteus mirabilis* by resveratrol. *Journal of Medical Microbiology*. Vol. 55. n.º 10 (2006). p. 1313-21.
- 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*. Vol. 50. n.º 3 (2002). p. 431-5.
- WARREN, J. R.; MARSHALL, B. J. - Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. Vol. 1. n.º 8336 (1983). p. 1273-5.
- WEBER, K.; SCHULZ, B.; RUHNKE, M. - Resveratrol and its antifungal activity against *Candida* species. *Mycoses*. (2009).

- WEISSE, M. E.; EBERLY, B.; PERSON, D. A. - Wine as a digestive aid: comparative antimicrobial effects of bismuth salicylate and red and white wine. *British Medical Journal*. Vol. 311. n.º 7021 (1995). p. 1657-60.
- WHYTE, L.; HUANG, Y. Y.; TORRES, K.; MEHTA, R. G. - Molecular mechanisms of resveratrol action in lung cancer cells using dual protein and microarray analyses. *Cancer Research*. Vol. 67. n.º 24 (2007). p. 12007-17.
- WIEDER, T.; PROKOP, A.; BAGCI, B.; ESSMANN, F.; BERNICKE, D.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; DORKEN, B.; SCHMALZ, H. G.; DANIEL, P. T.; HENZE, G. - Piceatannol, a hydroxylated analog of the chemopreventive agent resveratrol, is a potent inducer of apoptosis in the lymphoma cell line BJAB and in primary, leukemic lymphoblasts. *Leukemia*. Vol. 15. n.º 11 (2001). p. 1735-42.
- WILEY, J. M.; SHERWOOD, L. M.; WOLLVERTON, C. J. - Prescott's Principles of Microbiology. New York: McGraw-Hill Higher Education, 2009.
- XIAO, Z. P.; SHI, D. H.; LI, H. Q.; ZHANG, L. N.; XU, C.; ZHU, H. L. - Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of *Helicobacter pylori* urease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Vol. 15. n.º 11 (2007). p. 3703-10.
- YASAR, B.; ABUT, E.; KAYADIBI, H.; TOROS, B.; SEZIKLI, M.; AKKAN, Z.; KESKIN, O.; OVUNC KURDAS, O. - Efficacy of probiotics in *Helicobacter pylori* eradication therapy. *The Turkish Journal of Gastroenterology*. Vol. 21. n.º 3 (2010). p. 212-7.
- YU, C.; SHIN, Y. G.; CHOW, A.; LI, Y.; KOSMEDER, J. W.; LEE, Y. S.; HIRSCHELMAN, W. H.; PEZZUTO, J. M.; MEHTA, R. G.; VAN BREEMEN, R. B. - Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. *Pharmaceutical Research*. Vol. 19. n.º 12 (2002). p. 1907-14.
- ZAIDI, S. F.; AHMED, K.; YAMAMOTO, T.; KONDO, T.; USMANGHANI, K.; KADOWAKI, M.; SUGIYAMA, T. - Effect of resveratrol on *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 secretion, reactive oxygen species generation and morphological changes in human gastric epithelial cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. Vol. 32. n.º 11 (2009). p. 1931-5.
- ZAMIN, L. L.; DILLENBURG-PILLA, P.; ARGENTA-COMIRAN, R.; HORN, A. P.; SIMAO, F.; NASSIF, M.; GERHARDT, D.; FROZZA, R. L.; SALBEGO, C. - Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of PI3-K pathway. *Neurobiology of Disease*. Vol. 24. n.º 1 (2006). p. 170-82.

ZHU, Y. X.; COURY, L. A.; LONG, H.; DUDA, C. T.; KISSINGER, C. B.; KISSINGER, P. T. - Liquid chromatography with multichannel electrochemical detection for the determination of resveratrol in wine, grape juice, and grape seed capsules with automated solid phase extraction. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. Vol. 23. n.º 10 (2000). p. 1555-64.