



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

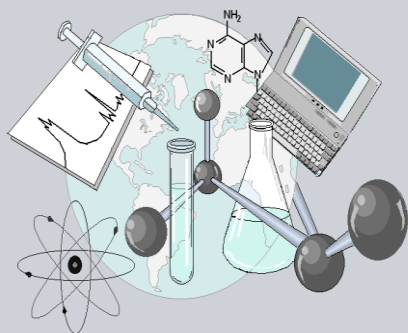
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Análise por injeção em fluxo para determinação da capacidade antioxidante total de vinhos utilizando o método DPPH: Otimização das condições a partir metodologia de superfície de resposta”

Dissertação apresentada por **Lais Bukman** ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

CCE



Centro de
Ciências Exatas

MARINGÁ, ABRIL /2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Análise por injeção em fluxo para determinação da capacidade antioxidante total de vinhos utilizando o método DPPH: Otimização das condições a partir metodologia de superfície de resposta

Dissertação apresentada por **Lais Bukman** ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Vitor de Cinque Almeida

MARINGÁ, ABRIL DE 2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

B932a Bukman, Lais
Análise por injeção em fluxo para determinação da capacidade antioxidante total de vinhos utilizando o método DPPH: otimização das condições a partir metodologia de superfície de resposta / Lais Bukman. -- Maringá, 2012.
57 f. : il., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Vitor de Cinque Almeida.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2012.

1. Vinho - Análise por injeção em fluxo. 2. Vinho - Atividade antioxidante. I. Almeida, Vitor de Cinque, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDD 21.ed.545
663.2

ECSL

Dedico este trabalho aos meus pais Haroldo e Olga pelo incentivo e dedicação todos estes anos.

Ao Guilherme pelo verdadeiro sentimento de irmandade.

“Escolha um trabalho que você ame e não terá que trabalhar um único dia em sua vida.”

Confúcio

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças para seguir em frente sempre.

Aos meus pais Haroldo e Olga pelo amor, carinho, apoio e pelos ensinamentos.

Ao meu irmão Guilherme pelo companheirismo e amizade.

Aos meus padrinhos Martha e Anibal, e ao meu afilhado Wilson, que se tornarão parte da família.

As minhas princesas Lola, Mel, Nala e Preta, e também a Mag e a Mili que não estão mais presentes. Quem tem cachorros sabe o que é amizade verdadeira sem nenhum interesse em troca, apenas carinho e amor.

Aos meus avôs pelos carinhos e almoços nos finais de semana.

Aos meus amigos de graduação por tornarem a vivência em sala muito mais alegre, e os finais de semana muito mais divertidos.

A todos os meus amigos da Pós- Graduação, em especial Alessandro, Bianca, Diogo, Eduardo, Heveline e Manu por se tornarem minha família em Maringá.

Aos meus companheiros de laboratório, em especial Lídia, André, Alessandro, Nathália, Maisa e Elizangela pelos momentos de descontração e risadas.

Ao Prof. Dr. Vitor de Cinque Almeida pela orientação, oportunidade e paciência e também por partilhar seu tempo, sabedoria, conselho e amizade.

Ao Prof. Dr. Jesuí Virgílio e a Prof. Dra. Juliana Garcia por toda assistência necessária para realização deste trabalho.

A todos os professores do departamento de química pelo conhecimento adquirido nas aulas.

A Capes pelo apoio financeiro.

A todos que me ajudaram de alguma forma meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Radicais Livres	4
2.2. Antioxidantes	5
2.3. Produção nacional e mundial de uvas e vinhos	6
2.4. Compostos fenólicos presentes em uvas e vinhos	9
2.5. Métodos de avaliação da atividade antioxidante	13
2.5.1. Análise de DPPH	14
2.5.2. Determinação de compostos fenólicos totais	15
2.6. Sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA)	15
2.7. Otimização	18
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivos gerais	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. Amostras	22
4.2. Preparo das soluções	22
4.3. DPPH convencional	23
4.4. Determinação de compostos fenólicos totais	23
4.5. Sistema FIA adaptado ao método DPPH	24
4.6. Planejamento experimental	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1. Cálculos da resposta	28
5.2. Planejamento fatorial composto central rodável	31
5.3. Análise das superfícies de resposta	35
5.4. Ensaaios otimizados	38

5.5. Teste de diluição nas amostras de vinhos	40
5.6. Aplicações do método em amostras de vinho	42
5.7. Compostos fenólicos Totais	46
6. CONCLUSÕES	49
7. REFERÊNCIAS	51

RESUMO

Os antioxidantes são substâncias que reagem com os radicais livres estabilizando e impedindo suas ações maléficas ao organismo e estão presentes em uma grande variedade de alimentos e bebidas. Devido à importância da atividade antioxidante em alimentos, vários métodos analíticos têm sido propostos, dentre os quais incluem o método FRAP, ORAC, Fenólicos Totais e o DPPH. O objetivo principal do trabalho foi propor uma metodologia analítica utilizando um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA), com configuração de zonas coalescentes, para determinação da atividade antioxidante total por captura do radical DPPH. As condições do sistema FIA foram otimizadas através da metodologia de superfície de resposta usando um planejamento fatorial composto central rodável (PFCCR). Os parâmetros de otimização estudados foram: fluxo do transportador, comprimento das alças de amostragem e do reagente e comprimento do reator. De acordo com os resultados, os níveis dos parâmetros selecionados foram: fluxo de $1,12 \text{ mL min}^{-1}$, comprimento das alças de $18,5 \text{ cm}$ e comprimento do reator de $234,6 \text{ cm}$. Os limites de detecção e quantificação foram $2,647 \cdot 10^{-6}$ e $8,824 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ácido gálico / mL de vinho. O método proposto apresentou frequência analítica de 41 análises por hora e uma economia de 58% no consumo do reagente DPPH e 62,60% no consumo do agente transportador metanol em comparação com o método convencional. O ensaio DPPH adaptado ao sistema FIA de zonas coalescentes, nas condições otimizadas foi utilizado para determinar a atividade antioxidante total de amostras de vinho.

Palavras Chave: Análises por injeção em fluxo, metodologia de superfície de resposta, atividade antioxidante, vinhos.

ABSTRACT

Antioxidants are substances that react with free radicals stabilizing and preventing their harmful actions to the organism and are present in a wide variety of foods and beverages. Due to importance of antioxidant activity in the some foods, several analytical methods have been proposed among them include FRAP, ORAC, total polyphenol content and DPPH methods. The main objective of this study is to propose an analytical methodology using a flow injection analysis system (FIA), with a merging zones configuration, for determination of total antioxidant activity by DPPH radical scavenging assay. The FIA system conditions were optimized with the response surface methodology using the central composite rotatable design. The optimization parameters studied were: the carrier flow rate, the lengths of the sample and reagent loops and the length of the reactor. According to the results, levels of selected parameters were: carrier flow rate 1.12 mL min^{-1} , length of the loops 18.5 cm and length of the reactor 234.6 cm. The detection and quantification limits were, respectively, 2.647 and $8.824 \mu \text{ mol L}^{-1}$ acid galic / mL wine. The proposed method had an analytical frequency of 41 samples per hour and a 58% saving in the consumption of reagent DPPH and 62.6% in the consumption of carrier agent methanol compared to the conventional method. The DPPH assay adapted to the FIA system under the optimization conditions was utilized to determine the antioxidant activity of wine samples.

Keywords: flow injection analysis, response surface methodology, antioxidant activity, wine.

LISTA DE ABREVIATURAS

ERO	Espécies reativas do oxigênio
DPPH	(2,2-difenil-1-picrilhidrazil)
FRAP	(Ferric Reducing Antioxidant Power)
ABTS	(2,2-azino-bis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)
(H ₃ PMo ₁₂ O ₄₀)	Ácido fosfomolibdílico
(H ₃ PW ₁₂ O ₄₀)	Ácido fosfotungstico
(Mo ₈ O ₂₃)	óxido de molibdênio
(W ₈ O ₂₃)	óxido de tungstênio
EAG	Equivalentes de ácido gálico
FIA	Análise por injeção em fluxo
MSR	Metodologia de superfície de resposta
PFCCR	Planejamento fatorial composto central rodável
L1 e L2	Alças de amostragem
W	Descarte
S	Amostra
B	Reator
DET	Detector
Trolox	(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico)
AAT	Atividade antioxidante total
ETR	Equivalentes de Trolox

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura genérica dos flavonóides (Balasundram, N. et al., 2006). 10
- Figura 2. Estruturas químicas da epicatequina, epigallocatequina, resveratrol, quercetina, miricetina, kaempferol. 12
- Figura 3. Reação de inibição do radical DPPH por um antioxidante AH. 14
- Figura 4. Configuração do sistema FIA em linha única a), em confluência b) e em zonas coalescentes c). L₁ é a alça de amostragem, L₂ é a alça do reagente, R é o fluxo do reagente, Y é a confluência, B é a bobina de reação, C₁ e C₂ é o fluido carreador, W é o descarte e DET é o detector 17
- Figura 5. Representação esquemática do sistema FIA proposto para análise total de antioxidantes. (a) posição de amostragem e (b) posição de injeção. L₁ e L₂ representam as alças de amostragem e reagente, W o descarte, S a amostra, R o reagente, B o reator e DET o detector. 25
- Figura 6. Diagrama do método proposto para determinação da atividade antioxidante para o ensaio nas condições: fluxo de 1,00 mL min⁻¹, comprimento das alças de amostragem de 20,0 cm e comprimento do reator de 400 cm. Os picos referem-se as análises em triplicata: os três primeiros picos correspondem apenas a solução de DPPH (8,0.10⁻⁴ mol L⁻¹), sem injeção de ácido gálico, e os demais picos as injeções de ácido gálico nas concentrações de 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0 μ mol L⁻¹, respectivamente. 29

Figura 7. Comparação das respostas observadas pelas respostas previstas pelo modelo quadrático	35
Figura 8. Gráficos de superfícies tridimensionais para as interações comprimento do reator-comprimento da alça (a) comprimento da alça e fluxo do carregador (b) e comprimento do reator e fluxo do carregador (c).	37
Figura 9. Interação entre o comprimento da alça e do reator (cm).	38
Figura 10. Espectros de absorção do reagente DPPH ($6,0 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1}) e do vinho tinto popular nas diluições 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 e 1:25.	41
Figura 11. Espectros de absorção do reagente DPPH ($6,0 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1}) e do vinho branco riesling sem diluição, 1:5, 1:10.	41
Figura 12. Fiagrama para o ensaio nas condições: fluxo de 1,12 mL min^{-1} , comprimento das alças de amostragem de 18,5 cm e comprimento do reator de 234,6 cm. Os picos referem-se às análises em triplicata: os três primeiros picos correspondem apenas a solução de DPPH ($8,0 \cdot 10^{-4}$ mol L^{-1}), sem injeção de Trolox, e os demais picos as injeções de Trolox nas concentrações de 8,0; 16,0; 24,0 e 32,0 mol L^{-1} , respectivamente.	42
Figura 13. Fiagrama do método proposto para determinação da atividade antioxidante para a injeção do DPPH ($8,0 \cdot 10^{-4}$ mol L^{-1}) e para as amostras de vinho sendo: vinho popular tinto (Vp) e para os vinhos finos tem-se, Tannat (Tn), Cabernet Sauvignon (Cs), Merlot (Mt), mistura dos três uvas anteriores (Ctm), Chardonay (Cd) e mistura das uvas Riesling Itálico e Chardonay (Rc).	43

Figura 14. Correlação entre os resultados da atividade antioxidante obtidos pelo método convencional e método proposto para as amostras de vinho sendo os valores ideais em vermelho e os experimentais em preto. 45

Figura 15. Correlação da atividade antioxidante total com o conteúdo de fenólicos totais nas amostras de vinhos. 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis reais com suas respectivas variáveis codificadas aplicadas no PFCCR para a otimização do método da análise da atividade antioxidante total através do sistema FIA proposto.	31
Tabela 2. Matriz planejamento aplicado ao planejamento fatorial composto central rodável (PFCCR).	32
Tabela 3. Análise da variância (ANOVA) para os fatores x_1 , x_2 e x_3 .	33
Tabela 4. Análise da variância ANOVA para o modelo ajustado	35
Tabela 5. Condições ótimas sugeridas pelo modelo e as respostas dos valores previstos e obtidos experimentalmente.	39
Tabela 6. Atividade antioxidante total (AAT) das amostras de vinho obtida através do método convencional e pelo método proposto.	45
Tabela 7. Conteúdo de compostos fenólicos totais, em equivalentes de ácido gálico (EAG) por mL de vinho, para as nove amostras de vinho.	47

1. INTRODUÇÃO

Radicais livres são átomos ou moléculas que contêm elétrons desemparelhados em sua camada externa e que, por sua vez, são instáveis e muito reativos (Ferreira & Matsubara, 2007). Nos seres vivos são formados a partir da respiração aeróbica através do mecanismo de redução do oxigênio molecular na mitocôndria. Cerca de 5 % do oxigênio absorvido pelos seres vivos é transformado em radicais livres, sendo que as principais espécies são: íon superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (HO^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e alcoxila (RO^{\cdot}). Fatores exógenos como cigarro, ozônio, radiações gama, radiação ultravioleta, medicamentos e estresse podem intensificar a formação dos radicais livres no organismo (Bianchi & Antunes, 1999).

O desequilíbrio no organismo entre as moléculas oxidantes, como os radicais livres, e as substâncias consideradas antioxidantes é comumente chamado de estresse oxidativo (Cerqueira et al., 2007). Este desequilíbrio tem sido associado ao desenvolvimento de várias doenças, incluindo doenças degenerativas, neurológicas, câncer, hipertensão e o envelhecimento, uma vez que, os radicais livres causam danos oxidativos nos tecidos, células, e no DNA, (Bianchi & Antunes, 1999; Cerqueira et al., 2007).

Os antioxidantes são substâncias que reagem com os radicais livres estabilizando-os e impedindo suas ações maléficas ao organismo, e que de uma forma generalizada podem ser classificados em enzimáticos e não-enzimáticos (Bianchi & Antunes., 1999). Os enzimáticos correspondem às enzimas superóxido dismutase, a catalase e a peroxidase. Os não enzimáticos são substâncias formadas por vitaminas, minerais e pigmentos obtidos através da

ingestão de alimentos, tais como: frutas, legumes e algumas bebidas (Oliveira et al., 2009).

O vinho é uma bebida alcoólica produzida pelo sumo de frutas de uva, o qual o consumo, de acordo com alguns estudos, está relacionado com a prevenção de diversas doenças. A sua ação benéfica à saúde deve-se a presença de compostos fenólicos de ação antioxidantes em sua composição, tais como os flavonóides e os ácidos fenólicos (Roussis et al., 2008; Arnous et al., 2002).

Devido à importância dos antioxidantes para a saúde, várias metodologias têm sido propostas e utilizadas para determinar a atividade ou capacidade antioxidantes de alimentos e bebidas, como por exemplo, os ensaios Folin-Ciocalteu, ABTS (2,2-azino-bis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico), FRAP(Ferric Reducing Antioxidant Power) e DPPH(2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Arnous et al.,2002; Granato, et al., 2010; Roussis, et al., 2008). Estes métodos, por sua vez, possuem uma característica em comum que é o alto custo das análises.

Os sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA) são definidos como um método de automatização de procedimentos analíticos no qual ocorre a injeção da amostra líquida em um fluxo contínuo do carregador apropriado (Ruzicka et al., 1981). Os sistemas FIA possuem vantagens como: a possibilidade de automação, alta frequência analítica e baixo consumo de reagentes (Ruzicka et al., 1981; Karlberg & Pacey, 1989). Alguns trabalhos envolvendo o sistema FIA e a determinação da atividade antioxidante de uma variedade de amostras têm sido relatado na literatura (Magalhães et al., 2006; Magalhães et al., 2008; Thongchai et al., 2009 e Ukeda et al., 2002).

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é comumente utilizada para a otimização de técnicas analíticas. Esta otimização tem como objetivo analisar as condições utilizadas a fim de se obter melhores respostas (Bezerra et al., 2008). A MSR consiste em duas etapas, modelagem e deslocamento, que podem ser repetidas quantas vezes for necessário a fim de se obter a região ótima da superfície de resposta (Barros Neto et al., 2007; Bezerra et al., 2008; Karacabey & Mazza, 2010; Lima et al., 2011; Prasad et al., 2011; Wijngaard et al., 2011).

Tendo em vista o alto poder antioxidante dos vinhos, assim como o custo das análises da atividade antioxidante envolvendo o radical DPPH, uma metodologia usando sistemas FIA de zonas coalescentes foi proposta. Adicionalmente, as condições do método foram otimizadas a partir de técnicas multivariadas de análise.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Radicais livres

Radicaís livres são definidos como átomos ou moléculas que contém um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada. Devido a esta característica, são instáveis, muito reativos e com tempo de meia vida curto (Bianchi & Antunes, 1999, Ferreira & Matsubara, 2007). A reatividade destas espécies promove uma oxidação prejudicial que pode danificar membranas, conteúdos celulares, proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA. Os radicaís livres podem ser gerados nos citoplasmas, nas mitocôndrias ou nas membranas sendo que a presença destas espécies é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais. A principal fonte de formação dos radicaís livres é o metabolismo normal do oxigênio (O_2). Cerca de 5 % do O_2 absorvido pelos seres vivos sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. Durante este processo são formadas espécies reativas do oxigênio (EROs) como os radicaís superóxido, hidroperoxila, e hidroxila (Ferreira & Matsubara, 2007).

Apesar do peróxido de hidrogênio não ser um radical livre, esta espécie tem alto potencial reativo. Seu tempo de vida, diferente dos radicaís livres, é longo e é capaz de atravessar as membranas nucleares e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (Ferreira & Matsubara, 2007, Bianchi & Antunes, 1999).

Em uma condição de pró-oxidante, a concentração dos radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular destas espécies ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes. Este desequilíbrio é chamado de estresse oxidativo que é responsável pela maior indução de danos oxidativos provocados pelos radicais livres (Cerqueira et al., 2007). Estes danos têm sido relacionados com a etiologia de diversas doenças, incluindo doenças degenerativas, doenças neurológicas, câncer, hipertensão e no aceleração do processo de envelhecimento (Bianchi & Antunes, 1999, Cerqueira et al., 2007). Fatores exógenos como radiações gama e ultravioleta, ozônio, medicamentos, cigarro e uma dieta pobre em compostos antioxidantes intensificam a formação de radicais livres (Bianchi & Antunes, 1999).

Dentro deste contexto a identificação de compostos antioxidantes vem despertando grande interesse, pois estes podem manter um equilíbrio entre a produção de oxidantes e suas concentrações, minimizando danos oxidativos no organismo.

2.2. Antioxidantes

Compostos antioxidantes podem ser definidos como substâncias que quando presentes em baixas concentrações em comparação com a concentração de uma substância oxidável retardam ou inibem a velocidade de oxidação de biomoléculas. Estas espécies reagem com os radicais livres estabilizando-os e impedindo suas ações maléficas ao organismo (Bianchi & Antunes, 1999, Cerqueira et al., 2007).

Os compostos antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários. Os primários impedem a etapa de propagação dos radicais livres por meio da doação do átomo de hidrogênio presente em sua estrutura. Nesta classe encontram-se os compostos fenólicos, o tocoferol, os aminoácidos, os carotenóides e os antioxidantes sintéticos. Os antioxidantes classificados como secundários atuam de diversas maneiras sob os radicais livres, entre elas destacam-se o bloqueio da decomposição dos peróxidos e hidroperóxidos, convertendo-os em suas formas inativas por ação de agentes redutores; blindagem de íons metálicos; absorção da radiação ultravioleta e inativação das EROs (Maisuthisakul et al., 2007).

Os compostos antioxidantes também podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos. As enzimas antioxidantes são proteínas altamente ativas que aceleram uma reação química. A mais importante é a enzima superóxido dismutase que transforma o radical livre superóxido em peróxido de hidrogênio que posteriormente se decompõe através da enzima catalase e glutathione peroxidase em água e oxigênio. Já os compostos não enzimáticos são obtidos através da dieta, entre os quais se destacam vitaminas, minerais e compostos fenólicos. Estas substâncias são encontradas em uma variedade enorme de frutas, legumes e bebidas (Oliveira et al., 2009).

2.3. Produção nacional e mundial de uvas e vinhos

No Brasil, a vitivinicultura é uma atividade antiga que foi introduzida no país pelos jesuítas no século XVII. No final do século XIX, com a chegada dos imigrantes italianos, a vitivinicultura ganhou impulso e tornou-se atividade sócia

econômica, sobretudo no estado do Rio Grande do Sul, que se tornou a principal região produtora de uvas no país (Mello, 2010; Guerra et al., 2009).

Os maiores produtores de vinho são a França, a Itália, a Espanha, os Estados Unidos e Argentina, sendo que o Brasil é o 16º produtor mundial de vinho (Guerra et al., 2009).

Atualmente, cerca de 50% da produção nacional de uvas é destinada a fabricação de vinhos, sucos e outros derivados da fruta. A produção de uvas se concentra nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do país sendo que o estado do Rio Grande do Sul responde a 90% da produção nacional de vinho. No entanto, 75,26% do vinho fino comercializado no Brasil são importados de outros países e apenas 8% do total produzido no país são exportados (Mello, 2010).

No cenário internacional, a Europa destaca-se como a principal produtora de vinhos e uvas representando 43,14% da produção mundial. O continente europeu destina 85% da uva produzida para a elaboração de vinhos (Mello, 2010).

Diversas regiões brasileiras produzem vinhos finos e vinhos de consumo corrente. Os vinhos finos são aqueles elaborados exclusivamente a partir de variedades européias *Vitis vinifera L.* Entre as principais variedades deste grupo cultivadas no Brasil, pode-se citar: Cabernet Sauvignon, Merlot, Tannat, Chardonnay e Riesling Itálico (Guerra et al., 2009).

Cabernet Sauvignon é uma antiga cultivar da região de Bordeaux, França, e hoje é plantada em diversos países vitícolas. Seu cultivo foi intensificado no final da década de 1980 com a produção de vinhos varietais no estado do Rio Grande do Sul e atualmente é a vinífera tinta mais importante do estado. O vinho produzido através desta variedade é mundialmente reputado pelo seu

caráter varietal, com intensa coloração, riqueza em taninos, complexidade de aroma e pode evoluir em qualidade com alguns anos de envelhecimento. Já a varietal tinta Merlot é originária da região Médoc, França, expandindo seu cultivo para outras regiões da França e para muitos outros países vitícolas. Nos últimos anos, juntamente com a uva Cabernet Sauvignon, tornou-se uma das viníferas tintas mais plantadas no mundo e no Brasil principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina por adaptar-se as condições climáticas do sul do Brasil. Esta variedade origina um vinho de alta qualidade. Também originária da França, na região de Madiran, a uva Tannat começou ser difundida em 1987 na Serra Gaúcha. Seu vinho é rico em cor e em extrato servindo pra corrigir as deficiências, destas características, em outros vinhos ou é comercializado como vinho varietal. Por originar um vinho bastante adstringente, necessita de envelhecimento. Chardonay é uma variedade de uva branca que tem origem da região francesa da Borgonha. No Brasil, seus primeiros cultivares foram na cidade de São Roque, São Paulo, e no estado do Rio Grande do Sul. Esta uva tem sido usada para a elaboração de vinho fino varietal e vinhos espumantes. Já a varietal branca Riesling Itálico é originária do norte da Itália. Foi trazida para o Rio Grande do Sul em 1900 e a partir de 1973 tornou-se uma das principais uvas finas brancas da região. Seu vinho é fino, com aroma sutil e típico e é comercializado como vinho fino de mesa varietal e também é utilizado na elaboração de espumantes bem conceituados (Guerra et al., 2009).

2.4. Compostos fenólicos presentes em uvas e vinhos

O estudo sobre compostos fenólicos da uva e do vinho vem despertando interesse cada vez maior dos pesquisadores devido aos efeitos benéficos associados ao seu consumo.

Entre as frutas, a uva destaca-se como uma das maiores fontes de compostos fenólicos sendo os principais os flavonóides (antocianinas, flavonóis e flavanóis), os etilbenos (resveratrol) e os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos) (Roussis et al., 2008; Granato et al., 2010; Arnous et al., 2002; Abe et al., 2007). Estes compostos são agentes redutores que possuem a capacidade de estabilizar os radicais livres oferecendo proteção contra o estresse oxidativo. Além disto, esta classe de compostos é a mais abundante na dieta humana (Abe et al., 2007).

O conteúdo dos compostos fenólicos presentes na uva varia de acordo com a espécie, maturidade, condições climáticas, e cultivar. Durante o processo de vinificação, os compostos fenólicos são extraídos do bagaço, casca e sementes da uva e transferidos para o vinho. Além disso, a maneira como ocorre este processo também interfere na quantificação destes compostos nos vinhos (Beer et al., 2002; Roussis et al., 2008).

Os flavonóides são os polifenóis mais abundantes nos alimentos e bebidas. Sua estrutura química é composta por dois anéis aromáticos, denominados A e B, unidos por um anel pirano, denominado anel C, conforme mostrado na Figura 1. Devido a uma maior capacidade eletrodadora do anel B, os grupos hidroxilas presentes nas posições 3, 4 ou 5 deste anel são responsáveis pela atividade antioxidante dos flavonóides. Variações nas

configurações no anel C resultam em importantes classes dos flavonóides (Angelo & Jorge, 2006). As principais classes de flavonóides encontradas em uvas e vinhos são os flavanóis, flavonóis e antocianinas (Balasundram et al., 2006; Hollman & Arts, 2000; Rockenbach et al., 2008).

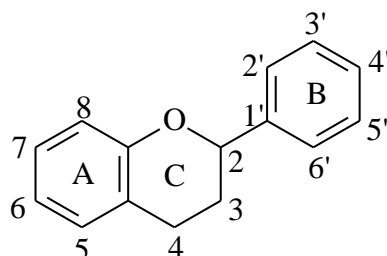


Figura 1. Estrutura genérica dos flavonóides (Balasundram, N. et al., 2006).

Os flavanóis mais abundantes nos vinhos são a catequina, epigallocatequina e epicatequina. Estas substâncias são responsáveis pelo sabor e adstringência desta bebida e encontram-se principalmente nas sementes da uva (Abe et al., 2007).

Dentre os flavonóis, as substâncias que mais se destacam são a quercetina, caempferol e miricetina, os quais atuam como co-pigmentos na coloração das uvas e vinhos. Segundo Cao Y. et al. (2002) a quercetina apresenta ação benéfica na prevenção do câncer.

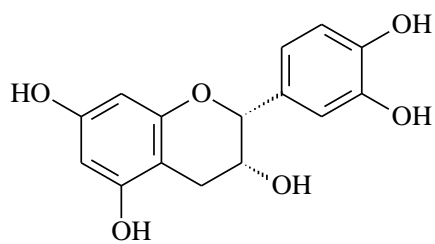
As antocianinas estão presentes apenas nos vinhos tintos e constituem a maior porcentagem de compostos fenólicos presentes nas uvas. São responsáveis pela coloração azul, roxa e vermelha desta bebida (Munhóz-Espada, 1999; Gómez-Migués et al., 2007). Assim, a quantidade de compostos fenólicos presentes nos vinhos tintos é maior do que nos vinhos brancos (Arnous et al., 2002; Roussis et al., 2008).

Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos: (i) derivados do ácido hidroxibenzóico e (ii) do ácido hidroxicinâmicos. Estas substâncias são

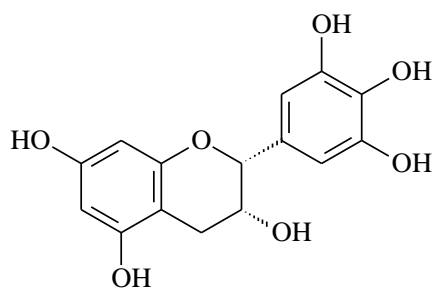
encontradas, em baixas concentrações, nos vinhos brancos e influenciam no seu sabor e aroma (Abe et al., 2007).

O resveratrol é um polifenol pertencente à classe dos etilbenos. São produzidos na uva em resposta as agressões externas como os processos mecânicos, fungos e radiação ultravioleta (Zhang & Bjorn, 2009). Sua forma trans ocorre naturalmente em várias espécies de plantas, porém a uva e seus derivados são a principal fonte de resveratrol na dieta alimentar (Abe et al., 2007; Counet et al., 2006). Sua atividade antioxidante esta relacionada com a sua estrutura (Figura 2), principalmente no número e no arranjo dos grupos hidroxila presentes no anel aromático (Sautter et al., 2005). Sua capacidade de doar os átomos de hidrogênio das hidroxilas para inibição dos radicais livres é responsável pelas ações benéficas do resveratrol, entre elas a prevenção de doenças cardiovasculares, câncer e aterosclerose (Ratna & Simonelli, 2002; Lu & Serrero, 1999; Calabrese, 1999).

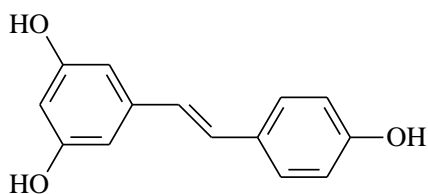
A Figura 2 apresenta as estruturas da epicatequina, epigallocatequina, resveratrol, quercetina, miricetina, kaempferol e a estrutura geral das antocianinas.



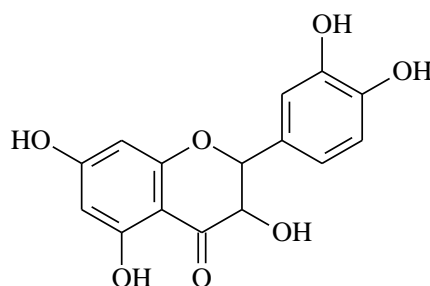
Epicatequina



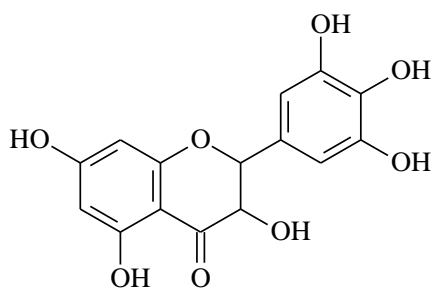
Epigallocatequina



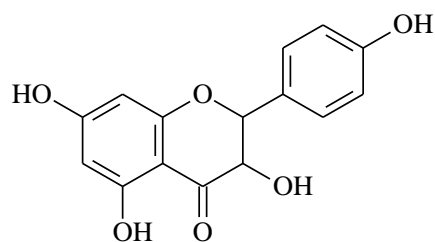
Resveratrol



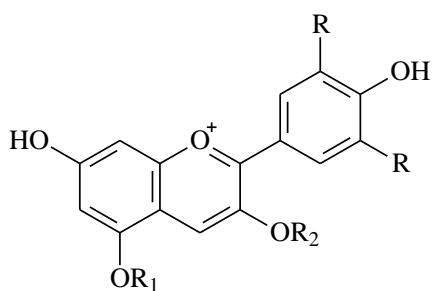
Quercetina



Miricetina



Kaempferol



Estrutura geral das Antocianinas

Figura 2. Estruturas químicas da epicatequina, epigallocatequina, resveratrol, quercetina, miricetina, kaempferol.

2.5. Métodos de avaliação da atividade antioxidante

Devido à importância dos compostos fenólicos, várias metodologias têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante em alimentos e bebidas e outros substratos. Entre elas destacam-se os métodos FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), fenólicos totais, determinação da atividade antioxidante total por captura de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) ou ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico) (Arnous et al., 2002; Granato et al., 2010; Roussis et al., 2008).

A determinação da atividade antioxidante através dos métodos DPPH e ABTS baseia-se na estabilização destes radicais pela doação de um átomo de hidrogênio presente na estrutura química dos antioxidantes. Esta estabilização gera uma mudança de cor que é lida em comprimento de onda de 515 e 734 nm, respectivamente (Roussis et al., 2008).

O ensaio FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant-Power* – Poder antioxidante de redução do ferro) consiste na capacidade do antioxidante do substrato em reduzir o Fe^{3+} para Fe^{2+} em solução, que quando complexado com TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil) – s – trizina) adquire uma coloração azul intensa, possível de medir a absorvância no comprimento de onda de 595 nm (Prior et al., 2005; Krishnaiah et al., 2011).

O método para determinação de compostos fenólicos é baseado na redução do estado de oxidação do molibdênio na presença de compostos fenólicos no substrato. Esta redução provoca uma mudança de cor amarela para azul podendo ser medida no comprimento de onda de 725 nm (Angelo & Jorge, 2007).

2.5.1. Análise de DPPH

A análise de DPPH consiste na reação do antioxidante presente na amostra com certa quantidade do radical DPPH (2,2- difenil -1- picrilhidrazil). Esta reação ocasionará um decréscimo no sinal de absorbância, lido em 517 nm, devido ao descoramento do radical. O cálculo do IC50 é um parâmetro utilizado pelo método, o qual corresponde à quantidade necessária de antioxidante para reduzir em 50 % a absorbância inicial do radical DPPH (Roussis et al., 2008). Os resultados da atividade antioxidante também podem ser expressos em termos de equivalentes de Trolox através de uma curva analítica utilizando o reagente Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetranetilchroman-2-ácido carboxílico) como padrão (Paixão et al., 2007). Este reagente é utilizado por possuir alta atividade antioxidante frente à estabilização de radicais. A reação de inibição do radical DPPH por um antioxidante é apresentada na Figura 3.

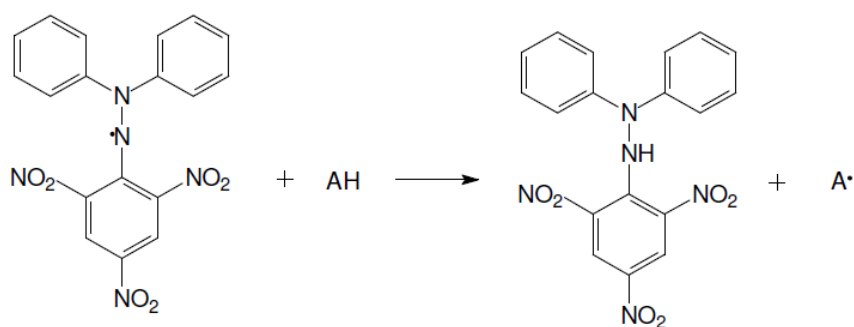


Figura 3. Reação de inibição do radical DPPH por um antioxidante AH.

A análise utilizando o radical DPPH tem sido adaptada para determinar a atividade antioxidante total em vinhos (Arnous, 2002; Granato, 2010; Lucena,

2010; Minussi, 2003; Mulero, 2010; Nixdorf & Gutiérrez, 2010; Pachón, 2004; Paixão, 2007; Roussis, 2008).

2.5.2. Determinação de compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos em alimentos é realizada por meio de uma variedade de técnicas. Entretanto, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu figura entre as mais utilizadas (Angelo & Jorge, 2007).

Este reagente consiste na mistura dos ácidos fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) e fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$). Na presença dos compostos fenólicos, estes dois ácidos são reduzidos a óxido de molibdênio (Mo_8O_{23}) e óxido de tungstênio (W_8O_{23}), respectivamente, promovendo uma cor azulada que absorve na região do visível com comprimento de onda máximo em 725 nm. Tal redução ocorre em meio alcalino e o reagente mais indicado é o carbonato de sódio. O resultado de compostos fenólicos totais presentes na amostra é expresso em equivalentes de ácido gálico (EAG) através de uma curva padrão (Cruz, 2008; Angelo & Jorge, 2007).

2.6. Sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA)

Os sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA) são definidos como um método de automatização de procedimentos analíticos no qual ocorre a injeção da amostra líquida em um fluxo contínuo do carregador apropriado, seguindo em direção ao sistema de detecção. A amostra sofre dispersão na solução transportadora formando uma zona de amostra com diferentes gradientes de

concentração. A formação destes gradientes, associados ao fato da medida ocorrer com a zona da amostra em movimento em relação ao sistema de detecção, gera um sinal transiente onde sua altura pode ser relacionada com a concentração do analito (Ruzicka et. al., 1981).

Os sistemas FIA podem apresentar diversas configurações. O sistema mais simples é o de linha única (Figura 4a), onde há apenas uma alça de amostragem e a amostra injetada no caminho do carregador, segue em direção ao detector. Já os sistemas em confluência, Figura 4b, inserem, além da amostra, o reagente para que ocorra uma reação química. O reagente é adicionado por confluência logo, cada fração da amostra recebe a mesma quantidade de reagente (Reis et. al., 1989; Reis, 1996).

Os sistemas mais complexos são os com zonas coalescentes e os com re-amostragem, Figura 4c. No primeiro tipo tanto o reagente quanto a amostra são inseridas ao mesmo tempo no fluxo carregador através de alças de amostragem se encontrando através de uma confluência. Uma vantagem deste tipo de sistema é a economia de reagente. Os sistemas de re-amostragem são utilizados quando a amostra é muito concentrada. Uma vez que não é possível a diminuição da alça de amostragem indefinidamente, este tipo de sistema permite a diluição da amostra através de duas dispersões da amostra em dois fluxos do carregador (Ruzicka et. al., 1981; Reis et. al., 1989; Reis, 1996; Rocha et. al., 2000).

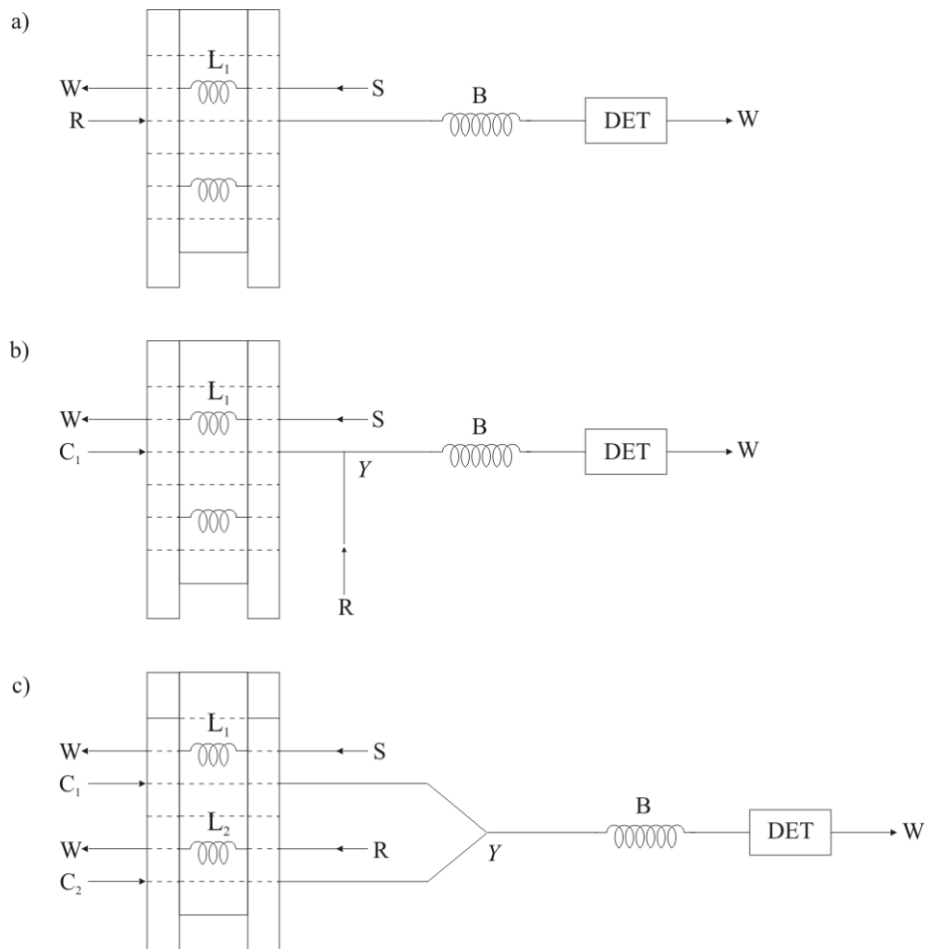


Figura 4. Configuração do sistema FIA em linha única a), em confluência b) e em zonas coalescentes c). L_1 é a alça de amostragem, L_2 é a alça do reagente, R é o fluxo do reagente, Y é a confluência, B é a bobina de reação, C_1 e C_2 é o fluido carreador, W é o descarte e DET é o detector.

Dentre as vantagens dos sistemas FIA destacam-se as diversas possibilidades de automação, a economia de amostras e reagentes, alta frequência analítica, redução do tempo de trabalho e redução dos resíduos gerados. Além disso, não há a necessidade da reação atingir o equilíbrio químico devido à temporização reprodutível (Reis et. al., 1989; Reis, 1996; Rocha et. al., 2000).

Alguns trabalhos envolvendo o sistema FIA na determinação da atividade antioxidante de uma variedade de amostras têm sido relatado na literatura. Um

método utilizando sistema FIA de configuração em confluência , no qual o radical ABTS é gerado em um meio enzimático foi proposto por Milardovic et al, 2007. Neste trabalho, a atividade antioxidante de bebidas alcoólicas utilizou detectores potenciométricos.

Métodos para determinação da atividade antioxidante por captura do radical DPPH adaptados a sistemas FIA foram desenvolvidos por Ukeda et al., 2002; Magalhães, et al. 2006, Magalhães et al. 2008 e Mrazek et al. 2012. Magalhães, 2006 também propôs um sistema FIA baseado no poder de redução de compostos específicos.

2.7. Otimização

O termo otimização é utilizado em química analítica com o objetivo de se avaliar as condições utilizadas na técnica a fim de se obter melhores respostas.

Normalmente, a influência de cada fator sobre a resposta é avaliada variando um fator por vez e mantendo os outros em valores constantes. Este tipo de otimização, chamado “Uma variável por vez” apresenta as desvantagens de necessitar de um grande número de experimentos e de não avaliar o efeito das interações entre os fatores (Bezerra et al., 2008).

Para resolver este problema, a otimização pode ser realizada através de técnicas multivariadas, destacando-se a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Esta metodologia baseia-se no ajuste de equações polinomiais aos dados experimentais do planejamento fatorial com o objetivo de avaliar, simultaneamente, os níveis de todos os fatores para se obter melhores resultados.

De acordo com Bezerra et al.,2002 e Myers & Montgomery, 1995, modelo mais simples que pode ser usado na MSR baseia-se numa função linear. Para a sua aplicação, é necessário que as respostas obtidas estejam bem ajustadas na equação:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \varepsilon \quad \text{Eq. (1)}$$

Em que k é o número de variáveis, β_0 é uma constante, β_i representa os coeficientes dos parâmetros lineares, x_i representa as variáveis e ε é o resíduo associado aos ensaios. A superfície de resposta para um modelo linear não deve apresentar qualquer curvatura. Para avaliar a curvatura, deve-se utilizar um modelo de segunda ordem. Este modelo deve conter termos adicionais, que descrevem a interação entre as diferentes variáveis experimentais. Desta forma, um modelo para uma interação de segunda ordem apresenta os seguintes termos:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad \text{Eq. (2)}$$

Em que β_{ij} representa os coeficientes de interação. Para determinar os pontos críticos (máximo ou mínimo), é necessária uma função polinomial que contenha termos quadráticos:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad \text{Eq. (3)}$$

Em que β_{ii} representa os coeficientes quadráticos.

Para estudar o efeito de cada fator sobre uma determinada resposta, devem-se variar seus níveis e observar o resultado que esta variação produz sobre a resposta. Para realizar um planejamento fatorial completo, realizam-se experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Quando os fatores que influenciam na resposta são muitos e é desejável avaliar estes em mais de dois níveis, uma alternativa é a utilização de planejamentos fatoriais compostos centrais rodáveis (PFCCR). Geralmente, um PFCCR para k fatores divide-se em três partes. A primeira, chamada de fatorial completo com 2^k experimentos. A segunda parte refere-se aos pontos axiais $2k$ e a última ensaios realizados no ponto central que podem ser repetidos quantas vezes for necessário (Barros Neto et al., 2007).

O uso de MSR é muito utilizado em otimização de técnicas para avaliação da atividade antioxidante em alimentos e bebidas (Karacabey & Mazza, 2010; Prasad et al., 2011; Wijngaard et al., 2011) e para a otimização de técnicas analíticas, como por exemplo, cromatografia líquida de alta eficiência (Fonseca et al., 2004) e em análise por injeção em fluxo (Lima et al., 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver um método analítico por injeção em fluxo adaptado ao ensaio de DPPH para determinação da atividade antioxidante total de vinhos.

3.2. Objetivos Específicos

- Adaptar a análise da atividade antioxidante utilizando o radical DPPH a um sistema FIA com zonas coalescentes.
- Otimizar variáveis, tais como: fluxo do carregador; comprimento das alças e comprimento do reator através da metodologia de superfície de resposta.
- Aplicar o método FIA proposto e otimizado para determinação da atividade antioxidante total em vinhos.
- Comparar os resultados obtidos pelo método FIA proposto com os do método convencional.
- Correlacionar a atividade antioxidante total obtida através da análise de DPPH com a atividade antioxidante em relação ao conteúdo de compostos fenólicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras

As amostras de vinhos foram adquiridas no comércio local, sendo que foram selecionados dois tipos de vinhos denominados populares e finos. Para os vinhos populares foram adquiridos duas amostras de vinho tinto e uma de vinho branco. Para os vinhos finos, foram seis amostras da mesma marca, quatro tintos e dois brancos, produzidos a partir das uvas Tannat, Cabernet Sauvignon, Merlot, Chardonay e Riesling. Ambos os vinhos foram produzidos na região Sul do Brasil sendo o vinho popular produzido no estado do Paraná e os finos no estado do Rio Grande do Sul.

4.2. Preparo das soluções

Foram preparadas soluções metanólicas de DPPH (Sigma- Aldrich) em diversas concentrações. Estas soluções foram preparadas no momento da análise e protegidas da luz.

Soluções de ácido gálico nas concentrações 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0 $\mu\text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas diluindo-se massas devidamente pesadas do ácido (Sigma) em metanol.

O solvente metanol utilizado como agente transportador no sistema FIA foi previamente sonificado por 40 min.

4.3. DPPH convencional

O ensaio para determinação da atividade antioxidante das amostras através da captura do radical DPPH foi realizado de acordo com Nixdorf & Gutierrez (2010). Alíquotas de 100,0 μ L das amostras de vinhos devidamente diluídas em metanol foram adicionadas a 2,90 mL de uma solução metanólica de DPPH ($6,0 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹), homogenizadas e mantidas por 30 min sob abrigo da luz. Em seguida, os valores de absorvância foram medidos no comprimento de onda de 515 nm no espectrofotômetro Varian (Cary 50). A curva analítica foi preparada a partir de soluções metanólicas de Trolox (Merck) nas concentrações de 0,80 a $6,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹. A resposta foi expressa em equivalentes mol L⁻¹ de Trolox por mL da amostra de vinho.

4.4. Determinação de compostos fenólicos totais

Para determinação dos fenólicos totais foi utilizado o método analítico proposto por Granato et al., 2010 que se baseia no método colorimétrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Alíquota 250,0 μ L da amostra de vinho, diluídas 25 vezes em água, foi adicionada a 250,0 μ L do reagente de Folin-Ciocalteu (Dinâmica), também diluído em água na proporção 1:1, e a 2,0 mL de água. Após 5 minutos, adicionou-se 250,0 μ L de solução aquosa de carbonato de sódio 10,0 g / 100,0 g. Após 60 min a temperatura ambiente sob abrigo da luz, a mistura foi lida em comprimento de onda de 725 nm no espectrofotômetro Varian (Cary 50).

Para expressar os resultados, foi feita uma curva padrão de ácido gálico nas concentrações de 0 a 100,0 mg L⁻¹.

4.5. Sistema FIA adaptado ao método DPPH

O sistema FIA com zonas coalescentes para o ensaio DPPH é mostrado na Figura 5. Este sistema consiste em duas alças, sendo L₁ a alça da amostra (vinhos diluídos em metanol) e L₂ para o reagente DPPH. Ambas são inseridas, simultaneamente, no fluxo do agente carregador através de um injetor comutador de acrílico que consiste em uma barra móvel intercalada em duas barras fixas (Figura 5a) (Bergamin et al., 1978). Ao movimentar a barra móvel, o reagente e a amostra são inseridos no fluxo carregador (metanol) e se coalescem através de um conector de acrílico em “Y” (Figura 5b). Foi utilizada uma bomba peristáltica de quatro canais (Ismatec) e tubos (Ismatec), resistentes a solventes orgânicos, para propulsão dos fluidos. Todo o percurso analítico, as alças de amostragem e o reator foram feitos utilizando-se tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro encapados com papel alumínio para proteger o reagente da luz. Para a leitura do sinal absorvância, no comprimento de onda de 515 nm, foi utilizado um espectrofotômetro (Varian-Cary 50) equipado com uma cela de fluxo de quartzo.

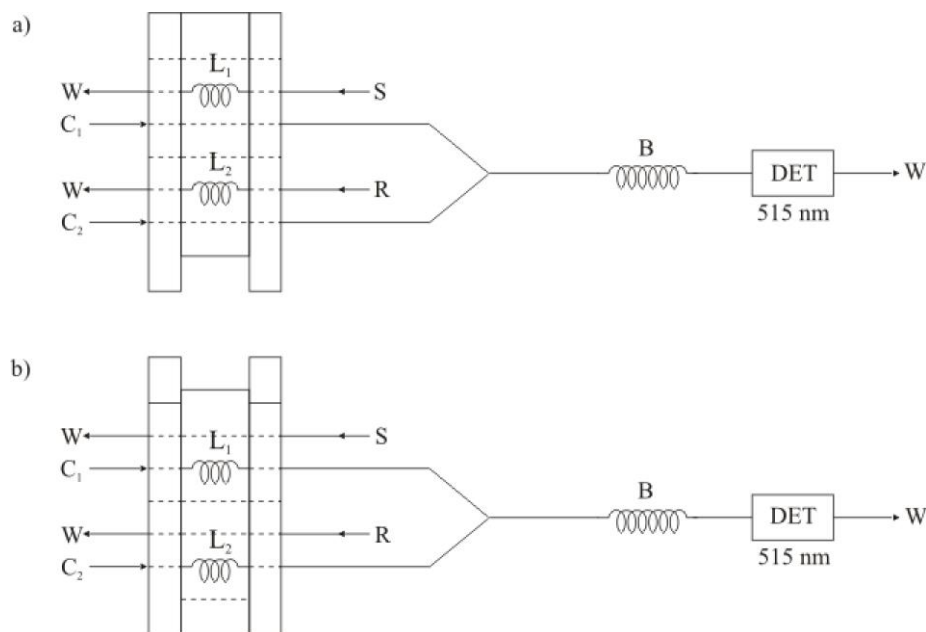


Figura 5. Representação esquemática do sistema FIA proposto para análise total de antioxidantes. (a) posição de amostragem e (b) posição de injeção. L₁ e L₂ representam as alças de amostragem e reagente, W o descarte, S a amostra, R o reagente, B o reator e DET o detector.

4.6. Planejamento experimental

O primeiro passo para a realização de um planejamento fatorial é avaliação das variáveis do sistema. Neste caso, as variáveis estudadas foram fluxo do carregador (mL min^{-1}), comprimento das alças (cm) e comprimento do reator (cm).

A fim de se avaliar a influência das variáveis na resposta, foi utilizado um planejamento fatorial composto central rodável (PFCCR). Os ensaios de tal planejamento são divididos em três partes. A primeira parte é composta pelo planejamento fatorial comum 2^k , onde k é o número de fatores. A segunda refere-se aos pontos axiais formada por $n_{\text{ax}} = 2k$ e a terceira corresponde as replicatas no ponto central. Os ensaios no ponto central permitem verificar se há ou não falta de ajuste para o modelo proposto (Barros Neto et. al., 2007).

As variáveis codificadas para os níveis superiores e inferiores foram calculadas através da Equação 4:

$$x_i = \frac{X_1 - X_0}{\bar{X}} \quad \text{Eq. (4)}$$

Em que, x_i é o valor da variável codificada, X_1 é o valor real do nível máximo ou do nível mínimo, X_0 é o valor real do nível central e \bar{X} a média entre o valor real do nível máximo e do nível mínimo. Os pontos axiais foram calculados a partir da equação 5:

$$\alpha = \sqrt[4]{n_{fat}} \quad \text{Eq.(5)}$$

Em que α é o valor da variável codificada e n_{fat} é o número de ensaios referente ao planejamento fatorial 2^3 (Barros Neto et. al., 2007).

O planejamento proposto no presente trabalho possui três fatores, portanto um planejamento fatorial 2^3 completo ampliado com quatro replicatas no ponto central e seis pontos axiais foi realizado, totalizando 18 ensaios. A resposta do planejamento experimental foi o valor do coeficiente angular das curvas analíticas (b), obtidas a partir de soluções padrões de ácido gálico (20,0 a 100,0 μmolL^{-1}) e da solução do radical DPPH (8,0.10⁻⁴ molL^{-1}). A concentração da solução do radical DPPH foi escolhida por apresentar valores de absorvância de aproximadamente 1 para leituras no comprimento de onda de 515 nm.

Os dados experimentais obtidos foram avaliados através do software Design Expert 8.0.1. Este software além de elaborar a matriz do planejamento

fatorial e o modelo matemático, também realiza a análise de variância (ANOVA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cálculos da resposta

A resposta do planejamento para otimização do método proposto foi definido como sendo o coeficiente angular (b) obtido a partir da curva analítica da altura máxima do pico versus a concentração do ácido gálico utilizado nas análises. As concentrações de ácido gálico utilizadas foram de 20,0 a 100,0 μ mol L⁻¹ e a altura máxima foi obtida através da média das absorbâncias máximas dos fiagramas. Os picos foram obtidos através da reação entre o DPPH na concentração $8,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ com as soluções de ácido gálico nas concentrações citadas anteriormente. A Figura 6 apresenta o fiagrama obtido para um dos ensaios do planejamento fatorial (Tabela 2). Neste caso, utilizou-se fluxo de 1,00 mL min⁻¹, comprimento das alças de amostragem de 20,0 cm e comprimento do reator de 400 cm.

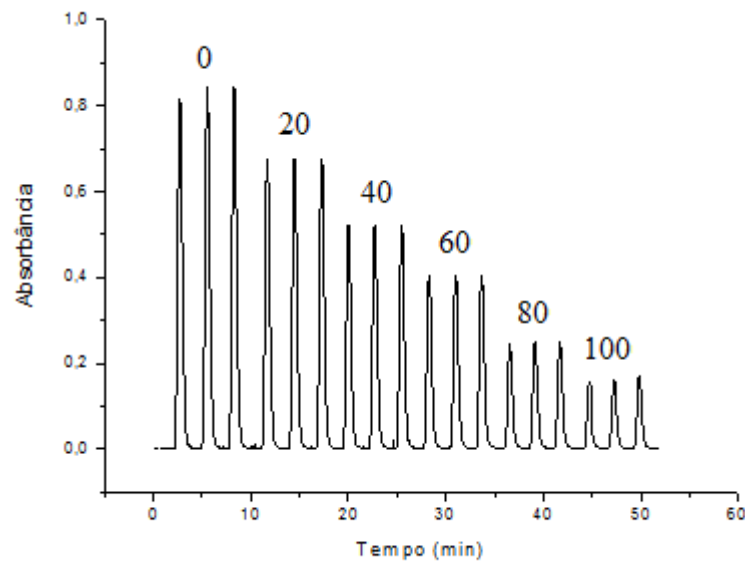


Figura 6. Diagrama do método proposto para determinação da atividade antioxidante para o ensaio nas condições: fluxo de $1,00 \text{ mL min}^{-1}$, comprimento das alças de amostragem de $20,0 \text{ cm}$ e comprimento do reator de 400 cm . Os picos referem-se as análises em triplicata: os três primeiros picos correspondem apenas a solução de DPPH ($8,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), sem injeção de ácido gálico, e os demais picos as injeções de ácido gálico nas concentrações de $20,0$; $40,0$; $60,0$; $80,0$ e $100,0 \mu \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

Uma vez que os ensaios foram realizados em dias distintos, a absorbância do reagente DPPH não era reprodutível devido a pesagens diferentes para o preparo das soluções metanólicas com concentração igual a $8,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Portanto, para contornar este problema, foi feita uma curva de calibração obtida através da leitura de diversas concentrações de soluções metanólicas de DPPH $0,20$; $0,40$; $0,60$; $0,80$ e $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Esta curva foi obtida através do método proposto nas condições: fluxo do carregador de $0,50 \text{ mL min}^{-1}$, alças do reagente e da amostra de 20 cm e reator no comprimento de 120 cm .

A alça da amostra foi preenchida com metanol e a do reagente com DPPH nas concentrações $0,2$; $0,4$; $0,6$; $0,8$ e $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

A equação da reta para a curva analítica do padrão de DPPH é mostrada pela Equação 6, a qual apresentou um coeficiente de correlação de 0,9992.

$$\text{Abs} = -0,02588 + 1879,124 \cdot [\text{DPPH}] \quad \text{Eq. (6)}$$

A partir da Equação 6, foi calculado um valor considerado ideal de absorvância para a solução de DPPH de concentração igual a $8,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. O valor ideal de absorvância foi de 1,4774.

A partir do valor ideal de absorvância, calculou-se um fator de correção (f) para cada experimento, dividindo-se 1,47742 pelo valor de absorvância do controle de cada ensaio. Este controle foi obtido através da injeção no sistema FIA proposto apenas da solução metanólica ($8,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) de DPPH na condições: fluxo do carregador de $0,50 \text{ mL min}^{-1}$, comprimento das alças do reagente e da amostra de 20 cm e reator no comprimento de 120 cm.

As absorvâncias máximas foram determinadas e sua média foi definida como o denominador da Equação 7.

$$f = \frac{\text{Valor ideal}}{\text{Valor do controle}} \quad \text{Eq. (7)}$$

Após o cálculo do fator de correção (f), todos os valores de absorvâncias, obtidos através dos diagramas dos ensaios do planejamento fatorial, foram multiplicados pelo fator f . Em seguida, foram construídas curvas analíticas de absorvância corrigidas pelo fator f versus concentração de ácido gálico. A partir destas curvas o coeficiente angular (b) foi obtido através de regressões lineares.

5.2. Planejamento Fatorial Composto Central Rodável

Os valores codificados e os níveis dos valores reais são apresentados na Tabela 1. A matriz do planejamento fatorial obtido através do software Design Expert 8.0.6 e as respostas experimentais dos coeficientes angulares obtidos são mostradas na Tabela 2. Uma vez que as curvas analíticas obtidas são decrescentes, os valores de b calculados são negativos. Logo, os menores valores são os considerados como sendo as melhores respostas.

Os ensaios foram realizados de forma aleatória para evitar a ocorrência de distorção estatística, ou seja, para impedir que desvios atípicos sejam associados a combinações de níveis que não existam. Sem fazer a aleatorização, os erros podem parecer menores do que na realidade são (Barros Neto et. al., 2007).

Tabela 1. Variáveis reais com suas respectivas variáveis codificadas aplicadas no PFCCR para a otimização do método da análise da atividade antioxidante total através do sistema FIA proposto.

Parâmetros	Variáveis codificadas				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
	Variáveis reais				
Vazão do fluxo carreador (mL min^{-1}), x_1	0,16	0,50	1,00	1,50	1,84
Comprimento das alças (cm), x_2	11,6	15,0	20,0	25,0	28,4
Comprimento do reator (cm), x_3	63,6	200,0	400,0	600,0	736,4

Tabela 2. Matriz planejamento aplicado ao planejamento fatorial composto central rodável (PFCCR).

Ensaio	x_1	x_2	x_3	y_i
	Fluxo (mLmin ⁻¹)	Comprimento da alça (cm)	Comprimento do reator (cm)	Inclinação
1	0,5 (-1)	15,0 (-1)	200,0 (-1)	-7593,54
2	1,5 (+1)	15,0 (-1)	200,0 (-1)	-5632,91
3	0,5 (-1)	25,0 (+1)	200,0 (-1)	-13108,63
4	1,5 (+1)	25,0 (+1)	200,0 (-1)	-9798,06
5	0,5 (-1)	15,0 (-1)	600,0 (+1)	-6041,96
6	1,5 (+1)	15,0 (-1)	600,0 (+1)	-4898,35
7	0,5 (-1)	25,0 (+1)	600,0 (+1)	-7247,68
8	1,5 (+1)	25,0 (+1)	600,0 (+1)	-6460,55
9	0,16 (-1,68)	20,0 (0)	400,0 (0)	-9076,29
10	1,84 (+1,68)	20,0 (0)	400,0 (0)	-5238,70
11	1,0 (0)	11,6 (-1,68)	400,0 (0)	-4747,59
12	1,0 (0)	28,4 (+1,68)	400,0 (0)	-8514,05
13	1,0 (0)	20,0 (0)	63,6 (-1,68)	-9511,78
14	1,0 (0)	20,0 (0)	736,4 (+1,68)	-6413,70
15	1,0 (0)	20,0 (0)	400,0 (0)	-6456,16
16	1,0 (0)	20,0 (0)	400,0 (0)	-5899,25
17	1,0 (0)	20,0 (0)	400,0 (0)	-7593,54
18	1,0 (0)	20,0 (0)	400,0 (0)	-5650,94

* Em parênteses os valores codificados onde, (-1,68) e (+1,68) os pontos axiais, (-1) o nível mínimo, (0) o ponto central e (+1) o nível máximo.

Os dados foram ajustados a um modelo quadrático de acordo com a Equação 8 em que β_0 , β_i , e β_{ii} β_{ij} são os coeficientes da regressão (β_0 é o coeficiente linear, β_i é o efeito principal de todos os fatores, β_{ii} é o termo quadrático e β_{ij} β_{ij} é o efeito de interação), ε corresponde ao resíduo deixado pelo modelo e y a resposta dos valores previstos pelo modelo.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_{ij} x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad \text{Eq. (8)}$$

A Tabela 3 apresenta os dados obtidos através da ANOVA. A fim de se avaliar a significância dos fatores e as interações dos mesmos, foi realizado o teste F. A partir dos graus de liberdade dos fatores, já calculados pelo software, determinam-se os valores de f tabelado (F_{tab}) no nível de 95% de confiança. Se o valor de F calculado (F_{calc}) pelo software para os fatores for maior do que o valor de F_{tab} , o fator em questão é significativo.

Tabela 3. Análise da variância (ANOVA) para os fatores x_1 , x_2 e x_3 .

Termos	Soma quadrática	Graus de liberdade (v)	Média Quadrática	F_{calc}	$F_{0,05; v}$
Modelo	$7,274 \cdot 10^7$	9	$8,083 \cdot 10^6$	14,11	3,39
x_1	$1,366 \cdot 10^7$	1	$1,366 \cdot 10^7$	23,84	5,32
x_2	$2,583 \cdot 10^7$	1	$2,583 \cdot 10^7$	45,10	5,32
x_3	$2,041 \cdot 10^7$	1	$2,041 \cdot 10^7$	35,63	5,32
x_1x_2	$1,234 \cdot 10^5$	1	$1,234 \cdot 10^5$	0,22	5,32
x_1x_3	$1,395 \cdot 10^6$	1	$1,395 \cdot 10^6$	2,44	5,32
x_2x_3	$5,973 \cdot 10^6$	1	$5,973 \cdot 10^6$	10,43	5,32
x_1^2	$1,393 \cdot 10^6$	1	$1,393 \cdot 10^6$	2,43	5,32
x_2^2	$2,684 \cdot 10^5$	1	$2,684 \cdot 10^5$	0,47	5,32
x_3^2	$4,809 \cdot 10^6$	1	$4,809 \cdot 10^6$	8,39	5,32
Residual	$4,582 \cdot 10^6$	8	$5,728 \cdot 10^5$		

*Em que x_1 é o fluxo, x_2 o comprimento das alças, x_3 comprimento do reator; x_1x_2 , x_1x_3 e x_2x_3 são as interações entre os fatores e x_1^2 , x_2^2 e x_3^2 os termos quadráticos.

De acordo com a Tabela 3, pode-se observar que os fatores fluxo (x_1), comprimento das alças (x_2) e comprimento do reator (x_3), assim como a interação alça-reator (x_2x_3) e o reator ao quadrado (x_3^2), foram todos significativos. A equação que define o modelo quadrático foi modificada excluindo-se os termos não significativos conforme a Tabela 3. Tal ajuste é apresentado na Equação 9.

$$y = -977,38 + 1999,87x_1 - 620,68x_2 - 0,49104x_3 + 0,86404x_2x_3 - 0,013347x_3^2 \quad \text{Eq. (9)}$$

De acordo com a Equação 9, os fatores correspondentes ao comprimento do reator e ao comprimento das alças possuem sinais negativos. Isto significa que o aumento destes níveis tende a diminuir a resposta (*b*). Por outro lado, o fator correspondente ao fluxo apresentou sinal positivo, logo, ao se elevar seus níveis, a resposta tende a aumentar. A interação comprimento da alça-comprimento do reator atuou de maneira sinérgica sobre a resposta. Ou seja, o aumento de seu nível promove um aumento na resposta.

O teste F foi usado para se avaliar a significância estatística da regressão e a falta de ajuste do modelo proposto, em nível de 95 % de confiança, compararam-se os valores de F_{cal} e F_{tab} . Para a significância estatística da regressão, observaram-se valores de F_{cal} maiores do que os de F_{tab} , logo, a regressão é significativa. Em contrapartida, a falta de ajuste não foi significativa quando avaliada pelo teste F. Neste caso, valores menores de F_{tab} indicaram que o modelo quadrático se ajusta aos dados experimentais obtidos.

A Figura 7 apresenta o gráfico das respostas previstas em relação às respostas observadas. De acordo com a figura pode-se observar uma boa concordância entre toda a faixa de valores estudada. A análise de variância ANOVA para o modelo ajustado, desconsiderando-se os fatores não significativos, esta apresentada na Tabela 4. O valor porcentual de variação do modelo, ou seja, a razão entre a soma quadrática do modelo e a soma quadrática total foi de 90,21 %. Isto significa que 9,79 % são resíduos.

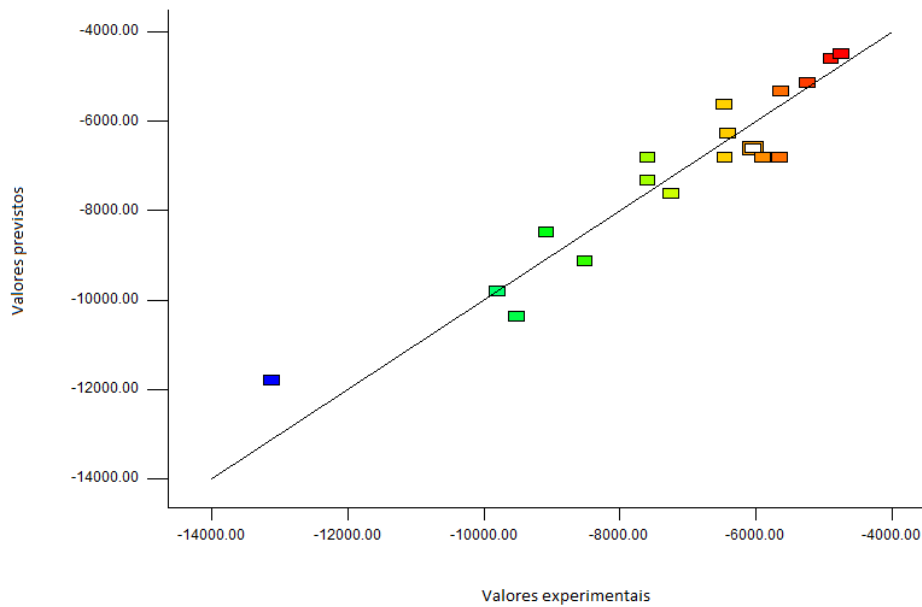


Figura 7. Comparação das respostas observadas pelas respostas previstas pelo modelo quadrático

Tabela 4. Análise da variância ANOVA para o modelo ajustado.

Termos	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	F _{0,05}
Modelo	$6,976 \cdot 10^7$	5	$1,395 \cdot 10^7$	22,11	3,18
Resíduos	$7,570 \cdot 10^6$	12	$6,309 \cdot 10^5$		
Falta de ajuste	$5,331 \cdot 10^6$	9	$5,923 \cdot 10^5$	0,79	8,79
Erro puro	$2,240 \cdot 10^6$	3	$7,465 \cdot 10^5$		
Total	$7,733 \cdot 10^7$	17			

% de variação explicada: 90,21%

5.3. Análise das superfícies de resposta

As superfícies de respostas tridimensionais das interações descritas pela Equação 8 são apresentadas na Figura 8. Estes gráficos apresentam-se em função de dois fatores e o terceiro fator é mantido no seu ponto central. A Figura 8a é referente à interação comprimento do reator e comprimento da alça. Nota-se que quando o comprimento do reator encontra-se em seu nível mínimo e o

comprimento da alça em seu nível máximo, a resposta tende a ser ainda mais negativa. A interação comprimento da alça e fluxo pode ser observada na Figura 8b. Os menores valores das respostas foram observados ao se manter o comprimento das alças L_1 e L_2 em seu nível máximo e o fluxo em seu nível mínimo. De acordo com a Figura 8c quando o comprimento do reator e o fluxo encontram-se em seus níveis mínimos, um valor mais negativo de b foi observado.

Segundo Ruzicka et al. (1981), a altura do pico de um diagrama é diretamente proporcional ao comprimento da alça da amostra devido ao maior volume da mesma que é adicionado. Porém, um aumento do percurso analítico promove uma maior dispersão da amostra. Assim, comprimentos de reatores maiores e alças de amostragem menores tendem a diminuir o sinal analítico.

O efeito do fluxo em sistemas FIA foi observado por Shpigun et al., (2006) e Nalewajko – Sieliwoniuk et al., (2008). Quando fluxos menores são utilizados, o tempo de residência da amostra e do reagente no sistema FIA são maiores. Logo, por se tratar de uma reação química, esta se estende quase que completamente e o sinal transiente aumenta significativamente. Por outro lado, fluxos abaixo de $0,80 \text{ mL min}^{-1}$ não são interessantes devido ao alto tempo que se gastaria com as análises (Ruzicka et al., 1981).

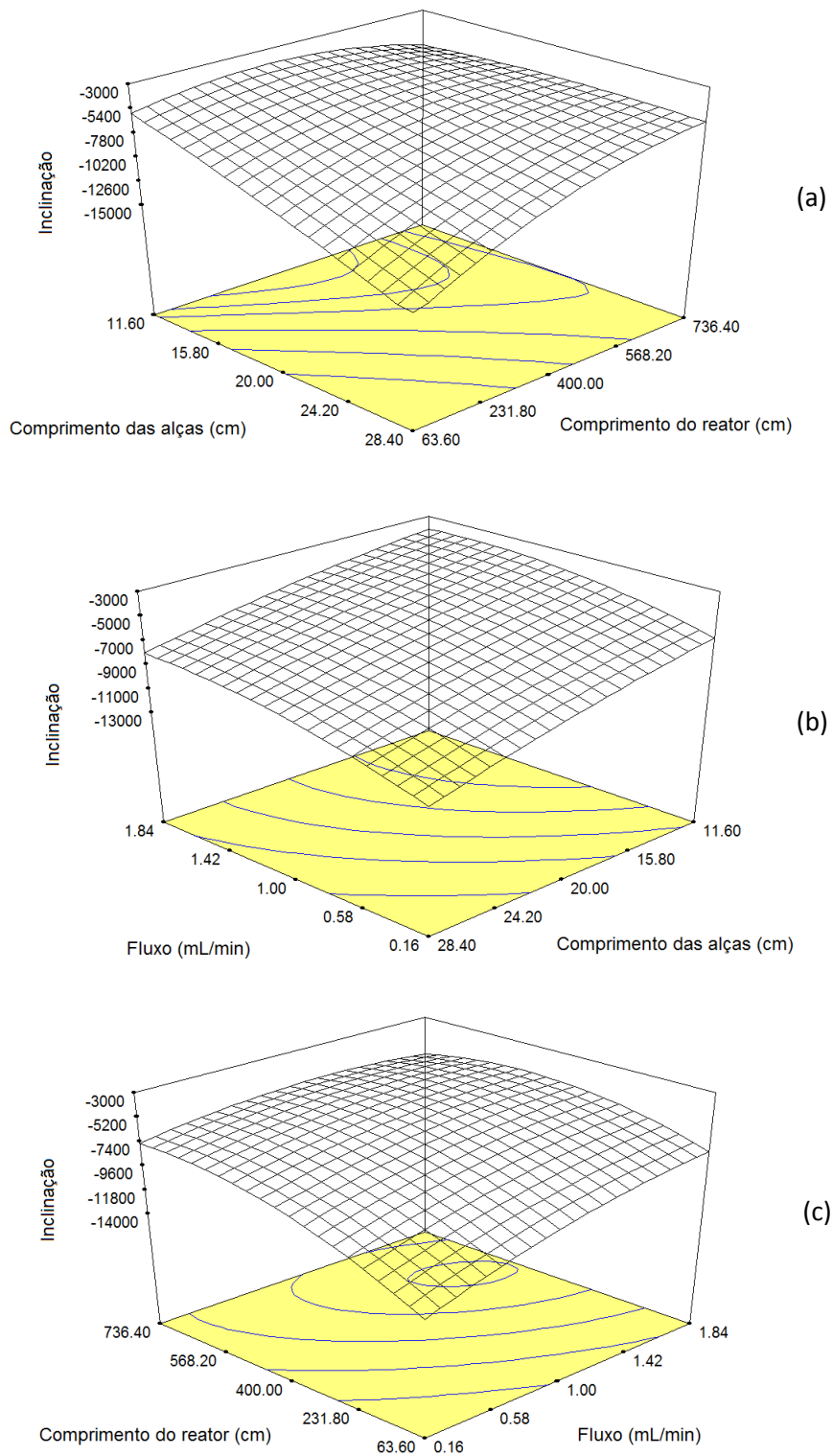


Figura 8. Gráficos de superfícies tridimensionais para as interações comprimento do reator-comprimento da alça (a) comprimento da alça e fluxo do carregador (b) e comprimento do reator e fluxo do carregador (c).

A Figura 9 mostra a interação entre o comprimento da alça e comprimento do reator foi significativa como apresentado pela Equação 9. A falta de paralelismo das linhas indica que há interação entre os fatores como apresentado pela equação 9.

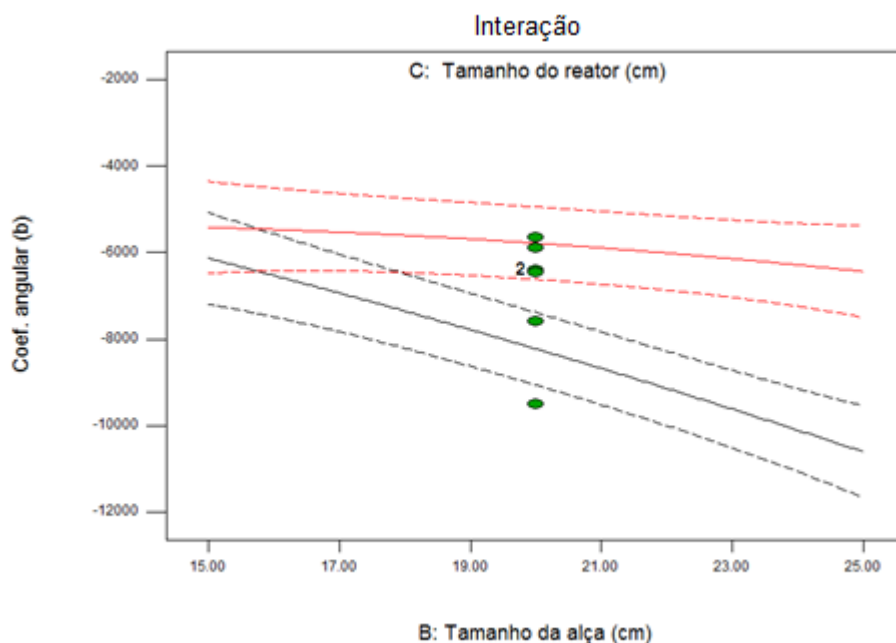


Figura 9. Interação entre o comprimento da alça e do reator (cm).

5.4. Ensaios otimizados

Após a avaliação da ANOVA e do efeito dos fatores na resposta do sistema FIA proposto, o software sugeriu diversos ensaios com os valores dos níveis em seus níveis ótimos, ou seja, com melhores respostas.

Um destes ensaios propostos foi selecionado e a escolha deste levando em consideração o mínimo consumo do reagente e do carregador e alta frequência analítica. O consumo de reagente pode ser diminuído ao se utilizar alças menores, ou seja, menores volumes. No entanto, alças com comprimentos muito reduzidos tendem a aumentar a dispersão do reagente no fluxo do

carregador, e logo, o sinal analítico diminui. O fluxo do carregador não deve ser muito baixo, pois como consequência tem-se a diminuição da frequência analítica. Por outro lado fluxos muito altos são indesejáveis, pois provocam turbulências no sistema FIA (Ruzicka et al., 1981) e geração de bolhas.

Os parâmetros sugeridos pelo modelo, o valor previsto pelo modelo e a resposta obtida experimentalmente encontram-se na Tabela 5. O ensaio proposto foi reproduzido em triplicata e o coeficiente de variação foi calculado através da Equação 10.

$$\text{Coef. de variação}(\%) = \frac{X_{\sigma n-1}}{\bar{X}} \times 100 \quad \text{Eq. (10)}$$

Em que $X_{\sigma n-1}$ é o desvio padrão e \bar{X} é a média entre o valor obtido experimentalmente e o previsto pelo modelo.

Tabela 5. Condições ótimas sugeridas pelo modelo e as respostas dos valores previstos e obtidos experimentalmente.

Fluxo (mL/min)	Comprimento das alças (cm)	Comprimento do reator (cm)	Valor previsto	Valor experimental	Coeficiente de variação (%)
1,12	18,5	234,6	-7319,86	-7517,12	1,33

O baixo valor do coeficiente de variação entre o valor previsto pelo modelo e o valor obtido experimentalmente, foi um indicativo que o método apresentou boa repetibilidade. O presente ensaio foi utilizado para analisar a atividade antioxidante total em amostras de vinhos.

5.5. Efeito da diluição nas amostras de vinhos

A Figura 10 mostra os espectros de absorção para a solução de DPPH ($6,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e para a amostra de vinho tinto popular em diversas diluições (1:5, 1:10, 1:15, 1:20 e 1:25) em metanol. Através dos espectros de absorção foi possível observar que a amostra de vinho sem diluição apresenta uma absorção máxima, assim como a solução metanólica de DPPH ($6,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), em comprimentos de onda próximos a 525 nm. Logo, esta absorção da amostra de vinho sem diluição poderia interferir na absorção de DPPH tornando os resultados, obtidos da análise da atividade antioxidante total, irreprodutíveis. No entanto, quando a amostra de vinho passou a ser diluída, houve uma baixa absorção em comprimentos próximos a 515 nm. Assim, adotou-se a diluição 1:25 para realizar as análises nas amostras de vinho. A Figura 11 mostra os espectros de absorção para a amostra de vinho branco riesling onde se pode observar que não houve absorção nos comprimentos de onda próximos a 515 nm, não interferindo, portanto, nas análises da atividade antioxidante total por captura do radical DPPH.

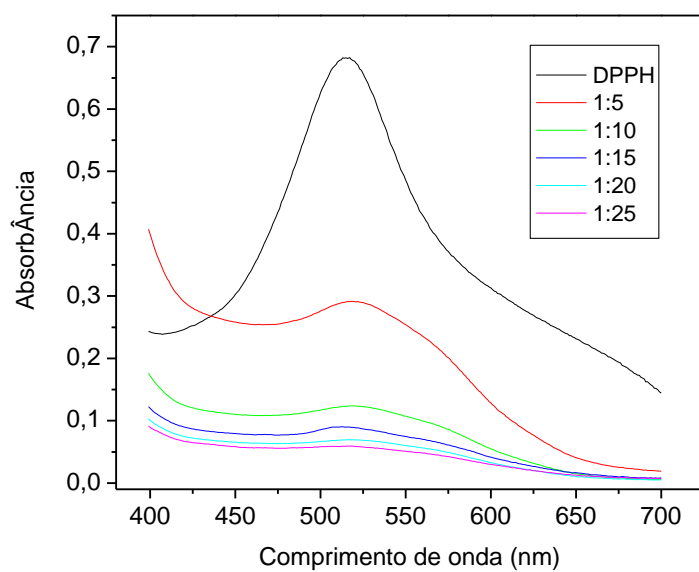


Figura 10. Espectros de absorção do reagente DPPH ($6,0 \cdot 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$) e do vinho tinto popular nas diluições 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 e 1:25.

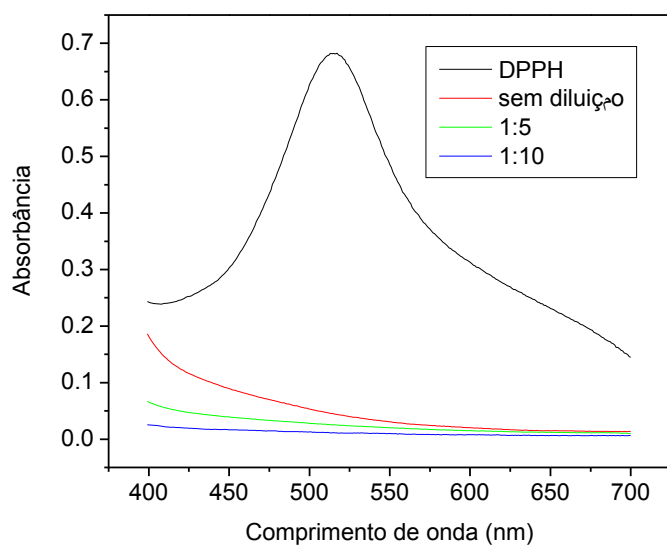


Figura 11. Espectros de absorção do reagente DPPH ($6,0 \cdot 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$) e do vinho branco riesling sem diluição, 1:5, 1:10.

5.6. Aplicações do método em amostras de vinho

Para expressar os resultados da atividade antioxidante total obtidos pelo método FIA proposto foi realizado uma curva analítica de Trolox nas concentrações de 8,0 a 32,0 m mol L⁻¹ (Figura 12). O ensaio FIA para a construção da curva analítica de Trolox foi realizado nas condições: fluxo de 1,12 mL min⁻¹, comprimento das alças de amostragem de 18,5 cm e comprimento do reator de 234,6 cm. A equação da regressão linear obtida para a curva analítica de Trolox foi $y = 2224,375x + 16,0 \cdot 10^{-3}$, com $R=0,9997$.

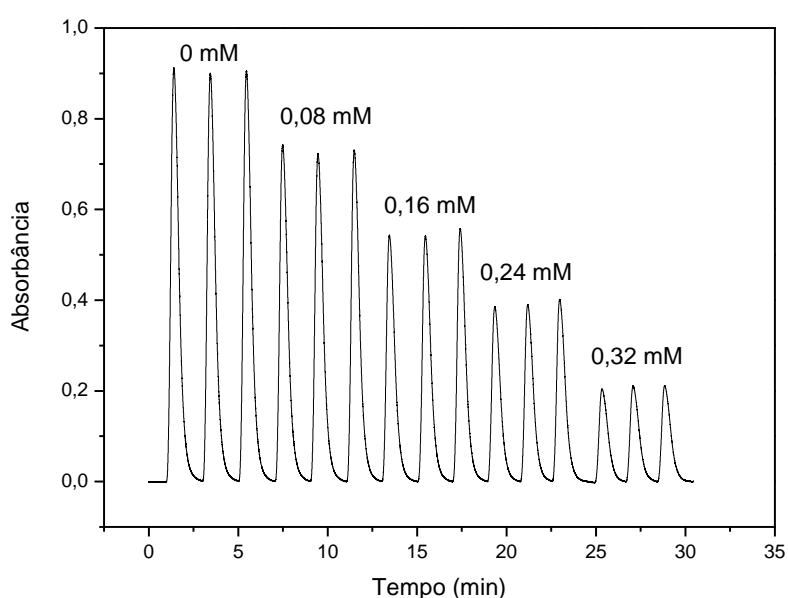


Figura 12. Diagrama para o ensaio nas condições: fluxo de 1,12 mL min⁻¹, comprimento das alças de amostragem de 18,5 cm e comprimento do reator de 234,6 cm. Os picos referem-se às análises em triplicata: os três primeiros picos correspondem apenas a solução de DPPH ($8,0 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹), sem injeção de Trolox, e os demais picos as injeções de Trolox nas concentrações de 8,0; 16,0; 24,0 e 32,0 m mol L⁻¹, respectivamente.

A Figura 13 mostra o diagrama do método proposto, nas condições otimizadas (Tabela 5) para determinação da atividade antioxidante total em

amostras de vinhos, obtido a partir das injeções do DPPH $8,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e das amostras de vinhos. De acordo com a figura pode-se observar que os sinais transientes foram bem resolvidos e com mínima dispersão.

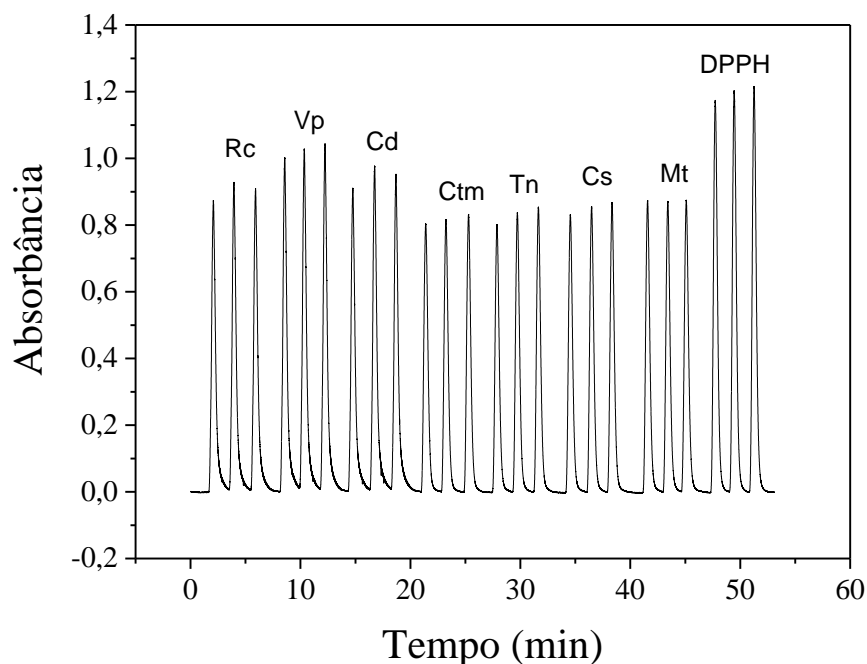


Figura 13. Diagrama do método proposto para determinação da atividade antioxidante para a injeção do DPPH ($8,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e para as amostras de vinho sendo: vinho popular tinto (Vp) e para os vinhos finos tem-se, Tannat (Tn), Cabernet Sauvignon (Cs), Merlot (Mt), mistura dos três uvas anteriores (Ctm), Chardonay (Cd) e mistura das uvas Riesling Itáliaico e Chardonay (Rc).

Os resultados da atividade antioxidante total (AAT) dos vinhos obtidos através do diagrama do método proposto (Tabela 5) foram correlacionados com os resultados do método convencional (item 4.3) a fim de se avaliar a aplicabilidade do método (Figura 14). De acordo com a figura, pode-se observar que os valores obtidos pelo método convencional foram maiores do que para o método proposto, isto se deve possivelmente devido às diferenças existentes entre as metodologias, tais como as concentrações dos reagentes e dos padrões da curvas analíticas e os fatores de diluição.

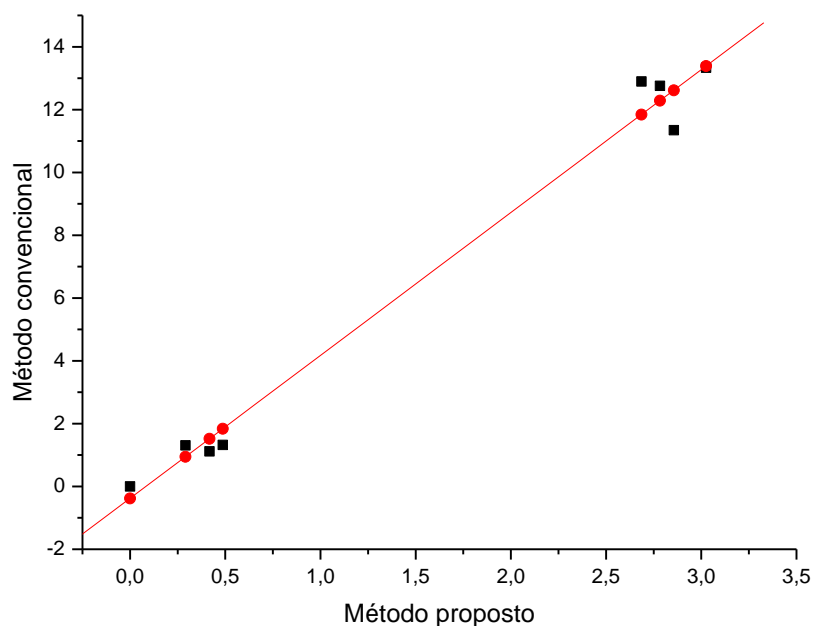


Figura 14. Correlação entre os resultados da atividade antioxidante obtidos pelo método convencional e método proposto para as amostras de vinho sendo os valores ideais em vermelho e os experimentais em preto.

A Equação 11 refere-se à regressão linear entre os valores desta correlação a qual apresentou um valor de $R = 0,9817$. A partir desta equação, os dados obtidos pelo método proposto foram ajustados em relação ao método convencional. Os valores são apresentados na Tabela 6.

$$y = 2,35781x - 0,00208 \quad \text{Eq.(11)}$$

Em que y é o valor de absorbância obtido pelo método convencional e x é o obtido através do método proposto.

Tabela 6. Atividade antioxidante total (AAT) das amostras de vinho obtida através do método convencional e pelo método proposto.

Amostras	AAT (mM de Trolox por mL de vinho)		
	Método convencional	Método proposto	Desvio Relativo
Tannat	$12,76 \pm 8.10^{-3}$	$12,28 \pm 2.10^{-2}$	3,8
Cabernet Sauvignon	$12,90 \pm 4.10^{-3}$	$11,84 \pm 2.10^{-2}$	8,2
Merlot	$11,34 \pm 4.10^{-3}$	$12,61 \pm 2.10^{-2}$	-11,2
Cabernet/Merlot/Tannat	$13,34 \pm 4.10^{-3}$	$13,39 \pm 3.10^{-2}$	-0,4
Chardonay	$1,32 \pm 3.10^{-3}$	$1,84 \pm 3.10^{-2}$	-39,4
Riesling/Chardonay	$1,31 \pm 9.10^{-3}$	$0,95 \pm 2.10^{-2}$	27,5
Vinho tinto popular	$1,11 \pm 3.10^{-3}$	$1,52 \pm 3.10^{-2}$	-36,9

A partir dos resultados apresentados na Tabela 6 avaliou-se, segundo o teste t, a significância dos métodos. De acordo com os resultados, não houve diferença significativa entre os resultados obtidos pelo método proposto e pelo método convencional em nível de 95 % de confiança para todas as amostras de vinho.

O limite de quantificação e o limite de detecção foram calculados de acordo com Fonseca et al. (2004), apresentando os valores de $8,824.10^{-6}$ e $2,647.10^{-6}$ mol L⁻¹ ácido gálico/mL de vinho, respectivamente.

O método proposto apresentou uma freqüência analítica de 41 análises por hora e uma economia de 58 % no consumo do reagente DPPH e 62,6 % no agente transportador metanol em comparação com o método convencional.

Como pode ser observado na Tabela 6, os vinhos finos tintos, ou seja, os provenientes das uvas Tannat, Merlot e Cabernet Sauvignon, apresentaram uma maior atividade antioxidante em relação ao vinho popular. Esta diferença deve-se principalmente a melhor qualidade das uvas finas e também do processo de

vinificação das mesmas (Beer et al., 2002; Roussis et al., 2008). Com relação aos vinhos brancos, os fabricados pelas uvas Chardonay e Riesling apresentaram menor atividade antioxidante em relação ao popular. Ainda pode-se afirmar que todos os vinhos tintos finos apresentaram maior atividade antioxidante do que as variedades de vinhos brancos devido a sua composição ser rica em antocianinas, substância que não é encontrada em vinhos brancos (Arnous et al., 2002; Roussis et al., 2008). De uma forma geral, os vinhos tintos apresentaram maior atividade antioxidante total do que o vinho branco.

5.7. Compostos Fenólicos Totais

Os valores do conteúdo de compostos fenólicos totais presente nas amostras de vinho, expressos em equivalentes de ácido gálico por mL de vinho, encontram-se na Tabela 7. A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que os vinhos tintos, principalmente os vinhos tintos finos, apresentaram maior conteúdo destes compostos quando comparados as amostras dos vinhos brancos. Esta diferença deve-se, principalmente, a ausência de antocianinas nos vinhos brancos.

Tabela 7. Conteúdo de compostos fenólicos totais, em equivalentes de ácido gálico (EAG) por mL de vinho, para as nove amostras de vinho.

Amostras	Compostos Fenólicos Totais (g EAG mL ⁻¹)
Tannat	3,62
Cabernet Sauvignon	3,61
Merlot	3,02
Cabernet/ Merlot/Tannat	3,56
Chardonay	0,60
Riesling/Chardonay	0,49
Vinho popular tinto 1	2,23
Vinho popular tinto 2	2,03
Vinho popular branco	0,64

Os compostos fenólicos são os principais constituintes nos vinhos e são responsáveis pela atividade antioxidante total desta bebida. Muitos trabalhos reportam que a atividade antioxidante dos vinhos é diretamente proporcional ao seu conteúdo de compostos fenólicos (Lucena, 2010; Minussi, 2003; Pachón, 2004; Paixão, 2007). A Figura 15 mostra a correlação entre atividade antioxidante total determinado pelo método proposto e os valores de fenólicos totais determinado pelo ensaio de Folin-Ciocalteu.

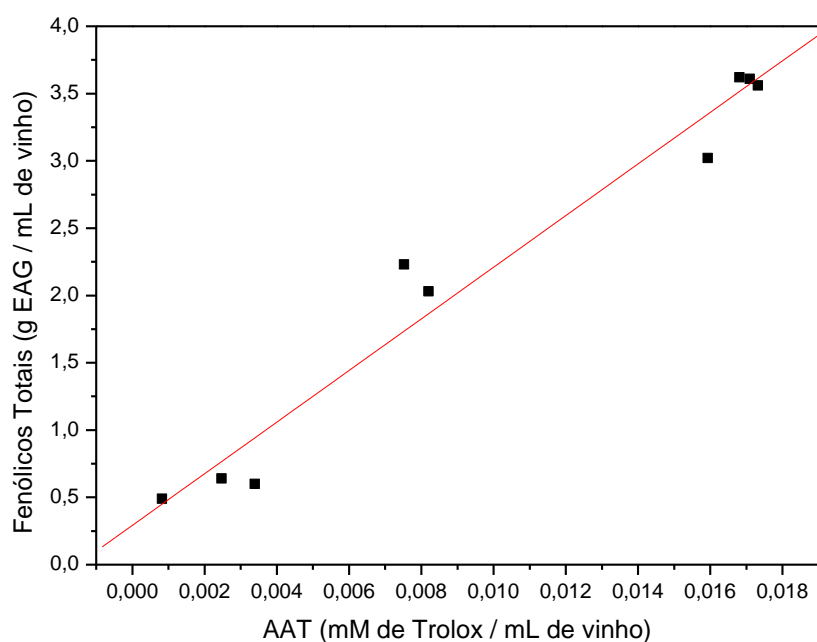


Figura 15. Correlação da atividade antioxidante total com o conteúdo de fenólicos totais nas amostras de vinhos.

O cálculo de regressão linear do gráfico de correlação apresentou um valor de coeficiente de correlação (R) igual a 0,9815. O valor de R próximo a 1, indica que as atividades antioxidantes estão diretamente correlacionados com o conteúdo de compostos fenólicos presente nos vinhos (Vaqueiro et al., 2010).

6. Conclusões

No presente trabalho foi proposta uma nova metodologia para a determinação da atividade antioxidante total, utilizando o radical DPPH, através de sistemas FIA.

Esta nova metodologia foi otimizada utilizando a MSR e um planejamento composto central com pontos axiais que avaliaram se os efeitos dos parâmetros fluxo, comprimento das alças e comprimento do reator foram significativos. Através da análise de variância (ANOVA), os dados foram ajustados a um modelo quadrático que determinou que todos os fatores, a interação comprimento das alças-comprimento do reator e o efeito quadrático do comprimento do reator foram significativos. Ainda de acordo com a ANOVA, o modelo quadrático proposto foi significativo e não apresentou falta de ajuste a nível de 95 % de confiança.

O método otimizado foi aplicado em amostras de vinho tinto e branco e os resultados obtidos foram correlacionados aos resultados do método convencional para a análise de DPPH. Através desta correlação concluiu-se que não houve diferença significativa nos resultados obtidos para os dois métodos. Logo, o método proposto pode ser utilizado para determinação da atividade antioxidante total em amostras de vinho com a vantagem de economizar 58 % no consumo do reagente DPPH e 62,6 % no solvente metanol em comparação com o método convencional.

Com base nos resultados obtidos, observou-se que os vinhos tintos, principalmente os vinhos tintos finos, apresentaram maior atividade antioxidante

e maior conteúdo de compostos fenólicos quando comparada ao vinho branco.

Isto se deve a ausência de antocianinas nos vinhos brancos.

7. Referências

- Abe, T.L.; Da Mota, R.V.; Lajolo F.M.; Genovese, M.I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L e *Vitis vinifera* L. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*,27(2), 394-400,2007.
- Angelo, P.M.; Jorge, N. Compostos fenólicos em alimentos- Uma breve revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 66 (1), 232-240,2007.
- Arnous, A., Makris, D.P.; Kefalas, P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 655-665, 2002.
- Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203, 2006.
- Barros Neto, B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E. *Como fazer experimentos*. 3ª ed. Editora da UNICAMP, Campinas, 2007.
- Beer, D.; Joubert, E.; Gelderblom, W.C.A.; Manley, M. Phenolic compounds: A review of their possible role as in vivo antioxidants of wine. *S. Afri. Enol. Vitic*, 23 (2), 2002.
- Bergamin, H., Zagatto, E. A. G, Krug, F. J., Reis, B. F. Merging Zones in Flow Injection Analysis: Part 1. Double Proportional Injector and Reagent Consumption, *Analytica Chimica Acta*, 101, 17-23, 1978.
- Bezerra, A.M.; Santelli, R.E.; Oliveira, E.P.; Villar, L.S.; Escaleira, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76, 965-977, 2008.

- Bianchi, M.L.P.; Antunes, M.H.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de nutrição, Campinas*, 12, 123-130, 1999.
- Calabrese, G. Nonalcoholic compounds of wine the phytoestrogen resveratrol and moderate red wine consumption during menopause. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, 25 (2), 111-114, 1999.
- Cao, Y.; Cao, A.A.; Brakenhielm, E. Antiangiogenic mechanism of diet derived polyphenols. *The Journal of Biochemistry*, 13 (7), 380-390, 2002.
- Cerqueira, F.M.; Medeiros, M.H.G; Augusto, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*, 30(2), 441-449, 2007.
- Counet, C.; Callemien, D.; COLLIN, S. Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. *Food Chemistry*, 98, 649-657, 2006.
- Cruz, A. P. G.. Avaliação do efeito da extração e da microfiltração do açaí sobre as composição e atividade antioxidante. *Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro*, 2008.
- Ferreira, A.L.A.; Matsubara L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica, Brasil*, 43, 61-68, 2007.
- Fonseca, S.G.C.; Silva L.B.L.; Castro, R.F.; Santana P.P. Validação da metodologia analítica para doseamento de soluções de lapachol por CLAE. *Química Nova*, 27, 157-159, 2004.
- Goméz-Miguez, M.; González-Miret, M.L.; Heredia, F.H. Evolution of color and anthocyanin composition of Syrah wines elaborated with pre-fermentative cold maceration. *Journal of Food Engineering*, 79, 271-278, 2007.

- Granato, D.; Katayama, F.C.U.; Castro, I.A. Assessing the association between phenolic compounds and the antioxidant activity of Brazilian red wines using chemometrics. *LWT- Food Science and Technology*, 43, 1542-1549, 2010.
- Guerra, C.C.; Mandeli, F.; Tonieto, J.; Zannus, M.S.; Camargo, U.A. *Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos*. Embrapa uva e vinho, 2009.
- Hollman, P.C.H.; Arts, I.C.W. Flavonols, flavones and flavanols- Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (7), 1081-1093, 2000.
- Karacabey, E.; Mazza, G. Optimization of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology. *Food Chemistry*, 119, 343-348, 2010.
- Karlberg, B.; Pacey, G.E. *Flow injection analysis – A practical guide*. Elsevier. Amsterdam, 1989.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, 89, 217–233, 2011.
- Lima, G.F.; Brondi, A.M.; Paiva, A.L.S.F.; Tarley, C.R.T.; Oliveira, A.F.; Wisniewski, C.; Luccas P.O. Direct introduction of water sample in multisegmented flow-injection analysis for sulfide determination. *Analytical sciences*, 27, 309-313, 2011.
- Lima, M. J. R.; Tóth, I. V.; Rangel, A. O. S. S. A new approach for the sequential injection spectrophotometric determination of the total antioxidant activity, *Talanta*, 68, 207–213, 2005.
- Lu, R.; Serrero, G. Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of woman breast cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 179 (3), 297-304, 1999.

- Lucena, A.P.S.; Nascimento, R.J.B.; Maciel, J.A.C.; Tavares, J.X.; Barbosa-Filho, J.M.; Oliveira, E.J. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 30-36, 2010.
- Magalhães, L.M.; Santos, M.; Segundo, M.A.; Reis, S.; Lima, J.L.F.C. Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. *Analytica Chimica Acta*, 558, 310-318, 2006.
- Magalhães, L.M.; Santos, M.; Segundo, M.A.; Reis, S.; Lima, J.L.F.C. Flow injection methods for fast screening of antioxidant capacity. *Talanta*, 77, 1559-1566, 2008.
- Maisuthisakul, P; Suttajit, M; Pongsawatmanit, R. Assesment of phenolic content and free radical scavenging apacity of some Thai indigenous plant. *Food Chemistry*, 100, 1409-1418, 2007.
- Melo, L.M.R. *Vitivinicultura brasileira: panorama 2010*. EMBRAPA, 2010.
- Milardovic, S.; Kereković, I.; Rumenjak, V. A flow injection biamperometric method for determination of total antioxidant capacity of alcoholic beverages using bienzymatically produced ABTS. *Food Chemistry*, 105 (4), 1688-1694, 2007.
- Minussi, R.C.; Rossi, M.; Bologna, L.; Cordi, L.; Rotilio, D.; Pastore, G.M.; Durán, N. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry*, 82, 409-416, 2003.
- Mrazek, N., Watla-iad, K., Deachathai, S., Suteerapataranon, S. Rapid Antioxidant Capacity Screening in Herbal Extracts Using a Simple Flow Injection – Spectrophotometric System, *Food Chemistry*, 132, 544 – 548, 2012.

- Mulero, J.; Pardo, F.; Zafrilla. Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 569-574, 2010.
- Munhóz-Espada, A.C. Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of concord, Norton and Marechal foch grapes and wines. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 52, 201-206, 1999.
- Myers, R. H. & Montgomery, D. C. (2002) *Response surface methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, (2nd Ed.). New York: John Wiley & Sons.
- Nalewajko-Sieliwoniuk, E.; Nazaruk, J.; Antypiuk, E.; Anatol, K. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in *Erigeron acris* L. extracts and pharmaceutical formulation by flow injection analysis with inhibited chemiluminescent detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48 (3), 579-586, 2008.
- Nixdorf, S.L.; Gutiérrez, I.H. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity. *Analytica Chimica Acta*, 659, 208-215, 2010.
- Oliveira, A.C.; Valentim, I.B.; Goulart, M.O.F.; Silva, C.A.; Bechara, E.J.H.; Trevisan, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, 32 (3), 689-702, 2009.
- Pachón, M.S.F.; Villaño, D.; Parrilla, M.C.G.; Troncoso, A.M. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analytica Chimica Acta*, 513, 113-118, 2004
- Paixão, N.; Perestrelo, R.; Marques, J.C.; Camara, J.S. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*, 105, 204-214, 2007.

- Prasad, K.N.; Hassan, F.A.; Yang B.; Kong K.W.; Ramanan R.N.; Azlan a.; Ismail, A. Response surface optimization for the extraction of phenolic compounds and antioxidants capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm peels. *Food Chemistry*, 128, 1121-1127, 2011.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290 – 4302, 2005.
- Ratna, W.N.; Simonelli, J.A. The action of dietary phytochemicals quercetin, catequin, resveratrol and naringenin on estrogen-mediated gene expression. *Life Sciences*, 70, 1577-1589, 2002.
- Reis, B.F. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. *Química Nova*, 19, 51-55, 1996.
- Reis, B.F.; Kronka, A.M. A análise química por injeção em fluxo contínuo. *Química Nova*, 12, 82-90, 1989.
- Rocha, F.R.P.; Martelli, P.B.; Reis, B.F. Experimentos didáticos utilizando sistema de análise por injeção em fluxo. *Química Nova*, 23, 119-125, 2000.
- Rockenbach, I.I.; Silva, G.L.; Rodrigues, E.; Kuskoski, E.M.; Fett, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, 238-244, 2008.
- Roussis, I.G.; Lambropoulos, I.; Tzimas, P.; Gkoulioti, A.; Marinos, V.; Tsoupeis, D.; Boutaris, I. Antioxidant activities of some Greek wines and wine phenolic extracts. *Journal of Food Composition Analysis*, 21, 614-621, 2008.
- Ruzicka, J.; Hansen E.H. *Flow Injection Analysis*. V-62, EUA, 1981.

- Sautter, C.K.; Denardim, S.; Alves, A.O.; Mallmann, C.A.; Penna, N.G.; Hecktheuer, L.H. Determinação do resveratrol em sucos de uva no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25 (3), 437-442, 2005.
- Shpigun, L. K., Arharova, M. A., Brainina, K. Z., Ivanova, A. V. (2006) Flow injection potentiometric determination of total antioxidant activity of plant extracts. *Analytica Chimica Acta*, 573, 419 – 426, 2006.
- Thongchai W.; Liawruangrath B.; Liawruangrath S. Flow injection analysis of total curcuminoids in turmeric and total antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. *Food Chemistry*, 112, 494-499, 2009.
- Ukeda H.; Adachi Y.; Sawamura M. Flow injection analysis of DPPH radical based on electron spin resonance. *Talanta*, 58, 1279-1283, 2002.
- Vaqueiro, M. J. R., Sevalle, L. R. T., Nadra, M. C. M., Saad, A. M. S. Antioxidant Capacity and Antibacterial activity of Phenolic Compounds From Argentina Herbs Infusion, *Food Control*, 21, 779 – 785, 2010.
- Wijngaard, H.H.; Ballay, M.; Brunton N. The optimization of extraction of antioxidants from potato peel by pressurized liquids. *Food Chemistry*, xx, xx-xx, 2011.
- Zhang, W.J.; Bjorn, L.O. The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia*, 80, 207-218, 2009.