

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E DE PÓS GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO *Stricto sensu*  
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TIAGO MARGRAF

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS ANALÍTICOS E EFEITOS DA ORIGEM  
GEOGRÁFICA, VARIETAL E CULTIVO AGRONÔMICO NA COMPOSIÇÃO  
QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE SUCOS DE UVA

PONTA GROSSA

2015

TIAGO MARGRAF

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS ANALÍTICOS E EFEITOS DA ORIGEM  
GEOGRÁFICA, VARIETAL E CULTIVO AGRONÔMICO NA COMPOSIÇÃO  
QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE SUCOS DE UVA

Dissertação de Mestrado apresentada como  
requisito para obtenção do Título de Mestre em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Programa  
de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos da Universidade Estadual de Ponta  
Grossa - PR

Orientador: Prof. Dr. Daniel Granato

PONTA GROSSA  
2015

**Ficha Catalográfica**  
**Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG**

MARGRAF, TIAGO

M329      Avaliação de diferentes métodos analíticos e efeitos da origem geográfica, varietal e cultivo agrônômico na composição química e atividade antioxidante de sucos de uva/ TIAGO MARGRAF. Ponta Grossa, 2015.  
105f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Área de Concentração: Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Granato.

1.cultivo orgânico. 2.peroxidação lipídica. 3.capacidade redutora. 4.análise multivariada. 5.Vitis sp. I.Granato, Daniel. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. T.

CDD: 634.8

## TERMO DE APROVAÇÃO

TIAGO MARGRAF

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS ANALÍTICOS E EFEITOS DA ORIGEM GEOGRÁFICA, VARIETAL E CULTIVO AGRONÔMICO NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE SUCOS DE UVA.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

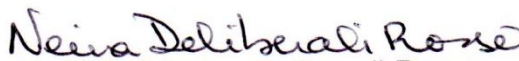
Orientador:



Prof. Dr. Daniel Granato – UEPG



Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes – UEPG



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Neiva Deliberali Rosso – UEPG



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Lúcia Masson – UFPR

Ponta Grossa, 12 de novembro de 2015.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por tudo, que mesmo sem merecermos, nos concede por seu infinito amor.

Ao Prof. Dr. Daniel Granato, meu orientador, pelos ensinamentos, confiança, auxílio e respeito ao longo do desenvolvimento desse projeto.

Ao laboratório do GTM, por disponibilizar equipamentos e vidrarias para a realização de grande parte das análises instrumentais.

Ao laboratório multiusuário – Labmu, por disponibilizar o uso do espectrofotômetro UV-VIS para análises.

À Aline Alberti, pela análise de ácido ascórbico por HPLC.

Ao Eriel Forville de Andrade, CEPPA-UFPR, pelas análises de ácidos fenólicos por HPLC.

À Prof. Dr.<sup>a</sup> Maria Lucia Masson, CEPPA-UFPR, por facilitar o uso do HPLC para as análises dos ácidos fenólicos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e ajuda financeira.

À Denise Mendes, técnica de laboratório do CTA, pelo auxílio com reagentes, materiais e equipamentos.

## RESUMO

Em todo o mundo, o consumo de sucos de uva roxa tem crescido, visto que vários estudos apontam os potenciais benefícios à saúde, aliados a uma alimentação equilibrada e a prática regular de exercícios físicos. Esses potenciais benefícios estão relacionados com os compostos bioativos presentes nesta fruta e em demais vegetais, responsáveis pela inibição de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, formadas em processos oxidativos e inflamatórios no corpo humano. Nesse contexto, pesquisadores têm testado e validado metodologias rápidas, baratas, precisas e reprodutíveis, que possibilitem estimar o conteúdo de compostos bioativos em bebidas e alimentos. Nesse cenário, os objetivos deste estudo foram divididos em dois capítulos experimentais, dos quais o Capítulo II objetivou testar e validar uma metodologia espectrofotométrica mais seletiva que o Folin-Ciocalteu para quantificar o teor de compostos fenólicos totais em suco de uva. Já no Capítulo III, objetivou-se caracterizar n=62 sucos de uvas roxas brasileiros de diferentes origens geográficas (RS, PR, e SC), agronômicas (orgânicos e convencionais), e genotípicas (Bordô, Isabel, e Concord) quanto às suas propriedades físico-químicas, químicas, e atividade antioxidante *in vitro* usando sistemas químicos e biológico. Os resultados mostraram que o método do Azul da Prússia apresentou um baixo limite de detecção ( $0,27 \text{ mg L}^{-1}$ ) e quantificação ( $0,92 \text{ mg L}^{-1}$ ), e uma alta associação ( $r = 0,923$ ;  $p < 0,0001$ ) com o método padrão de Folin-Ciocalteu para a matriz de suco de uva, além de menor tempo de reação e alta seletividade comparado ao ensaio de Folin-Ciocalteu. A origem geográfica e a variedade de uva mostraram-se os fatores mais importantes na distinção dos sucos ( $p < 0,05$ ) para atividade antioxidante e alguns marcadores químicos. Já para os sucos orgânicos e convencionais, com exceção para alguns ácidos fenólicos determinados por cromatografia líquida de alta eficiência, não foram encontradas distinções estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Um total de n=18 sucos de uva foram caracterizados por apresentarem alta, intermediária e baixa atividade antioxidante *in vitro* usando quatro metodologias diferentes (Seqüestro de radicais ABTS $^{\bullet+}$ ; Poder antioxidante de redução do ferro - FRAP; Poder redutor total; Potencial redutor dos compostos fenólicos hidrofílicos - PRCFH) e foram submetidos à análise de inibição da peroxidação lipídica a  $37^\circ\text{C}$  por meio de um ensaio biológico em meio tamponado em pH 7,4. A inibição da peroxidação lipídica dos sucos de uva apresentou uma correlação significativa ( $r \geq 0,505$ ;  $p \leq 0,02$ ) com outros ensaios de atividade antioxidante, concluindo-se que a atividade antioxidante *in vitro* de suco de uva roxa brasileiro apresenta associação tanto por métodos químico quanto em meio biológico.

**Palavras-chave:** cultivo orgânico, peroxidação lipídica, capacidade redutora, análise multivariada, *Vitis* sp.

## ABSTRACT

Worldwide, the consumption of purple grape juice has grown since several studies point to the potential health benefits, combined with a balanced diet and regular physical exercise. These potential benefits are related to the bioactive compounds present in this fruit and other plants, responsible for the inhibition of reactive oxygen and nitrogen species, formed in oxidative and inflammatory processes in the human body. In this context, researchers have tried and tested fast, inexpensive, accurate and reproducible methods, which are able estimating the content of bioactive compounds in beverages and foods. In this scenario, the objectives of this study were divided in two experimental chapters, where the Chapter II had as purpose to test and validate a more selective spectrophotometric method than the Folin-Ciocalteu assay, to quantify the content of phenolic compounds in grape juice. Already the Chapter III had as purpose to characterize  $n = 62$  juices Brazilian purple grapes from different geographic origins (RS, PR and SC), agronomic (organic and conventional) and genotypic (Bordo, Isabel and Concord) about its physicochemical and chemical properties, and *in vitro* antioxidant activity using chemical and biological systems. The results showed that the Prussian Blue method has low detection ( $0.27 \text{ mg L}^{-1}$ ) and quantification limit ( $0.92 \text{ mg L}^{-1}$ ), and a high association ( $r = 0.923$ ,  $p < 0.0001$ ) with the standard method of Folin-Ciocalteu reagent for the grape juice matrix, and also a faster reaction and high selectivity compared to the Folin-Ciocalteu assay. Furthermore, the geographical origin and the grape variety proved to be the most important factors in distinguishing juices ( $p < 0.05$ ) for antioxidant activity and some chemical markers. However for the organic and conventional juices, except for some phenolic acids determined by high-performance liquid chromatography, there were no statistically significant distinctions ( $p > 0.05$ ). A total of  $n = 18$  grape juices were characterized by presenting high, intermediate and low antioxidant activity *in vitro* using four different methodologies (Scavenging of  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  radical; Ferric-reducing antioxidant power - FRAP; Total reducing power; and Reducing potential of the hydrophilic phenolic compounds - RPHPC) and were subjected to analysis of the inhibition of lipid peroxidation at  $37^\circ\text{C}$  by means of a biological assay in buffered medium at pH 7.4. The inhibition of lipid peroxidation of the grape juice showed a significant correlation ( $r \geq 0.505$ ;  $p \leq 0.02$ ) with other antioxidant activity assays, concluding that the antioxidant activity *in vitro* of Brazilian purple grape juice has association either by chemical methods or by biological means.

**Keywords:** organic farming, lipid peroxidation, reducing capacity, multivariate analysis, *Vitis* sp.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

|                                                                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.1:</b> Fluxograma básico do processamento do suco de uva .....                                                                                                         | 18 |
| <b>Figura 1.2:</b> Estruturas químicas de alguns ácidos hidroxibenzóicos.....                                                                                                      | 20 |
| <b>Figura 1.3:</b> Estruturas químicas de alguns ácidos hidroxicinâmicos.....                                                                                                      | 21 |
| <b>Figura 1.4:</b> Estruturas químicas genéricas de algumas classes de flavonóides.....                                                                                            | 22 |
| <b>Figura 1.5:</b> Estrutura química de algumas antocianidinas.....                                                                                                                | 23 |
| <b>Figura 1.6:</b> Estrutura química de alguns taninos.....                                                                                                                        | 25 |
| <b>Figura 1.7:</b> Estrutura química de um estilbeno.....                                                                                                                          | 25 |
| <b>Figura 1.8:</b> Reação de elétron transferência entre o molibdênio, metal presente no reagente de Folin-Ciocalteu, e um composto redutor, no caso o anion fenolato.....         | 27 |
| <b>Figura 1.9:</b> Complexação do alumínio com um flavonoide, no caso com a luteolina.....                                                                                         | 27 |
| <b>Figura 1.10:</b> Complexação metálica entre o molibdato de sódio e ácido caféico, um o-difenol, em meio aquoso.....                                                             | 28 |
| <b>Figura 1.11:</b> Formas estruturais predominantes de antocianinas em diferentes pHs: o mecanismo do método pH diferencial.....                                                  | 29 |
| <b>Figura 1.12:</b> Reação da vanilina com um tanino condensado em meio ácido para formar um complexo com coloração.....                                                           | 30 |
| <b>Figura 1.13:</b> Estabilização do radical $ABTS^{\cdot+}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.....                                                   | 30 |
| <b>Figura 1.14:</b> Representação da reação do FRAP que mostra a redução do complexo férrico-tripiridiltiazina (Fe(III)-TPTZ) em complexo ferroso (Fe(II)-TPTZ) em meio ácido..... | 31 |
| <b>Figura 1.15:</b> Reação de redução do $Fe^{3+}$ e sua complexação com o ferricianeto para formar o complexo metálico hexacianoferrato(II) de ferro(III).....                    | 32 |
| <b>Figura 1.16:</b> Reação de peroxidação lipídica induzida por ferro(II), cujos produtos reagem com o ácido tiobarbitúrico.....                                                   | 33 |

### CAPÍTULO II



|                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 2.1:</b> Análise de regressão entre os ensaios de Folin-Ciocalteu e Azul da Prússia na determinação do conteúdo fenólico total em <i>I. paraguariensis</i> e <i>C. sinensis</i> (A), e em sucos de uva roxa (B)..... | 53 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### CAPÍTULO III

|                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 3.1:</b> Atividade Antioxidante e Capacidade Redutora dos sucos de uva em função do método de cultivo (A), região de cultivo (B) e variedade de uva (C).....                                                                                                            | 77 |
| <b>Figura 3.1:</b> Análise de componentes principais (PCA) para projeção dos sucos em função do método de cultivo (A), região produtora (B) e variedade de uva (C)..                                                                                                              | 81 |
| <b>Figura 3.3:</b> Análise de componentes principais (PCA) para escolha dos sucos a serem utilizados na análise de lipoperoxidação (A) e classificação dos dados de inibição da lipoperoxidação em função da composição química e atividade antioxidante <i>in vitro</i> (B)..... | 84 |

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

|                                                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 2.1:</b> Parâmetros da curva analítica, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os ensaios de Folin-Ciocalteu e Azul da Prússia.....                                                    | 49 |
| <b>Tabela 2.2:</b> Recuperação, repetibilidade e reprodutibilidade dos ensaios Azul da Prússia e Folin-Ciocalteu realizadas em microplacas de 96 poços, incluindo o intervalo de confiança (IC) de 95%..... | 50 |
| <b>Tabela 2.3:</b> Compostos fenólicos totais de chás e sucos de uva comerciais determinados usando o método Azul da Prússia e Folin-Ciocalteu.....                                                         | 51 |
| <b>Tabela 2.4:</b> Seletividade dos métodos de Azul da Prússia e Folin-Ciocalteu frente a alguns compostos interferentes em suco puro de uva roxa.....                                                      | 55 |

### CAPÍTULO III

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 3.1:</b> Propriedades físico-químicas e composição química dos sucos de uva em função do método de cultivo..... | 73 |
| <b>Tabela 3.2:</b> Propriedades físico-químicas e composição química dos sucos de uva em função da região de cultivo..... | 74 |
| <b>Tabela 3.3:</b> Propriedades físico-químicas e composição química dos sucos de uva em função da variedade de uva.....  | 75 |

## LISTA DE SIGLAS

|         |                                                       |
|---------|-------------------------------------------------------|
| ABTS    | Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) |
| ANOVA   | Análise de variância                                  |
| DNA     | Ácido desoxirribonucleico                             |
| DPR     | Desvio padrão relativo                                |
| ERN     | Espécie Reativa de Nitrogênio                         |
| ERO     | Espécie Reativa de Oxigênio                           |
| FC      | Folin-Ciocalteu                                       |
| FRAP    | Poder antioxidante de redução do ferro                |
| HAA     | Alta atividade antioxidante                           |
| HPLC    | Cromatografia líquida de alta eficiência              |
| IBRAVIN | Instituto Brasileiro do Vinho                         |
| IC      | Intervalo de Confiança                                |
| IAA     | Atividade antioxidante intermediária                  |
| LAA     | Baixa atividade antioxidante                          |
| LD      | Limite de detecção                                    |
| LDL     | Lipoproteína de baixa densidade                       |
| LQ      | Limite de quantificação                               |
| MAPA    | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento   |
| PB      | Azul da Prússia                                       |
| PCA     | Análise de componentes principais                     |
| PRCFH   | Potencial Redutor de compostos fenólicos hidrofílicos |
| TBA     | Ácido tiobarbitúrico                                  |

## SUMÁRIO

|                            |    |
|----------------------------|----|
| <b>INTRODUÇÃO</b> .....    | 12 |
| <b>OBJETIVOS</b> .....     | 13 |
| Objetivo geral.....        | 13 |
| Objetivos específicos..... | 13 |

### CAPÍTULO I

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....                                                   | 15 |
| 1.1 Alimentos orgânicos.....                                                           | 15 |
| 1.2 Suco de uva.....                                                                   | 15 |
| 1.3 Radicais livres e Compostos antioxidantes.....                                     | 18 |
| 1.4 Metodologias para determinação da composição química e atividade antioxidante..... | 26 |
| <b>REFERENCIAS</b> .....                                                               | 33 |

### CAPÍTULO II

#### COMPARAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS DE FOLIN-CIOCALTEU E AZUL DA PRÚSSIA PARA ESTIMAR O CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL DE SUCOS E CHÁS USANDO MICROPLACAS DE 96 POÇOS

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>RESUMO</b> .....                                                                                                 | 41 |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....                                                                                           | 41 |
| <b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                                                                                  | 44 |
| 2.1 Reagentes.....                                                                                                  | 44 |
| 2.2 Amostras e preparação dos extratos.....                                                                         | 44 |
| 2.3 Estimativa do conteúdo de fenólicos totais.....                                                                 | 45 |
| 2.3.1 Ensaio de Folin-Ciocalteu.....                                                                                | 45 |
| 2.3.2 Método do Azul da Prússia.....                                                                                | 45 |
| 2.3.3 Curvas analíticas, repetibilidade, reprodutibilidade, seletividade e limites de detecção e quantificação..... | 46 |
| 2.5 Análise de dados.....                                                                                           | 48 |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                                                                               | 48 |
| <b>4 CONCLUSÕES</b> .....                                                                                           | 56 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....                                                                                            | 56 |

### CAPÍTULO III

#### EFEITO DA ORIGEM GEOGRÁFICA, VARIEDADE E SISTEMA DE CULTIVO NOS COMPOSTOS BIOATIVOS E FUNCIONALIDADE *in vitro* DE SUCOS DE UVA, USANDO SISTEMAS QUÍMICOS E BIOLÓGICO

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>RESUMO</b> .....                                                                                                                         | 64 |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....                                                                                                                   | 64 |
| <b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                                                                                                          | 66 |
| 2.1 Reagentes.....                                                                                                                          | 66 |
| 2.2 Amostras de suco de uva.....                                                                                                            | 66 |
| 2.3 Análises físico-químicas.....                                                                                                           | 66 |
| 2.4 Marcadores químicos.....                                                                                                                | 67 |
| 2.5 Capacidade redutora e atividade antioxidante <i>in vitro</i> : sistemas químicos.....                                                   | 69 |
| 2.6 Inibição da peroxidação lipídica induzida em sistema biológico.....                                                                     | 70 |
| 2.7 Análise estatística.....                                                                                                                | 71 |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                                                                                                       | 72 |
| 3.1 Propriedades físico-químicas.....                                                                                                       | 72 |
| 3.2 Composição química e atividade antioxidante dos sucos.....                                                                              | 76 |
| 3.3 Análise multivariada do efeito da origem geográfica, variedade e sistema de cultivo na composição química e atividade antioxidante..... | 80 |
| 3.4 Correlação entre as capacidades antioxidantes químicas e biológica <i>in vitro</i> .....                                                | 83 |
| <b>4 CONCLUSÕES</b> .....                                                                                                                   | 86 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....                                                                                                                    | 87 |
| <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....                                                                                                           | 93 |
| <b>APÊNDICE A – Cromatograma típico de uma amostra de suco de uva</b> .....                                                                 | 94 |
| <b>APÊNDICE B – Dados de equação da curva e tempo de retenção dos ácidos fenólicos</b> .....                                                | 96 |
| <b>ANEXO A – Artigo aceito para publicação</b> .....                                                                                        | 98 |

## INTRODUÇÃO

O suco de uva é um produto consumido em todo o mundo, não só pelo seu aroma e sabor, mas também devido aos seus efeitos benéficos à saúde quando consumido regularmente. Comparados na sua composição com a própria uva, os sucos de uva são uma importante fonte de polifenóis e muitas pessoas estão se conscientizando da importância de seu consumo em sua dieta diária. Nesse sentido, sucos de uva comerciais já mostraram efeito antioxidante sobre a lipoproteína de baixa densidade (LDL) comparável ao do vinho tinto (FRANKEL et al., 1998). Além disso, alguns estudos *in vivo* (VINSON; TEUFEL; WU, 2001; AGUIAR Jr. et al., 2011; MACEDO et al., 2013) mostraram que os compostos polifenólicos presentes em produtos à base de uva, incluindo suco e vinho, atuam como antioxidantes, reduzindo assim os efeitos deletérios de espécies reativas no plasma e nos órgãos.

Assim, a medição da atividade antioxidante usando diferentes sistemas de avaliação (*in vitro* e *ex vivo*) de produtos de uva é uma abordagem importante e complementar para a determinação das vias bioquímicas e também a identificação de substâncias químicas que exercem tal atividade em modelos *in vivo*, obtendo assim uma correlação estatisticamente significativa entre estudos *in vivo* e *in vitro*.

Muitos trabalhos tem verificado que as quantidades de compostos fenólicos nos sucos de uva são extremamente dependentes dos tratamentos aos quais são submetidos a uva e o mosto, como o uso de diferentes binômios de tempo e temperatura, aplicação de enzimas pectinolíticas (TOALDO et al., 2014; LAMBRI et al., 2015; LIMA et al., 2015). E também do método de cultivo (orgânico, biodinâmico e convencional), região produtora e variedade genotípica da uva (BURIN et al., 2014; GRANATO; KOOT; VAN RUTH, 2014; CRUPI et al., 2015; SILVA et al., 2015).

A produção orgânica de alimentos é um sistema de gestão de produção ecológica baseada no uso mínimo de insumos não-agrícolas e de práticas de gestão que restauram, mantêm e melhoraram a harmonia ecológica. Um número crescente de agricultores estão adotando este sistema de plantio a fim de reduzir os custos em insumos, conservar os recursos não-renováveis, e aumentar a renda agrícola.

Levando em conta essa existência de estudos com produtos e subprodutos de uvas produzidas em lugares distintos, porém a ausência de trabalhos que abordem a avaliação de sucos de uva de um mesmo país, que ao mesmo tempo são advindos de diferentes tipos de cultivo e de diferentes variedades de uva, suas composições químicas e atividades antioxidantes devem ser avaliadas e

comparadas, com o intuito de verificar o peso desses efeitos na funcionalidade dos produtos finais.

## OBJETIVOS

### *Objetivo Geral*

Avaliar duas metodologias colorimétricas diferentes na quantificação do teor de compostos fenólicos totais, bem como os efeitos da origem, varietal e cultivo agrônômico na composição química e atividade antioxidante de sucos de uva brasileiros

### *Objetivos específicos*

- Examinar metodologias analíticas quanto as suas qualidades potenciais de marcadores de tipicidade de sucos de uva produzidos no Brasil com base em:
  - Compostos fenólicos totais, flavonoides, *orto*-difenólicos, taninos condensados, e antocianinas monoméricas, além de acidez, pH e sólidos solúveis totais dos sucos de uva;
  - Ácidos fenólicos individuais por cromatografia líquida de alta eficiência
  - Atividade antioxidante *in vitro* dos sucos de uva baseada em quatro ensaios químicos: Potencial redutor de compostos fenólicos hidrofílicos, poder redutor, poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), seqüestro de radicais livres pelo método ABTS;
  - Atividade antioxidante *in vitro* de inibição da peroxidação lipídica usando um modelo biológico;
- Avaliar o uso de métodos estatísticos multivariados destinados a discriminar os sucos de uva em função do sistema de cultivo, origem e variedades de uva;
- Correlacionar as composições químicas com as atividades antioxidantes *in vitro* dos métodos químicos e biológico usando métodos estatísticos multivariados;

## **CAPÍTULO I**



## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Produtos orgânicos

Alimento orgânico é o termo dado aos alimentos produzidos sem o uso de pesticidas no caso de produtos de origem vegetal e sem antibióticos ou hormônios de crescimento no caso de produtos de origem animal. Ainda, esses alimentos devem ser produzidos por métodos ambientalmente seguros, ou seja, o produto deve ser sem fertilizantes químicos, organismos geneticamente modificados, irradiação, solventes industriais ou aditivos químicos alimentares (PAUL; RANA, 2012).

A busca por alimentos isentos de agrotóxicos tem impulsionado a produção de alimentos orgânicos. No mundo, o faturamento com produtos orgânicos foi em torno de 64 bilhões de dólares no ano de 2013, liderado pelos Estados Unidos (US\$ 35 bilhões) e seguido pela Alemanha (US\$ 7 bilhões) e Canadá (US\$ 4,4 bilhões). O Brasil foi responsável por aproximadamente 2 bilhões de reais desse faturamento mundial (ORGANICS BRASIL, 2014). Apesar dessa parcela ínfima, a produção de alimentos orgânicos no Brasil cresceu mais de 300% no período de 2003 a 2013 (WOLFANG, 2013) e atualmente o Brasil se encontra como a quarta maior área de produção de alimentos orgânicos da América Latina (FLORES, 2015) e a sexta maior área de cultivo mundial de orgânicos (LERNOUD; WILLER, 2015).

Yin et al. (2010) a partir de um estudo sobre a intenção de compra de alimentos orgânicos com 432 questionários distribuídos na China, verificaram que os principais empecilhos da aquisição de alimentos orgânicos. O principal destes empecilhos é o alto preço de produção e certificação, que são repassados aos consumidores. O segundo grande empecilho é a pequena credibilidade depositada pelos consumidores nos órgãos de fiscalização e supervisão dos produtos, visto que o preço mais elevado e o aumento pela procura tendem à existência de produtos fraudados (CAPUANO et al., 2013). E por fim, o terceiro empecilho está relacionado com a divulgação deficiente da aquisição de alimentos orgânicos, visto seus benefícios à saúde e ao meio ambiente.

### 1.2 Suco de Uva

A uva é o fruto da videira, ou vinha, sendo uma das frutas mais cultivadas e consumidas no mundo, visto que inclusive a produção de uvas orgânicas se encontra entre as cinco culturas permanentes com maior área de cultivo no mundo

(LERNOUD; WILLER, 2015). Dados do Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN) mostram que no Rio Grande do Sul, de 2001 a 2014, ocorreu um aumento de 40% no processamento de uvas americanas/híbridas e aumento de 32% no processamento de uvas viníferas. Ainda, de acordo com os dados da IBRAVIN, de 2004 a 2014 ocorreu uma diminuição na produção de vinhos de uvas viníferas (10%) e vinhos comuns (37%), e aumento na produção de derivados da uva e do vinho (170%).

Entre os derivados da uva, encontra-se a elaboração de suco, que acaba por apresentar em sua composição todos os constituintes principais da própria uva, como açúcares, minerais, vitaminas e compostos bioativos, principalmente compostos fenólicos (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). A uva é uma das frutas com mais alto conteúdo de compostos fenólicos, sendo este um dos mais importantes constituintes do suco de uva, responsáveis pela cor e adstringência (AL BITTAR et al., 2013).

Segundo a Instrução Normativa 01/2000 do Ministério da Agricultura e Pecuária – MAPA (BRASIL, 2000), o suco de uva é a bebida não fermentada e não diluída, obtida da parte comestível da uva, a partir de processo tecnológico adequado. Sua cor deve ser vinho, rosado ou translúcido (branco) e deve ter sabor e aroma próprios.

Os sucos de uva podem ser encontrados como (BRASIL, 2004):

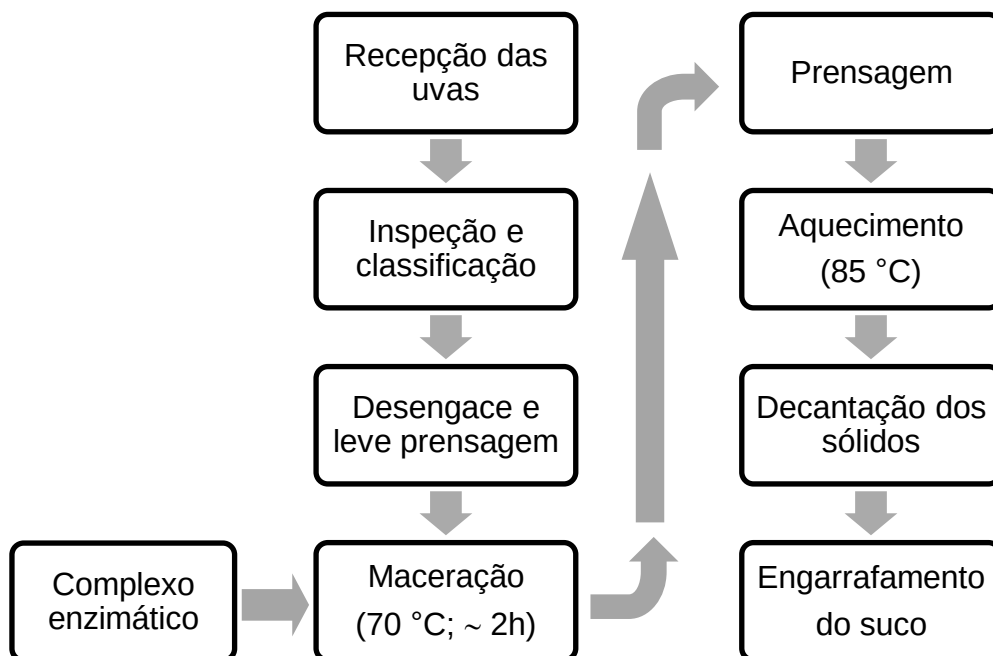
- Integral (concentração e composição natural, límpido ou turvo e sem adição de açúcares);
- Concentrado (suco parcialmente desidratado, por meio de processo tecnológico adequado, apresentando concentração mínima equivalente a 65 °Brix em sólidos solúveis naturais da fruta);
- Desidratado (produto sob a forma sólida, obtido pela desidratação do suco de uva, cujo teor de umidade não exceda 3%);
- Reprocessado ou reconstituído (produto obtido pela diluição do suco concentrado e/ou desidratado até a sua concentração natural);
- Adoçado, quando adicionado de açúcar.

A princípio, o suco pode ser elaborado com uva de qualquer variedade, americana ou européia, desde que apresente maturação adequada; bom estado

sanitário; adequada relação açúcar/acidez e aroma e sabor agradáveis e bem definidos. Entretanto, as variedades do grupo das americanas, especialmente da espécie *Vitis labrusca*, devido seu aroma “foxado” – aroma este negativo para vinhos finos, porém positivo para sucos – são bastante utilizadas para suco de uva. Enquanto que as variedades do grupo das européias (*Vitis vinifera*) perdem o frescor e adquirem o gosto de cozido por ocasião do processamento de suco (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). No Brasil, as uvas mais utilizadas na fabricação de sucos são as uvas americanas (*Vitis labrusca*) das variedades Isabel, Bordô, Concord e Niágara Branca, principalmente devido a seus aromas e sabores únicos, corantes, resistência a doenças e fácil manejo agrícola (SUCO DE UVA DO BRASIL, 2015).

Em geral, (Figura 1.1) o processo de obtenção do suco de uva ocorre primeiramente com a recepção das uvas na indústria, onde elas são inspecionadas e classificadas. Em seguida, as uvas seguem para a desengaçadeira, onde o engaço (parte lenhosa do cacho de uvas) é separado das uvas e ocorre uma leve prensagem dos grãos. A seguir as uvas são levemente prensadas e seguem para a maceração, com emprego de calor (~ 70 °C) e do composto enzimático, a fim de facilitar a extração dos componentes presentes nos grãos e na casca da uva. Ao final da maceração, isto é, após aproximadamente 2 horas, o conteúdo sólido é separado do conteúdo líquido e submetido à prensagem, para extrair o suco e pigmentos restantes. Após a prensagem, o suco é submetido a um período de decantação a 85 °C para separação dos sólidos em suspensão e aquecimento final que antecede o engarrafamento. O suco passa então por uma peneira para evitar obstrução dos bicos da enchedora e é engarrafado a 85 °C, não necessitando a pasteurização (POSTINGHER, 2015). Nesse processo, para se obter 1 litro de suco são necessários aproximadamente 1,3 kg de uvas.

**Figura 1.1:** Fluxograma básico do processamento do suco de uva



Fonte: Adaptado de Postingher (2015).

As quantidades de compostos fenólicos nos sucos de uva são extremamente dependentes dos tratamentos aos quais são submetidos a uva e o mosto, como o uso de diferentes binômios de tempo e temperatura, aplicação de enzimas pectinolíticas (TOALDO et al., 2014; LAMBRI et al., 2015; LIMA et al., 2015), bem como o método de cultivo (orgânico, biodinâmico e convencional), região produtora e variedade genotípica da uva (BURIN et al., 2014; GRANATO, KOOT, van RUTH, 2014; CRUPI et al., 2015; SILVA et al., 2015).

### 1.3 Radicais livres e compostos antioxidantes

A troca de elétrons é um dos processos químicos fundamentais para a sobrevivência das células (ALVES et al., 2010). O efeito colateral dessa troca é a produção de radicais livres de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Os radicais livres são produzidos naturalmente nas reações bioquímicas e fisiológicas do corpo humano, catalisados por metais como cobre e ferro, porém quando produzidos em excesso, ocasionam a oxidação de células, doenças e danos ao organismo (HALLIWELL, 2012).

Denham Harman, em 1957, formulou a “teoria dos radicais livres do envelhecimento”, onde, o envelhecimento é resultado do acúmulo de danos a proteínas e outras células devido o ataque de radicais livres das mitocôndrias (BIESALSKI, 2002). Os radicais livres estão ligados a processos fisiopatológicos como envelhecimento, câncer, aterosclerose e inflamações, visto que podem atacar e danificar qualquer molécula do organismo (YOO; SALIBA; PRENZLER, 2010). Segundo Biesalski (2002), as mitocôndrias produzem a maioria dos radicais livres em células vivas e os principais alvos deles são as membranas das células e o DNA. Estudos evidenciam que danos oxidativos do DNA das células são as causas de doenças como insuficiência crônica renal, hipertensão e infarto do miocárdio, além de câncer (AGUIAR Jr. et al., 2011). Ainda relacionada à peroxidação lipídica, a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade, conhecidas também como colesterol LDL, se deve ao fato destas apresentarem em sua estrutura elevada concentração de ácidos graxos polinsaturados (FRANKEL et al., 1998).

As formas mais conhecidas de espécies reativas de oxigênio (ERO) compreendem radicais de oxigênio, tais como anion radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), radical alcóxil ( $RO^{\bullet}$ ), radical peróxil ( $RO_2^{\bullet}$ ), e agentes oxidantes não-radicaís, tais como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) e ozônio ( $O_3$ ). Já as espécies reativas de nitrogênio (ERN) compreendem os radicais nitroxil ( $NO^{\bullet}$ ;  $NO_2^{\bullet}$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Craft et al., 2013).

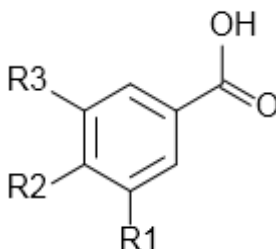
Essas espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio são controladas no corpo humano por múltiplos sistemas de defesa, que incluem as enzimas antioxidantes endógenas (catalase, glutatona-redutase, glutatona-peroxidase, superóxido dismutase), fatores endógenos (glutatona, co-enzima Q), sistemas de seqüestro de íons metálicos e substâncias antioxidantes (vitamina E, vitamina C, carotenóides) (Craft et al., 2013).

Os compostos fenólicos, os quais agem como antioxidantes naturais e encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal, apresentam em sua estrutura pelo menos um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxila (IGNAT; VOLF; POPA, 2011). Essa estrutura permite que estes compostos atuem como agentes redutores, interrompendo assim reações de oxidação, por meio da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, ou ainda complexando-se com metais iniciadores de oxidações (MELO et al., 2008), além de desempenharem o

papel de linha de defesa contra patógenos e oxidação nos vegetais (CATANEO et al., 2008). As principais fontes de compostos fenólicos são as frutas vermelhas e as frutas cítricas, como uva, mirtilo, cereja, limão e maçã.

Existem em torno de 8000 variantes estruturais dos compostos fenólicos, sendo possível classificá-los de acordo com o número de anéis e elementos ligados à estrutura. Os principais grupos de polifenóis são os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos (hidrolisáveis ou condensados) e os estilbenos (IGNAT; VOLFF; POPA, 2011). Os ácidos fenólicos são os compostos mais simples, formados por um anel benzênico e seus substituintes, e podem ser divididos em ácidos hidroxibenzóicos (Figura 1.2). Estes compostos apresentam sete átomos de carbono em sua estrutura, sendo que várias espécies destes ocorrem nas uvas, como os para-hidroxibenzóicos, protocatequico, vanílico, gálico e siríngico. E os ácidos hidroxicinâmicos (Figura 1.3), que apresentam nove átomos de carbono em sua estrutura, como os ácidos caféico, ferrúlico, para-cumárico e sinápico.

**Figura 1.2:** Estruturas químicas de alguns ácidos hidroxibenzóicos



Ácido p-hidroxibenzóico ou ácido 4-hidroxibenzóico  $\begin{cases} R1=H \\ R2=OH \\ R3=H \end{cases}$

Ácido protocatéquico ou ácido 3,4-diidroxibenzóico  $\begin{cases} R1=OH \\ R2=OH \\ R3=H \end{cases}$

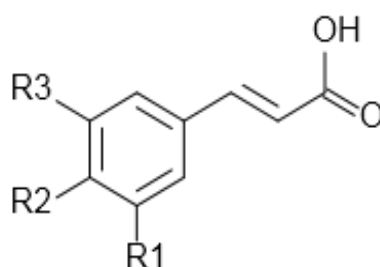
Ácido gálico ou ácido 3,4,5-triidroxibenzóico  $\begin{cases} R1=OH \\ R2=OH \\ R3=OH \end{cases}$

Ácido vanílico ou ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico  $\begin{cases} R1=OCH_3 \\ R2=OH \\ R3=H \end{cases}$

Ácido siríngico ou ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico  $\begin{cases} R1=OCH_3 \\ R2=OH \\ R3=OCH_3 \end{cases}$

Destes ácidos, os ácidos hidroxicinâmicos são antioxidantes mais ativos do que os ácidos hidroxibenzóicos, devido à dupla ligação que estes apresentam a mais na estrutura, o que os torna mais estáveis (ROCKENBACH, 2008).

**Figura 1.3:** Estruturas químicas de alguns ácidos hidroxicinâmicos



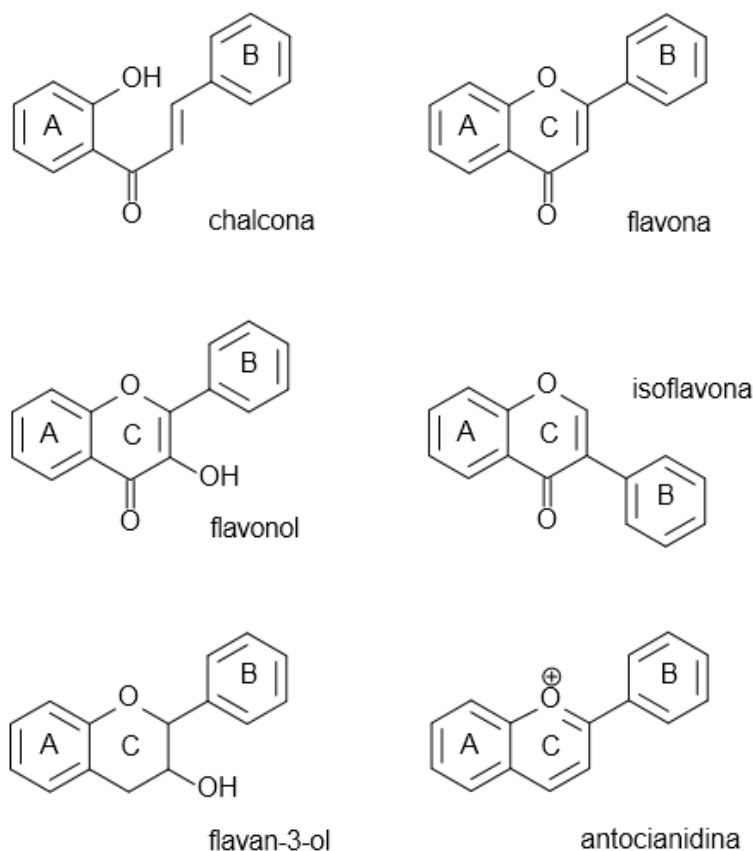
Ácido caféico ou ácido 3-(3,4-diidroxifenil)-2-propenóico  $\begin{cases} R1=OH \\ R2=OH \\ R3=H \end{cases}$

Ácido ferrúlico ou ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenóico  $\begin{cases} R1=OCH_3 \\ R2=OH \\ R3=H \end{cases}$

Ácido p-cumárico ou ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-propenóico  $\begin{cases} R1=H \\ R2=OH \\ R3=H \end{cases}$

Ácido sinápico ou ácido 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-2-propenóico  $\begin{cases} R1=OCH_3 \\ R2=OH \\ R3=OCH_3 \end{cases}$

Os flavonóides (Figura 1.4) constituem o maior grupo de polifenóis, sendo responsáveis pela coloração de flores, frutos e também algas. São formadas por um arranjo de quinze átomos de carbono, com dois anéis aromáticos (Figura 1.4 – anéis A e B) ligados por uma cadeia de até três carbonos, que formam um anel heterocíclico (Figura 1.4 – anel C). Estes compostos são gerados como metabólitos secundários nos vegetais, a partir da via do acetato/malonato (anel A) e fenilalanina pela via do chiquimato (anel B). A via do chiquimato origina o ácido cinâmico e seus derivados. A via do acetato origina um tricetídio com seis átomos de carbono. A condensação de um derivado do ácido cinâmico com o tricetídeo gera uma chalcona, com 15 átomos de carbono, precursor dos flavonoides. Variações no anel heterocíclico resultam nos principais sub-grupos dos flavonoides, ou seja, flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis, isoflavonas e antocianidinas. Substituições nos anéis A e B dão origem a diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides (IGNAT; VOLFF; POPA, 2011).

**Figura 1.4:** Estruturas químicas genéricas de algumas classes de flavonoides

Os flavonóis são comumente encontrados em frutas e legumes e agem como co-pigmentos das antocianinas nas uvas, e seu conteúdo varia em função de fatores ambientais como cultivo, clima e armazenamento (GONZÁLES-NEVES et al., 2011; IGNAT; VOLF; POPA, 2011). Estes compostos são caracterizados pela ligação dupla entre os carbonos 2 e 3, além de um grupamento hidroxila no carbono 3. Os principais flavonóis das uvas são a quercetina, a rutina e o kampferol. As flavonas são caracterizadas pela ligação dupla entre os carbonos 2 e 3, e ausência do grupamento hidroxila no carbono 3. Na uva estão presentes sob a forma de luteolina e genisteína. As flavanonas são caracterizados pelos três carbonos saturados e um átomo de oxigênio no carbono 4 do anel heterocíclico e geralmente apresentam um dissacarídeo no carbono 7. São encontradas em altas concentrações em frutas cítricas, no tomate e em plantas aromáticas como hortelã (SANT'ANNA, 2013).

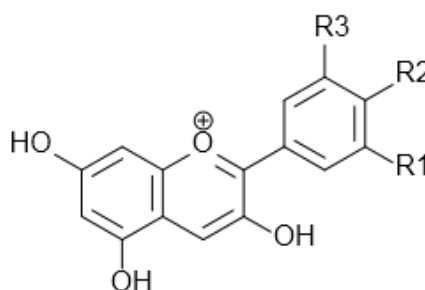
Os flavanóis são benzopiranos com uma cadeia de carbono saturado entre os carbonos 2 e 3, um grupamento hidroxila no carbono 3 e nenhuma carbonila no carbono 4. Na natureza, são encontrados principalmente em madeira e casca de árvores, e raramente em frutas (SANT'ANNA, 2013). Na uva, estão presentes na



película e sementes (GONZÁLES-NEVES et al., 2011). As isoflavonas possuem semelhanças estruturais com os estrogênios, isto é, grupamentos hidroxila nos carbonos 4 e 7. Eles são fitoquímicos encontrados em muitas plantas e seus derivados (extratos, sucos). Potenciais efeitos importantes à saúde são atribuídos a eles na prevenção de doenças como aterosclerose ou câncer (IGNAT; VOLFF; POPA, 2011).

As antocianidinas (Figura 1.5) são substâncias derivadas do cátion flavilium, que consiste de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos e condensados por um oxigênio. Elas são os pigmentos responsáveis pela coloração das uvas tintas e se localizam nas películas, com exceção de algumas variedades, onde também são encontradas na polpa (GONZÁLES-NEVES et al., 2011). Nas uvas, cinco antocianidinas estão presentes: cianidina, peonidina, delfidina, pelargonidina e malvidina. Na natureza são encontradas geralmente na forma glicosilada (ligado a um açúcar), sendo conhecidas como antocianinas (IGNAT; VOLFF; POPA, 2011; SANT'ANNA, 2013).

**Figura 1.5:** Estrutura química de algumas antocianidinas



Cianidina ou 2-(3,4-diidroxifenil)-3,5,7-triidroxi-1-benzopirilium  $\begin{cases} R1=OH \\ R2=OH \\ R3=H \end{cases}$

Delfinidina ou 3,5,7-triidroxi-2-(3,4,5-triidroxifenil)-1-benzopirilium  $\begin{cases} R1=OH \\ R2=OH \\ R3=OH \end{cases}$

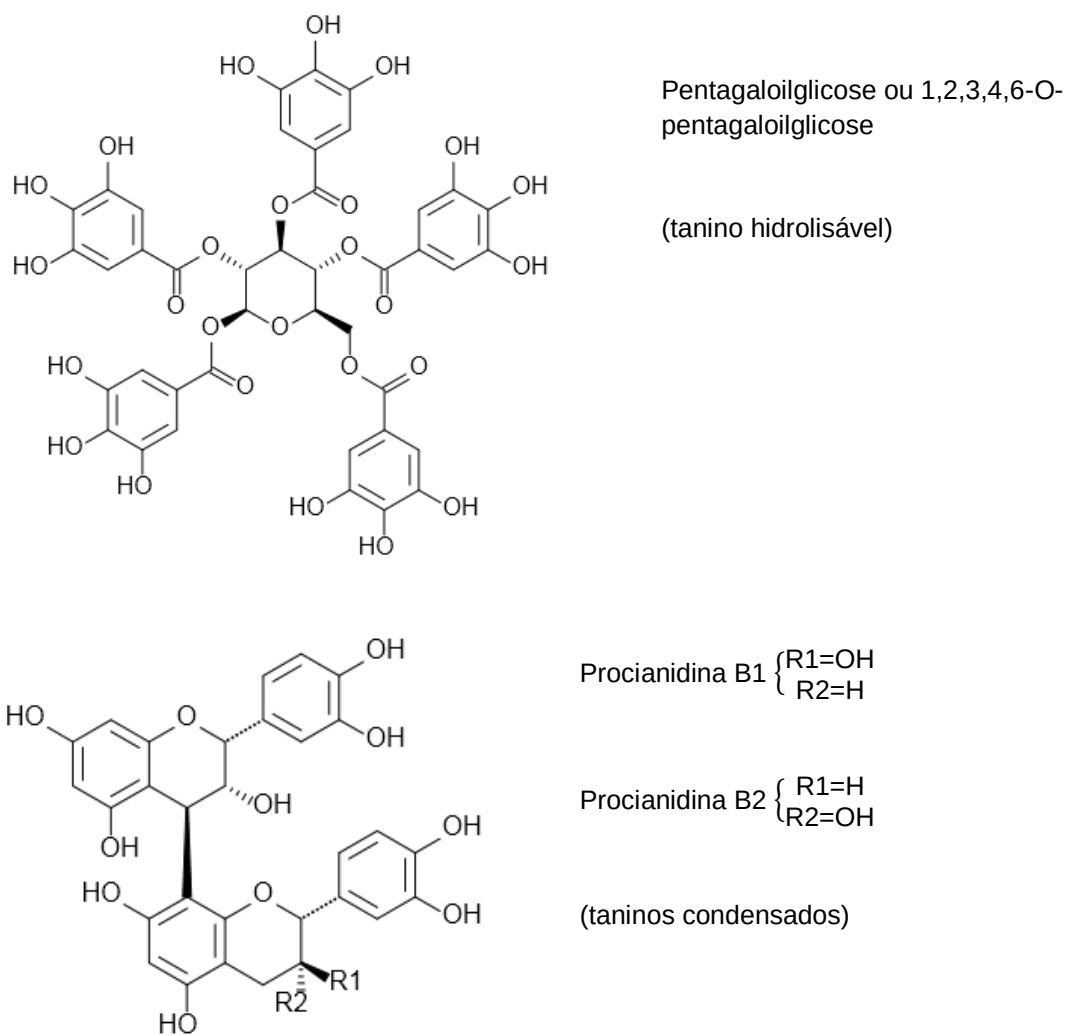
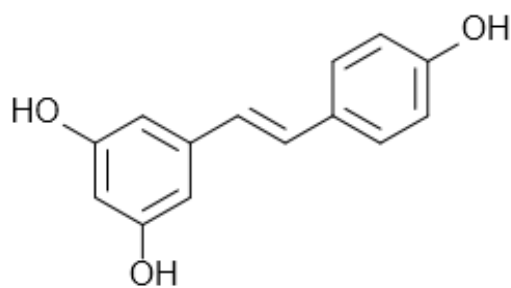
Pelargonina ou 3,5,7-triidroxi-2-(4-hidroxifenil)-1-benzopirilium  $\begin{cases} R1=H \\ R2=OH \\ R3=H \end{cases}$

Peonidina ou 3,5,7-triidroxi-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-benzopirilium  $\begin{cases} R1=H \\ R2=OH \\ R3=OCH_3 \end{cases}$

As antocianinas apresentam variação na cor dependente do pH do meio onde se encontram, bem como são degradadas, perdendo a coloração, a altas temperaturas e quando expostas à luz (FALCÃO et al., 2007).

Os taninos, Figura 1.6, constituem o terceiro grupo importante de compostos fenólicos. Podem ser subdivididos em taninos hidrolisáveis e condensados. As proantocianidinas (taninos condensados) são flavonóides poliméricos. Apesar de serem compreendidas as vias de síntese dos flavonóides, as etapas que levam à condensação e polimerização não o são. Os taninos condensados mais amplamente estudados são baseados nos flavan-3-óis; (-)-epicatequina e (+)-catequina. Já os taninos hidrolisáveis são derivados de ácido gálico, o qual é esterificado de uma base poliol e os grupos galoil podem ser esterificados ou oxidativamente formar ligações cruzadas para produzir taninos hidrolisáveis mais complexos. Os taninos têm diversos efeitos sobre os sistemas biológicos, uma vez que são quelantes de íons metálicos, precipitantes de proteínas e antioxidantes. (IGNAT; VOLF; POPA, 2011)

Os estilbenos, Figura 1.7, são encontrados exclusivamente na película da uva e estão vinculados às defesas naturais da videira. Os estilbenos mais conhecidos são o resveratrol e seus derivados (GONZÁLES-NEVES et al., 2011). O resveratrol pode ser considerado como uma toxina que a fruta utiliza para se defender do ataque de fungos e sua concentração decresce com o amadurecimento da fruta (SANT'ANNA, 2013).

**Figura 1.6:** Estrutura química de alguns taninos**Figura 1.7:** Estrutura química de um estilbenoResveratrol ou *trans*-3,5,4'-tridroxiestilbeno

Frankel et al. (1998) verificaram que os compostos fenólicos dos sucos de uva se mostraram potentes inibidores da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade em um ensaio *in vitro* catalisada por cobre. Um estudo parecido foi conduzido por Toaldo et al. (2015), que verificaram uma relação diretamente proporcional entre a capacidade antioxidante medida em ensaios *in vitro* e a inibição da peroxidação lipídica do sangue de indivíduos que ingeriram sucos de uva orgânicos e convencionais. Aguiar Jr. et al. (2011) investigaram os efeitos da administração de suco de uva concentrado sobre a capacidade de proteção das células do fígado e sangue de ratos com colesterol induzido. Os resultados mostraram que a administração do suco reduziu as lesões oxidativas induzidas ao DNA das células do sangue dos ratos.

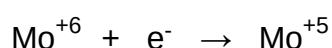
Aguiar Jr. et al. (2011) concluíram que os chás fornecem potenciais prevenções a inflamações, visto que os conteúdos de compostos bioativos podem eliminar o excesso de radicais livres e estimular a regeneração de células e tecidos danificados. Camargo et al. (2014) investigaram o perfil fenólico de subprodutos das uvas BRS Cora, Isabel, Syrah, e Tempranillo, gerados pelas indústrias de sucos e de vinho, obtidas de Pernambuco e Bahia, respectivamente. Esses subprodutos foram avaliados por análises de capacidade antioxidante *in vitro*, inibição da oxidação de colesterol LDL e inibição do radical peroxila nos danos causados no DNA. Os resultados mostraram uma correlação alta e estatisticamente significativa entre todos os ensaios antioxidantes e os conteúdos de compostos fenólicos totais, sugerindo que os compostos fenólicos podem desempenhar um papel importante na prevenção de doenças relacionadas à oxidação.

#### 1.4 Metodologias para determinação da composição química e atividade antioxidante

O conteúdo total de compostos fenólicos é amplamente determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999), onde o complexo metálico formado pela reação de tungstênio e molibdênio com os compostos fenólicos é monitorada em  $\lambda = 725$  nm, após uma hora de reação em um meio com pH básico. Destes metais presentes no reagente de Folin-Ciocalteu, o molibdênio é mais facilmente reduzido do que o tungstênio. Isto sugere que a maior transferência de elétrons ocorre entre o agente redutor e o molibdênio, que passa do estado de oxidação +6, com cor amarela, para o estado

de oxidação +5, com cor azul (Figura 1.8). A amostra é substituída por água ultrapura como branco da análise.

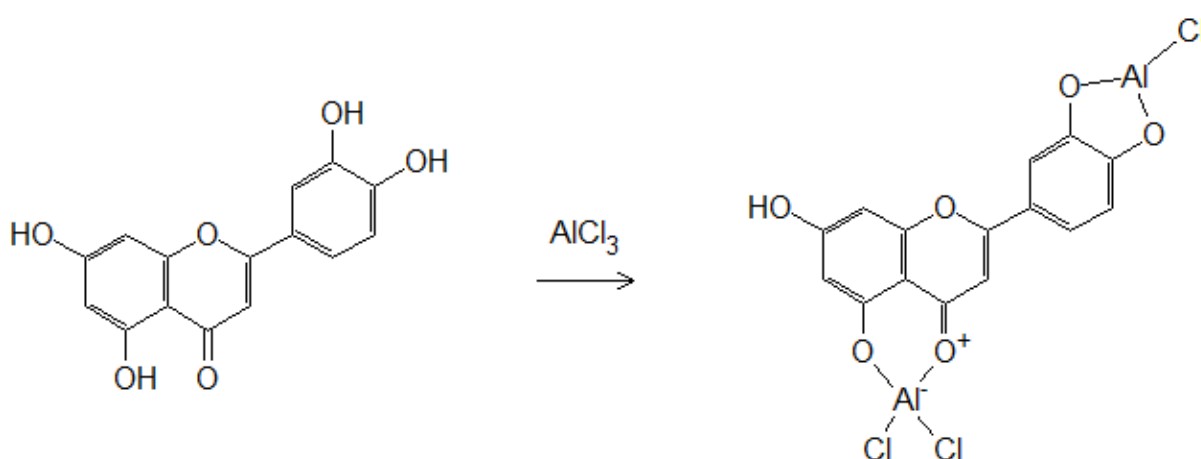
**Figura 1.8:** Reação de elétron transferência entre o molibdênio, metal presente no reagente de Folin-Ciocalteu, e um composto redutor, no caso o anion fenolato.



Fonte: Adaptado de Sánchez-Rangel et al. (2013).

O teor de flavonóides totais é determinado utilizando o método colorimétrico descrito por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999), empregando cloreto de alumínio como agente quelante. A complexação do alumínio com os flavonóides é monitorado em  $\lambda = 510 \text{ nm}$  em meio com pH básico (Figura 1.9). A linha de base do equipamento é realizada com todos os reagentes, nas proporções da análise, onde a amostra é substituída por água ultrapura.

**Figura 1.9:** Complexação do alumínio com um flavonoide, no caso com a luteolina

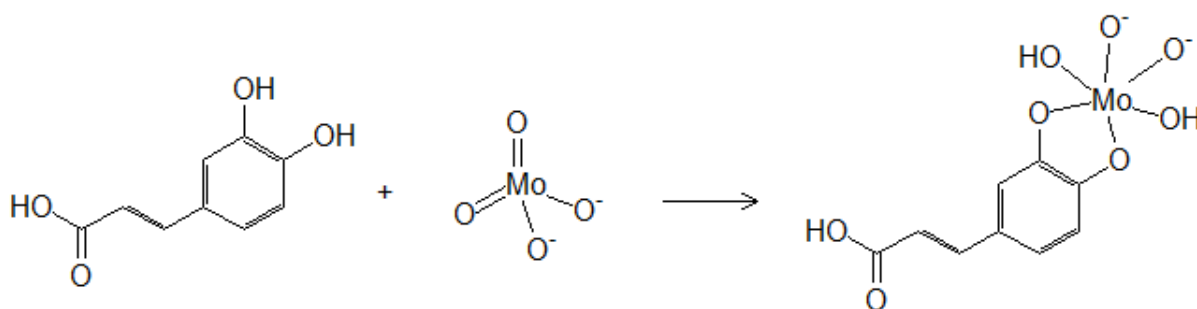


Fonte: Adaptado de Mabry et al. (1970).

A concentração de *o*-difenois é determinado pelo método espectrofotométrico em que os compostos fenólicos na posição *orto* reagem com molibdato de sódio

(DURÁN et al., 1991), sendo o produto final da reação monitorado em  $\lambda = 370$  nm após 25 min de reação (Figura 1.10). A linha de base do equipamento é realizada com todos os reagentes, nas proporções da análise, onde a amostra é substituída por água ultrapura.

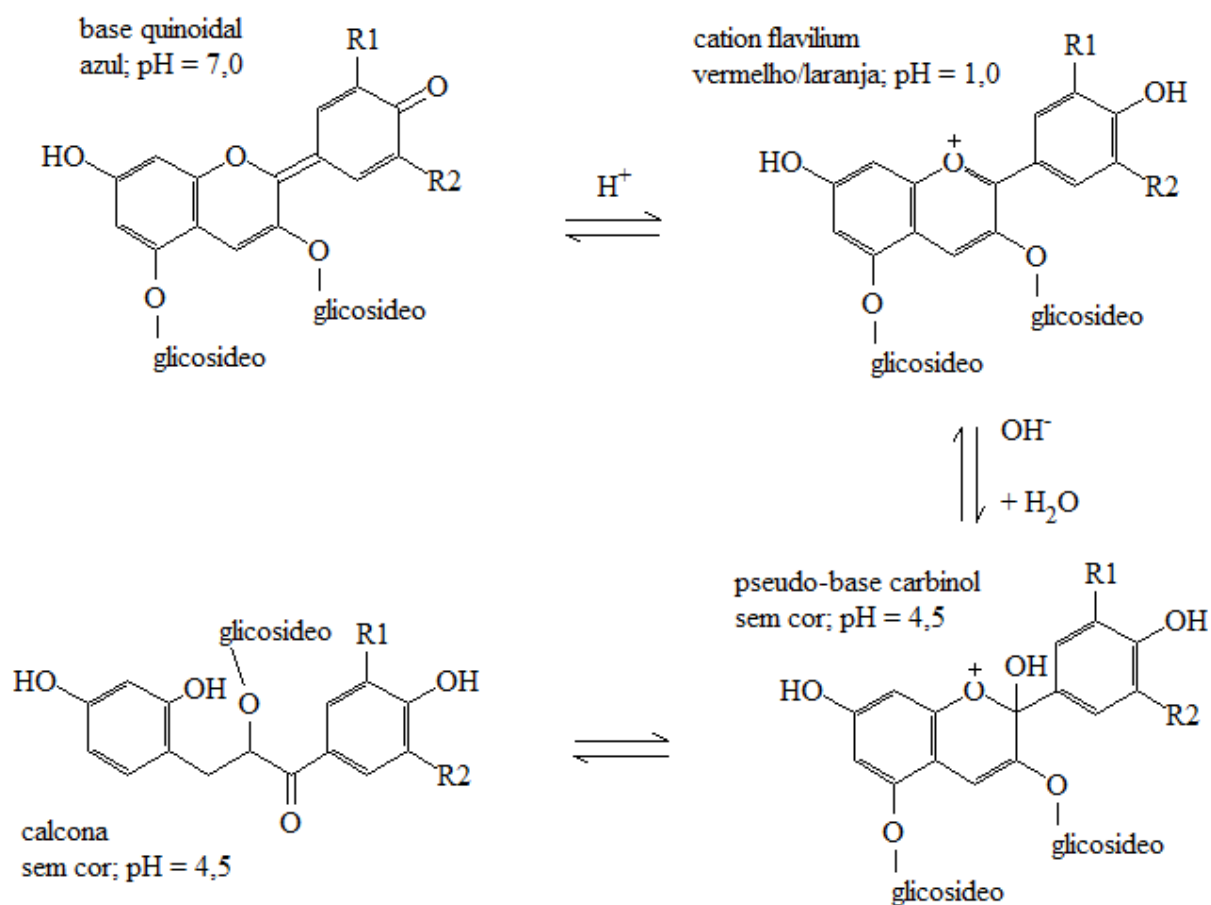
**Figura 1.10:** Complexação entre o molibdato de sódio e ácido caféico, um o-difenol, em meio aquoso



O conteúdo estimado de flavonóis totais é determinado pelo método colorimétrico proposto por Yermakov, Arasimov e Yarosh (1987). O produto da complexação com cloreto de alumínio hexahidratado e acetato de sódio é monitorado em  $\lambda = 440$  nm após 2,5 horas de incubação. A linha de base do equipamento é realizada com todos os reagentes, nas proporções da análise, onde a amostra é substituída por água ultrapura.

O teor de antocianinas monoméricas totais é determinado pelo método do pH diferencial (LEE; DURST; WROLSTADT, 2005) empregando soluções padronizadas de cloreto de potássio a  $0,025 \text{ mol L}^{-1}$  (pH = 1,0) e acetato de sódio a  $0,40 \text{ mol L}^{-1}$  (pH = 4,5), devido à troca estrutural que sofrem as antocianinas nesses diferentes pHs, onde em pH 1,0 a estrutura apresenta máxima coloração e em pH 4,5 é incolor. As absorvâncias das amostras nos diferentes pHs são medidos em  $\lambda = 520$  nm e  $\lambda = 700$  nm utilizando um espectrofotômetro e cubeta com 1 cm de caminho óptico (Figura 1.11). A linha de base do equipamento é realizada somente com as soluções padronizadas de cloreto de potássio a  $0,025 \text{ mol L}^{-1}$  (pH = 1,0) e acetato de sódio a  $0,40 \text{ mol L}^{-1}$  (pH = 4,5).

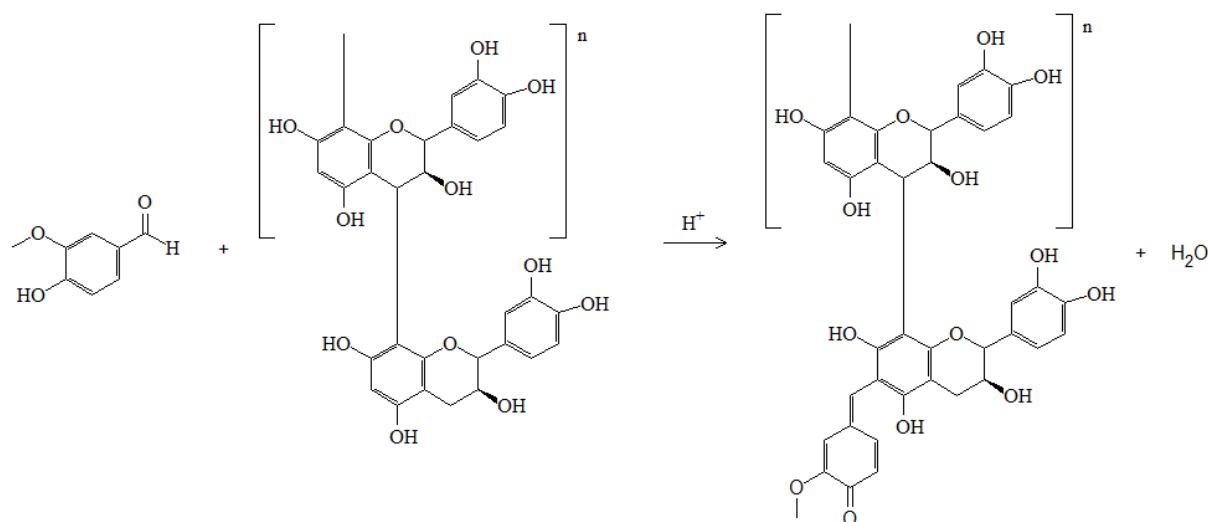
**Figura 1.11:** Formas estruturais predominantes de antocianinas em diferentes pHs: o mecanismo do método pH diferencial.



Fonte: Adaptado de Lee, Durst e Wrolstadt (2005).

O conteúdo de taninos condensados hidrossolúveis (flavanóis) é determinado pelo método colorimétrico descrito por Horszwald e Wilfried (2011), onde a vanilina, em meio ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), complexa com o anel *meta*-difenólico dos taninos. Essa reação é monitorada em  $\lambda = 500$  nm (Figura 1.12). A linha de base do equipamento é realizada com todos os reagentes, nas proporções da análise, onde a amostra é substituída por água ultrapura.

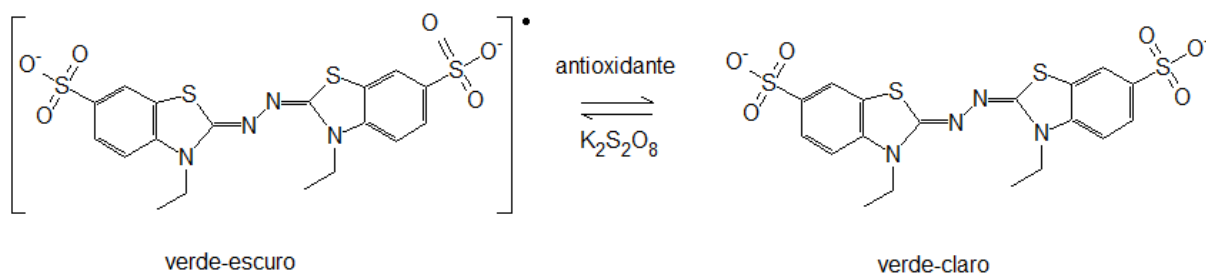
**Figura 1.12:** Reação da vanilina com um tanino condensado em meio ácido para formar um complexo com coloração porque reage naquele carbono



Fonte: Adaptado de Schofield, Mbugua e Pell (2001).

Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é a partir da captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS), que pode ser gerado a partir de uma reação química (utilizando persulfato de potássio), eletroquímica ou enzimática (RE et al., 1999). Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica, dependendo do solvente utilizado para as amostras. O radical  $\text{ABTS}^+$  apresenta coloração verde-escura e em contato com um antioxidante, há diminuição da coloração, proporcional à atividade antioxidante da matriz analisada (Figura 1.13). A linha de base do equipamento é realizada com todos os reagentes, nas proporções da análise, onde a amostra é substituída por etanol.

**Figura 1.13:** Estabilização do radical  $\text{ABTS}^+$  por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

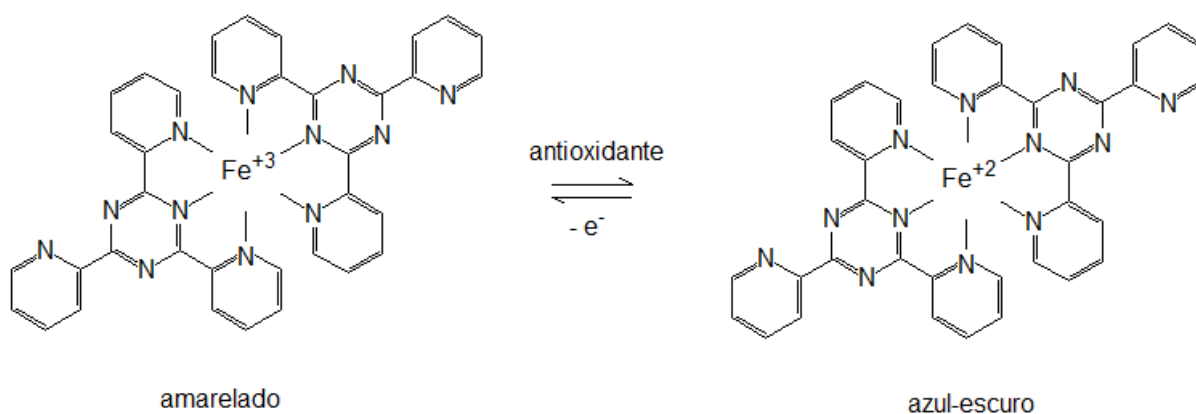


Fonte: Adaptado de Rufino et al. (2007).



O método FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro) é um método de transferência de elétrons baseado na capacidade de redução do ferro (III) a ferro (II) por um extrato ou substância isolada. Em meio ácido (pH 3,6), o complexo férrico tripiridiltiazina é reduzido ao ferroso, mudando sua coloração para azul na presença de um antioxidante. A mudança de absorção pode ser acompanhada espectrofotometricamente em  $\lambda = 593$  nm e a intensidade de coloração azul formada é linearmente correlacionada com o conteúdo de compostos antioxidantes presentes na amostra-teste (BENZIE; STRAIN, 1996) (Figura 1.14). A linha de base do equipamento é realizada com todos os reagentes, nas proporções da análise, onde a amostra é substituída por água ultrapura.

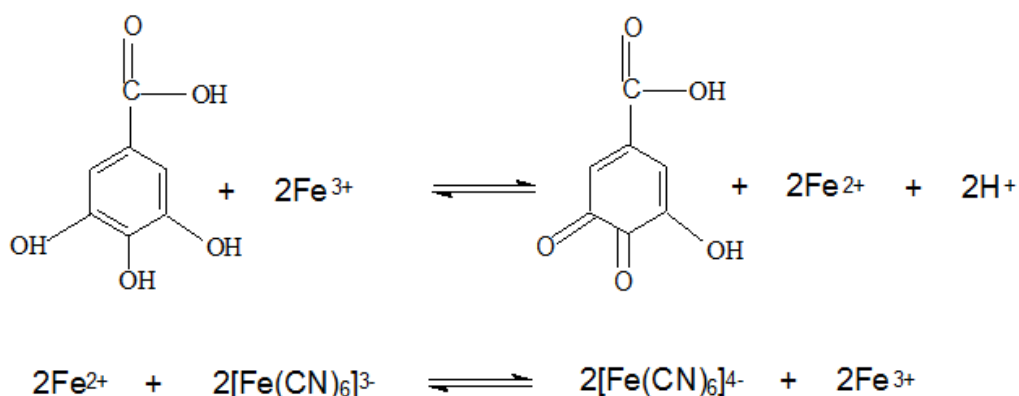
**Figura 1.14:** Representação da reação do FRAP que mostra a redução do complexo férrico-tripiridiltiazina (Fe(III)-TPTZ) em complexo ferroso (Fe(II)-TPTZ) em meio ácido



Fonte: Adaptado de Rufino et al. (2006).

O potencial redutor dos compostos fenólicos hidrofílicos dos sucos é estimado utilizando o método do Azul da Prússia (PRICE; BUTLER, 1977). Esse método emprega o ferricianeto de potássio ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) e cloreto férrico hexahidratado ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) como agentes complexantes dos compostos fenólicos em meio ácido (Figura 1.15). A linha de base do equipamento é realizada com todos os reagentes, nas proporções da análise, onde a amostra é substituída por água ultrapura.

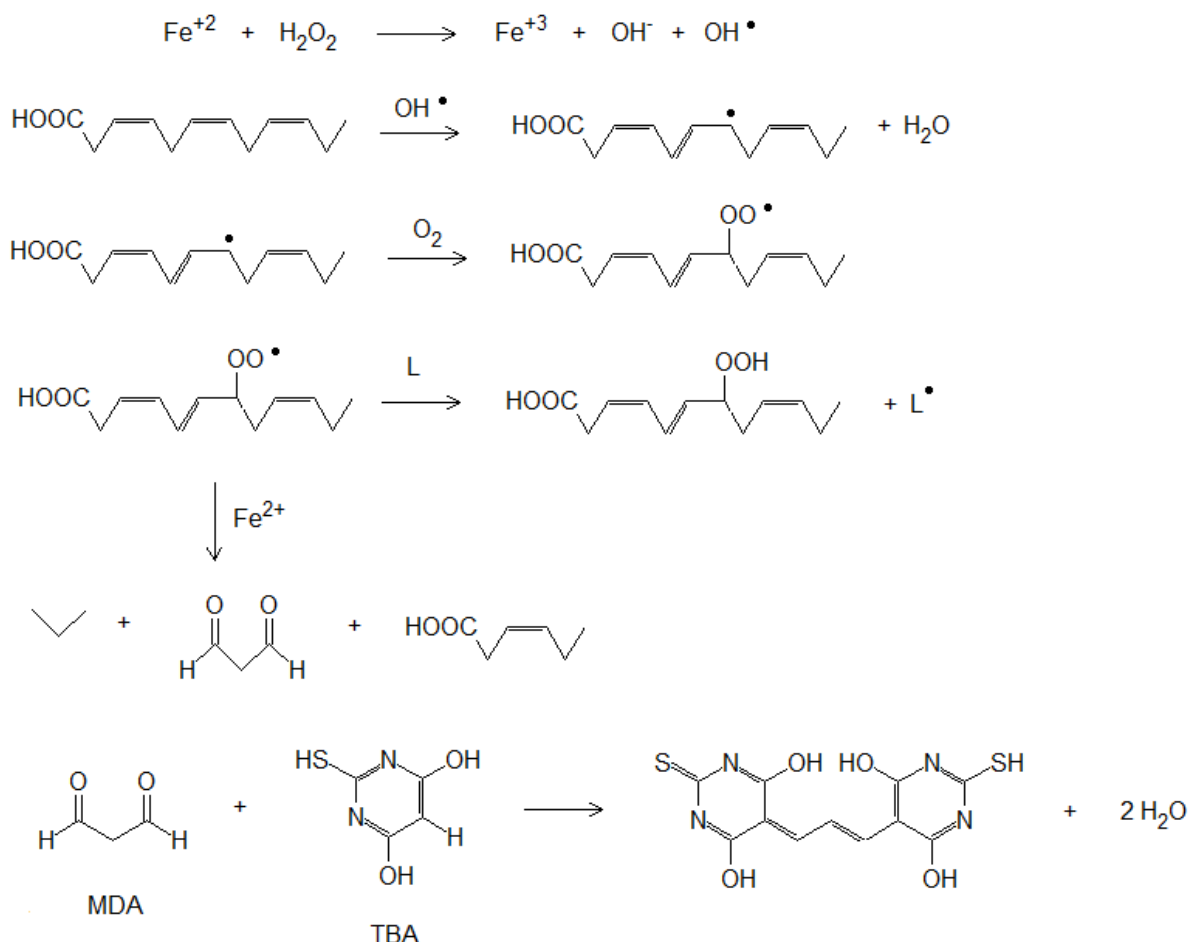
**Figura 1.15:** Reação de redução do  $\text{Fe}^{3+}$  e sua complexação com o ferricianeto para formar o complexo metálico hexacianoferrato(II) de ferro(III)



O poder redutor total dos compostos hidrofílicos e lipofílicos das amostras é avaliado em meio básico utilizando o método de Folin-Ciocalteu modificado por Berker et al. (2013), onde o reagente de Folin-Ciocalteu, diluído em isobutanol, complexa com compostos redutores hidrofílicos e lipofílicos e o produto é monitorado em  $\lambda = 665 \text{ nm}$ . A linha de base do equipamento é realizada com todos os reagentes, nas proporções da análise, onde a amostra é substituída por acetona.

A inibição da peroxidação lipídica (DAKAR et al., 2008) é baseado na reação entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e carbonilas produzidas na peroxidação induzida por  $\text{Fe}^{2+}$  em gema de ovo tamponada em pH 7,4 à temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . Esse sistema biológico simula o organismo humano, ou seja, simula a peroxidação de ácidos graxos insaturados à mesma temperatura e pH do sangue humano, numa reação de 45 min. Os produtos da peroxidação lipídica são monitorados em espectrofotômetro em  $\lambda = 532 \text{ nm}$ , visto que o composto que costuma ser atribuído como produto primário da oxidação lipídica e que reage com o TBA é o malondialdeído (MDA). O malondialdeído é um dos produtos secundários da oxidação lipídica, que surgem da decomposição de hidroperóxidos por reações de  $\beta$ -clivagem e/ou pela presença de pró-oxidantes como metais (McCLEMENTS e DECKER, 2010) (Figura 1.16).

**Figura 1.16:** Reação de peroxidação lipídica induzida por ferro(II), cujos produtos reagem com o ácido tiobarbitúrico



## REFERENCIAS

AGUIAR Jr., O.; GOLLÜCKE, A. P. B.; MORAES, B. B. de; PASQUINI, G.; CATHARINO, R. R.; RICCIO, M. F.; IHARA, S. S. M.; RIBEIRO, D. A. Grape Juice concentrate prevents oxidative DNA damage in peripheral blood cells of rats subjected to a high-cholesterol diet. **British Journal of Nutrition**, v. 105, p. 694-702, 2011.

AL BITTAR, S.; PÉRINO-ISSARTIER, S.; DANGLES, O.; CHEMAT, F. An innovative grape juice enriched in polyphenols by microwave-assisted extraction. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3268-3272, 2013.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BERKER, K. I.; OZDEMIR OLGUN, F. A.; OZYURT, D.; DEMIRATA, B.; APAK, R. Modified Folin–Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 20, p. 4783-4791, 2013.

BIESALSKI, H. K. Free Radical theory of aging. **Current Opinion In Clinical Nutrition And Metabolic Care**, v. 5, n. 1, p. 5-10, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária - MAPA. **Instrução Normativa nº 1 de 7 de janeiro de 2000**. Regulamento Técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para suco de uva.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Portaria nº 55, de 27 de julho de 2004**. Normas referentes à complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho e dos derivados da uva e do vinho.

BURIN, V. M.; FERREIRA-LIMA, N. E.; PANCERI, C. P.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. **Microchemical Journal**, v. 114, p. 155-163, 2014.

CAMARGO, A. C. de; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; BIASOTO, A. C. T.; SHAHIDI, F. Low Molecular Weight Phenolics of Grape Juice and Winemaking Byproducts: Antioxidant Activities and Inhibition of Oxidation of Human Low-Density Lipoprotein Cholesterol and DNA Strand Breakage. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 50, p. 12159-12171, 2014.

CAPUANO, E.; BOERRIGTER-EENLING, R.; VAN DER VEER, G.; van RUTH, S. M. Analytical authentication of organic products: an overview of markers. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 1, p. 12-28, 2013.

CATANEO, C. B.; CALIARI, V.; GONZAGA, L. V.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do residuo agroindustrial da produção de vinho. **Semina – Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 93-101, 2008.

CRAFT, B. D.; KERRIHARD, A. L.; AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B. Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 2, p. 148-173, 2012.

CRUPI, P.; BERGAMINI, C.; PERNIOLA, R.; DIPALMO, T.; CLODOVEO, M. L.; ANTONACCI, D. A chemometric approach to identify the grape cultivar employed to produce nutraceutical fruit juice. **European Food Research and Technology**, v. 241, n. 4, p. 487-496, 2015.

DAKER, M.; ABDULLAH, N.; VIKINESWARY, S.; GOH, P. C.; KUPPUSAMY, U. R. Antioxidant from maize and maize fermented by *Marasmiellus* sp. as stabiliser of lipid-rich foods. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 1092-1098, 2008.

DURÁN, R. M.; PADILLA, R. B.; MARTÍN, A. M.; URSINOS, J. A. F. de; MENDOZA, J. A. Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechín. **Grasas y Aceites**. v. 42, n. 4, p. 271-276, 1991.

FALCÃO, A. P.; CHAVES, E. S.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R.; FALCÃO, L. D. BORDIGNON-LUIZ, M. T. Índice de polifenóis, antocianinas totais e atividade antioxidante de um sistema modelo de geleia de uvas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 637-642, 2007.

FLORES, P. Organic Agriculture in Latin America and the Caribbean. In: Willer, H., & Lernoud, J. **The world of organic agriculture**. Statistics and emerging trends 2015. FiBL-IFOAM Report, Frick and Bonn, p. 230-233.

FRANKEL, E. N.; BOSANEK, C. A.; MEYER, A. S.; SILLIMAN, K.; KIRK, L. L. Commercial grape juices inhibit *in vitro* oxidation of human low-density lipoproteins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 46, n. 3, p. 834-838, 1998.

GONZÁLES-NEVES, G.; GIL, G.; FAVRE, G.; FERRER, M. Potencial Polifenólico de la uva: índices propuestos y posibles aplicaciones. **Comunicata Scientiae**, v. 2, n. 2, p. 57-69, 2011.

GRANATO, D.; KOOT, A.; VAN RUTH, S. M. Geographical provenancing of purple grape juices from different farming systems by proton transfer reaction mass

spectrometry using supervised statistical techniques. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2014.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition reviews**, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012.

HORSZWALD, A.; ANDLAUER, W. Characterisation of bioactive compounds in berry juices by traditional photometric and modern microplate methods. **Journal of Berry Research**, v. 1, n. 4, 2011.

IBRAVIN. Instituto Brasileiro do Vinho. **Dados estatísticos**. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/dados-estatisticos.php>>. Acesso em: 13 ago. 2015.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**. v. 126, p. 1821-1835, 2011.

LAMBRI, M.; TORCHIO, F.; COLANGELO, D.; SEGADE, S. R.; GIACOSA, S.; FAVERI, D. M. de; GERBI, V.; ROLLE, L. Influence of different berry treatment conditions, grape anthocyanin profile, and skin hardness on the extraction of anthocyanin compounds in the colored grape juice production. **Food Research International**. 2015, doi: 10.1016/j.foodres.2015.08.027.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTADT, E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colourants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. **Journal of the AOAC International**, v. 88, p. 1269–1278, 2005.

LERNOUD, J.; WILLER, H. Organic Agriculture Worldwide: Current Statistics. In: Willer, H., & Lernoud, J. **The world of organic agriculture**. Statistics and emerging trends 2015. FiBL-IFOAM Report, Frick and Bonn, p. 102-103.

LIMA, M. dos S.; DUTRA, M. D. C. P.; TOALDO, I. M.; CORREA, L. C.; PEREIRA, G. E; OLIVEIRA, D. de; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; NINOW, J. L. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced in industrial scale by different processes of maceration. **Food Chemistry**, v. 188, p. 384-392, 2015.

MABRY, T.J. et al. **The systematic identification of flavonoids**. Springer: Berlin, 1970. p.51-52.

MACEDO, L. F. L.; ROGERO, M. M.; GUIMARÃES, J. P.; GRANATO, D.; LOBATO, L. P.; CASTRO, I. A. Effect of red wines with different *in vitro* antioxidant activity on oxidative stress of high-fat diet rats. **Food Chemistry**, v. 137, p. 122-129, 2013.

McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Lipídeos. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 4. p. 132-176.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G. de; ARAÚJO, C. R. de. Teor de Fenólicos Totais e Capacidade Antioxidante de Polpas Congeladas de Frutas. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, p. 67-72, 2008.

ORGANICS BRASIL. Mercado de Orgânicos deve crescer 35%. Disponível em: <[http://www.organicsbrasil.org/pt/imprensa\\_detalhe/209/mercado-de-organicos-deve-crescer-35-](http://www.organicsbrasil.org/pt/imprensa_detalhe/209/mercado-de-organicos-deve-crescer-35-)> Acesso em: 12 out. 2015.

PAUL, J.; RANA, J. Consumer behavior and purchase intention for organic food. **Journal of Consumer Marketing**, v. 29, n. 6, p. 412-422, 2012.

POSTINGHER, B. M. **Fluxograma**. [Mensagem profissional]. Mensagem recebida por: <bruna@econatura.com.br> em: 11 ago. 2015.

PRICE, M. L.; BUTLER, L. G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1268-1273, 1977.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. **Suco de uva**. Brasília – DF: Embrapa Informação Tecnológica, 45 p., 2007.

ROCKENBACH, I. I. **Compostos Fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 112 p., 2008.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZJIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.G., **Metodologia científica:**

**Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP).** Comunicado técnico on line EMBRAPA Agroindústria Tropical, nº 125, 2006.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZJIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.G., **Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>•+</sup>**. Comunicado técnico on line EMBRAPA Agroindústria Tropical, nº 128, 2007.

SÁNCHEZ-RANGEL, J. C.; BENAVIDES, J.; HEREDIA, J. B.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. **Analytical Methods**, v. 5, n. 21, p. 5990-5999, 2013.

SANT'ANNA, V. **Concentração de suco de uva por osmose direta e estudo tecnológico para o aproveitamento do bagaço.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 161 p., 2013.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1, p. 21-40, 2001.

SILVA, J. K. da; CAZARIN, C. B. B.; CORREA, L. C.; BATISTA, A. G.; FURLAN, C. P. B.; BIASOTO, A. C. T.; PEREIRA, G. E.; CAMARGO, A. C. de; MARÓSTICA Junior, M. R. Bioactive compounds of juices from two Brazilian grape cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 2015, doi: 10.1002/jsfa.7309.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**. v. 299, p. 152-178, 1999.

SUCO DE UVA DO BRASIL. **Variedades**. Disponível em: <<http://www.sucodeuvadobrasil.com.br/variedades>>. Acesso em: 13 ago. 2015.

TOALDO, I. M.; GOIS, J. S. de; FOGOLARI, O.; HAMANN, D.; BORGES, D. L.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Phytochemical Polyphenol Extraction and Elemental Composition of Vitis labrusca L. Grape Juices Through Optimization of Pectinolytic Activity. **Food and bioprocess technology**, v. 7, n. 9, p. 2581-2594, 2014.



VINSON, J. A.; TEUFEL, K.; WU, N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. **Atherosclerosis**, v. 156, p. 67-72, 2001.

YERMAKOV, A. I.; ARASIMOV, V. V.; YAROSH, N. P. **Methods of biochemical analysis of plants**. Leningrad: Agropromizdat, 1987.

YIN, S.; WU, L.; DU, L.; CHEN, M. Consumers' purchase intention of organic food in China. **Journal of Science of Food and Agricultural**, v. 90, p. 1361-1367, 2010.

YOO, Y. J.; SALIBA, A.J.; PRENZLER, P. D. Should red wine be considered a functional food?. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 5, p. 530-551, 2010.

WOLFANG, W. **Produção de alimentos orgânicos cresce 300% em 10 anos no Brasil**. Rural BR Agricultura – Sustentabilidade - 27/06/2013. Disponível em: <<http://agricultura.ruralbr.com.br/noticia/2013/06/producao-de-alimentos-organicos-cresce-300-em-10-anos-no-brasil-4183055.html>> Acesso em: 28 jul 2014.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.

## **CAPÍTULO II**

## COMPARAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS DE FOLIN-CIOCALTEU E AZUL DA PRÚSSIA PARA ESTIMAR O CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL DE SUCOS E CHÁS USANDO MICROPLACAS DE 96 POÇOS

**RESUMO:** O ensaio colorimétrico de Folin-Ciocalteu (FC) é o ensaio mais amplamente utilizado para estimar o conteúdo de fenólicos totais em alimentos, bebidas, ervas e outros extratos de plantas, mas muitos compostos químicos podem agir como agentes interferentes, gerando uma estimação imprecisa da real concentração de compostos fenólicos na matriz. Baseada nesta limitação, o objetivo deste estudo foi comparar quantitativamente, os ensaios de Folin-Ciocalteu (FC) e Azul da Prússia (PB) na estimativa do conteúdo de fenólicos totais em sucos de uva roxa (n=20; *Vitis labrusca* L.) e chás (n=25) de diferentes origens botânicas, usando microplacas de 96 poços. O ensaio de PB apresentou um baixo limite de detecção (PB = 0,27 mg/L; FC = 0,25 mg/L) e quantificação (PB = 0,92 mg/L; FC = 0,82 mg/L), confirmando seu potencial no rastreamento do conteúdo de fenólicos totais em sucos de uva e chás. Os ensaios de FC e PB apresentaram uma alta associação ( $p < 0,0001$ ) para chás ( $r = 0,887$ ) e sucos de uva ( $r = 0,923$ ). As vantagens do ensaio de PB sobre FC são a simplicidade, baixo tempo de reação (15 min de reação quando comparado a 60 min do ensaio de FC), baixo uso de reagentes (as soluções são preparadas em base mM) e alta seletividade. Adicionalmente, o ensaio de PB provou ser reproduzível e repetível e, portanto, pode ser usado como uma alternativa ao ensaio de FC.

**Palavras-chave:** validação de método; método colorimétrico; compostos bioativos; *Vitis labrusca*; *Camellia sinensis*.

### 1 INTRODUÇÃO

Estudos científicos têm mostrado que existe grande interesse em compostos bioativos em alimentos e bebidas consumidas mundialmente devido ao fato que estudos experimentais têm indicado que existe uma associação inversa entre o consumo e o desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis, tais como aterosclerose (Milella et al., 2012), alguns tipos de câncer (González-Sarrías et al., 2012), diabetes (Sreerama et al., 2012), hiperlipidemia, incluindo hipercolesterolemia (Sreelatha et al., 2012) e inflamações crônicas devido a desordens metabólicas (Li et

al., 2014). Dentre estas substâncias bioativas, flavonóides, estilbenos e ácidos fenólicos são os mais notáveis e algumas das classes de compostos bioativos mais presentes em alimentos e bebidas (Brewer, 2011; Liu, 2013).

Pesquisas têm focado em não somente testar os efeitos benéficos dos compostos fenólicos à saúde em protocolos *in vitro* e *in vivo*, mas também na avaliação de métodos analíticos para estimar o conteúdo fenólico total em bebidas e alimentos, tais como chás, frutas e derivados, ervas e plantas medicinais. Para este propósito, alguns métodos tem sido desenvolvidos, testados e validados: determinação individual de compostos fenólicos usando cromatografia líquido de alta eficiência (HPLC) (Granato et al., 2011b); HPLC acoplado com espectrômetro de massa (Slatnar et al., 2014); cromatografia a gás (Wang e Zuo, 2011); HPLC em arranjo com espectrômetro de massa e espectrômetro de massa de alta resolução (Alakolanga et al., 2014); biossensores (Portaccio et al., 2006); ensaios espectrofotométricos que empregam cromóforos específicos, tais como o reagente de Folin-Ciocalteu e sais inorgânicos específicos que reagem com compostos fenólicos soluções aquosas, tais como hexacianoferrato de potássio (III) e sal de diazônico de Azul Rápido (González et al., 2003; Lester et al., 2012; Zielinski et al., 2014). Análises de cromatografia e biossensores são um pouco caras, demoradas, necessitam a preparação da amostras, e o uso de solventes na fase móvel do HPLC pode representar uma limitação para alguns laboratórios. Assim, o uso de ensaios espectrofotométricos para estimar o conteúdo fenólico total de vegetais e extratos de alimentos é vantajoso e leva menos tempo para ser realizado no laboratório rotineiro. Uma importante observação deve ser feita aqui: técnicas cromatográficas (acopladas a diferentes detectores) são capazes de executar a separação e identificação individual de cada composto fenólico na amostra. No mesmo sentido, ensaios colorimétricos são uma abordagem muito útil para fins de detecção e quantificação geral (apresentadas como “conteúdo fenólico total”). Assim, os resultados obtidos por métodos colorimétricos e cromatográficos são diferentes (algumas vezes complementares) e prós e contras devem ser considerados quando os compostos fenólicos necessitam ser estudadas em detalhes.

Dentre aqueles métodos mencionados acima, o ensaio mais tradicional e usado que tem sido aplicado para uma grande variedade de matrizes é o que emprega o reagente de fenol de Folin-Ciocalteu (Singleton e Rossi, 1965). Neste método, molibdênio e tungstênio estão no estado de oxidação 6+, mas em presença

de certos agentes redutores, tais como os compostos fenólicos, em um meio alcalino, forma um complexo azul  $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4]$ . A intensidade da cor no meio reacional é linearmente proporcional ao nível de substâncias redutoras, tais como polifenóis, dióxido de enxofre, ácidos orgânicos (incluindo ácido ascórbico), açúcares (frutose e sacarose), e alguns aminoácidos presentes na amostra. A absorção deste complexo metálico reside entre 620 e 760 nm, com um máximo em  $\lambda = 725$  nm (Sousa et al., 2007). De fato, o método espectrofotométrico usando o reagente de fenol de Folin-Ciocalteu é uma estimativa do conteúdo de compostos fenólicos presentes na matriz. Contudo, como o ensaio de Folin-Ciocalteu é baseado na transferência de elétrons e medida da capacidade redutora do extrato, os quais têm sido geralmente expressos como 'conteúdo fenólico', seria mais adequado ser chamado *ensaio da capacidade de redutores hidrofílicos* levando em consideração os interferentes químicos que agem como redutores, presentes em quase todos alimentos, bebidas e preparados herbais, tais como tiols, aminoácidos, proteínas, algumas vitaminas e íons inorgânicos (Everette et al., 2010; Prior et al., 2005; Chen et al., 2015). Apesar dos evidentes inconvenientes deste método em avaliar o real (exato) conteúdo de fenólicos totais dos extratos, muitos pesquisadores o tem usado não somente em muitas matrizes alimentares, tais como ervas, frutas, cervejas, mas também em fluidos biológicos, tais como urina (Medina-Remón et al., 2009; Granato et al., 2011a; Mrahi et al., 2013; Campos et al., 2015). Independentemente disto, estudos têm mostrado que o método de Folin-Ciocalteu não é a melhor abordagem analítica (baixa especificidade) para determinar o conteúdo fenólico (Everette et al., 2010). Por esse motivo, métodos espectrofotométricos alternativos devem ser investigados e validados ou devem ser realizadas modificações do método de Folin-Ciocalteu (Cicco et al., 2009; Medina, 2011; Bueno et al., 2012; Blainski et al., 2013; Bridi et al., 2014).

Um desses métodos espectrofotométricos alternativos que podem substituir o método de Folin-Ciocalteu é um método que envolve uma reação de complexação metálica, em meio ácido, o ensaio de Azul da Prússia. Ele se baseia na redução do  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$  pela formação do hexacianoferrato(II) de ferro(III), também conhecido como Azul da Prússia,  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ . O complexo metálico de Azul da Prússia não é tão solúvel em meio aquoso, então a leitura da absorbância em  $\lambda = 725$  nm deve ser realizada dentro de 20 min após todos os reagentes e amostra serem misturados para garantir a estabilidade da cor (Price e Butler, 1977). Este método tem sido

usado para avaliar o conteúdo fenólico total em alguns alimentos, tais como ameixas (Slimestad et al., 2009), ervas (Pueyo e Calvo, 2009), cogumelos (Reis et al., 2012), e arroz (Finocchiaro et al., 2010). Uma melhoria da metodologia inicial (isto é, concentração dos reagentes) foi realizada por Pueyo e Calvo (2009), na qual uma menor quantidade de solventes é utilizada (até 300 µL, em comparação com 3-4 mL) e leituras da absorbância de um grande número de amostras foi feita simultaneamente usando microplacas de 96 poços. Este método otimizado e melhorado tem mostrado apresentar baixos limites de detecção e quantificação (< 1 µg/mL) e um coeficiente de variação intra-diário abaixo de 5%, indicando adequação, repetibilidade e reprodutibilidade para analisar o conteúdo fenólico total em ervas. Além disso, a redução do uso de solvente, simplicidade e exatidão são algumas das características positivas mais importantes do método.

Baseado no fato que muitos pesquisadores aplicam métodos colorimétricos para determinar o conteúdo fenólico total em alimentos, ervas, suplementos nutricionais, e bebidas e levando em consideração que a exatidão, simplicidade, baixo custo, rapidez, e reprodutibilidade analítica do método são altamente necessárias e desejadas em análises rotineiras, o objetivo deste estudo foi de comparar, quantitativamente, os ensaios de Folin-Ciocalteu e Azul da Prússia na estimativa do conteúdo fenólico total em sucos de uva e chás de diferentes origens botânicas, usando microvolumes em placas de 96 poços.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Reagentes**

Ácido 3,4,5-trihidróxibenzóico monoidratado (ácido gálico, grau HPLC, 99% de pureza, Sigma-Aldrich, EUA) foi usado como controle positivo dos experimentos (curva analítica). Cloreto férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; Merck, Alemanha), ácido clorídrico, reagente de Folin-Ciocalteu 2N (Sigma-Aldrich, EUA), metabissulfito de sódio, glicose e ácido ascórbico (Vetec, Brasil), e hexacianoferrato(III) de potássio -  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (Merck, Alemanha) foram de grau analítico. Água ultrapura foi usada nos experimentos.

### **2.2 Amostras e preparação dos extratos**

Um total de 20 sucos de uva roxa (variedades Bordô e Isabel, *Vitis labrusca* L.), sendo 10 convencionais e 10 orgânicos, produzidos no Rio Grande do Sul,

Brasil, 21 chás de *Camellia sinensis* var. *sinensis* (6 verdes, 5 brancos, 4 vermelhos, 4 pretos e 2 amarelos), e 4 extratos de erva-mate tostada (*Ilex paraguariensis* A St.-Hil.) foram usados para comparar o método de Folin-Ciocalteu com o ensaio de Azul da Prússia. Chás ( $V = 100$  mL) foram preparados usando o mesmo procedimento experimental ( $m = 2,0$  g;  $T = 80$  °C; tempo de extração de 8,5 min sobre agitação magnética) descrito por Granato et al. (2014b).

## 2.3 Estimativa do conteúdo de fenólicos totais

### 2.3.1 Ensaio de Folin-Ciocalteu

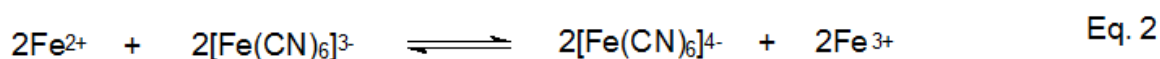
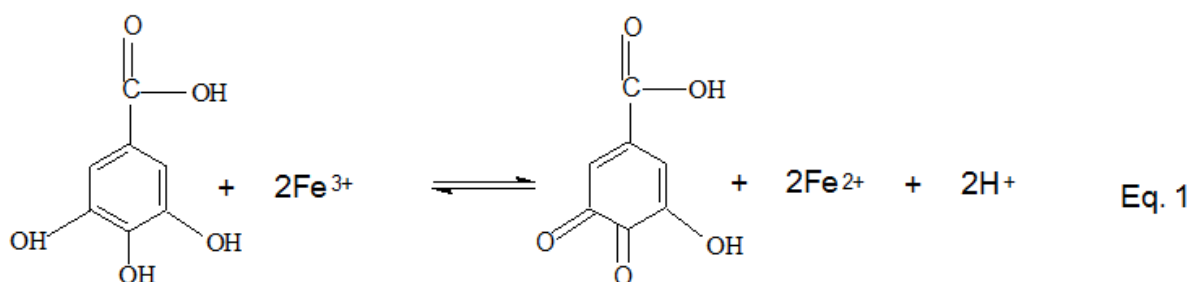
O conteúdo fenólico total em sucos de uva e chás foi avaliado usando o ensaio de Folin-Ciocalteu (Singleton e Rossi, 1965) adaptado para microplacas com 96 poços (Granato et al., 2015b). Primeiramente, as amostras foram diluídas apropriadamente (1:25 para os sucos e 1:10 para os chás) com água ultrapura, e 25  $\mu$ L das amostras diluídas foram misturadas com 25  $\mu$ L do reagente de Folin-Ciocalteu 3 vezes diluído e 200  $\mu$ L de água ultrapura. Depois de 5 min, uma alíquota de 25  $\mu$ L de uma solução saturada de carbonato de sódio (10,6 g/100 mL) foi adicionada à mistura e a placa foi agitada por 20 s. A mistura foi deixada em repouso por 60 min no escuro à temperatura ambiente (25 °C), e a absorbância foi medida em  $\lambda = 725$  nm usando uma leitora de microplaca (Epoch, Biotek, EUA). O conteúdo fenólico total foi expresso como mg equivalentes de ácido gálico por litro de bebida.

### 2.3.2 Método do Azul da Prússia

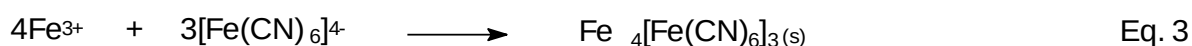
Para estimar a concentração de compostos fenólicos totais nos sucos e chás, o método do Azul da Prússia, primeiramente sugerido por Price e Butler (1977) e modificado por Graham (1992) com adaptação para microplacas (Pueyo e Calvo, 2009) foi usado, com algumas modificações. Resumidamente, uma alíquota de 100  $\mu$ L de cloreto férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 0,5 mM preparado em HCl 0,01 M, foi adicionada a 100  $\mu$ L de amostra devidamente diluída (~1:50 v/v em água ultrapura) e deixado para reagir por 2 min. Então, 100  $\mu$ L de uma solução de hexacianoferrato (III) de potássio 0,5 mM foi adicionada e a microplaca foi agitada por 20 s. A absorbância foi medida em  $\lambda = 725$  nm depois de 15 min de reação no escuro a 25 °C usando uma leitora de microplacas (Epoch, Biotek, EUA). O

conteúdo fenólico total foi expresso como mg de ácido gálico equivalente por litro de bebida.

Usando o método do Azul da Prússia, os compostos fenólicos presentes no extrato reagem com o íon hexacianoferrato (III),  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ , o qual é reduzido para o íon hexacianoferrato (II),  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ . Este íon reage com o íon férrico,  $\text{Fe}^{3+}$ , para formar o complexo azul metálico,  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$  (Graham, 1992). Em resumo, ambas reações podem ser descritas pelas Equações 1 e 2:



O complexo Azul da Prússia pode precipitar em meio aquoso dependendo da concentração de compostos fenólicos no extrato, como mostrado pela Equação 3. Portanto, a diluição das amostras é altamente necessária se o método do Azul da Prússia é usado como método de detecção.



### 2.3.3 Curvas analíticas, repetibilidade, reprodutibilidade, seletividade, e limites de detecção e quantificação

Soluções padrões com diferentes concentrações de ácido gálico ( $n = 8$  para o ensaio de Azul da Prússia e  $n = 9$  para o ensaio de Folin-Ciocalteu) foram preparadas para construir as curvas analíticas. As soluções com diferentes concentrações de ácido gálico foram preparadas para cada replicata (usando o conceito de 'replicatas verdadeiras') antes das medições e três leituras foram feitas para cada concentração (Nunes et al., 2015). Ácido gálico foi utilizado como padrão por causa de sua disponibilidade, pureza, e estabilidade química. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados usando o declive da curva



analítica, os quais foram obtidos pelo método dos mínimos quadrados. Para este propósito, a absorbância em  $\lambda = 725$  nm (x) foi plotada contra concentrações de uma solução de padrão de ácido gálico (y). Usando a curva analítica, LD e LQ foram determinados pelas Equações 4 e 5:

$$LD = \frac{3s}{b} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$LQ = \frac{10s}{b} \quad (\text{Eq. 5})$$

onde  $s$  é o desvio padrão do intercepto da ordenada e  $b$  é o coeficiente angular da curva analítica (Shrivastava e Gupta, 2011).

A repetibilidade, que é a precisão do método, foi avaliada usando as mesmas condições experimentais (amostra, compostos químicos, analista, e equipamento) e as mesmas series de análises em um curto intervalo de tempo. Para este propósito, não somente a repetibilidade para cada amostra, mas também uma série de dez medidas foi feita usando uma solução de ácido gálico a 30 mg/L para o ensaio do Azul da Prússia e 100 mg/L para o método de Folin-Ciocalteu. A recuperação foi calculada usando seis réplicas independentes e o intervalo de confiança (IC) a 95% ( $\alpha = 0,05 \therefore t_{0,025}$ ) foi calculado levando em consideração a população de  $n = 10$  replicas e o respectivo desvio padrão,  $\sigma$  (Equação 6):

$$IC(95\% \text{ confiança}) = \bar{x} \pm t_{\alpha/2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (\text{Eq. 6})$$

A reprodutibilidade, que se refere à precisão dos resultados obtidos para as mesmas amostras, mas usando diferentes condições (isto é, análises em diferentes dias, e diferentes analistas) foi analisada três vezes em um período de três diferentes dias, usando o mesmo equipamento, com uma solução de ácido gálico a 30 mg/L para o ensaio do Azul da Prússia e 100 mg/L para o método de Folin-Ciocalteu.

A seletividade dos métodos de Folin-Ciocalteu e Azul da Prússia foi avaliado usando ácido ascórbico, metabissulfito de sódio, e açúcar redutor, mais especificamente glicose. Para esta proposta, suco de uva roxa puro foi adicionado destas substâncias nas concentrações de 212 mg/L, 68 mg/L, e 10 g/L,

respectivamente, e imediatamente analisado para conteúdo fenólico total em dois experimentos independentes e um total de  $n = 6$  leituras foram realizadas para cada experimento. Os dados foram comparados usando análises de variância univariada seguida do teste de comparação múltipla de Duncan depois do estabelecimento da homocedasticidade ser aplicada (teste de Levene). Um valor de  $p$  abaixo de 5% foi usado para destacar diferenças.

## 2.4 Análise de dados

Os resultados foram apresentados como média ( $\mu$ )  $\pm$  desvio padrão ( $s$ ) de três replicatas. O desvio padrão relativo, %DPR, foi calculado usando a Equação 7:

$$\%DPR = (s/\mu) \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

Análise de correlação linear entre os métodos de Folin-Ciocalteu e Azul da Prússia para cada tipo de bebida (ou para chá ou para suco de uva) foi baseada no coeficiente de correlação de Pearson (Granato et al., 2014a) e o método dos mínimos quadrados foi usado para plotar os resultados graficamente. A significância estatística dos modelos (valor  $p$ ) foi determinada usando análise de variâncias univariada e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ),  $R^2$  ajustado, e erro padrão de estimativa também foram calculados. A normalidade dos conjuntos de dados e resíduos da análise de regressão foram formalmente verificados usando o teste de Shapiro-Wilk. Para as análises descritivas e inferenciais, os programas estatísticos Action v. 2.9 (Statcamp, Brasil) e Statistica v. 7.0 (Statsoft, EUA) foram usados. Valores de  $p$  abaixo de 5% foram usados para rejeitar a hipótese nula.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de comparar quantitativamente os conteúdos de fenólicos totais medidos pelos métodos de Azul da Prússia e Folin-Ciocalteu, um estudo foi conduzido para avaliar a linearidade e limites de detecção de quantificação para ambos os ensaios (Tabela 2.1). Para este propósito, uma curva analítica usando ácido gálico com padrão foi construída usando concentrações eqüidistantes de um intervalo definido. É possível observar que ambos métodos analíticos apresentaram LD abaixo de 0,5 mg/L e LQ abaixo de 1 mg/L. As curvas analíticas apresentaram

altos valores de  $R^2$ ,  $R^2$  ajustado e F, indicando que a maior variabilidade experimental foi explicada pelo modelo linear e as curvas analíticas foram altamente significativas ( $p > 0,0001$ ) quando a análise de variância foi aplicada. Adicionalmente, análise residual foi realizada graficamente para verificar tendências e padrões óbvios (normalidade) e o teste de Shapiro-Wilk mostrou que as curvas analíticas (modelos de regressão linear) foram adequados para descrever a quantificação de ácido gálico como resíduo conforme a distribuição normal (Azul da Prússia:  $W = 0,95$ ;  $p = 0,75$ ; Folin-Ciocalteu:  $W = 0,92$ ;  $p = 0,36$ ).

**Tabela 2.1:** Parâmetros da curva analítica, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os ensaios de Folin-Ciocalteu e Azul da Prússia.

| Ensaio          | Curva analítica <sup>a</sup> | Faixa de linearidade (mg GA/L) | $R^2$ | $R^2_{\text{ajustado}}$ | F-valor | p-valor <sup>b</sup> | LD (mg/L)       | LQ (mg/L)       |
|-----------------|------------------------------|--------------------------------|-------|-------------------------|---------|----------------------|-----------------|-----------------|
| Folin-Ciocalteu | $y = 244,47x - 21,12$        | 0 – 180                        | 0,977 | 0,974                   | 296,88  | $< 0,0001$           | $0,25 \pm 0,08$ | $0,82 \pm 0,25$ |
| Azul da Prússia | $y = 44,21x - 2,45$          | 2,5 – 40                       | 0,978 | 0,973                   | 218,10  | $< 0,0001$           | $0,27 \pm 0,06$ | $0,92 \pm 0,19$ |

Nota: <sup>a</sup>A análise de regressão foi conduzida usando a absorbância no eixo x e as concentrações do padrão de ácido gálico no eixo y; <sup>b</sup>Valor de probabilidade obtida pela ANOVA.

Os parâmetro de validação para os métodos de Folin-Ciocalteu e Azul da Prússia estão apresentados na Tabela 2.2. A precisão intra-diária dos métodos de Azul da Prússia e Folin-Ciocalteu, também conhecida como repetibilidade, foi 2,00 e 6,65% DPR, respectivamente, em que as médias de ambos os métodos apresentaram uma adequada precisão sob as mesmas condições de operação em um curto intervalo de tempo. Igualmente, a precisão inter-diária, aqui chamada reprodutibilidade, foi abaixo do limite máximo aceitável de 10% (Magnusson e Örnemark, 2014). Os procedimentos de recuperação analítica, também conhecidos como acurácia, está relacionado com a concordância entre os valores teóricos (uma conhecida concentração) e experimentais, e os métodos avaliados no corrente trabalho demonstraram uma alta recuperação. Para o ensaio do Azul da Prússia um valor de recuperação de  $109,70 \pm 1,69\%$  ( $n = 10$ ;  $IC_{95\%} = 32,44 - 33,38$  mg/L) foi obtido, enquanto que para o método de Folin-Ciocalteu a recuperação  $98,20 \pm 1,14\%$  ( $n = 10$ ;  $IC_{95\%} = 93,53 - 102,88$  mg/L). Quanto menor a recuperação, maior a tendência que afeta o método e, portanto, menor a exatidão (U.S. FDA, 2000). Um importante aspecto das recuperações próximas de 100% é que isto é uma indicação de um quase completo balanço de massa da recuperação padrão. Adicionalmente,

para efeitos experimentais, o método pode ser considerado preciso se as porcentagens de recuperação estão entre 85% e 115% (U.S. FDA, 2000). Aqui, nossos dados experimentais apresentaram claramente a adequação de ambos ensaios de Folin-Ciocalteu e Azul da Prússia na estimativa de compostos fenólicos totais usando microplacas de 96 poços. Os resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Blainski, Lopes e Mello (2013), que avaliaram algumas modificações no método original de Folin-Ciocalteu para medir o conteúdo fenólico total de *Limonium brasiliense*, uma típica erva brasileira usada para o preparo de chás, e obteve valores de LD = 1,84 µg/mL, LQ = 3,34 µg/mL, repetibilidade de 4,98%, e recuperação ao redor de 90%.

**Tabela 2.2:** Recuperação, repetibilidade e reprodutibilidade dos ensaios Azul da Prússia e Folin-Ciocalteu realizadas em microplacas de 96 poços, incluindo o intervalo de confiança (IC) de 95%

| Validação do Parâmetro                       | Ensaio do Azul da Prússia                                 | Ensaio de Folin-Ciocalteu                                 |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Recuperação/Acurácia (%)                     | 109,70 ± 1,69<br>(IC <sub>95%</sub> = 32,44 – 33,38 mg/L) | 98,20 ± 1,14<br>(IC <sub>95%</sub> = 93,53 – 102,88 mg/L) |
| Repetibilidade/Precisão intra-dias (%DPR)    | 2,00                                                      | 6,65                                                      |
| Reprodutibilidade/Precisão inter-dias (%DPR) | 1,46                                                      | 1,13                                                      |

O conteúdo fenólico total dos sucos de uva roxa estão de acordo com aqueles reportados para sucos produzidos ou no Brasil (n = 65; 368 – 2307 mg GAE/L) ou em países europeus (n = 31; 343 – 2248 mg GAE/L) (Granato et al., 2015a; Granato et al., 2015c). Igualmente, o conteúdo fenólico total dos chás de *C. sinensis* e *I. paraguariensis* estão de acordo, mas levemente menores quando aos níveis reportados por amostras de chá comerciais (140 – 967 mg GAE/L) (Granato et al., 2015a; Reta et al., 2012; Bassani et al., 2014a; Bassani et al., 2014b; Zielinski et al., in press).

Em geral, os dados apresentados para o conteúdo fenólico total pelo método de Folin-Ciocalteu para os sucos de uva variaram entre 709 e 3580 mg GAE/L e para os chás este número foi na faixa de 524 – 1820 mg GAE/L (Tabela 2.3). Os dados para o método do Azul da Prússia, no geral, apresentaram níveis menores de

conteúdo fenólico: 380 – 1865 mg GAE/L para chás (14 dos 25 valores médios com níveis menores) e 449 – 1783 mg GAE/L para os sucos de uva. É digno de nota que todas os valores médios de conteúdo fenólico total nos sucos de uva, determinados usando o método do Azul da Prússia, foram menores que aqueles determinados pelo ensaio de Folin-Ciocalteu, corroborando com os resultados obtidos por Padda e Picha (2007) para batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) e para alcachofra cruas e cozidas (*Cynara scolymus* L.) (Lutz et al., 2011).

González et al. (2003) avaliaram o conteúdo fenólico total de 14 amostras de própolis da Argentina por meio dos métodos de Folin-Ciocalteu, Azul da Prússia e o-fenantrolina, usando ácido gálico, vanilina, ácido cafeico, quercetina e ácido 3,4-dihidroxibenzóico como padrões químicos para a curva analítica. Os autores concluíram o método de Folin-Ciocalteu forneceu os maiores valores entre os métodos, enquanto que o ensaio do Azul da Prússia apresentou resultados intermediários e a mais alta sensibilidade, corroborando com observações anteriores (Budini et al., 1980). Ao contrário do que foi observado no presente estudo, Deshpande e Cheryan (1987) quantificaram o conteúdo de compostos fenólicos em 10 variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) usando quatro diferentes metodologias, incluindo os ensaios de Vanilina-HCl, Azul da Prússia, Folin-Ciocalteu, e teste de proteína precipitada por fenol. Os autores verificaram que o método de Azul da Prússia forneceu maior conteúdo fenólico total ( $p < 0,05$ ) do que o ensaio de Folin-Ciocalteu, mas estes métodos apresentaram uma forte correlação. Estes resultados, de modo geral, que existe um forte efeito da matriz no valor quantitativo dos ensaios de Folin-Ciocalteu e Azul da Prússia.

**Tabela 2.3:** Compostos fenólicos totais de chás e sucos de uva comerciais determinados usando o método Azul da Prússia e Folin-Ciocalteu.

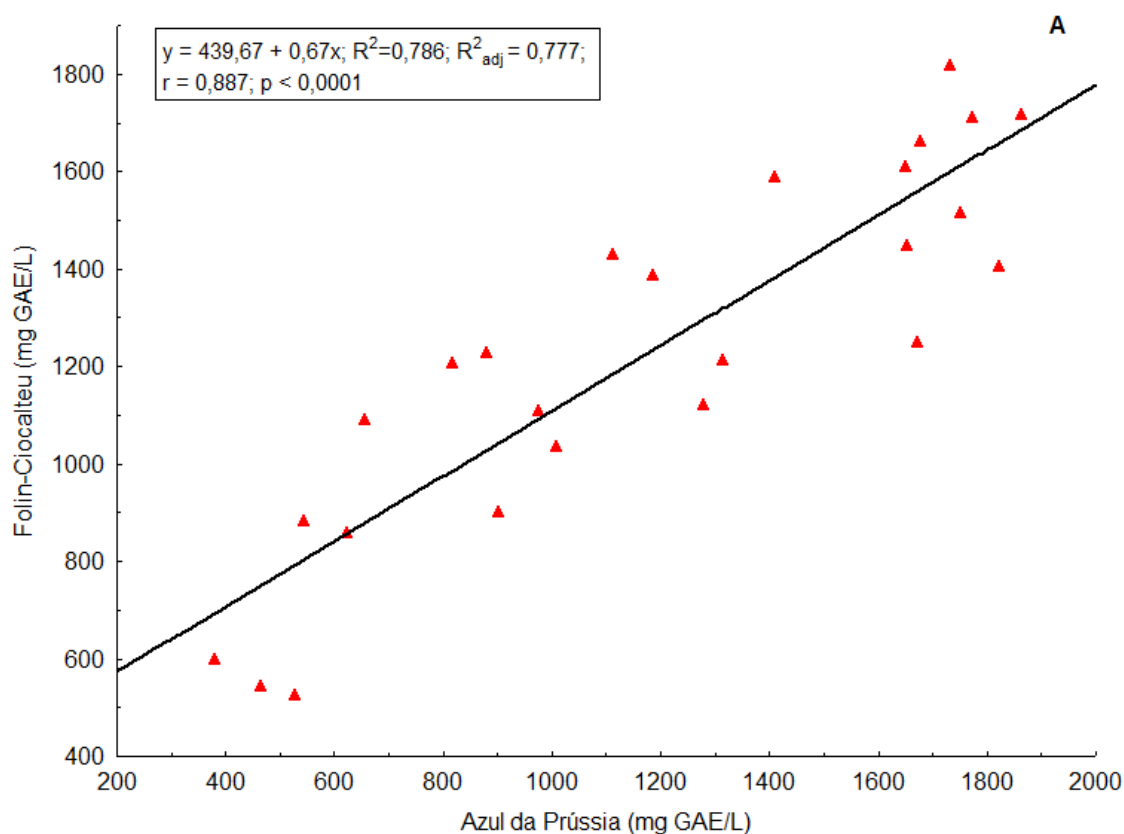
| Códigos das Amostras | Método do Azul da Prússia (mg/L) | Método de Folin-Ciocalteu (mg/L) |
|----------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| <b>Chás</b>          |                                  |                                  |
| 1                    | 1654 ± 84,71                     | 1449 ± 85,65                     |
| 2                    | 1679 ± 28,99                     | 1663 ± 94,57                     |
| 3                    | 1650 ± 91,84                     | 1610 ± 99,72                     |
| 4                    | 1775 ± 9,40                      | 1711 ± 12,76                     |
| 5                    | 1731 ± 32,87                     | 1819 ± 39,45                     |
| 6                    | 1113 ± 27,64                     | 1431 ± 45,40                     |
| 7                    | 1824 ± 53,84                     | 1404 ± 170,69                    |
| 8                    | 1673 ± 31,10                     | 1251 ± 52,14                     |

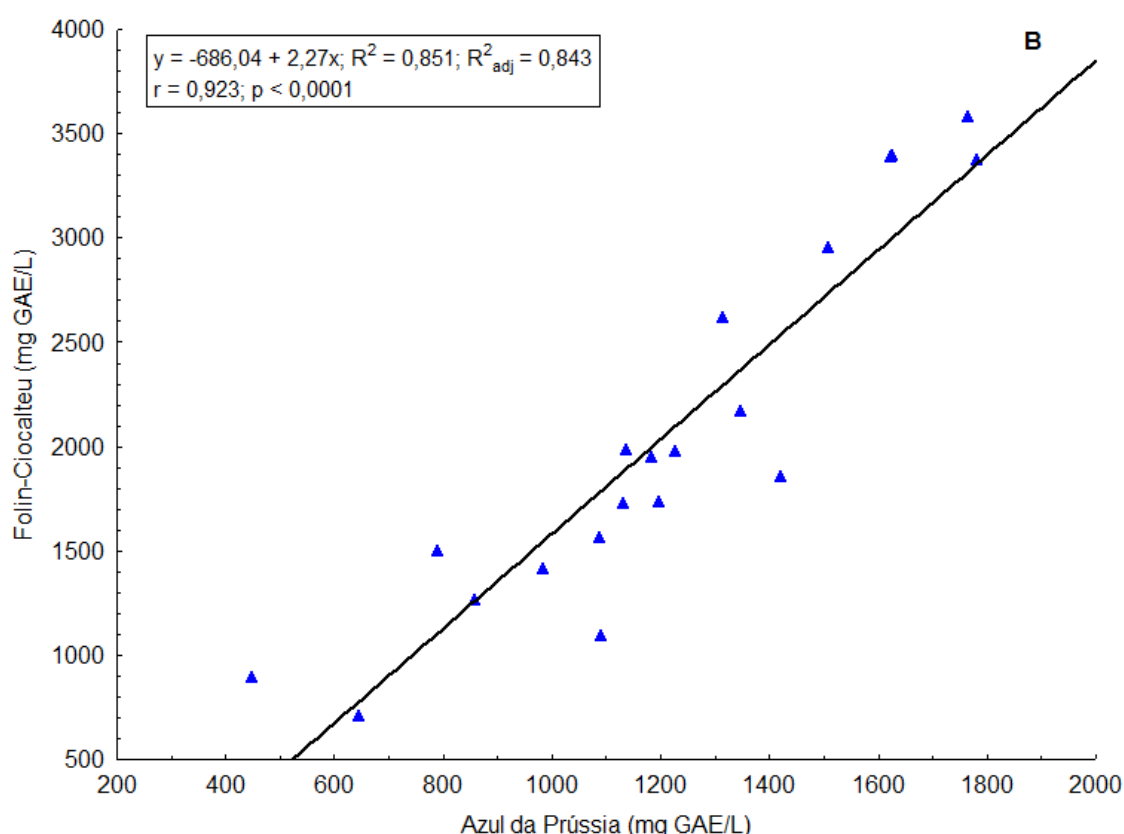
|                      |               |               |
|----------------------|---------------|---------------|
| 9                    | 1865 ± 30,39  | 1717 ± 212,38 |
| 10                   | 1315 ± 52,84  | 1213 ± 22,91  |
| 11                   | 1753 ± 30,39  | 1517 ± 140,62 |
| 12                   | 466 ± 11,31   | 544 ± 43,84   |
| 13                   | 1185 ± 27,35  | 1387 ± 116,90 |
| 14                   | 544 ± 27,59   | 882 ± 97,47   |
| 15                   | 624 ± 5,26    | 859 ± 89,07   |
| 16                   | 1008 ± 29,31  | 1037 ± 97,54  |
| 17                   | 817 ± 30,19   | 1208 ± 75,42  |
| 18                   | 880 ± 34,93   | 1229 ± 29,87  |
| 19                   | 656 ± 11,49   | 1091 ± 73,09  |
| 20                   | 1409 ± 14,11  | 1587 ± 180,82 |
| 21                   | 1280 ± 24,31  | 1120 ± 20,46  |
| 22                   | 380 ± 27,16   | 598 ± 9,76    |
| 23                   | 527 ± 21,91   | 525 ± 35,43   |
| 24                   | 901 ± 30,84   | 901 ± 122,60  |
| 25                   | 977 ± 13,54   | 1109 ± 61,12  |
| <b>Sucos de uvas</b> |               |               |
| 1                    | 645 ± 24,35   | 709 ± 35,56   |
| 2                    | 1347 ± 138,30 | 2166 ± 100,29 |
| 3                    | 1626 ± 62,54  | 3394 ± 212,65 |
| 4                    | 983 ± 42,31   | 1410 ± 151,00 |
| 5                    | 1782 ± 65,13  | 3377 ± 266,26 |
| 6                    | 1623 ± 44,15  | 3385 ± 141,93 |
| 7                    | 1133 ± 51,70  | 1727 ± 71,74  |
| 8                    | 1765 ± 70,22  | 3579 ± 19,68  |
| 9                    | 1509 ± 19,31  | 2952 ± 240,71 |
| 10                   | 1422 ± 31,34  | 1856 ± 71,74  |
| 11                   | 1228 ± 29,35  | 1977 ± 193,85 |
| 12                   | 1091 ± 33,56  | 1092 ± 164,17 |
| 13                   | 1184 ± 14,72  | 1951 ± 226,25 |
| 14                   | 449 ± 7,76    | 890 ± 58,15   |
| 15                   | 1197 ± 14,72  | 1736 ± 82,84  |
| 16                   | 858 ± 28,85   | 1264 ± 158,33 |
| 17                   | 1089 ± 24,35  | 1564 ± 182,83 |
| 18                   | 789 ± 36,48   | 1495 ± 180,39 |
| 19                   | 1136 ± 41,08  | 1981 ± 226,99 |
| 20                   | 1314 ± 50,21  | 2617 ± 253,80 |

Embora PB e FC envolvam reações redox para produzir complexos com aumento da absorbância em um comprimento de onda específico ( $\lambda = 620 - 760$  nm), diferenças nos valores entre os ensaios de FC e PB são relatadas para sensibilidade do reagente, potencial redox do meio e, mais importante, pela capacidade redutora dos compostos no meio reacional. Deve-se ter em mente que o ensaio de FC emprega um meio básico (pH ~10) melhorando a dissociação de prótons dos compostos fenólicos em fenolatos (alta capacidade redutora da

amostra), enquanto que a reação do ensaio de PB ocorre em meio ácido que por sua vez pode suprimir a capacidade de reduzir a amostra por causa da baixa taxa de protonação (Apak et al., 2013). Isto pode explicar baixos resultados obtidos aqui e em outros estudos.

Embora que os valores médios entre os métodos foram diferentes, análise de correlação foi aplicada para verificar a associação entre os ensaios. A correlação entre ambos os métodos analíticos usando cada chá de *C. sinensis* e *I. paraguariensis* ou sucos de uva é mostrado na Figura 2.1. Para as amostras de chá (n = 25), um coeficiente de correlação  $r = 0,887$  ( $p < 0,0001$ ) junto com um alto  $R^2$  ajustado (0,777) foi obtido (Figura 2.1A), enquanto que para os sucos de uva roxa (n = 20), um coeficiente de correlação  $r = 0,923$  ( $p < 0,0001$ ) e uma concordância próxima entre  $R^2$  e  $R^2$  ajustado foram obtidos (Figura 2.1B). A análise de resíduos não mostrou tendência óbvia (dados não mostrados) e o teste de Shapiro-Wilk revelou que para ambas análises de regressão, os resíduos foram normalmente distribuídos ( $W = 0,94$ ;  $p = 0,15$  para chás;  $W = 0,95$ ;  $p = 0,35$  para sucos de uva). Estes resultados mostram que embora os ensaios de FC e PB forneçam diferentes valores quantitativos em termos de ácido gálico equivalente, existe uma alta correlação entre os valores dos dois ensaios.





**Figura 2.1:** Análise de regressão entre os ensaios de Folin-Ciocalteu e Azul da Prússia na determinação do conteúdo fenólico total em *I. paraguariensis* e *C. sinensis* (A), e em sucos de uva roxa (B).

Assim como para outros métodos analíticos, o ensaio do Azul da Prússia também apresenta algumas limitações. Por exemplo, Budini et al. (1980) avaliaram o conteúdo fenólico total de morangos e verificaram que o ácido ascórbico parece ser um agente interferente naquelas amostras, indicando que açúcares e compostos baseados em nitrogênio não afetaram a reação redox. Então, o método do Azul da Prússia tem provado ser uma estratégia analítica rápida e efetiva para determinar o conteúdo fenólico de vegetais (e seus graus de maturação). No entanto, algumas observações devem ser feitas sobre o ensaio do Azul da Prússia: temperatura, pH, e ordem em que os reagentes são adicionados nos tubos/ poços da microplaca devem ser monitorados uma vez que podem afetar a formação de  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$  (complexo metálico Azul da Prússia). Adicionalmente, como a formação do complexo PB é dependente do tempo, um curto (< 20 min) período de incubação é recomendado para evitar o aumento da densidade de cor fora da faixa de linearidade (seguindo a lei de Lambert-Beer) (Bravo e Mateos, 2008).



Usando o teste de Levene (valor  $F = 2,071$ ;  $p = 0,136$  para Azul da Prússia e valor  $F = 2,141$ ;  $p = 0,129$  para Folin-Ciocalteu), os dados experimentais foram considerados como homocedásticos e um valor  $p < 0,0001$  foi obtido para ambos os métodos quando comparados os tratamentos (agentes redutores: glicose, ácido ascórbico, e metabissulfito de sódio) por análise de variâncias univariada. Quando o teste múltiplo de Duncan foi usado para comparar as médias, foi possível observar que os resultados obtidos pelo ensaio de PB somente tiveram aumento para a adição de ácido ascórbico, mas os valores médios dos sucos adicionados de metabissulfito de sódio e glicose foram estatisticamente similares ao suco puro (controle) (Tabela 2.4). Por outro lado, o ensaio de Folin-Ciocalteu pareceu sofrer interferências de ácido ascórbico, glicose, e metabissulfito de sódio, quando o teste de Duncan foi usado, corroborando com observações anteriores de que o ensaio de FC apresenta baixa seletividade (Sánchez-Rangel et al., 2013; Olgun et al., 2014). Adicionalmente, usando todo o conjunto de dados ( $n = 24$  observações), a análise de correlação mostrou que os dados de PB e FC foram convergentes ( $r = 0,732$ ;  $p < 0,001$ ), embora altos valores serem observados para o ensaio de FC.

**Tabela 2.4:** Seletividade dos métodos de Azul da Prússia e Folin-Ciocalteu frente a alguns compostos interferentes em suco puro de uva roxa

| Experimento                     | Azul da Prússia              | Folin-Ciocalteu              |
|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Suco puro - controle (n=6)      | 1275,82 <sup>b</sup> ± 25,99 | 1638,62 <sup>b</sup> ± 46,17 |
| Ácido ascórbico* (n=6)          | 1486,56 <sup>a</sup> ± 57,15 | 1748,22 <sup>a</sup> ± 58,08 |
| Metabissulfito de sódio** (n=6) | 1275,09 <sup>b</sup> ± 25,58 | 1551,01 <sup>c</sup> ± 62,65 |
| Glicose*** (n=6)                | 1272,14 <sup>b</sup> ± 31,63 | 1532,68 <sup>c</sup> ± 93,86 |

Nota: \* Concentração de 212 mg/L; \*\* Concentração de 68 mg/L; \*\*\* Concentração de 10 g/L. Letras diferentes na mesma coluna representam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de acordo com teste de comparação múltipla de Duncan

Do ponto de vista prático, o uso do método do Azul da Prússia na avaliação do conteúdo fenólico total de frutas e chás tem vantagens como baixas quantidades de reagentes necessárias (até 300  $\mu$ L contra ~3 mL usados no ensaio de Folin-Ciocalteu), somente 15 min de reação são requeridos (contra 60 min usando o ensaio de Folin-Ciocalteu) e este método provou ser mais seletivo, comparado ao ensaio de FC.

## 4 CONCLUSÕES

Como uma conclusão, estes resultados analisados todos juntos, mostraram que o método do Azul da Prússia apresentou ser reprodutível e repetível, mostrando ser possível seu uso como um método de rastreamento para estimar o conteúdo fenólico total de sucos de uva e chás. A análise de correlação entre o método mais utilizado (Folin-Ciocalteu) e o ensaio do Azul da Prússia evidenciou uma associação alta e estatisticamente significativa entre os métodos. As vantagens do ensaio do Azul da Prússia sobre Folin-Ciocalteu são a simplicidade, baixo de tempo de reação (15 min quando comparado aos 60 min do método de Folin-Ciocalteu), menor uso de reagentes (as soluções são preparadas na base mM) e alta seletividade. Neste sentido, o uso do ensaio do Azul da Prússia para estimar o conteúdo fenólico total de extratos alimentícios, ervas e outras matrizes alimentares é estimulado.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES pelo apoio financeiro para realizar esta pesquisa (mestrandos bolsistas – T. Margraf e A. R. Karnopp; pós-doutorando bolsista – D. Granato). Nós também agradecemos ao Prof. Dr. Alessandro Nogueira por disponibilizar o uso da leitora de microplacas.

## REFERÊNCIAS

Alakolanga AGAW, Siriwardane AMDA, Kumar NS, Jayasinghe L, Jaiswal R, and Kuhnert N. 2014. LC-MS<sup>n</sup> identification and characterization of the phenolic compounds from the fruits of *Flacourtia indica* (Burm. F.) Merr. and *Flacourtia inermis* Roxb. Food Res Int 62: 388-396.

Apak R, Gorinstein S, Böhm V, Schaich KM, Özyürek M, and Güçlü K. 2013. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). Pure Applied Chem 85(5): 957-998.

Bassani DC, Nunes DS, and Granato D. 2014a. Quality control of *Camellia sinensis* and *Ilex paraguariensis* teas marketed in Brazil based on total phenolics, flavonoids and free-radical scavenging activity using chemometrics. In: Granato D, Ares G, (Org.), Mathematical and Statistical Approaches in Food Science and Technology. 1<sup>st</sup>ed, Oxford, UK: Wiley Blackwell. p 219–230.

- Bassani DC, Nunes DS, and Granato D. 2014b. Optimization of phenolics and flavonoids extraction conditions and antioxidant activity of roasted yerba-mate leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using response surface methodology. *An Acad Bras Cienc* 86: 923–934.
- Blainski A, Lopes GC, and Mello JCP. 2013. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense*. *L.Molecules* 18: 6852-6865.
- Bravo L, and Mateos R. Analysis of flavonoids in functional foods and nutraceuticals. In: Hurst WJ. *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*. 2<sup>nd</sup> ed. CRC Press, 2008, p. 147-206.
- Brewer MS. 2011. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Compr Rev Food Sci F* 10: 221-247.
- Bridi R, Troncoso MJ, Folch-Cano C, Fuentes J, Speisky H, and López-Alarcón. 2014. A Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)-assisted Folin–Ciocalteu assay to assess total phenol content of commercial beverages. *Food Anal Method* 7(10): 2075-2083.
- Budini R, Tonelli D, and Girotti S. 1980. Analysis of total phenols using the Prussian Blue method. *J Agric Food Chem* 28(6): 1236–1238.
- Bueno FG, Machareth MAD, Panizzon GP, Lopes GC, Leite-Mello EVS, and Mello, JCP. 2012. Development of a UV/VIS spectrophotometric method for analysis of total polyphenols from *Caesalpinia peltophoroides* Benth. *Quim Nova* 35: 822–826.
- Campos MRS, Ruiz JR, Chel-Guerrero L and Ancona DB. 2015. *Coccoloba uvifera* (L.) (Polygonaceae) fruit: phytochemical screening and potential antioxidant activity. *J Chem*, Article ID 534954, 2015: 1-9.
- Chen LY, Cheng CW, and Liang JY. 2015. Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chem* 170: 10-15.
- Cicco N, Lanorte MT, Paraggio M, Viggiano M, and Lattanzio V. 2009. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem J* 91: 107–110.
- Deshpande SS, and Cheryan M. 1987. Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays. *J Food Sci* 52(2): 332-334.

Everette JD, Bryant QM, Green AM, Abbey YA, Wangila GW, and Walker RB. 2010. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin–Ciocalteu reagent. *J Agric Food Chem* 58(14): 8139–8144.

Finocchiaro F, Ferrari B and Gianinetti A. 2010. A study of biodiversity of flavonoid content in the rice caryopsis evidencing simultaneous accumulation of anthocyanins and proanthocyanidins in a black-grained genotype. *J Cereal Sci* 51:28-34.

González-Sarriás A, Li L, and Seeram NP. 2012. Anticancer effects of maple syrup phenolics and extracts on proliferation, apoptosis, and cell cycle arrest of human colon cells. *J Funct Foods* 4(1):185-196.

González M, Guzmán B, Rudyk R, Romano E, and Molina MAA. 2003. Spectrophotometric determination of phenolic compounds in propolis. *Lat Am J Pharm* 22(3): 243-248.

Graham HD. 1992. Stabilization of the Prussian Blue color in the determination of polyphenols. *J Agric Food Chem* 40: 801-805.

Granato D, Branco GF, Cruz AG, and Faria JAF. 2011a. Characterization of Brazilian lager and brown ale beers based on color, phenolic compounds, and antioxidant activity using chemometrics. *J Sci Food Agric* 91: 563-571.

Granato D, Katayama FCU, and Castro IA. 2011b. Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. *Food Chem* 129: 366-373.

Granato D, Calado VMA, and Jarvis B. 2014a. Observations on the use of statistical methods in food science and technology. *Food Res Int* 55: 137-149.

Granato D, Grevink R, Zielinski AAF, Nunes DS, and Van Ruth SM. 2014b. Analytical strategy coupled with response surface methodology to maximize the extraction of antioxidants from green, yellow, and red teas (*Camellia sinensis* var *sinensis*). *J Agric Food Chem* 62(42): 10283-10296.

Granato D, Margraf T, Brotzakis I, Caprano E, and Van Ruth SM. 2015a. Characterization of conventional, biodynamic, and organic purple grape juices by chemical markers, antioxidant capacity and instrumental taste profile. *J Food Sci* 80(1): C55-C65.

Granato D, Karnopp AR, and Van Ruth SM. 2015b. Characterization and comparison of phenolic composition, antioxidant capacity and instrumental taste profile of juices from different botanical origins. *J Sci Food Agric* 95(10): 1997-2006.

Granato D, Koot A, Schnitzler E, and Van Ruth SM. 2015c. Authentication of geographical origin and crop system of grape juices by phenolic compounds and antioxidant activity using chemometrics. *J Food Sci* 80(3): C584-C593.

Lester GE, Lewers KS, Medina MB, and Saftner RA. 2012. Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *J Food Compos Anal* 27: 102–107.

Li H, Lee HS, Kim SH, Moon B, and Lee C. 2014. Antioxidant and anti-inflammatory activities of methanol extracts of *Tremella fuciformis* and its major phenolic acids. *J Food Sci* 79 (4): 460–468.

Liu RH. 2013. Dietary Bioactive compounds and their health implications. *J Food Sci* 78(s1): 18–25.

Lutz M, Henríquez C, and Escobar M. 2011. Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. *J Food Compos Anal* 24: 49–54.

Magnusson B and Örnemark U. 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics 2nd edn.

Medina-Remón A, Barrionuevo-González A, Zamora-Ros R, Andres-Lacueva C, Estruch R, Martínez-González MA, Diez-Espino J, and Lamuela-Raventos RM. 2009. Rapid Folin–Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake. *Anal Chim Acta* 634(1): 54-60.

Medina MB. 2011. Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *J. Funct Foods* 3(2): 79-87.

Milella RA, Antonacci D, Crupi P, Incampo F, Carrieri C, Semeraro N, and Colucci M. 2012. Skin extracts from 2 Italian table grapes (*Italia* and *Palieri*) inhibit tissue factor expression by human blood mononuclear cells. *J Food Sci* 77(8): 154–159.

- Mraihi F, Journi M, Chérif JK, Sokmen M, Sokmen A, and Trabelsi-Ayadi M. 2013. Phenolic contents and antioxidant potential of crataegus fruits grown in Tunisia as determined by DPPH, FRAP, and  $\beta$ -carotene/linoleic acid assay. J Chem 1-6.
- Nunes CA, Alvarenga, VO, Sant'ana AS, Santos JS, and Granato D. 2015. The use of statistical software in food science and technology: Advantages, limitations and misuses. Food Res Int 75: 270-280.
- Olgun FAO, Ozyurt D, Berker KI, Demirata B, Apak R. 2014. Folin–Ciocalteu spectrophotometric assay of ascorbic acid in pharmaceutical tablets and orange juice with pH adjustment and pre-extraction of lanthanum(III)–flavonoid complexes. J Sci Food Agric 94(12): 2401-2408.
- Padda MS, and Picha DH. 2007. Methodology optimization for quantification of total phenolics and individual phenolic acids in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) roots. J Food Sci 72(7): 412-416.
- Portaccio M, Di Martino S, Maiuri P, Durante D, De Luca P, Lepore M, Bencivenga U, Rossi S, De Maio A, and Mita DG. 2006. Biosensors for phenolic compounds: The catechol as a substrate model. J Mol Catal B Enzym 41: 97–102.
- Price ML, and Butler LG. 1977. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. J Agric Food Chem 26: 1268-1272.
- Prior RL, Wu X, and Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem 53(10): 4290-4302.
- Pueyo IU, and Calvo MI. 2009. Assay conditions and validation of a new UV spectrophotometric method using microplates for the determination of polyphenol content. Fitoterapia 80: 465–467.
- Reis FS, Martins A, Barros L, and Ferreira IC FR. 2012. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between *in vivo* and *in vitro* samples. Food Chem Toxicol 50: 1201-1207.
- Reta JV, Lanari MC, and Valerga J. 2012. Polyphenol input to the antioxidant activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts. LWT - Food Sci Technol 45: 28-35.

Sánchez-Rangel JA, Benavides J, Heredia JB, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. 2013. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal Methods* 21(5): 5990-5999.

Singleton VL, and Rossi Jr JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagent. *Am J Enol Vitic* 16: 144–158.

Shrivastava A, and Gupta VB. 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron Young Sci* 2: 21-25.

Slatnar A, Mikulic-Petkovsek M, Stampar F, Veberic R, and Solar A. 2014. HPLC-MS<sup>n</sup> identification and quantification of phenolic compounds in hazelnut kernels, oil and bagasse pellets. *Food Res Int* 64: 783-789.

Slimestad R, Vangdal E, and Brede C. 2009. Analysis of phenolic compounds in six Norwegian plum cultivars (*Prunus domestica* L.). *J Agric Food Chem* 57(23): 11370-11375.

Sousa CMM, Silva HR, Vieira Jr. GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, and Chaves MH. 2007. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. *Quim Nova* 30(2): 351-355.

Sreelatha S, and Inbavalli R. 2012. Antioxidant, antihyperglycemic, and antihyperlipidemic effects of *Coriandrum sativum* leaf and stem in alloxan-induced diabetic rats. *J Food Sci* 77: 119-123.

Sreerama YN, Takahashi Y, and Yamaki K. 2012. Phenolic antioxidants in some *Vigna* species of legumes and their distinct inhibitory effects on  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase activities. *J Food Sci* 77: 927–933.

U.S. FDA. 2000. Guidance for Industry (draft): Analytical Procedures and Methods Validation: Chemistry, Manufacturing, and Controls and Documentation 2000. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070489.pdf>. Accessed 08 November 2014.

Wang C, and Zuo Y. 2011. Ultrasound-assisted hydrolysis and gas chromatography–mass spectrometric determination of phenolic compounds in cranberry products. *Food Chem* 128 (2): 562-568.

Zielinski AAF, Ávila S, Ito V, Nogueira A, Wosiacki G, and Haminiuk CWI. 2014. The association between chromaticity, phenolics, carotenoids, and *in vitro* antioxidant activity of frozen fruit pulp in Brazil: an application of chemometrics. J Food Sci 79: 510–516.

Zielinski AAF, Granato D, Alberti A, Nogueira A, Demiate IM, and Haminiuk CWI. Modelling the extraction of phenolic compounds and *in vitro* antioxidant activity of mixtures of green, white and black teas (*Camellia sinensis* L. Kuntze). J Food Sci Technol. In press. DOI: 10.1007/s13197-015-1797-0



## **CAPÍTULO III**

## EFEITO DA ORIGEM GEOGRÁFICA, VARIEDADE E SISTEMA DE CULTIVO NOS COMPOSTOS BIOATIVOS E FUNCIONALIDADE *in vitro* DE SUCOS DE UVA, USANDO SISTEMAS QUÍMICOS E BIOLÓGICO

### RESUMO

Os efeitos do sistema de cultivo, origem geográfica, e variedade da uva na funcionalidade *in vitro*, algumas propriedades físico-químicas e a composição química foram investigados usando diferentes métodos estatísticos. Compostos fenólicos principais e minoritários, ensaios antioxidantes e redutores usando sistemas químicos e biológicos foram empregados para analisar n=62 sucos brasileiros de uva roxa puros (*Vitis labrusca* L.) de sistemas de cultivo orgânico e convencional das três grandes regiões produtoras. Resultados foram submetidos à ANOVA e análise de componentes principais. Distinções não foram observadas entre os sucos de uva orgânicos e convencionais em relação às capacidades redutoras e antioxidantes *in vitro*, mas somente a partir das análises de ácidos fenólicos por HPLC. A origem geográfica e a variedade de uva demonstraram um papel mais importante na distinção de sucos de uva brasileiros de acordo com a atividade antioxidante e alguns marcadores químicos. A inibição da peroxidação lipídica foi significativamente ( $p < 0,05$ ) correlacionada ao potencial redutor de compostos fenólicos hidrofílicos e à atividade de seqüestro de radicais ABTS.

**Palavras-chaves:** peroxidação lipídica, análise estatística multivariada, antioxidantes, ácidos fenólicos, alimento funcional, *Vitis* sp.

### 1. INTRODUÇÃO

Na procura por alimentos saudáveis, o consumo de produtos orgânicos tem aumentado, junto com a produção dos mesmos. O Brasil é hoje um dos mais importantes mercados consumidores, quarta maior área de produção de orgânicos na América Latina (Flores, 2015) e sexta maior área de produção orgânica mundial, e a produção de uvas orgânicas está entre as cinco culturas permanentes com maior área de cultivo no mundo (Lernoud e Willer, 2015).

O suco de uva integral obtido de uvas não-viníferas (*Vitis labrusca* L.) é um produto amplamente consumido na América do Sul e em alguns países europeus, não somente devido ao seu sabor, cor e aroma, mas também pelos potenciais

efeitos benéficos à saúde quando consumido regularmente (Hyson, 2015; Di Lorenzo et al., 2015). Os potenciais efeitos benéficos à saúde atribuídos aos compostos fenólicos presentes em diversos alimentos, em especial nas frutas e hortaliças, estão relacionados com a atividade antioxidante. Atividade esta obtida por diferentes mecanismos, como a transferência de átomos de hidrogênio, transferência de elétrons e quelação de metais (Craft et al., 2012), que tamponam e inibem o efeito deletério de espécies reativas e oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) formadas pelos processos oxidativos e inflamatórios no corpo humano (Yoo, Saliba, Prenzler, 2010; Macedo et al., 2013; Toaldo et al., 2015).

A funcionalidade de sucos de uva integrais comercializados em diversos países está relacionada diretamente com o conteúdo e perfil de compostos bioativos, em especial dos compostos fenólicos. Estes compostos são dependentes das técnicas de processamento do suco (Toaldo et al., 2014; Lambri et al., 2015; Lima et al., 2015) e também do método de cultivo (orgânico, convencional, biodinâmico), região produtora, manejo agrícola, características climáticas, e variedade da uva utilizada (Granato, Koot, van Ruth, 2014; Crupi et al., 2015; Silva et al., 2015). Em relação ao sistema de cultivo, Dani et al. (2007) analisaram  $n=8$  sucos de uva roxa e branca oriundos do sistema convencional e orgânico e verificaram diferenças significativas ( $p<0.05$ ) entre as amostras. Já Granato et al. (2015a) analisaram o perfil de sabor instrumental, marcadores químicos e atividade antioxidante de  $n=31$  sucos de diferentes países da Europa dos sistemas orgânicos, biodinâmicos e convencional e não observaram diferença estatística entre os métodos de cultivo, mas o local de produção afetou consideravelmente a funcionalidade dos sucos. Por outro lado, em outro estudo de Granato et al. (2015b) compararam sucos orgânicos, convencionais e biodinâmicos do Brasil ( $n=65$ ) e Europa ( $n=31$ ), e verificaram que os sucos brasileiros, independentemente do sistema de cultivo, apresentaram maiores níveis de conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonóides, antocianinas monoméricas, proantocianidinas, flavonóis, flavanóis, cianidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-glicosídeo e malvidina-3,5-diglicosídeo.

Os estudos com sucos de uva produzidos em localidades distintas mostram que diferenças na composição química e na funcionalidade baseada na atividade antioxidante e capacidade redutora são claras e bem documentadas, mas não foram encontrados estudos revelando as diferenças nas amostras provenientes de diferentes locais no mesmo país. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi

avaliar a existência de diferenças na composição química e bioatividade em sistemas químicos e um sistema biológico de sucos comerciais brasileiros obtidos a partir de uvas não-viníferas (*Vitis labrusca* L.), em função de três variáveis: método de cultivo (orgânico e convencional), região de cultivo (principais locais de produção no Brasil) e variedade genotípica da uva utilizada.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes

Reagente de Folin-Ciocalteu, 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfônico) (ABTS), ácido tiobarbitúrico (TBA), (+)-catequina, quercetina e ácido ascórbico foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Padrões analíticos (HPLC; grau de pureza > 97%) dos ácidos gálico, protocatecuico, siríngico, caféico, clorogênico, *p*-cumárico e ferúlico foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Todos os outros reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico. As soluções aquosas foram preparadas usando água ultrapura pelo sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil).

### 2.2 Amostras de suco de uva

Um total de 62 sucos de uva brasileiros integrais (37 convencionais e 25 orgânicos) elaborados a partir de uvas não-viníferas (*Vitis labrusca* L.) sem adição de água ou sacarose foram adquiridos no comércio de diferentes regiões do Brasil entre Julho de 2014 e Janeiro de 2015; n=49 sucos do Rio Grande do Sul, n=6 de Santa Catarina, n=5 do Paraná, n=1 de Minas Gerais e n=1 do Sergipe. Ressalta-se que essas regiões produzem mais de 95% das uvas no Brasil. As variedades de uva estudadas foram Niágara, Isabel, Bordô, Concord e suas misturas. Todos os sucos orgânicos eram certificados por no mínimo, uma empresa certificadora (IBD, EcoCert, Tecpar).

### 2.3 Análises físico-químicas

O pH dos sucos a 25 °C foi medido de acordo com a AOAC (2005), utilizando um pHmetro com um eletrodo previamente calibrado. A acidez titulável total foi determinada por volumetria potenciométrica (AOAC, 2005). O teor de sólidos solúveis (SST) dos sucos foi determinado utilizando um refratômetro portátil (modelo Atago N-1α, 0-32 °Brix, Japão) contra um branco (água) de acordo com AOAC

(2005), e os resultados expressos em °Brix. A relação SST/acidez também foi determinada para estimar o grau de maturação da uva destinada à fabricação do suco. A intensidade de cor e a tonalidade instrumental dos sucos foi determinada analiticamente utilizando um espectrofotômetro (Mini UV 1240, Shimadzu, Kyoti, Japão), a partir da leitura das absorbâncias em 420, 520 e 620 nm em cubeta de 1 cm de caminho óptico dos sucos diluídos (1:4, razão de volume) em água ultrapura (OIV, 2014). Para os cálculos de intensidade de cor (IC) e tonalidade (T), foram utilizadas as Equações (1) e (2):

$$\text{Intensidade de Cor} = A_{420} + A_{520} + A_{620} \quad (1)$$

$$\text{Tonalidade} = A_{420} / A_{520} \quad (2)$$

#### 2.4 Marcadores químicos

O conteúdo de compostos fenólicos totais dos sucos foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos, 1999) com modificação para microplacas (Granato, Karnopp e van Ruth, 2014), onde a formação do complexo metálico com os compostos fenólicos foi monitorada em  $\lambda = 725$  nm por um leitor de microplacas (Epoch, Biotek, EUA). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por litro (mg GAE L<sup>-1</sup>).

O teor de flavonóides totais foi determinado utilizando o método colorimétrico descrito por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999), empregando cloreto de alumínio como agente quelante. A complexação do alumínio com os flavonóides foi monitorada em  $\lambda = 510$  nm por um leitor de microplacas (Epoch, Biotek, EUA). Os resultados foram expressos como mg de equivalentes de catequina por litro (mg CTE L<sup>-1</sup>).

A concentração de o-difenóis totais dos sucos foi determinado pelo método espectrofotométrico adaptado para microplacas, em que os compostos fenólicos na posição *orto* complexam com molibdato de sódio (Durán et al. 1991), com pequenas modificações. O produto final da reação monitorado em  $\lambda = 370$  nm por um leitor de microplacas (Epoch, Biotek, EUA). Os resultados foram expressos como mg de equivalentes de ácido clorogênico por litro (mg CAE L<sup>-1</sup>).

O conteúdo estimado de flavonóis totais foi determinado pelo método colorimétrico proposto por Yermakov, Arasimov e Yarosh (1987), com modificações para microplacas. O produto da complexação com cloreto de alumínio hexahidratado e acetato de sódio foi monitorado em  $\lambda = 440$  nm por um leitor de microplacas (Epoch, Biotek, EUA) e os resultados foram expressos em mg equivalentes de quercetina por litro (mg QE L<sup>-1</sup>).

O teor de antocianinas monoméricas totais foi determinado pelo método do pH diferencial (Lee, Durst e Wrolstadt, 2005) empregando soluções padronizadas de cloreto de potássio a 0,025 mol L<sup>-1</sup> (pH = 1,0) e acetato de sódio a 0,40 mol L<sup>-1</sup> (pH = 4,5). Os sucos nos diferentes pHs foram medidos em  $\lambda = 520$  nm e  $\lambda = 700$  nm utilizando um espectrofotômetro (modelo Cary 50 UV-Vis Varian, Agilent, EUA) e cubeta com 1 cm de caminho óptico. O conteúdo de antocianinas monoméricas totais foi expresso como mg equivalentes de malvidina-3,5-diglicosídeo por litro (coeficiente de absorção molar de 37000 L cm<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> e massa molar de 724,5 g mol<sup>-1</sup>).

O conteúdo de taninos condensados hidrossolúveis (flavanóis) foi determinado pelo método colorimétrico descrito por Horszwald e Wilfried (2011), onde a vanilina, em meio ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), complexa com os taninos hidrossolúveis. Essa reação foi monitorada em  $\lambda = 500$  nm por um leitor de microplacas (Epoch, Biotek, EUA) e os resultados foram expressos em mg equivalentes de catequina por litro (mg CTE L<sup>-1</sup>). A estimativa do grau de polimerização das proantocianidinas foi determinada pela razão entre os teores de compostos fenólicos totais e flavanóis, como descrito por Souza et al. (2008).

O teor de ácido ascórbico (mg L<sup>-1</sup>) foi determinado empregando as condições experimentais e sistema eluente propostos por Scherer, Rybka e Godoy (2008) num cromatógrafo líquido de alta eficiência – CLAE (modelo Alliance e2695, Waters, EUA) acoplado a um sistema de diodos e detecção por fluorescência (HPLC-DAD-FL). A fase móvel foi constituída de uma solução aquosa de fosfato monobásico de potássio 0,01 mol L<sup>-1</sup>, com pH ajustado para 2,6 com ácido fosfórico, onde um fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup> e um volume de 20 µL foram empregados numa corrida de 15 minutos. Os sucos foram diluídos (1:4) com a fase móvel e filtrados em membrana de difluoreto de polivinilideno (Kasvi, China) com poro de 0,22 µm. A quantificação foi realizada utilizando uma coluna Gemini NX-C18 (150 x 4,6 mm; 3,5 µm;

Phenomenex) mantida a 10 °C e a detecção ocorreu em  $\lambda = 210$  nm. Uma curva analítica com seis diferentes concentrações equidistantes de ácido ascórbico foi construída (0 – 100 mg L<sup>-1</sup>; R<sup>2</sup> = 0,9971) para quantificar os teores de ácido ascórbico dos sucos.

Os teores dos ácidos hidroxibenzóicos (gálico, protocatecuico, e siríngico) e hidroxicinâmicos (caféico, clorogênico, *p*-cumárico e ferúlico) foram determinados empregando as condições experimentais e sistema eluente propostos por Andrade et al. (2014) num cromatógrafo líquido de alta eficiência – CLAE (série 1200, Agilent Technologies, EUA) acoplado a um sistema de diodos (HPLC-DAD) contendo uma bomba quaternária e injeção automática das amostras. Os sucos foram diluídos (1:2) com uma solução de ácido fosfórico 0,85% e filtrados em membrana de difluoreto de polivinilideno com poro de 0,45  $\mu$ m (Whatmann, GE, EUA). A quantificação foi realizada utilizando uma coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 (250 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m; Agilent Technologies, EUA) e a detecção ocorreu em  $\lambda = 278$  nm. A fase móvel foi constituída de uma solução A (ácido fórmico 1%) e solução B (metanol). O gradiente de eluição iniciou com 75% da solução A e ajustado para 40% da solução B em 40min; 75% da solução B em 50 min; 25% da solução B em 65 min. A taxa de fluxo foi de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e um volume de 10  $\mu$ L de injeção foram empregados. As soluções padrões dos compostos químicos foram preparadas em metanol e as curvas analíticas foram obtidas com cinco concentrações equidistantes. Os compostos químicos de cada suco foram identificados por comparação com os tempos de retenção e espectros UV-Vis dos padrões analíticos.

### *2.5 Capacidade redutora e atividade antioxidante in vitro: sistemas químicos*

É bem aceito que a funcionalidade de extratos alimentícios e bebidas medidos por métodos químicos *in vitro* são confiáveis e devem basear-se em pelo menos três ensaios diferentes (Apak et al., 2013). No presente estudo, nós avaliamos as propriedades antioxidantes baseado no seqüestro de radicais livres e no potencial redutor de materiais hidrofílicos e lipofílicos presentes no suco de uva.

A atividade de sequestro de radicais livres pelo mecanismo de doação de elétrons foi determinada pelo ensaio de descoloração do radical ABTS, como descrito por Re et al. (1999) com modificações. As soluções de estoque de ABTS (7 mmol L<sup>-1</sup>) e de persulfato de potássio (140 mmol L<sup>-1</sup>) foram misturadas na proporção

625:11 (v/v) para formar o radical  $\text{ABTS}^+$ . Antes da análise, a solução contendo o radical  $\text{ABTS}^+$  foi diluída em etanol (1:49). Uma curva analítica com diferentes concentrações de ácido ascórbico foi obtida para o ensaio. A absorbância das amostras foi medida em  $\lambda = 734 \text{ nm}$  em um leitor de microplacas (Epoch, Biotek, EUA). Os valores foram expressos em mg equivalentes de ácido ascórbico por litro ( $\text{mg AAE L}^{-1}$ ).

O poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) foi medido pelo método descrito por Benzie e Strain (1996), adaptado para microplacas. O reagente de FRAP foi obtido pela mistura de uma solução de TPTZ ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) diluída em ácido clorídrico ( $40 \text{ mmol L}^{-1}$ ) com uma solução tampão de acetato de sódio  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 3,6) e uma solução de cloreto férrico hexahidratado  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ . As amostras foram colocadas para reagir por 5 min a  $37^\circ\text{C}$  com o reagente de FRAP, e em seguida a absorbância foi lida em  $\lambda = 593 \text{ nm}$  em um leitor de microplacas (Epoch, Biotek, EUA). Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido ascórbico por litro ( $\text{mg AAE L}^{-1}$ ).

O potencial redutor dos compostos fenólicos hidrofílicos dos sucos foi estimado utilizando o método do Azul da Prússia (Price e Butler, 1977) com modificações propostas por Margraf et al. (2015). Esse método emprega o ferricianeto de potássio ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ,  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e cloreto férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) como agentes complexantes em meio ácido. Os valores foram expressos como mg de ácido gálico equivalente por litro ( $\text{mg GAE L}^{-1}$ ).

O poder redutor total dos compostos hidrofílicos e lipofílicos das amostras foi avaliado em meio básico utilizando o método de Folin-Ciocalteu modificado por Berker et al. (2013). O reagente de Folin-Ciocalteu, diluído em isobutanol na proporção 1:2 (v/v) foi adicionado a uma alíquota da amostra diluída em propanona, seguida da adição de uma solução de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e água ultrapura. A absorbância do complexo colorido formado foi registrada em  $\lambda = 665 \text{ nm}$  num leitor de microplacas (Epoch, Biotek, EUA) e os valores foram expressos como mg de quercetina equivalentes por litro ( $\text{mg QE L}^{-1}$ ).

## 2.6 Inibição da peroxidação lipídica induzida em sistema biológico

Com a finalidade de associar as propriedades antioxidantes/redutoras medidas usando meios químicos e a funcionalidade usando um sistema biológico, os



sucos de uva foram testados na inibição da peroxidação induzida por  $\text{Fe}^{2+}$  em fosfolipídios, triacilgliceróis e proteínas presentes em gema de ovo, seguindo os procedimentos descritos por Dakar et al. (2008), com modificações. Este ensaio foi usado como uma alternativa aos microssomas e ácido linoléico de fígado/cérebro de rato, que como são lipídeos insaturados, são propensos à oxidação pelos radicais hidroxila gerados pela reação de Fenton, induzida por  $\text{FeSO}_4$ .

Resumidamente, alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de suco foram misturados com 500  $\mu\text{L}$  de homogenato de gema (gema de ovo emulsificada com tampão fosfato de sódio 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 7,4, na proporção de 25 g  $\text{L}^{-1}$ ) e 50  $\mu\text{L}$  de sulfato ferroso 4  $\text{mmol L}^{-1}$ . Essa mistura permaneceu a 37 °C por 45 min em um banho-maria, sendo então adicionados 500  $\mu\text{L}$  de ácido acético 20% (pH 3,5) e 1000  $\mu\text{L}$  de uma solução de ácido tiobarbitúrico 0,67%. A mistura foi aquecida a 95 °C por 30 min. A formação dos produtos da peroxidação foi monitorado com o sobrenadante da mistura, em um leitor de microplacas a  $\lambda = 532 \text{ nm}$  (Epoch, Biotek, EUA). Ao mesmo tempo, um ensaio controle (sem antioxidantes) foi conduzido da mesma forma que descrito para as amostras, utilizando água ultrapura em lugar da amostra. A inibição da lipoperoxidação foi calculada pela Equação (3):

$$\% \text{ inibição} = [(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}] \quad (3)$$

## 2.7 Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Para verificar diferenças entre os grupos (orgânicos e convencionais), foram realizados teste t de Student para amostras independentes. Já a comparação entre os grupos de sucos das três principais regiões produtoras e sucos elaborados com variedades de uva diferentes, a análise de variância univariada (ANOVA) foi aplicada após a confirmação da homogeneidade das variâncias pelo teste de Brown-Forsythe. Diferenças nos valores médios foram apontadas pelo teste de Fisher LSD (Granato, Calado e Jarvis, 2014).

Devido à grande quantidade de dados, análise de componentes principais (PCA) foi realizada para observar as correlações entre os marcadores químicos e a funcionalidade *in vitro* de forma simultânea. PCA é uma ferramenta estatística multivariada exploratória que facilita a observação de semelhanças e diferenças

entre as amostras por meio do agrupamento de variáveis correlacionadas, denominado componentes principais (PCs), permitindo a projeção das amostras em função de duas ou três PCs (Zielinski et al., 2014). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica v. 7.0 (Statsoft, EUA).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Propriedades Físico-Químicas

Com relação às propriedades físico-químicas, conforme mostra a Tabela 3.1, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre os sucos convencionais ( $n=37$ ) e orgânicos ( $n=25$ ) para os atributos de pH, acidez, sólidos solúveis totais, grau de maturidade das uvas utilizadas, intensidade de cor, e tonalidade. Quando as propriedades físico-químicas dos sucos de uva vindos de diferentes regiões foram avaliadas, somente sólidos solúveis totais ( $p = 0,002$ ) foi diferente entre as regiões, na qual os sucos de uva produzidos no Paraná apresentaram os menores valores médios (Tabela 3.2). Os dados corroboram com as observações feitas por Toaldo et al. (2015), que também não encontraram diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre os sucos convencionais e orgânicos, produzidos sem adição de água ou açúcar e elaborados com uvas *Vitis labrusca* L. das variedades Bordo e Isabel, cultivadas no Rio Grande do Sul, Brasil. Bem como para as propriedades físico-químicas de pH, densidade, acidez titulável, e sólidos solúveis totais. Igualmente, Granato et al. (2015b) não encontraram diferenças significativas entre os sucos europeus biodinâmicos ( $n=6$ ), orgânicos ( $n=7$ ), e convencionais ( $n=18$ ) para pH ( $p=0,34$ ) e sólidos solúveis totais ( $p=0,40$ ). Valores de acidez e sólidos solúveis totais similares aos do presente trabalho foram encontrados por Toaldo et al. (2015) ( $0,59 \pm 0,15$  g TAE  $100 \text{ mL}^{-1}$  e  $0,66 \pm 0,15$  g TAE  $100 \text{ mL}^{-1}$  para a acidez, e  $15,03 \pm 0,06$  °Brix e  $16,73 \pm 0,06$  °Brix para sólidos solúveis totais dos sucos orgânicos e convencionais, respectivamente).

**Tabela 3.1:** Propriedades físico-químicas e composição química dos sucos de uva em função do método de cultivo

| Variáveis de resposta                            | Convencional<br>(n=37)   | Orgânico (n=25)          | t-valor | p-valor <sup>A</sup> |
|--------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------|----------------------|
| Propriedades Físico-Químicas                     |                          |                          |         |                      |
| pH                                               | 3,88 ± 0,10              | 3,90 ± 0,14              | -0,557  | 0,580                |
| Acidez (g TAE/L)                                 | 6,68 ± 1,03              | 6,81 ± 0,96              | -0,491  | 0,625                |
| SST (°Brix)                                      | 16,15 ± 1,72             | 15,44 ± 1,56             | 1,666   | 0,101                |
| Grau de maturação                                | 24,75 ± 4,75             | 23,13 ± 4,04             | 1,400   | 0,167                |
| Intensidade de cor                               | 1,72 ± 0,80              | 1,71 ± 0,67              | 0,041   | 0,968                |
| Tonalidade                                       | 1,02 ± 0,14              | 1,04 ± 0,21              | -0,487  | 0,628                |
| Composição Química                               |                          |                          |         |                      |
| Fenólicos Totais (mg GAE/L)                      | 2011,16 ± 586,20         | 1914,13 ± 609,96         | 0,629   | 0,532                |
| Flavonóides Totais (mg CTE/L)                    | 987,18 ± 328,16          | 1007,35 ± 318,90         | -0,240  | 0,811                |
| orto-difenóis (mg CAE/L)                         | 607,61 ± 152,76          | 612,28 ± 165,87          | -0,114  | 0,910                |
| Flavonóis (mg QE/L)                              | 162,18 ± 34,91           | 162,10 ± 39,53           | 0,008   | 0,993                |
| Antocianinas (mg M3,5DE/L)                       | 204,08 ± 159,18          | 213,28 ± 235,57          | -0,184  | 0,855                |
| Taninos Condensados<br>Hidrossolúveis (mg CTE/L) | 805,78 ± 514,13          | 813,36 ± 623,48          | -0,052  | 0,959                |
| Grau de polimerização                            | 3,02 ± 1,25              | 3,19 ± 1,55              | -0,453  | 0,244                |
| Ácido Ascórbico (mg/L)                           | 21,28 ± 11,06            | 18,71 ± 10,91            | 0,902   | 0,370                |
| Ácido Gálico (mg/L)                              | 9,56 ± 3,96 <sup>a</sup> | 7,72 ± 2,87 <sup>b</sup> | 2,001   | 0,050                |
| Ácido Protocatecuico (mg/L)                      | 68,49 ± 14,89            | 69,35 ± 18,23            | -0,203  | 0,840                |
| Ácido Clorogênico (mg/L)                         | 27,90 ± 16,62            | 23,52 ± 28,05            | 0,771   | 0,444                |
| Ácido Caféico (mg/L)                             | 5,81 ± 2,78              | 4,48 ± 2,90              | 1,828   | 0,072                |
| Ácido Sirínico (mg/L)                            | 4,09 ± 3,17 <sup>a</sup> | 2,03 ± 1,73 <sup>b</sup> | 2,961   | 0,004                |
| Ácido p-cumárico (mg/L)                          | 7,24 ± 4,42 <sup>a</sup> | 4,51 ± 3,54 <sup>b</sup> | 2,574   | 0,013                |
| Ácido Ferúlico (mg/L)                            | 0,26 ± 0,81              | 0,18 ± 0,62              | 0,431   | 0,668                |

<sup>A</sup> Valores de probabilidade obtidos pelo teste t de Student para amostras independentes; SST = sólidos solúveis totais

**Tabela 3.2:** Propriedades físico-químicas e composição química dos sucos de uva em função da região de cultivo

| Variáveis de resposta                         | RS (n=49)                     | PR (n=5)                      | SC (n=6)                      | p-valor <sup>A</sup> | p-valor <sup>B</sup> |
|-----------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------|----------------------|
| Propriedades Físico-Químicas                  |                               |                               |                               |                      |                      |
| pH                                            | 3,89 ± 0,12                   | 3,85 ± 0,10                   | 3,83 ± 0,12                   | 0,763                | 0,342                |
| Acidez (g TAE/L)                              | 6,81 ± 0,93                   | 6,82 ± 1,31                   | 6,50 ± 1,10                   | 0,683                | 0,756                |
| SST (°Brix)                                   | 16,19 ± 1,61 <sup>a</sup>     | 13,56 ± 0,49 <sup>b</sup>     | 15,52 ± 1,46 <sup>a</sup>     | 0,254                | 0,002                |
| Grau de maturação                             | 24,21±4,31                    | 20,39±3,41                    | 24,65±5,96                    | 0,426                | 0,178                |
| Intensidade de cor                            | 1,73 ± 0,75                   | 2,17 ± 0,57                   | 1,57 ± 0,65                   | 0,408                | 0,368                |
| Tonalidade                                    | 1,04 ± 0,16                   | 0,91 ± 0,13                   | 1,07 ± 0,25                   | 0,575                | 0,227                |
| Composição Química                            |                               |                               |                               |                      |                      |
| Fenólicos Totais (mg GAE/L)                   | 1951,88 ± 575,71 <sup>b</sup> | 2711,72 ± 463,74 <sup>a</sup> | 1649,50 ± 436,19 <sup>b</sup> | 0,447                | 0,007                |
| Flavonóides Totais (mg CTE/L)                 | 992,22 ± 313,39 <sup>b</sup>  | 1361,90 ± 303,92 <sup>a</sup> | 805,76 ± 189,70 <sup>b</sup>  | 0,495                | 0,012                |
| orto-difenóis (mg CAE/L)                      | 612,26 ± 153,83 <sup>b</sup>  | 779,97 ± 111,03 <sup>a</sup>  | 503,23 ± 90,25 <sup>b</sup>   | 0,313                | 0,011                |
| Flavonóis (mg QE/L)                           | 164,49 ± 35,34 <sup>ab</sup>  | 190,50 ± 31,64 <sup>a</sup>   | 136,69 ± 27,61 <sup>b</sup>   | 0,529                | 0,042                |
| Antocianinas Monoméricas (mg M3,5DE/L)        | 198,94 ± 188,13 <sup>b</sup>  | 424,09 ± 210,61 <sup>a</sup>  | 111,15 ± 106,67 <sup>b</sup>  | 0,675                | 0,018                |
| Taninos Condensados Hidrossolúveis (mg CTE/L) | 774,01 ± 517,54 <sup>b</sup>  | 1578,45 ± 705,61 <sup>a</sup> | 507,46 ± 209,22 <sup>b</sup>  | 0,392                | 0,002                |
| Grau de polimerização                         | 3,12 ± 1,32                   | 1,93 ± 0,71                   | 3,82 ± 1,87                   | 0,132                | 0,071                |
| Ácido Ascórbico (mg/L)                        | 21,35 ± 11,41                 | 15,99 ± 5,46                  | 13,74 ± 10,58                 | 0,236                | 0,199                |
| Ácido Gálico (mg/L)                           | 8,36 ± 3,27 <sup>b</sup>      | 13,09 ± 3,94 <sup>a</sup>     | 8,12 ± 4,55 <sup>b</sup>      | 0,789                | 0,017                |
| Ácido Protocatecuico (mg/L)                   | 70,14 ± 15,34 <sup>a</sup>    | 80,44 ± 13,98 <sup>a</sup>    | 52,35 ± 15,33 <sup>b</sup>    | 0,706                | 0,009                |
| Ácido Clorogênico (mg/L)                      | 25,29 ± 22,43                 | 35,32 ± 25,50                 | 24,55 ± 18,52                 | 0,749                | 0,626                |
| Ácido Caféico (mg/L)                          | 5,34 ± 2,89                   | 6,64 ± 3,81                   | 3,95 ± 2,00                   | 0,634                | 0,312                |
| Ácido Siríngico (mg/L)                        | 3,03 ± 2,59                   | 4,60 ± 1,50                   | 4,20 ± 5,43                   | 0,436                | 0,376                |
| Ácido p-cumárico (mg/L)                       | 5,84 ± 4,41                   | 9,25 ± 4,26                   | 5,05 ± 2,54                   | 0,210                | 0,205                |
| Ácido Ferúlico (mg/L)                         | 0,15 ± 0,55 <sup>b</sup>      | 1,39 ± 1,68 <sup>a</sup>      | ND                            | 0,001                | 0,001                |

<sup>A</sup> Valores de probabilidade de homogeneidade de variância obtidos pelo teste de Brow-Forsythe; <sup>B</sup> Valores de probabilidade obtidos por ANOVA univariada. Letras diferentes na mesma linha representam resultados estatisticamente diferentes para o teste de Fisher LSD; RS= Rio Grande do Sul; PR= Paraná; SC= Santa Catarina; ND= não detectado.

**Tabela 3.3:** Propriedades físico-químicas e composição química dos sucos de uva em função da variedade de uva

| Variáveis de Resposta                         | Isabel (n=6)                  | Bordô (n=19)                  | IB (n=18)                      | IBC (n=4)                      | p-valor <sup>A</sup> | p-valor <sup>B</sup> |
|-----------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------|----------------------|
| Propriedades Físico-Químicas                  |                               |                               |                                |                                |                      |                      |
| pH                                            | 4,00 ± 0,12                   | 3,86 ± 0,13                   | 3,89 ± 0,09                    | 3,86 ± 0,04                    | 0,315                | 0,056                |
| Acidez (g TAE/L)                              | 6,89 ± 1,02                   | 6,52 ± 1,13                   | 6,98 ± 0,78                    | 6,18 ± 1,24                    | 0,473                | 0,364                |
| SST (°Brix)                                   | 15,52 ± 0,78                  | 15,64 ± 1,41                  | 16,46 ± 1,73                   | 16,53 ± 1,71                   | 0,473                | 0,297                |
| Grau de maturação                             | 22,82 ± 2,60                  | 24,57 ± 4,37                  | 23,99 ± 4,70                   | 27,24 ± 3,58                   | 0,530                | 0,440                |
| Intensidade de cor                            | 1,93 ± 0,73                   | 1,79 ± 0,54                   | 1,84 ± 0,89                    | 1,10 ± 0,63                    | 0,264                | 0,283                |
| Tonalidade                                    | 1,09 ± 0,09                   | 0,98 ± 0,16                   | 1,04 ± 0,13                    | 1,13 ± 0,05                    | 0,434                | 0,108                |
| Composição Química                            |                               |                               |                                |                                |                      |                      |
| Fenólicos Totais (mg GAE/L)                   | 1351,13 ± 450,42 <sup>b</sup> | 2247,95 ± 480,22 <sup>a</sup> | 1952,77 ± 506,72 <sup>a</sup>  | 1708,02 ± 480,61 <sup>ab</sup> | 0,907                | 0,002                |
| Flavonóides Totais (mg CTE/L)                 | 750,00 ± 181,64 <sup>c</sup>  | 1112,26 ± 296,82 <sup>a</sup> | 1020,39 ± 269,02 <sup>ab</sup> | 771,44 ± 119,02 <sup>bc</sup>  | 0,326                | 0,014                |
| orto-difenóis (mg CAE/L)                      | 470,12 ± 70,15 <sup>b</sup>   | 690,07 ± 132,99 <sup>a</sup>  | 623,57 ± 151,34 <sup>a</sup>   | 450,83 ± 37,62 <sup>b</sup>    | 0,166                | 0,001                |
| Flavonóis (mg QE/L)                           | 138,61 ± 26,23 <sup>b</sup>   | 173,89 ± 28,14 <sup>a</sup>   | 173,43 ± 35,37 <sup>a</sup>    | 131,60 ± 20,02 <sup>b</sup>    | 0,619                | 0,012                |
| Antocianinas Monoméricas (mg M3,5DE/L)        | 86,36 ± 42,49 <sup>b</sup>    | 301,28 ± 234,35 <sup>a</sup>  | 163,50 ± 105,37 <sup>b</sup>   | 78,86 ± 30,12 <sup>b</sup>     | 0,173                | 0,010                |
| Taninos Condensados Hidrossolúveis (mg CTE/L) | 471,65 ± 210,75 <sup>b</sup>  | 1036,64 ± 589,52 <sup>a</sup> | 677,41 ± 311,18 <sup>b</sup>   | 399,50 ± 76,39 <sup>b</sup>    | 0,381                | 0,007                |
| Grau de polimerização                         | 3,64 ± 2,09 <sup>ab</sup>     | 2,52 ± 0,83 <sup>b</sup>      | 3,33 ± 1,38 <sup>ab</sup>      | 4,29 ± 0,92 <sup>a</sup>       | 0,094                | 0,038                |
| Ácido Ascórbico                               | 23,49 ± 11,93                 | 20,22 ± 8,45                  | 20,25 ± 12,66                  | 25,58 ± 18,18                  | 0,356                | 0,785                |
| Ácido Gálico (mg/L)                           | 9,62 ± 3,02                   | 8,39 ± 3,89                   | 7,51 ± 2,66                    | 11,24 ± 5,64                   | 0,775                | 0,231                |
| Ácido Protocatecuico (mg/L)                   | 66,63 ± 13,29                 | 74,61 ± 13,80                 | 67,89 ± 16,87                  | 59,44 ± 29,90                  | 0,141                | 0,319                |
| Ácido Clorogênico (mg/L)                      | 45,92 ± 14,63                 | 25,32 ± 27,47                 | 21,30 ± 16,22                  | 22,24 ± 2,56                   | 0,609                | 0,111                |
| Ácido Caféico (mg/L)                          | 2,80 ± 0,77                   | 6,12 ± 3,24                   | 5,79 ± 3,02                    | 5,26 ± 2,18                    | 0,285                | 0,117                |
| Ácido Sirínico (mg/L)                         | 2,50 ± 0,49 <sup>b</sup>      | 3,49 ± 3,24 <sup>b</sup>      | 2,80 ± 2,09 <sup>b</sup>       | 8,11 ± 4,60 <sup>a</sup>       | 0,059                | 0,009                |
| Ácido p-cumárico (mg/L)                       | 5,80 ± 3,18                   | 7,11 ± 4,18                   | 6,14 ± 5,17                    | 8,53 ± 1,83                    | 0,347                | 0,706                |
| Ácido Ferúlico (mg/L)                         | ND                            | 0,38 ± 0,84                   | ND                             | ND                             | NA                   | NA                   |

<sup>A</sup> Valores de probabilidade de homogeneidade de variância obtidos pelo teste de Brow-Forsythe; <sup>B</sup> Valores de probabilidade obtidos por ANOVA univariada. Letras diferentes na mesma linha representam resultados estatisticamente diferentes para o teste de Fisher; IB= blend de Isabel e Bordô; IBC= blend de Isabel, Bordô e Concord; NA= não aplicável; ND= não detectado

Uma leve diferença nos valores de pH ( $p=0,056$ ) foi observada para os sucos produzidos com diferentes variedades de uva (Tabela 3.3), onde a Isabel apresentou os maiores valores (pH  $4,00\pm0,12$ ). O mesmo não foi observado por Lima et al. (2014), onde foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) entre os sucos obtidos das uvas (*Vitis labrusca* L.) Isabel Precoce, BRS Cora, BRS Violeta, BRS Magna, mistura de Isabel Precoce e BRS Violeta, e mistura de Isabel Precoce e BRS Cora, cultivadas em Pernambuco, Brasil, para os atributos de pH, sólidos solúveis totais, acidez titulável, grau de maturidade das uvas, e intensidade de cor.

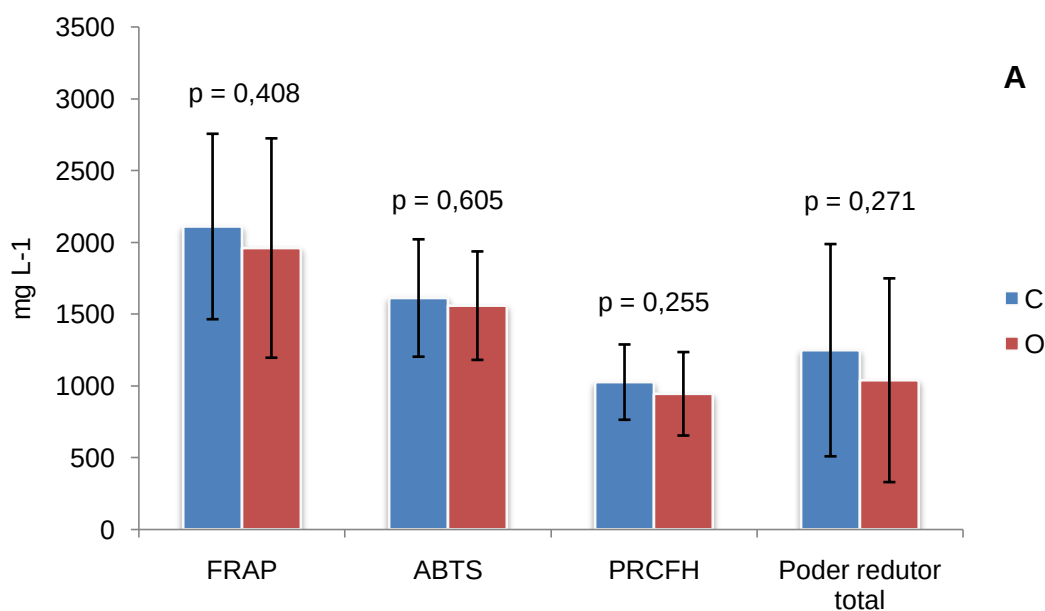
### 3.2 Composição química e atividade antioxidante dos sucos

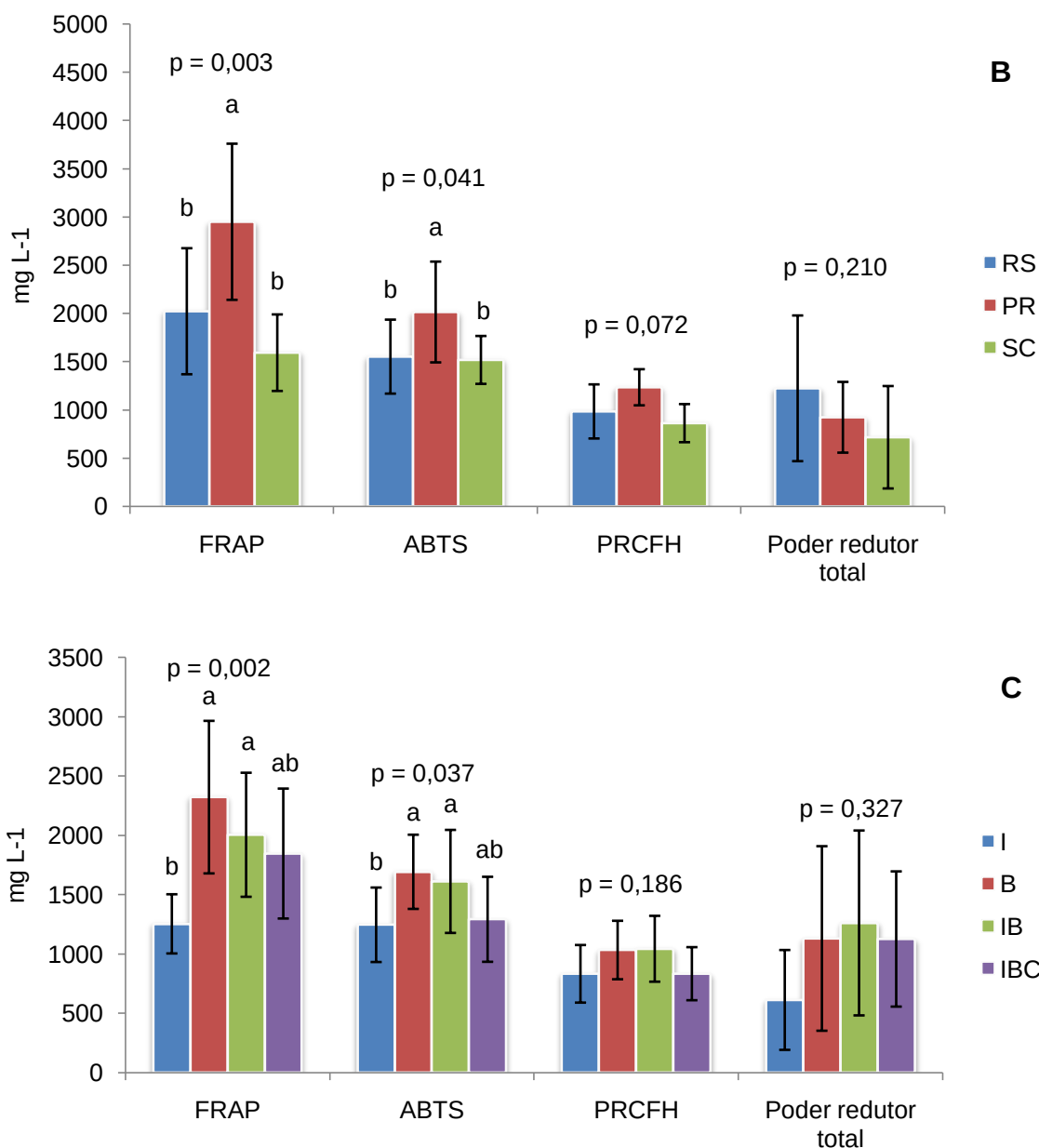
A diferenciação da composição química dos sucos produzidos com uvas cultivadas pelo sistema orgânico e convencional foi verificada pelos teores de ácido gálico ( $p=0,050$ ), ácido sirínico ( $p=0,004$ ) e ácido *p*-cumárico ( $0,013$ ), sendo que os maiores valores desses atributos pertencem aos sucos convencionais, como mostrados na Tabela 3.1. Para a composição química, Toaldo et al. (2015) obtiveram diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) entre o suco orgânico, produzido com uvas Bordô, e o suco convencional, produzido com uvas Bordô e Isabel, para os conteúdos de fenólicos totais, antocianinas monoméricas totais, ácidos orgânicos (cítrico, málico e tartárico), e ácidos fenólicos (vanílico, protocatecuico, cafeico, ferúlico). Já Granato et al. (2015a) verificaram diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) somente para os conteúdos de ácido clorogênico e miricetina, entre os sucos orgânicos ( $n=46$ ) e convencionais ( $n=19$ ) brasileiros. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p\geq0,256$ ) na atividade antioxidante e capacidade redutora entre sucos orgânicos e convencionais (Figure 3.1A), corroborando os resultados obtidos por Granato et al. (2015a,b) e se diferenciando dos obtidos por Dani et al. (2007) e Toaldo et al. (2015) que obtiveram diferenças estatisticamente significativas para a atividade antioxidante pelos ensaios de sequestro de radicais livres (DPPH e ABTS), entre os sucos elaborados com uvas Bordô orgânicas e com uvas Bordô/Isabel convencionais.

Na verdade, não há consenso sobre as diferenças nos marcadores químicos e atividade antioxidante de produtos à base de vegetais provenientes de sistemas de cultivo orgânico e convencional. Parece que as diferenças estão relacionadas às outras características, tais como a origem geográfica e botânica da planta. Em

alguns casos, para os produtos à base de plantas específicas e alguns dos seus compostos químicos, a distinção entre sistemas de cultivo é possível de ser detectado, quantificado, e marcadores quimiotaxonômicos podem ser propostos (Dani et al., 2007; Hallmann e Rembiałkowska, 2012; Vallverdú-Queralt et al., 2012). No entanto, as diferenças são insignificantes (ou abaixo do limite de detecção dos métodos de análise) para alguns cultivares e mesmo entre sistemas de culturas (Luthria et al., 2013; Tassoni, Tango e Ferri, 2013).

**Figura 3.1:** Atividade Antioxidante e Capacidade Redutora dos sucos de uva em função do método de cultivo (A), região de cultivo (B) e variedade de uva (C).





Nota: FRAP, Poder antioxidante redutor do ferro; ABTS, atividade de seqüestro de radicais ABTS<sup>+</sup>; PRCFH, Potencial redutor de compostos fenólicos hidrofílicos; O, Orgânico; C, Convencional; RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina; PR, Paraná; B, Bordô; I, Isabel; IB, blend de Isabel e Bordô; IBC, blend de Isabel, Bordô e Concord.

No presente estudo, o efeito da origem geográfica da uva provou ser um fator de discriminação de sucos de uva produzidos no Brasil já que apenas os teores de ácido ascórbico ( $p=0,199$ ), ácido clorogênico ( $p=0,626$ ), ácido caféico ( $p=0,312$ ), ácido siríngico ( $p=0,376$ ) e ácido *p*-cumárico ( $p=0,205$ ) não mostraram diferenças entre as três principais regiões produtoras (Tabela 3.2). Apesar do Rio Grande do Sul ser o estado com uma reconhecida tradição de vitivinicultura na América do Sul, nesse trabalho observou-se que os sucos produzidos no Paraná apresentaram os



maiores valores médios para os compostos bioativos analisados, bem como maior capacidade redutora do ferro (FRAP) e captura de radicais ABTS (Figure 3.1B) ao passo que não foram observadas diferenças entre os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. É notável que apesar dos valores médios do grau de polimerização dos taninos nos sucos produzidos em diferentes regiões serem não estatisticamente significativos ( $p=0,071$ ), os produzidos no Paraná tiveram um valor de médio de 2 unidades, enquanto que os sucos produzidos no Rio Grande do Sul e Santa Catarina apresentaram três ou quatro unidades, e portanto, assim, um maior peso molecular. Este fato implica que o solo e outras condições ambientais altamente afetam o desenvolvimento de compostos fenólicos (isto é, taninos) com diferentes estruturas químicas.

Em função da região de cultivo, Vilanova et al. (2015) verificaram diferenças nos níveis de flavanóis, antocianinas, flavonóis, ácidos fenólicos, e resveratrol nos mostos da uva Mencía (*Vitis vinifera*), cultivadas em diferentes localidades do noroeste da Espanha. Mphahlele et al. (2014) em seu estudo com sucos de romãs obtidas de três diferentes localidades da África do Sul, obtiveram diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) para antocianinas monoméricas totais, conteúdo de fenólicos totais, flavonóides totais e taninos totais. Granato et al. (2015a) obtiveram diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) nos sucos oriundos do Brasil (*Vitis labrusca* L.) e na Europa (*Vitis* sp), em relação aos conteúdos de fenólicos totais, flavonóides, antocianinas totais, ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, rutina, e quercetina.

Alguns trabalhos claramente reportam que a composição química de sucos de uva é influenciada pela região em que a uva é produzida (Lima et al., 2014), enquanto outros autores atestam que a composição química e as propriedades funcionais de bebidas baseadas em uva não podem ser marcadores adequados para autenticar sua origem geográfica (Tassoni, Tango e Ferri, 2013). Como a pesquisa experimental tem mostrado resultados divergentes, nossos dados claramente indicam que o efeito da origem geográfica da uva é altamente significativa sobre a composição química e propriedades antioxidantes/redutoras de sucos de uva roxa.

Da mesma forma que a origem geográfica, a variedade de uva afetou de forma significativa a composição química dos sucos de uva (Tabela 3.3). No geral, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) nos sucos de

uvas Bordô (n=19), Isabel (n=6), mistura de Bordô e Isabel (n=18), e mistura de Bordô, Isabel e Concord (n=4) para a composição química, em relação aos valores de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, *o*-difenois, flavonóis, antocianinas monoméricas, taninos condensados hidrossolúveis, e teor de ácido siríngico. O grau de polimerização dos sucos de uva Bordô foram menores do que os encontrados para os sucos elaborados com a mistura de Bordo, Isabel e Concord. Os maiores valores médios de teor de compostos fenólicos totais, flavonoides, *o*-difenois, e flavonóis foram verificados para os sucos elaborados a partir da uva Bordô e Isabel/Bordo, ao passo que sucos de uva Bordo apresentaram o maior teor de antocianinas monoméricas e taninos condensados hidrossolúveis em relação aos demais tipos de suco. Essa tendência também foi observada para a atividade antioxidante frente ao radical ABTS e para o poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), ao passo que os sucos oriundos de uva Isabel apresentaram a menor atividade antioxidante (Figure 3.1C). Apesar de não ser estatisticamente significativo ( $p = 0,111$ ), o teor de ácido clorogênico de sucos Isabel foram cerca de 200% maior do que nos outros sucos. Esses resultados corroboram com observações anteriores sobre o efeito da variedade de uva na composição química de sucos de uva roxa integrais (Lima et al., 2014; Silva et al., 2015). Os valores encontrados para os ácidos fenólicos, ainda que diferentes dos resultados encontrados por Toaldo et al. (2015), apresentam a mesma tendência. Os sucos elaborados com a uva Bordô apresentam valores maiores de ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido caféico e ácido *p*-cumárico do que os sucos elaborados com a mistura de uvas Bordô e Isabel. Igualmente para os valores dos ácidos fenólicos encontrados por Silva et al. (2015) para o suco de uva Isabel, os mesmos são bem diferentes dos encontrados no presente trabalho. O maior e menor valores encontrados por Silva et al. (2015) para a uva Isabel correspondem respectivamente ao ácido siríngico e ao ácido *p*-cumárico, enquanto que no presente trabalho estes valores correspondem respectivamente ao ácido protocatecuico e ácido ferúlico.

### *3.3 Análise multivariada do efeito da origem geográfica, variedade e sistema de cultivo na composição química e atividade antioxidante*

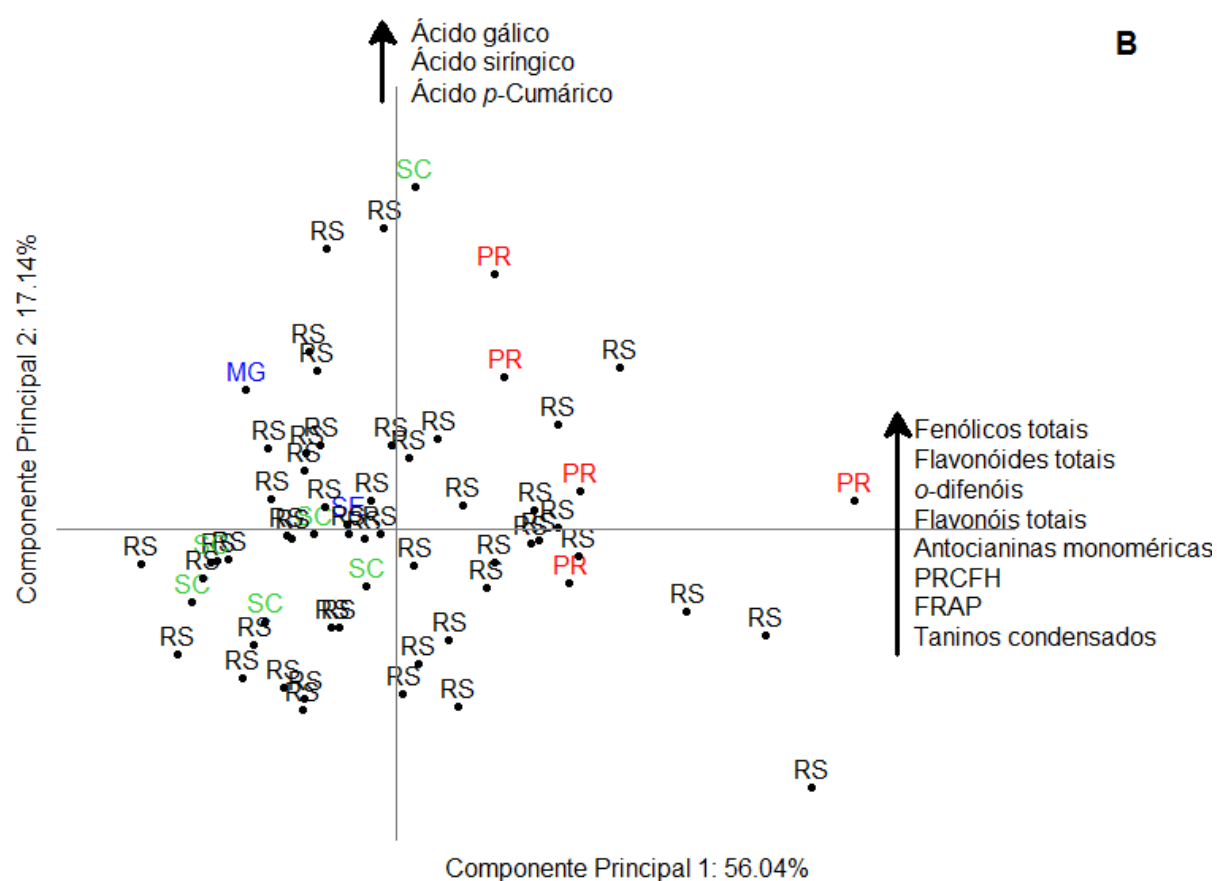
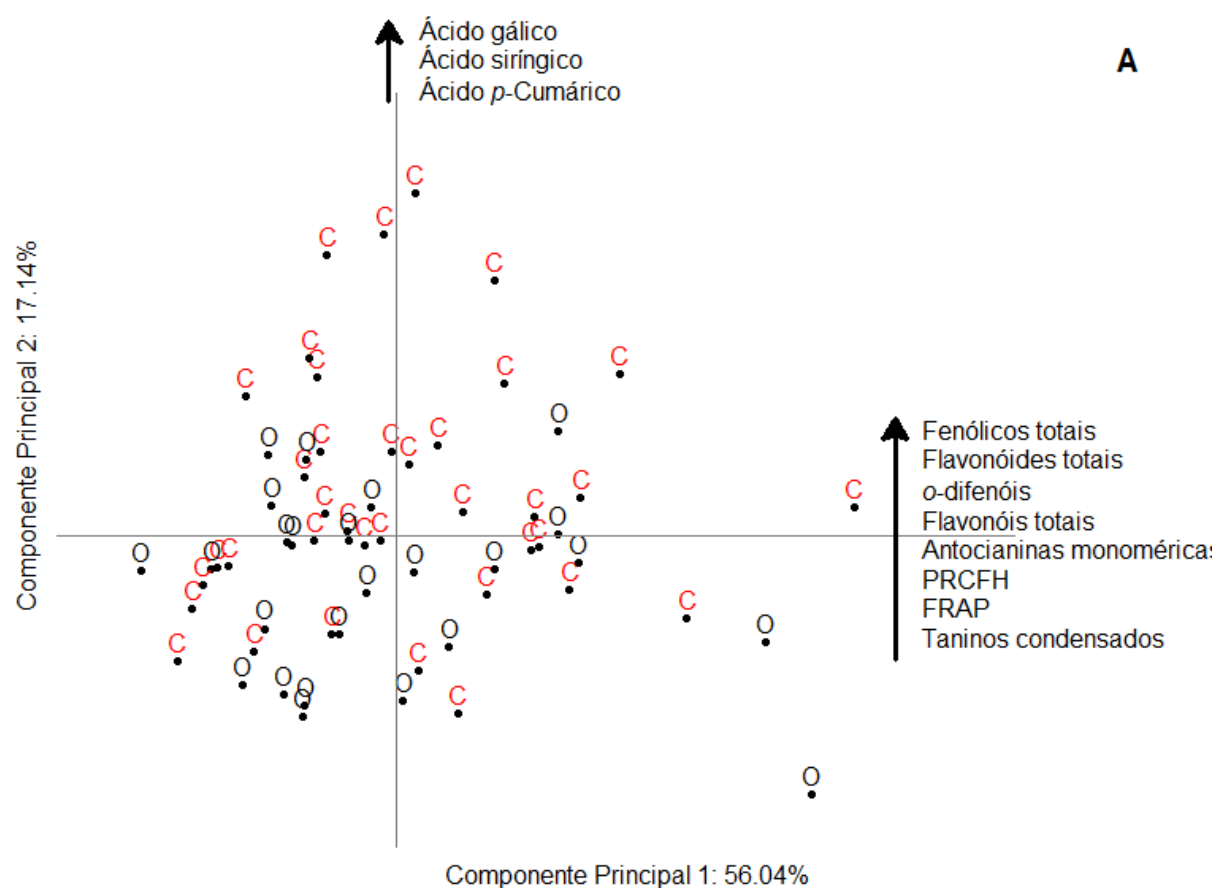
Para verificar de forma simultânea a composição química e a funcionalidade *in vitro* dos sucos, e explicar os efeitos da origem, variedade e método de cultivo, foi utilizada a análise multivariada de componentes principais. As duas componentes

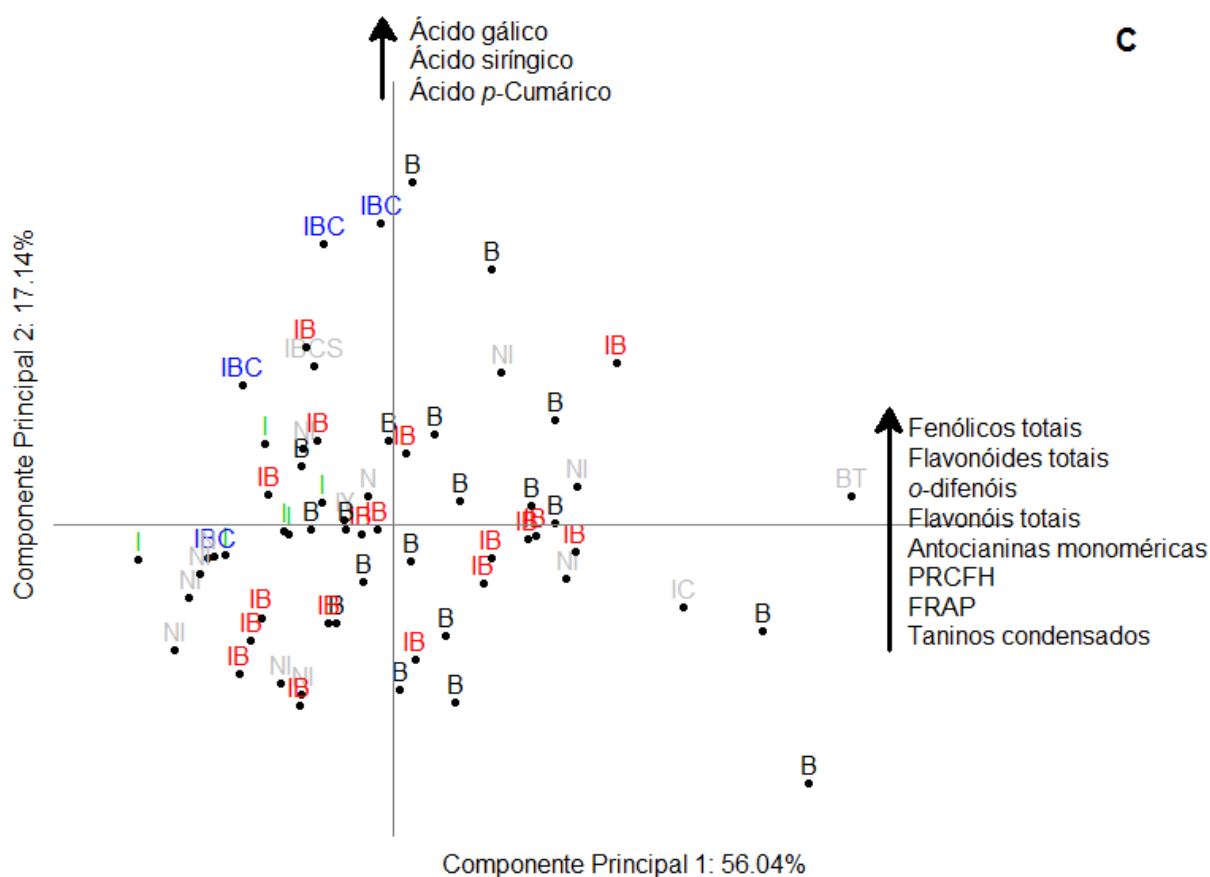
principais, compostas de 11 variáveis de resposta, explicaram 73.18% da variabilidade total dos sucos. Assim como mostra a Figura 3.2A, a partir da análise de componentes principais, não foi possível separar os sucos convencionais dos sucos orgânicos, entretanto, é possível observar os sucos orgânicos mais centralizados e alguns sucos convencionais distribuídos na região superior da projeção, onde estão os maiores valores dos ácidos gálico, siríngico e *p*-cumárico.

Para o efeito da região de cultivo (Figura 3.2B), observa-se que os sucos oriundos do Rio Grande do Sul apresentaram os menores valores de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, *o*-difenóis, flavonóis, antocianinas monoméricas, taninos condensados, atividade antioxidante de redução do ferro (FRAP), e potencial redutor de compostos fenólicos hidrofílicos (PRCFH). O mesmo é observado para os sucos oriundos de Santa Catarina, com exceção de uma amostra, enquanto que os sucos de origem do Paraná apresentaram os maiores valores de compostos bioativos e potencial antioxidante/redutor.

Com relação à variedade de uva (Figura 3.2C), não foi possível diferenciar os sucos elaborados com as uvas Bordô e Bordô/Isabel. No entanto, os sucos elaborados com a uva Isabel se encontram distribuídos no lado esquerdo da projeção, onde estão os menores valores de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, *o*-difenóis, flavonóis, antocianinas monoméricas, taninos condensados, atividade antioxidante de redução do ferro (FRAP), e potencial redutor de compostos fenólicos hidrofílicos (PRCFH), enquanto que os sucos de uva Bordô se encontram distribuídos no centro e lado direito da projeção, com maior potencial antioxidante/redutor e maior teor de compostos bioativos.

**Figura 3.2:** Análise de componentes principais (PCA) para projeção dos sucos em função do método de cultivo (A), região produtora (B) e variedade de uva (C).





Nota: PRCFH, Potencial redutor de compostos fenólicos hidrofílicos; FRAP, Poder antioxidante de redução do ferro; O, Orgânico; C, Convencional; RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina; PR, Paraná; MG, Minas Gerais; SE, Sergipe; B, Bordô; I, Isabel; IB, blend de Isabel e Bordô; IBC, blend de Isabel, Bordô e Concord; IBCS, blend de Isabel, Bordô, Concord e Seibert; BT, blend de Bordô e Terci; IC, blend de Isabel e Concord; N, Niágara; NI, não identificado

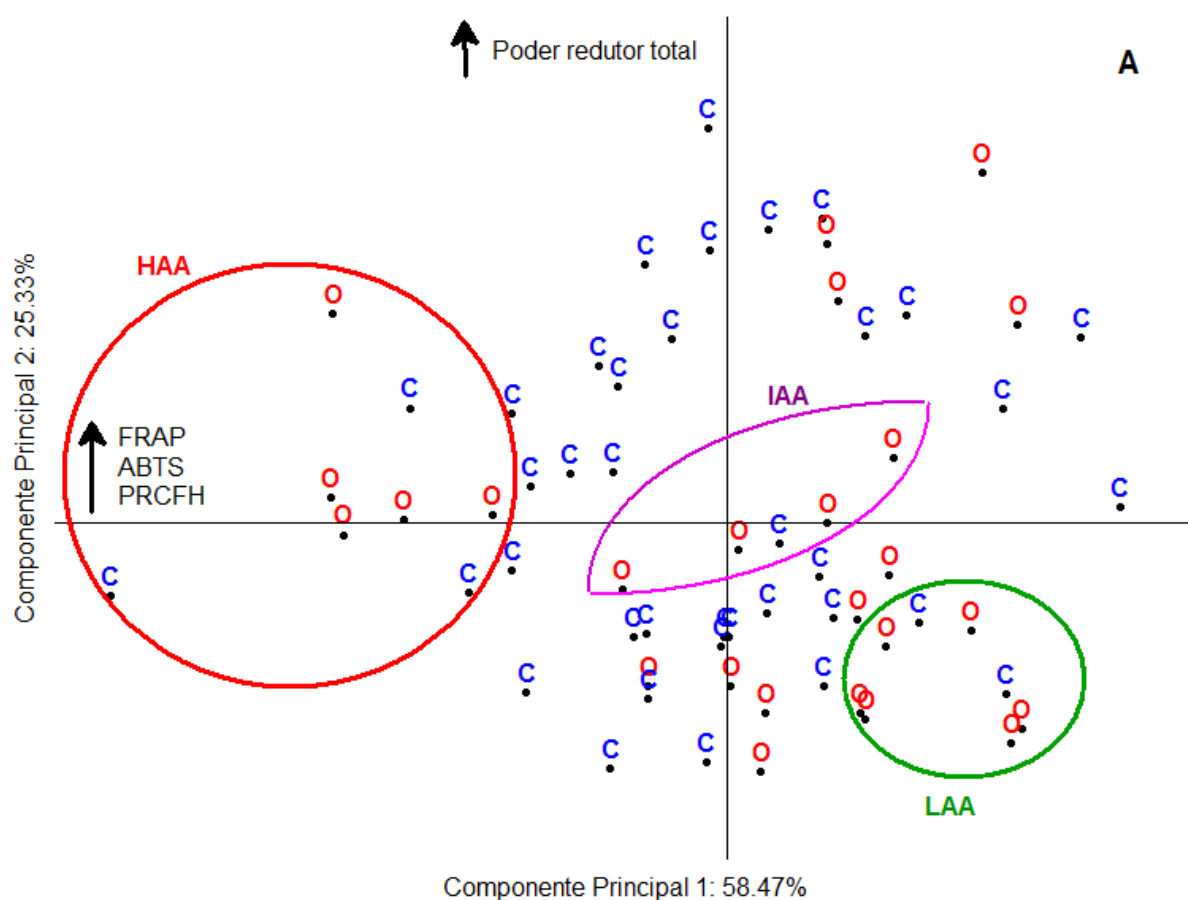
### 3.4 Correlação entre as capacidades antioxidantes químicas e biológica in vitro

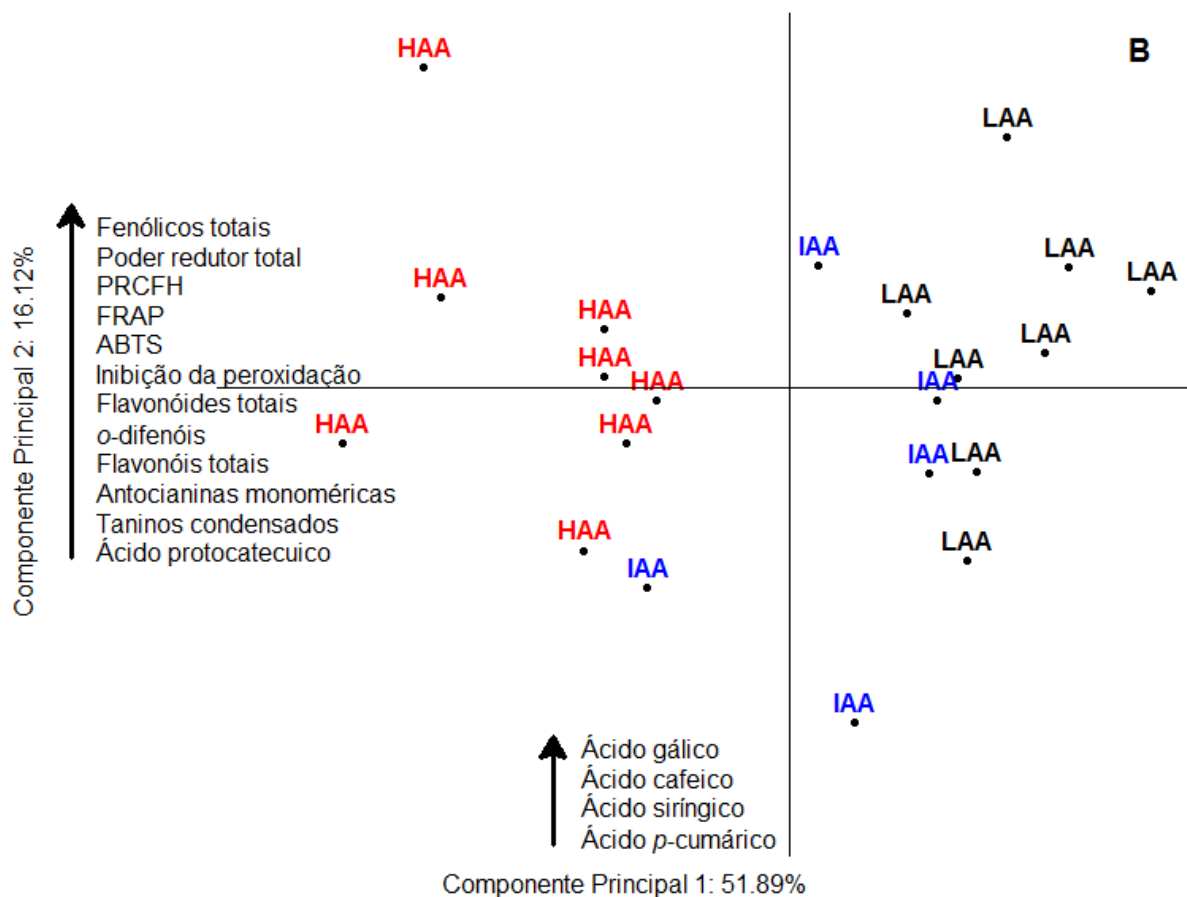
Sabe-se que métodos químicos para avaliação do potencial antioxidante apresentam críticas por não serem conduzidos em meio com pH fisiológico e não considerarem a composição química, temperatura de reação e envolverem espécies químicas não existentes no corpo humano. Assim, a inibição da peroxidação lipídica induzida por reações de Fenton ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$ ;  $\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{HOO}^\bullet + \text{H}^+$ ) foi avaliada em um sistema biológico tamponado (pH 7,4), em que a reação de formação de radicais livres foi conduzida em  $T = 37^\circ\text{C}$ , simulando as condições fisiológicas de oxidação lipídica *in vivo*.

Com a finalidade de associar as capacidades antioxidantes e redutoras medidas por métodos químicos *in vitro*, uma projeção multivariada dos sucos foi feita usando análise de componentes principais, e um total de 18 sucos foram selecionados e analisados na inibição da peroxidação induzida por  $\text{Fe}^{2+}$  nos lipídeos

de gema de ovo tamponada. Para este propósito,  $n = 8$  sucos de uva foram classificados como alta atividade antioxidante (HAA),  $n = 5$  como atividade antioxidante intermediária (IAA), e  $n = 8$  como um grupo com baixa atividade antioxidante (LAA), como observado na Figura 3.3A. Quando os resultados (maiores e menores composições químicas e capacidades antioxidantes/redutoras) foram analisadas em conjunto, foi possível observar uma alta similaridade entre a atividade antioxidante medida por diferentes métodos *in vitro* e o ensaio que empregou a peroxidação lipídica em um sistema biológico (Figura 3.3B). De fato, a inibição da peroxidação lipídica foi significativamente correlacionada com o potencial redutor de compostos fenólicos hidrofílicos ( $r = 0,533$ ;  $p = 0,013$ ) e com a atividade de seqüestro de radicais livres a partir do radical ABTS ( $r = 0,505$ ;  $p = 0,020$ ).

**Figura 3.3:** Análise de componentes principais (PCA) para escolha dos sucos a serem utilizados na análise de lipoperoxidação (A) e classificação dos dados de inibição da lipoperoxidação em função da composição química e atividade antioxidante *in vitro* (B)





Nota: FRAP, Poder antioxidante redutor do ferro; ABTS, atividade de seqüestro de radicais ABTS<sup>+</sup>; PRCFH, Potencial redutor de compostos fenólicos hidrofílicos; O, Orgânico; C, Convencional; AA, Atividade antioxidante; HAA, Atividade antioxidante alta; IAA, Atividade antioxidante intermediária; LAA, Atividade antioxidante baixa.

Estudos relacionando protocolos *in vitro* e *in vivo* não são conclusivos e não há consenso sobre o efeito antioxidante de produtos à base de frutas. Por exemplo, Stinco et al. (2015) tentaram avaliar uma possível relação entre a capacidade antioxidante *in vitro* de sucos de laranja, obtidos de seis variedades diferentes, com a resistência ao stress oxidativo induzido quimicamente em células de *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados obtidos não apresentaram uma correlação significativa entre as diferentes metodologias *in vitro* e *in vivo*. Por outro lado, Camargo et al. (2014) investigaram o perfil fenólico, capacidade antioxidante *in vitro*, inibição da oxidação de colesterol LDL e inibição do radical peroxila nos danos causados no DNA de subprodutos das uvas BRS Cora, Isabel, Syrah, e Tempranillo produzidas no Brasil. Os resultados mostraram uma correlação alta e estatisticamente significativa entre todos os ensaios antioxidantes e os conteúdos de fenólicos totais ( $p < 0,01$ ), com exceção da oxidação induzida ao colesterol LDL

( $p > 0,05$ ). Assim os autores sugerem que os compostos fenólicos podem desempenhar um papel importante na prevenção de doenças relacionadas à oxidação.

Em relação aos sucos de uva, os estudos conduzidos por Camargo et al. (2014) e Toaldo et al. (2015) corroboram com os dados obtidos no presente estudo. Estes últimos autores citados obtiveram maiores decréscimos nos níveis de hidroperóxidos lipídicos e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico do sangue dos sujeitos que ingeriram sucos de uva Bordô orgânicos, em comparação com sujeitos que ingeriram sucos de uva Bordô/Isabel convencionais. Estes sucos de uva Bordô orgânica apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante *in vitro*, seguidos dos sucos elaborados com as uvas Bordô/Isabel convencionais.

#### **4. CONCLUSÕES**

Usando diferentes técnicas estatísticas, foi possível confirmar que não foram observadas distinções entre os sucos de uva orgânicos e convencionais em relação às capacidades antioxidantes e redutoras, mas somente a partir da análise de ácidos fenólicos por HPLC. A origem geográfica e a variedade genotípica das uvas demonstraram um papel mais importante na distinção de sucos brasileiros de uva roxa de acordo com a atividade antioxidante (ABTS), capacidade redutora (FRAP) e alguns marcadores químicos. Foi possível também observar uma similaridade entre a atividade antioxidante medida por métodos químicos e o ensaio de atividade antioxidante analisado por método biológico para a matriz de suco de uva. Este estudo apresentou que as capacidades redutoras e antioxidantes medidas por sistema químico podem fornecer uma forte associação com a atividade antioxidante que ocorre em um sistema vivo.

#### **Agradecimentos**

Autores agradecem à CAPES pela bolsa de mestrado (T. Margraf) e à CAPES/PNPD por uma bolsa de pós-doutorado (D. Granato). Também agradecemos ao LABMU-UEPG e à Prof. Maria Lucia Masson (CEPPA-UFPR) por facilitarem as análises dos compostos bioativos por HPLC.



## REFERENCIAS

- Andrade, E. F. de, Souza Leone, R. de, Ellendersen, L. N., & Masson, M. L. (2014). Phenolic profile and antioxidant activity of extracts of leaves and flowers of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Industrial Crops and Products*, 62, 499-506.
- AOAC International (2005). *Official methods of analysis of AOAC International*. AOAC International.
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 85(5), 957-998.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Berker, K. I., Ozdemir Olgun, F. A., Ozyurt, D., Demirata, B., & Apak, R. (2013). Modified Folin–Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20), 4783-4791.
- Camargo, A. C., Regitano-d’Arce, M. A. B., Biasoto, A. C. T., & Shahidi, F. (2014). Low Molecular Weight Phenolics of Grape Juice and Winemaking Byproducts: Antioxidant Activities and Inhibition of Oxidation of Human Low-Density Lipoprotein Cholesterol and DNA Strand Breakage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(50), 12159-12171.
- Craft, B. D., Kerrihard, A. L., Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2012). Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 148-173.
- Crupi, P., Bergamini, C., Perniola, R., Dipalmo, T., Clodoveo, M. L., & Antonacci, D. (2015). A chemometric approach to identify the grape cultivar employed to produce nutraceutical fruit juice. *European Food Research and Technology*, 241(4), 487-496.
- Daker, M., Abdullah, N., Vikineswary, S., Goh, P. C., & Kuppusamy, U. R. (2008). Antioxidant from maize and maize fermented by *Marasmiellus* sp. as stabiliser of lipid-rich foods. *Food Chemistry*, 107(3), 1092-1098.
- Dani, C., Oliboni, L. S., Vanderlinde, R., Bonatto, D., Salvador, M., & Henriques, J. A. P. (2007). Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices

manufactured with organically or conventionally-produced grapes. *Food Chemical Toxicology*, 45, 2574-2580.

Di Lorenzo, C., de Sousa, L. P., Pastor, R. F., Colombo, F., Frigerio, G., & Restani, P. (2015). Beneficial effects of non-alcoholic grape-derived products on human health: A literature review. In *BIO Web of Conferences* (Vol. 5, p. 04002). EDP Sciences.

Durán, R. M., Borja Padilla, R., Martín, A., Fiestas Ros de Ursinos, J. A., & Alba Mendoza, J. (1991). Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechín. *Grasas y Aceites*, 42(4), 271-276.

Flores, P. Organic Agriculture in Latin America and the Caribbean (2015). In Willer, H., & Lernoud, J. *The world of organic agriculture*. Statistics and emerging trends 2015 (pp. 230-233). FiBL-IFOAM Report, Frick and Bonn.

Granato, D., Calado, V. M. de A., & Jarvis, B. (2014). Observations on the use of statistical methods in food science and technology. *Food Research International*, 55, 137-149.

Granato, D., Karnopp, A. R., & van Ruth, S. M. (2014). Characterization and comparison of phenolic composition, antioxidant capacity and instrumental taste profile of juices from different botanical origins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(10), 1997-2006.

Granato, D., Koot, A., & van Ruth, S. M. (2014). Geographical provenancing of purple grape juices from different farming systems by proton transfer reaction mass spectrometry using supervised statistical techniques. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(13), 2668-2677.

Granato, D., Koot, A., Schnitzler, E., & Ruth, S. M. (2015a). Authentication of geographical origin and crop system of grape juices by phenolic compounds and antioxidant activity using chemometrics. *Journal of Food Science*, 80(3), C584-C593.

Granato, D., Margraf, T., Brotzakis, I., Capuano, E., & Ruth, S. M. (2015b). Characterization of conventional, biodynamic, and organic purple grape juices by chemical markers, antioxidant capacity, and instrumental taste profile. *Journal of Food Science*, 80(1), C55-C65.

Hallmann, E., & Rembiałkowska, E. (2012). Characterisation of antioxidant compounds in sweet bell pepper (*Capsicum annuum* L.) under organic and

conventional growing systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(12), 2409-2415.

Horszwald, A., & Andlauer, W. (2011). Characterisation of bioactive compounds in berry juices by traditional photometric and modern microplate methods. *Journal of Berry Research*, 1(4), 189-199.

Hyson, D. A. (2015). A Review and Critical Analysis of the Scientific Literature Related to 100% Fruit Juice and Human Health. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 6(1), 37-51.

Lambri, M., Torchio, F., Colangelo, D., Segade, S.R., Giacosa, S., De Faveri, D.M., Gerbi, V. & Rolle, L. (2015). Influence of different berry treatment conditions, grape anthocyanin profile, and skin hardness on the extraction of anthocyanin compounds in the colored grape juice production, *Food Research International*, doi: 10.1016/j.foodres.2015.08.027

Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269-1278.

Lernoud, J.; Willer, H. (2015). Organic Agriculture Worldwide: Current Statistics. In Willer, H., & Lernoud, J. *The world of organic agriculture*. Statistics and emerging trends 2015 (pp. 102-103). FiBL-IFOAM Report, Frick and Bonn.

Lima, M. dos S., Dutra, M. D. C. P., Toaldo, I. M., Corrêa, L. C., Pereira, G. E., de Oliveira, D., Bordignon-Luiz, M. T., & Ninow, J. L. (2015). Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced in industrial scale by different processes of maceration. *Food Chemistry*, 188, 384-392.

Lima, M. dos S., Silani, I. D. S. V., Toaldo, I. M., Corrêa, L. C., Biasoto, A. C. T., Pereira, G. E., Bordignon-Luiz, M. T., & Ninow, J. L. (2014). Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. *Food Chemistry*, 161, 94-103.

Luthria, D., Singh, A. P., Wilson, T., Vorsa, N., Banuelos, G. S., & Vinyard, B. T. (2010). Influence of conventional and organic agricultural practices on the phenolic content in eggplant pulp: Plant-to-plant variation. *Food Chemistry*, 121, 406-411.

- Macedo, L. F. L., Rogero, M. M., Guimaraes, J. P., Granato, D., Lobato, L. P., & Castro, I. A. (2013). Effect of red wines with different in vitro antioxidant activity on oxidative stress of high-fat diet rats. *Food chemistry*, 137(1), 122-129.
- Margraf, T., Karnopp, A. R., Rosso, N. D., & Granato, D. (2015). Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates. *Journal of Food Science*. doi: 10.1111/1750-3841.13077
- Mphahlele, R. R., Stander, M. A., Fawole, O. A., & Opara, U. L. (2014). Effect of fruit maturity and growing location on the postharvest contents of flavonoids, phenolic acids, vitamin C and antioxidant activity of pomegranate juice (cv. Wonderful). *Scientia Horticulturae*, 179, 36-45.
- OIV, International Organization of Vine and Wine. (2014). *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*. Vol 2, Paris: OIV
- Price, M. L., & Butler, L. G. (1977). Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(6), 1268-1273.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Scherer, R., Rybka, A. C. P., & Godoy, H. T. (2008). Simultaneous determination of tartaric, malic, ascorbic and citric acids in acerola, açai and cashew pulps, and stability evaluation in cashew juices. *Química Nova*, 31(5), 1137-1140.
- Silva, J. K. da, Cazarin, C. B. B., Correa, L. C., Batista, Â. G., Furlan, C. P. B., Biasoto, A. C. T., Pereira, G. E., Camargo, A. C. de, & Maróstica Junior, M. R. (2015). Bioactive compounds of juices from two Brazilian grape cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, doi: 10.1002/jsfa.7309.
- Singleton, V., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Souza, J. N., Silva, E. M., Loir, A., Rees, J. F., Rogez, H., & Larondelle, Y. (2008). Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A

correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. *Food Chemistry*, 106(1), 331-339.

Stinco, C. M., Baroni, M. V., Naranjo, R. D. D. P., Wunderlin, D. A., Heredia, F. J., Meléndez-Martínez, A. J., & Vicario, I. M. (2015). Hydrophilic antioxidant compounds in orange juice from different fruit cultivars: Composition and antioxidant activity evaluated by chemical and cellular based (*Saccharomyces cerevisiae*) assays. *Journal of Food Composition and Analysis*, 37, 1-10.

Tassoni, A., Tango, N., & Ferri, M. (2013). Comparison of biogenic amine and polyphenol profiles of grape berries and wines obtained following conventional, organic and biodynamic agricultural and oenological practices. *Food Chemistry*, 139, 405-413.

Toaldo, I. M., Cruz, F. A., de Lima Alves, T., de Gois, J. S., Borges, D. L., Cunha, H. P., Silva, E. L. da, & Bordignon-Luiz, M. T. (2015). Bioactive potential of *Vitis labrusca* L. grape juices from the Southern Region of Brazil: Phenolic and elemental composition and effect on lipid peroxidation in healthy subjects. *Food Chemistry*, 173, 527-535.

Toaldo, I. M., de Gois, J. S., Fogolari, O., Hamann, D., Borges, D. L., & Bordignon-Luiz, M. T. (2014). Phytochemical polyphenol extraction and elemental composition of *Vitis labrusca* L. grape juices through optimization of pectinolytic activity. *Food and Bioprocess Technology*, 7(9), 2581-2594.

Vallverdú-Queralt, A., Medina-Remón, A., Casals-Ribes, I., & Lamuela-Raventos, R. M. (2012). Is there any difference between the phenolic content of organic and conventional tomato juices?. *Food Chemistry*, 130(1), 222-227.

Vilanova, M., Rodríguez, I., Canosa, P., Otero, I., Gamero, E., Moreno, D., Talaverano, I., & Valdés, E. (2015). Variability in chemical composition of *Vitis vinifera* cv Mencía from different geographic areas and vintages in Ribeira Sacra (NW Spain). *Food Chemistry*, 169, 187-196.

Yermakov, A. I., Arasimov, V. V., & Yarosh, N. P. (1987). *Methods of biochemical analysis of plants*. Leningrad: Agropromizdat.

Yoo, Y. J., Saliba, A. J., & Prenzler, P. D. (2010). Should red wine be considered a functional food?. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 530-551.

Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559.

Zielinski, A. A., Haminiuk, C. W., Nunes, C. A., Schnitzler, E., Ruth, S. M., & Granato, D. (2014). Chemical composition, sensory properties, provenance, and bioactivity of fruit juices as assessed by chemometrics: a critical review and guideline. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(3), 300-316.

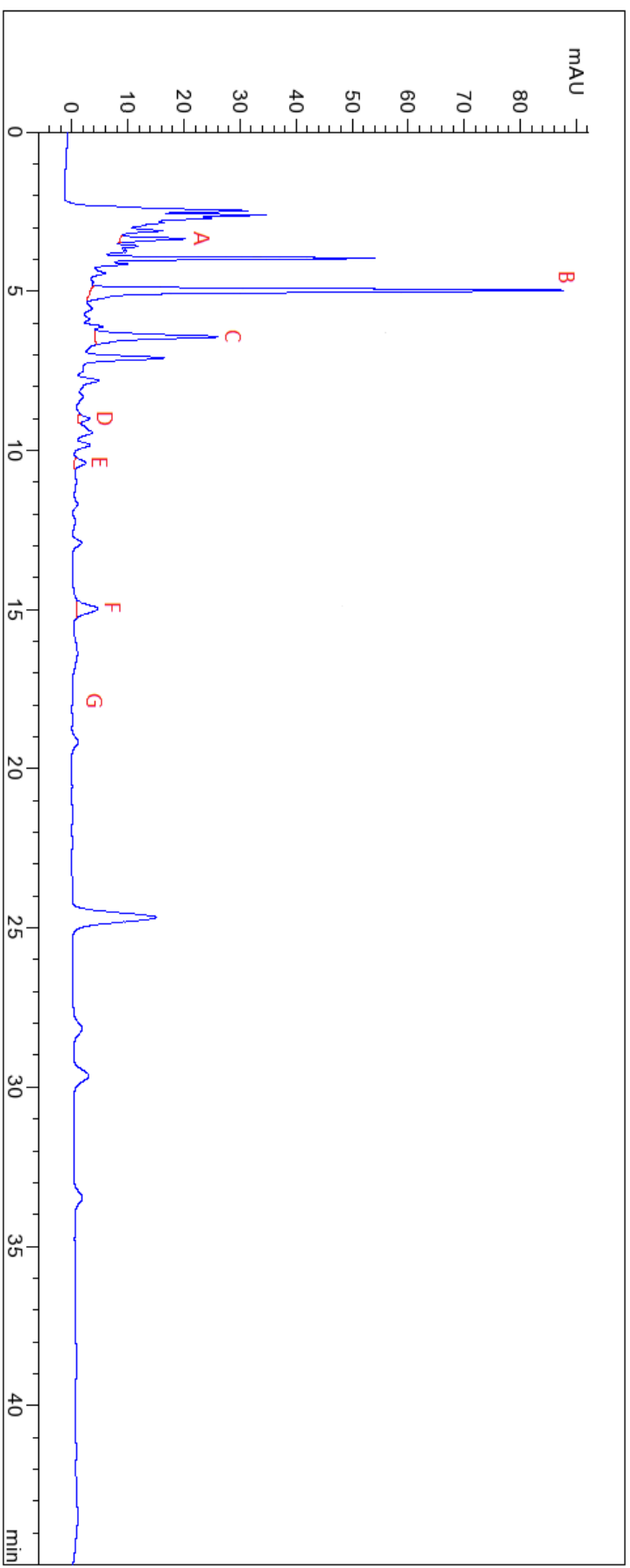
## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados experimentais obtidos no presente trabalho, conclui-se que:

- O ensaio de Azul da Prússia fornece uma estimativa mais fidedigna do conteúdo de compostos fenólicos totais em suco de uva, visto sua maior seletividade, comparado ao ensaio padrão de Folin-Ciocalteu;
- O efeito do método de cultivo (orgânico e convencional) não foi estatisticamente significativo para que fosse feita distinção entre os sucos de uva estudados em função das análises físico-químicas, marcadores químicos e atividade antioxidante realizadas;
- Os efeitos da origem geográfica e variedade de uva demonstraram forte influênciana na distinção dos sucos, onde os sucos produzidos no Paraná apresentaram maiores conteúdos de compostos bioativos e maior atividade antioxidante *in vitro*. Quanto à variedade da uva, os maiores conteúdos de compostos fenólicos e de atividade antioxidante foram obtidos para os sucos das uvas Bordô e mistura Bordô/Isabel;
- A inibição da peroxidação lipídica simulou um ensaio empregando as mesmas condições de pH e temperatura do sangue humano. Foi verificado uma correlação significativa entre este ensaio e a atividade antioxidante por ensaios químicos. Portanto, a atividade antioxidante pode fornecer uma estimativa ou ideia da atividade antioxidante demonstrada por uma matriz num sistema vivo.

**APÊNDICE A - Cromatograma típico de uma amostra de  
suco de uva**





Nota: A = ácido gálico; B = ácido protocatecuico; C = ácido clorogênico; D = ácido caféico; E = ácido sirínigico; F = ácido p-cumárico; G = ácido ferúlico

**APÊNDICE B – Dados de equação da curva e tempo de  
retenção dos ácidos fenólicos**

| ácido fenólico | equação curva                   | r       | R <sup>2</sup> | linearidade<br>(mg/L) | retenção<br>(min) |
|----------------|---------------------------------|---------|----------------|-----------------------|-------------------|
| gálico         | [mg/L] = (0,12087*área)+0,49049 | 0,99901 | 0,99802        | 2,66 - 42,50          | 3,38              |
| protocatecuico | [mg/L] = (0,11949*área)+0,28285 | 0,99902 | 0,99804        | 1,56 - 25,00          | 4,98              |
| clorogênico    | [mg/L] = (0,24772*área)+0,20126 | 0,99991 | 0,99982        | 13,28 - 212,50        | 6,52              |
| cafeico        | [mg/L] = (0,11220*área)+0,70158 | 0,99863 | 0,99726        | 3,13 - 50,00          | 9,00              |
| siringico      | [mg/L] = (0,06936*área)+0,69644 | 0,9977  | 0,99541        | 2,34 - 37,50          | 10,55             |
| p-cumárico     | [mg/L] = (0,05997*área)+2,83309 | 0,99788 | 0,99576        | 8,13 - 130,00         | 15,2              |
| ferúlico       | [mg/L] = (0,10107*área)+0,56653 | 0,99926 | 0,99852        | 2,97 - 47,50          | 17,74             |

## **ANEXO A – Artigo aceito para publicação**

# Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates

Tiago Margraf, Ariadne Roberto Karnopp, Neiva Deliberali Rosso, and Daniel Granato

**Abstract:** Folin-Ciocalteu colorimetric assay (FC) is the most widely used assay to estimate the total phenolic content in foods, beverages, herbs and other plant extracts, but many chemical compounds may act as interfering agents, producing inaccurate estimations of the real concentration of phenolic compounds in the matrix. Based on this limitation, the objective of this study was to compare, quantitatively, the Folin-Ciocalteu and Prussian Blue (PB) assays in estimating the total phenolic content in purple grape juices ( $n = 20$ ; *Vitis labrusca* L.) and teas ( $n = 25$ ) from different botanical origins using 96-well microplates. PB assay presented a low limit of detection (PB = 0.27 mg/L; FC = 0.25 mg/L) and quantification (PB = 0.92 mg/L; FC = 0.82 mg/L), showing its suitability in screening the total phenolic content in grape juices and teas. FC and PB assays presented a high association ( $P < 0.0001$ ) for teas ( $r = 0.887$ ) and grape juices ( $r = 0.923$ ). The advantages of PB over FC assay are its simplicity, low time consumption (15 min reaction as compared to 60 min reaction for the FC assay), lower usage of reagents (solutions are prepared in a mM base), and higher selectivity. Additionally, PB assay was proven to be reproducible and repeatable and, therefore, may be used as an alternative to FC assay.

**Keywords:** bioactive compounds, *Camellia sinensis*, colorimetric method, method validation, *Vitis labrusca*

**Practical application:** Prussian Blue assay (PB) has been used as an alternative to Folin-Ciocalteu assay (FC) to estimate the total content of phenolic compounds in herbs and some natural products. In our study we showed that the advantages of PB assay over FC are its simplicity, low time consumption (15 min reaction as compared to 60 min reaction for the FC assay), lower usage of reagents (solutions are prepared in a mM base) and higher selectivity as compared to FC assay. Additionally, PB assay was proven to be reproducible and repeatable and, therefore, may be used as an alternative to FC assay.

## Introduction

Scientific studies have shown that there is great interest in bioactive compounds in food products and beverages consumed worldwide due to the fact that experimental studies have indicated that there is an inverse association between the consumption and the development of non-transmissible chronic diseases, such as atherosclerosis (Milella and others 2012), some types of cancer (González-Sarrias and others 2012), diabetes (Sreerama and others 2012), hyperlipidemia, including hypercholesterolemia (Sreelatha and Inbavalli 2012), and chronic inflammation due to metabolic disorders (Li and others 2014). Among these bioactive substances, flavonoids, stilbenes, and phenolic acids are the most remarkable and some of the most bioactive classes of compounds present in foods and beverages (Brewer 2011; Liu 2013).

Research has focused on not only testing the beneficial health effects of phenolic compounds *in vitro* and *in vivo* protocols,

but also on the assessment of analytical methods to estimate the total phenolic content in beverages and foods, such as teas, fruits and fruit-based products, herbs, and medicinal plants. For this purpose, some methods have been developed, tested and validated: individual determination of phenolic compounds using high-performance liquid chromatography (HPLC) (Granato and others 2011b); HPLC coupled with mass spectrometry (Slatnar and others 2014); gas chromatography (Wang and Zuo 2011); HPLC tandem mass spectrometry and high resolution mass spectrometry (Alakolanga and others 2014); biosensors (Portaccio and others 2006); spectrophotometric assays that employ specific chromophores, such as the Folin-Ciocalteu reagent and specific inorganic salts that react with phenolic compounds in aqueous solutions, such as potassium hexacyanoferrate (III) and Fast Blue BB diazonium salt (González and others 2003; Lester and others 2012; Zielinski and others 2014). Chromatographic and biosensor analyses are somewhat expensive, time-consuming, require sample preparation, and use of solvents in the mobile phase of HPLC may represent a limitation to some laboratories. Thus, the use of spectrophotometric assays to estimate the total phenolic content of plant materials and food extracts is advantageous and takes less time to be performed in the laboratory routine. One important observation should be made here: Chromatographic techniques (coupled to different detectors) are able to carry out the individual

MS 20151026 Submitted 6/17/2015, Accepted 8/16/2015. Author are with Graduate Program in Food Science and Technology, State Univ. of Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, CEP 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brazil. Direct inquiries to author Granato (E-mail: dgranato@uepg.br or granatod@gmail.com).

This article was originally published on 8 October 2015. Subsequently typesetting errors in Equation 6 and Table 4 were corrected and the article was published on 15 October 2015.

separation and identification of each phenolic compound in a sample. In the same sense, colorimetric assays are a very useful approach for screening purposes and the quantification is generally given as “total phenolic content”. Thus the results obtained by colorimetric and chromatographic methods are different (sometimes complementary) and pros and cons should be considered when the phenolic compounds need to be studied in details.

Among those above-mentioned methods, the most traditional and used assay that has been applied for a great variety of matrices is the one that employs the Folin–Ciocalteu phenol reagent (Singleton and Rossi 1965). In this method, molybdenum and tungsten are in the oxidation state 6+, but in the presence of certain reducing agents, such as phenolic compounds, in an alkaline medium, form a blue complex  $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}]$ . The color intensity in the reaction medium is linearly correlated to the level of reducing substances, such as polyphenols, sulfur dioxide, organic acids including ascorbic acid, sugars (fructose and sucrose), and some amino acids present in the test sample. The absorption of this metallic complex lies between 620 and 760 nm, with a maximum at  $\lambda = 725$  nm (Sousa and others 2007). In fact, the spectrophotometric method using the Folin–Ciocalteu phenol reagent is an estimate of the amount of phenolic compounds present in the matrix. However, as Folin–Ciocalteu is an electron transfer based assay and measures the reducing capacity of the extract, which has normally been expressed as “phenolic content,” it would be more suitable to be called *hydrophilic reducing capacity assay* taking into consideration the chemical interferences that act as reducers present in almost all foods, beverages and herbal preparations, such as thiols, amino acids, proteins, some vitamins, and inorganic ions (Prior and others 2005; Everette and others 2010; Chen and others 2015). Besides the obvious drawbacks of this method in assessing the real (accurate) total phenolic content of extracts, many researchers have used it not only in many food matrices, such as herbs, fruits, beers, but also in biological fluids, such as urine (Medina-Remón and others 2009; Granato and others 2011a; Mraihi and others 2013; Campos and others 2015). Regardless of this, studies have shown that Folin–Ciocalteu method is not the best analytical approach (low specificity) to screen the total phenolic content (Everette and others 2010). Therefore, alternative spectrophotometric methods should be tested and validated or modification of the Folin–Ciocalteu method should be performed (Cicco and others 2009; Medina 2011; Bueno and others 2012; Blainski and others 2013; Bridi and others 2014).

One of these spectrophotometric alternatives that can replace Folin–Ciocalteu is a method that involves a metallic complexation reaction in an acidic medium, the Prussian Blue assay. It relies on the reduction of  $\text{Fe}^{3+}$  to  $\text{Fe}^{2+}$  by the development of the iron (III) hexacyanoferrate (II) chelate, also known as Prussian Blue,  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ . The Prussian Blue metallic complex is not so soluble in aqueous medium, so the readings of absorbance at  $\lambda = 725$  nm should be performed within 20 min after all reagents and sample are mixed to ensure color stability (Price and Butler 1977). This method has been used to assess the total phenolic content in some foods, such as plums (Slimestad and others 2009), herbs (Pueyo and Calvo 2009), mushrooms (Reis and others 2012), and rice (Finocchiaro and others 2010). An improvement of the initial methodology (that is, concentration of reagents) was performed by Pueyo and Calvo (2009), in which a lesser quantity of solvents is used (up to 300  $\mu\text{L}$  as compared to 3–4 mL) and readings of absorbance from a large number of samples are made simultaneously using 96-well microplates. This optimized and improved method has shown to present low limits of detection and quantification ( $<1$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

and an intra-day coefficient of variation below 5%, indicating its suitability, repeatability and reproducibility to analyze the total phenolic content in herbs. In addition, the reduction of solvent usage, simplicity and accuracy are some of the most important positive characteristics of the method.

Based on the fact that most researchers apply colorimetric methods to screen the total phenolic content in food extracts, herbs, nutritional supplements, and beverages and taking into consideration that accurate, simple, low-cost, rapid, and reproducible analytical methods are highly necessary and desired in routine analysis, the objective of this study was to compare, quantitatively, the Folin–Ciocalteu and Prussian Blue assays in estimating the total phenolic content in grape juices and teas from different botanical origins using microtiter 96-well plates.

## Material and Methods

### Chemicals

Monohydrate 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (gallic acid, HPLC grade, 99% purity, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) was used as the positive control of the experiments (analytical curves). Ferric chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; Merck, Germany), hydrochloric acid, Folin–Ciocalteu 2N (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.), sodium metabisulphite, glucose and ascorbic acid (Vetec, Brazil), and potassium hexacyanoferrate (III) –  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (Merck, Germany) were of analytical grade. Ultrapure water was used in the experiments.

### Sampling and preparation of extracts

A total of 10 conventional and 10 organic purple grape juices (Bordo and Isabel varieties, *Vitis labrusca* L.) produced in Rio Grande do Sul, Brazil, 21 *Camellia sinensis* var. *sinensis* teas (6 green, 5 white, 4 red, 4 black, and 2 yellow), and 4 roasted *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (yerba mate) were used to compare the Folin–Ciocalteu method with the Prussian Blue assay. Teas ( $v = 100$  mL) were prepared using the same experimental procedures ( $m = 2.0$  g,  $T = 80$  °C extraction time of 8.5 min under magnetic stirring) described by Granato and others (2014b).

### Estimation of total phenolic content

**Folin–Ciocalteu assay.** The total phenolic content in grape juices and teas was assessed using the Folin–Ciocalteu assay (Singleton and Rossi 1965) adapted to 96-well microplates (Granato and others 2015b). Firstly, samples were diluted appropriately (1:25 for juices and 1:10 for teas) with ultrapure water, and 25  $\mu\text{L}$  of this solution were mixed with 25  $\mu\text{L}$  of 3-fold-diluted Folin–Ciocalteu reagent and 200  $\mu\text{L}$  of ultrapure water. After 5 min, an aliquot of 25  $\mu\text{L}$  of a saturated sodium carbonate solution (10.6 g/100 mL) was added to the mixture and the plate was shaken for 20 s. The mixture was allowed to stand for 60 min in the dark at room temperature (25 °C) and the absorbance was measured at  $\lambda = 725$  nm using a microplate reader (Epoch, BioteK, Winooski, VT, U.S.A.). The total phenolic content was expressed as mg of gallic acid equivalents per liter of beverage.

**Prussian blue method.** To estimate the concentration of total phenolic compounds in juices and teas, the Prussian blue method firstly suggested by Price and Butler (1977) and modified by Graham (1992) with adaptation to microplates was used (Pueyo and Calvo 2009), with minor modifications. Briefly, an aliquot of 100  $\mu\text{L}$  of a 0.50 mmol/L ferric chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) diluted in HCl 0.01 mol/L was added to 100  $\mu\text{L}$  of properly diluted sample ( $\sim 1:50$  v/v in ultrapure water) and left to react for 2 min. Then, 100  $\mu\text{L}$  of a 0.50 mmol/L  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$



**Table 1**–Parameters from the calibration curve, limit of detection (LOD), and quantification (LOQ) for Folin-Ciocalteu and Prussian Blue assays.

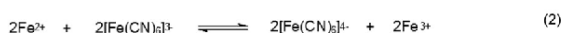
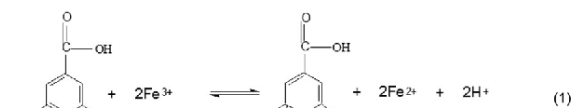
| Assay           | Analytical curve <sup>a</sup> | Linearity range (mg GA/L) | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> <sub>adjusted</sub> | F-value | P value <sup>b</sup> | LOD (mg/L)  | LOQ (mg/L)  |
|-----------------|-------------------------------|---------------------------|----------------|------------------------------------|---------|----------------------|-------------|-------------|
| Folin-Ciocalteu | $y = 244.42x - 21.15$         | 0–180                     | 0.977          | 0.974                              | 296.88  | <0.0001              | 0.25 ± 0.08 | 0.82 ± 0.25 |
| Prussian Blue   | $y = 44.21x - 2.45$           | 2.5–40                    | 0.978          | 0.973                              | 218.10  | <0.0001              | 0.27 ± 0.06 | 0.92 ± 0.19 |

<sup>a</sup>Regression analysis was conducted using the absorbance in the  $x$ -axis and the gallic acid standard concentrations in the  $y$ -axis.

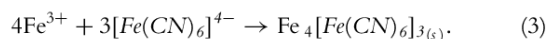
<sup>b</sup>Probability value obtained by ANOVA.

solution were added and microplates were shaken for 20 s. The absorbance was recorded at  $\lambda = 725$  nm after 15 min reaction in the dark at 25 °C using a microplate reader (Epoch, Biotek, U.S.A.). The total phenolic content was expressed as mg of gallic acid equivalents per liter of beverage.

Using the Prussian Blue method, the phenolic compounds (PC) present in the extract test reacts with the hexacyanoferrate (III) ion,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ , which is reduced to hexacyanoferrate (II) ion,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ . This ion reacts with ferric ion,  $\text{Fe}^{3+}$ , to form a blue metallic complex,  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$  (Graham 1992). In summary, both reactions may be described by Equations 1 and 2:



The Prussian Blue metallic complex may precipitate in aqueous medium depending on the concentration of phenolic compounds in the extract, as shown by Equation (3). Therefore, the dilution of samples is highly required if the Prussian Blue method is used as screening method.



**Analytical curves, repeatability, reproducibility, selectivity, and limits of detection and quantification.** Standard solutions with different concentrations of gallic acid ( $n = 8$  for the Prussian Blue assay and  $n = 9$  for the Folin-Ciocalteu assay) were prepared to construct the analytical curves. The solutions with different concentration of gallic acid were prepared for each replicate (using the concept of “true replicates”) prior to the measurements and 3 readings were computed to each concentration (Nunes and others, 2015). Gallic acid was used as standard because of its availability, purity, and chemical stability. The limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated using the slope of the analytical curves, which were obtained by the ordinary least square method. For this purpose, the absorbance at  $\lambda = 725$  nm ( $x$ ) was plotted against the standard concentrations of gallic acid standard solutions ( $y$ ). Using the analytical curve, LOD and LOQ were determined by Equation (4) and (5):

$$\text{LOD} = \frac{3s}{b} \quad (4)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10s}{b}, \quad (5)$$

where  $s$  is the standard deviation of the ordinate intercept and  $b$  is the slope of the analytical curve (Shrivastava and Gupta 2011).

The repeatability, which is the precision of the method, was assessed using the same experimental conditions (sample, chemicals, analyst, and equipment) and the same series of analysis in a short interval of time. For this purpose, not only the repeatability for each sample but also a series of 10 measurements was made using a gallic acid solution at 30 mg/L for the Prussian Blue assay and 100 mg/L for the Folin-Ciocalteu method. The recovery was calculated using 6 independent replicates and the 95% ( $\alpha = 0.05$  ∴  $t_{0.025}$ ) confidence interval (CI) was calculated taking into consideration the population of  $n = 10$  replicates and the respective standard deviation,  $\sigma$  (Equation (6)):

$$\text{CI (95\% confidence)} = \bar{x} \pm t_{\alpha/2} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (6)$$

Reproducibility, which refers to the precision of the results obtained for the same sample but using different conditions (that is, analysis in different days and analysts) was analyzed 3 times for a period of 3 different days, using the same equipment, with a gallic acid solution at 30 mg/L for the Prussian Blue assay and 100 mg/L for the Folin-Ciocalteu method.

The selectivity of Folin-Ciocalteu and Prussian Blue methods was assessed by using ascorbic acid, sodium metabisulphite, and a reducing sugar, namely glucose. For that purpose, a pure purple grape juice was spiked at concentration of 212 mg/L, 68 mg/L, and 10 g/L, respectively, and immediately analyzed for total phenolic content in 2 independent experiments and a total of  $n = 6$  readings were recorded for each experiment. Data were compared using one-way analysis of variances followed by the Duncan's multiple comparison test after the premise of homoscedasticity was applied (Levene's test). A  $P$ -value below 5% was used to highlight differences.

### Data analysis

Results are presented as means ( $\mu$ ) ± standard deviation ( $s$ ) of 3 replicates. The relative standard deviation, %RSD, was calculated using the Equation (7):

$$\%RSD = (s/\mu) \times 100. \quad (7)$$

Linear correlation analysis between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue method for each type of beverage (either for tea or grape juice) was based on the Pearson's correlation coefficient (Granato and others 2014a) and the ordinary least-squares method was used to plot the results graphically. The statistical significance of the models ( $P$  value) was computed using one-way-ANOVA and the coefficient of determination ( $R^2$ ), adjusted  $R^2$ , and the standard error of estimate were also calculated. The normality of the data sets and residuals from the regression analysis was formally checked using the Shapiro–Wilks test. For the descriptive and inferential analysis, Action v. 2.9 (Statcamp, Brazil) and Statistica v. 7.0 (Statsoft, U.S.A.) statistical packages were used.  $P$  values below 5% were used to reject the null hypothesis.

**Table 2—Recovery, repeatability and reproducibility of Prussian Blue and Folin-Ciocalteu assays performed in 96-well microplates, including the confidence interval (CI) at 95%.**

| Validation parameter                      | Prussian Blue assay                                    | Folin-Ciocalteu assay                                  |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Recovery/accuracy (%)                     | 109.70 ± 1.69 (CI <sub>95%</sub> = 32.44 – 33.38 mg/L) | 98.20 ± 1.14 (CI <sub>95%</sub> = 93.53 – 102.88 mg/L) |
| Repeatability/intraday precision (%RSD)   | 2.00                                                   | 6.65                                                   |
| Reproducibility/interday precision (%RSD) | 1.46                                                   | 1.13                                                   |

## Results and Discussion

In order to compare quantitatively the contents of total phenolic compounds measured by the Prussian Blue and Folin-Ciocalteu methods, a study was conducted to assess the linearity and limits of detection and quantification for both assays (Table 1). For this purpose, an analytical curve using gallic acid as standard was

**Table 3—Total phenolic content of commercial teas and purple grape juices assessed by Folin-Ciocalteu and Prussian Blue assays.**

| Sample codes | Prussian-Blue assay (mg/L) | Folin-Ciocalteu assay (mg/L) |
|--------------|----------------------------|------------------------------|
| Teas         |                            |                              |
| 1            | 1654 ± 84.71               | 1449 ± 85.65                 |
| 2            | 1679 ± 28.99               | 1663 ± 94.57                 |
| 3            | 1650 ± 91.84               | 1610 ± 99.72                 |
| 4            | 1775 ± 9.40                | 1711 ± 12.76                 |
| 5            | 1731 ± 32.87               | 1819 ± 39.45                 |
| 6            | 1113 ± 27.64               | 1431 ± 45.40                 |
| 7            | 1824 ± 53.84               | 1404 ± 170.69                |
| 8            | 1673 ± 31.10               | 1251 ± 52.14                 |
| 9            | 1865 ± 30.39               | 1717 ± 212.38                |
| 10           | 1315 ± 52.84               | 1213 ± 22.91                 |
| 11           | 1753 ± 30.39               | 1517 ± 140.62                |
| 12           | 466 ± 11.31                | 544 ± 43.84                  |
| 13           | 1185 ± 27.35               | 1387 ± 116.90                |
| 14           | 544 ± 27.59                | 882 ± 97.47                  |
| 15           | 624 ± 5.26                 | 859 ± 89.07                  |
| 16           | 1008 ± 29.31               | 1037 ± 97.54                 |
| 17           | 817 ± 30.19                | 1208 ± 75.42                 |
| 18           | 880 ± 34.93                | 1229 ± 29.87                 |
| 19           | 656 ± 11.49                | 1091 ± 73.09                 |
| 20           | 1409 ± 14.11               | 1587 ± 180.82                |
| 21           | 1280 ± 24.31               | 1120 ± 20.46                 |
| 22           | 380 ± 27.16                | 598 ± 9.76                   |
| 23           | 527 ± 21.91                | 525 ± 35.43                  |
| 24           | 901 ± 30.84                | 901 ± 122.60                 |
| 25           | 977 ± 13.54                | 1109 ± 61.12                 |
| Grape juices |                            |                              |
| 1            | 645 ± 24.35                | 709 ± 35.56                  |
| 2            | 1347 ± 138.30              | 2166 ± 100.29                |
| 3            | 1626 ± 62.54               | 3394 ± 212.65                |
| 4            | 983 ± 42.31                | 1410 ± 151.00                |
| 5            | 1782 ± 65.13               | 3377 ± 266.26                |
| 6            | 1623 ± 44.15               | 3385 ± 141.93                |
| 7            | 1133 ± 51.70               | 1727 ± 71.74                 |
| 8            | 1765 ± 70.22               | 3579 ± 19.68                 |
| 9            | 1509 ± 19.31               | 2952 ± 240.71                |
| 10           | 1422 ± 31.34               | 1856 ± 71.74                 |
| 11           | 1228 ± 29.35               | 1977 ± 193.85                |
| 12           | 1091 ± 33.56               | 1092 ± 164.17                |
| 13           | 1184 ± 14.72               | 1951 ± 226.25                |
| 14           | 449 ± 7.76                 | 890 ± 58.15                  |
| 15           | 1197 ± 14.72               | 1736 ± 82.84                 |
| 16           | 858 ± 28.85                | 1264 ± 158.33                |
| 17           | 1089 ± 24.35               | 1564 ± 182.83                |
| 18           | 789 ± 36.48                | 1495 ± 180.39                |
| 19           | 1136 ± 41.08               | 1981 ± 226.99                |
| 20           | 1314 ± 50.21               | 2617 ± 253.80                |

constructed using evenly spaced concentrations in a defined range. It is possible to observe that both analytical methods presented LOD below 0.5 mg/L and LOQ below 1 mg/L. The analytical curves presented high  $R^2$  and  $R^2_{adj}$  and  $F$ -values, indicating that most experimental variability was explained by the linear model and the analytical curves were highly significant ( $P < 0.0001$ ) when analysis of variances was applied. Additionally, residual analysis was carried out graphically to check for trends and obvious patterns (normality plot) and Shapiro–Wilks test showed that the analytical curves (linear regression models) were suitable to describe the quantification of gallic acid as the residuals conformed to the normal distribution (Prussian Blue:  $W = 0.95$ ,  $P = 0.75$ ; Folin-Ciocalteu:  $W = 0.92$ ,  $P = 0.36$ ).

The validation parameters for Folin-Ciocalteu and Prussian Blue methods are shown in Table 2. The intra-day precision of Prussian Blue and Folin-Ciocalteu methods, also known as repeatability, were 2.00 and 6.65% RSD, respectively, which means both methods presented a suitable precision under the same operating conditions over a short interval of time. Likewise, the interday precision, here named reproducibility, was way below the maximum acceptable limit of 10% (Magnusson and Örnemark 2014). The recovery of analytical procedures, also known as accuracy, is related to the closeness of agreement between the theoretical (a known concentration) and the experimental value, and the methods evaluated in the current work were shown to present a high recovery. For the Prussian Blue assay a recovery value of  $109.70 \pm 1.69\%$  ( $n = 10$ ;  $CI_{95\%confidence} = 32.44 - 33.38$  mg/L) was obtained, while for the Folin-Ciocalteu method the recovery was  $98.20 \pm 1.14\%$  ( $n = 10$ ;  $CI_{95\%confidence} = 93.53 - 102.88$  mg/L). The smaller the recovery, the larger is the bias that affects the method and thus the lower the trueness (U.S. FDA 2000). One important aspect of recoveries near 100% is that it is an indication of an almost complete mass balance of the recovery standard. Additionally, for experimental purposes, the method can be considered accurate if the recovery percentages are between 85% and 115% (U.S. FDA 2000). Herein, our experimental data clearly show the appropriateness of both Folin-Ciocalteu and Prussian Blue assays in estimating the total phenolic content using 96-well microplates. The results are in-line with those reported by Blainski and others (2013), who evaluated some modifications on the original Folin-Ciocalteu method to measure the total phenolic content of *Limonium brasiliense*, a typical Brazilian herb used for tea preparation, and obtained a  $LOD = 1.84$  µg/mL,  $LOQ = 3.34$  µg/mL, repeatability of 4.98%, and recovery of about 90%.

The total phenolic content of purple grape juices is in accordance with those reported for juices produced either in Brazil ( $n = 65$ ; 368–2307 mg GAE/L) or European countries ( $n = 31$ ; 343–2248 mg GAE/L) (Granato and others 2015a; Granato and others 2015c). Likewise, the total phenolic contents of *C. sinensis* and *I. paraguariensis* teas are in-line, but slightly lower as compared to levels reported in commercial tea samples (140–967 mg GAE/L) (Reta and others 2012; Bassani and others 2014a; Bassani and others 2014b; Granato and others 2015a; Zielinski and others, in press).

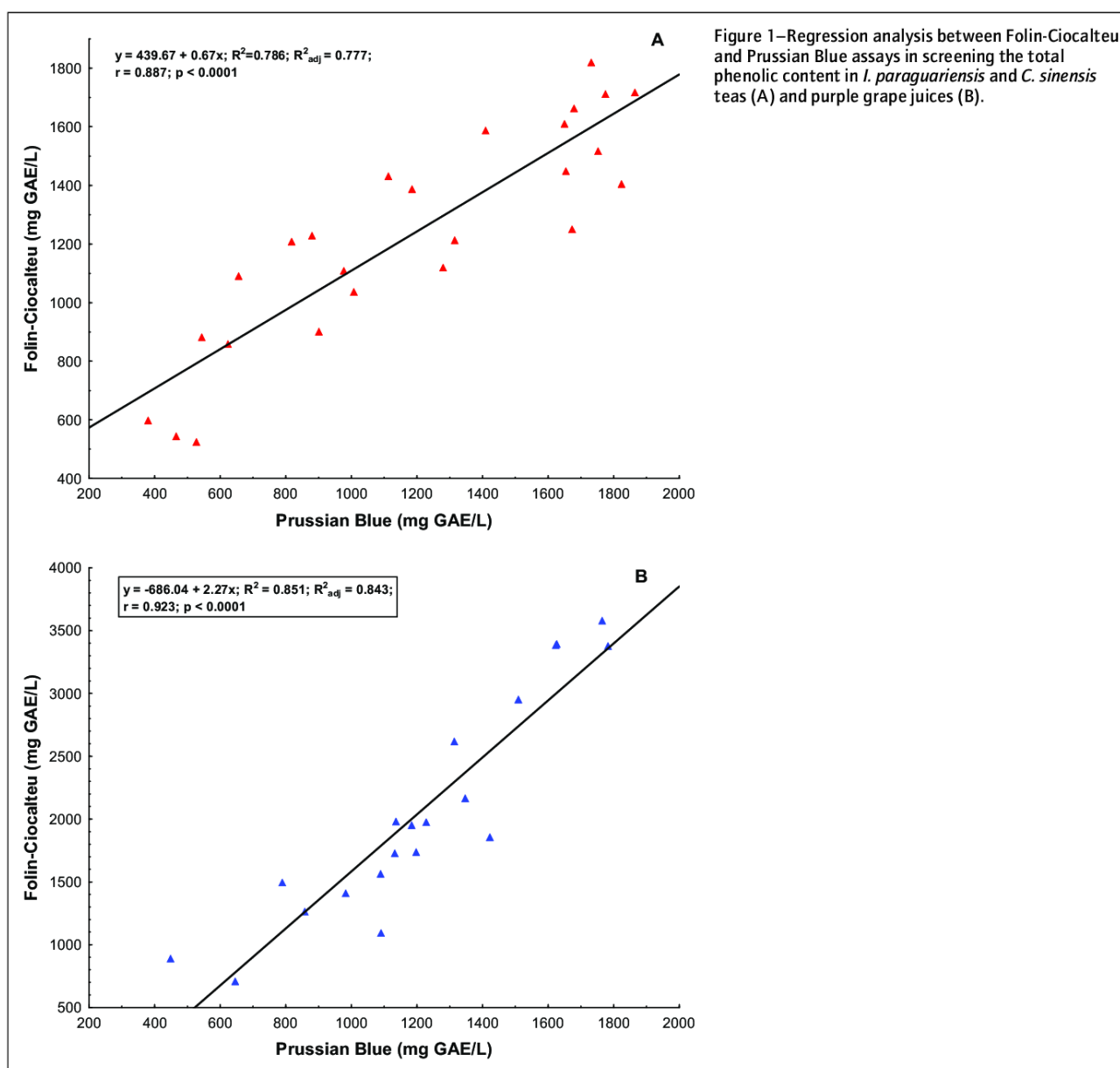


In general, Folin–Ciocalteu data showed the total phenolic content of grape juices varied between 709 and 3580 mg GAE/L and for teas this number was in the range 524 to 1820 mg GAE/L (Table 3). The Prussian Blue data, overall, showed lower levels of phenolic content: 380 to 1865 mg GAE/L for teas (13 out of 25 mean values with lower levels) and 449 to 1783 mg GAE/L for grape juices. It is noteworthy that all mean values of total phenolic content in grape juices determined using the Prussian Blue method were lower than those determined by the Folin–Ciocalteu assay, corroborating the results obtained by Padda and Picha (2007) for sweet potato roots (*Ipomoea batatas* L.) and for raw and cooked baby artichokes (*Cynara scolymus* L.) (Lutz and others 2011).

González and others (2003) assessed the total phenolic content of 14 propolis samples from Argentina by means of the Folin–Ciocalteu, Prussian Blue, and *o*-phenanthroline methods using gallic acid, vanillin, caffeic acid, quercetin, and 3,4-dihydroxy benzoic acid as the chemical standards for the analytical curve. Authors concluded that Folin–Ciocalteu yielded the highest values between

methods while Prussian–Blue assay presented intermediate results and the highest sensitivity, corroborating earlier observations (Budin and others 1980). Unlike of what was observed in this study, Deshpande and Cheryan (1987) quantified the total content of phenolic compounds in 10 genotypes of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) using 4 different methodologies, including the HCl–vanillin assay, Prussian Blue, Folin–Ciocalteu, and protein precipitate phenol test. Authors verified that PB method yielded higher total phenolic content ( $P < 0.05$ ) than the Folin–Ciocalteu assay but these methods presented a strong correlation. These results altogether suggest that there is a strong matrix effect on the quantitative value of Folin–Ciocalteu and Prussian Blue assays.

Although PB and FC entail redox reactions to produce complexes with the increase of absorbance at a specified wavelength ( $\lambda = 620$  to  $760$  nm), differences in values between FC and PB assays are related to the reagent sensitivity, redox potential of the medium and, most importantly, by the reducing capacity of the compounds in the reaction medium. One should bear in mind that



the FC assay employs a basic environment (pH ~ 10) enhancing the proton dissociation of phenolic compounds into phenolates (higher sample's reducing capacity) while the chemical reaction in the PB assays occurs in acidic medium, which in turn may suppress the sample's reducing capacity because of low protonation rate (Apak and others 2013). This may explain lower results obtained here and in other studies.

Although the mean values between methods were different, correlation analysis was applied to check for association between assays. The correlation between both analytical methods using either *C. sinensis* and *I. paraguariensis* teas or purple grape juices is shown in Figure 1. For the tea samples ( $n = 25$ ), a correlation coefficient  $r = 0.887$  ( $P < 0.0001$ ) together with a high adjusted  $R^2$  (0.777) were obtained (Figure 1A), while for purple grape juices ( $n = 20$ ), a correlation coefficient  $r = 0.923$  ( $P < 0.0001$ ) and a close agreement between  $R^2$  and  $R^2_{adj}$  were also obtained (Figure 1B). The residual analysis showed no obvious trends (data not shown) and the Shapiro-Wilk test revealed that for both regression analysis, the residuals were normally distributed ( $W = 0.94$ ,  $P = 0.15$  for teas;  $W = 0.95$ ,  $P = 0.35$  for grape juices). These results show that although Folin-Ciocalteu and Prussian Blue assays give different quantitative values in terms of gallic acid equivalents, there is a high correlation between values of the 2 assays.

Similarly to other analytical methods, Prussian Blue assay also presents some limitations. For example, Budini and others (1980) assessed the total phenolic content of strawberries and verified that ascorbic acid seems to be an interfering agent in those samples, indicating that sugars and some nitrogen-based compounds did not affect the redox reaction. So, the Prussian Blue method has been proven to be an effective and rapid analytical strategy to determine vegetable total phenolic content (and their degree of ripeness). However, some observations should be made about the Prussian Blue assay: temperature, pH, and order in which reagents are added in tubes/microplate wells should be monitored as they may affect the formation of  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$  (Prussian Blue metallic complex). Additionally, as the formation of the PB complex is time-dependent, a short (<20 min) incubation period is recommended to avoid the increase of color density outside the linearity range (following the Lambert-Beer's law) (Bravo & Mateos 2008).

Using the Levene's test ( $F$ -value = 2.071,  $P = 0.136$  for Prussian Blue and  $F$ -value = 2.141,  $P = 0.129$  for Folin-Ciocalteu) experimental data were regarded as homoscedastic, and a  $P < 0.001$  was obtained for both methods when comparing the treatments (reducing agents: glucose, ascorbic acid, and sodium metabisulphite) by one-way ANOVA. When the Duncan's multiple test was used to compare the means, it was possible to observe that Prussian Blue results were only increased by the ascorbic acid addition but the mean values for juices spiked with sodium metabisulphite and glucose are statistically similar with the pure juice—control (Table 4). On the other hand, the Folin-Ciocalteu assay seemed to suffer interferences from ascorbic acid, glucose, and sodium metabisulphite when the Duncan's test was used, corroborating earlier observations that FC assay presents low selectivity (Sánchez-Rangel and others 2013; Olgun and others 2014). Additionally, using the whole data set ( $n = 24$  observations), correlation analysis showed that PB and FC data were convergent ( $r = 0.732$ ,  $P < 0.001$ ), although higher values were observed for FC assay.

From a practical standpoint, the use of Prussian Blue method in assessing the total phenolic content of fruit juices and teas is advantageous as low quantities of reagents is necessary (up to 300

**Table 4—Selectivity of Prussian Blue and Folin-Ciocalteu methods toward some interfering compounds in pure purple grape juice.**

| Experiment                                     | Prussian Blue                | Folin-Ciocalteu              |
|------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Pure juice - control ( $n = 6$ )               | 1275.82 <sup>b</sup> ± 25.99 | 1638.62 <sup>b</sup> ± 46.17 |
| Ascorbic acid <sup>a</sup> ( $n = 6$ )         | 1486.56 <sup>a</sup> ± 57.15 | 1748.22 <sup>a</sup> ± 58.08 |
| Sodium metabisulphite <sup>b</sup> ( $n = 6$ ) | 1275.09 <sup>b</sup> ± 25.58 | 1551.01 <sup>c</sup> ± 62.65 |
| Glucose <sup>c</sup> ( $n = 6$ )               | 1272.14 <sup>b</sup> ± 31.63 | 1532.68 <sup>c</sup> ± 93.86 |

<sup>a</sup>Concentration of 212 mg/L.

<sup>b</sup>Concentration of 68 mg/L.

<sup>c</sup>Concentration of 10 g/L. Different letters in the same row represent statistically significant results ( $P < 0.05$ ) according to the Duncan's multiple comparison test.

μL compared with ~3 mL used in the FC assay), only 15 min reaction time is required (compared with 60 min used in the Folin-Ciocalteu assay) and this method was proved to be more selective as compared to Folin-Ciocalteu.

## Conclusions

As a conclusion, these results all together analyzed showed that Prussian Blue method has shown to be reproducible and repeatable, showing it is possible to use it as a screening method to estimate the total phenolic content of grape juices and teas. Correlation analysis between the most used method (Folin-Ciocalteu) and the Prussian Blue assay evidenced a high and statistically significant association between methods. The advantage of Prussian Blue assay over Folin-Ciocalteu is its simplicity, low time consumption (15 min reaction as compared to 60 min reaction for the Folin-Ciocalteu assay), lower usage of reagents (solutions are prepared in a mM base) and higher selectivity. In this sense, the use of Prussian Blue assay to estimate the total phenolic content of food extracts, herbs and other food matrices is stimulated.

## Acknowledgments

The authors thank CAPES for financial support to conduct this research (Master scholarship – T. Margraf and A. R. Karnopp; Post-Doctoral fellowship – D. Granato). We also thank Prof. Dr. Alessandro Nogueira for facilitating the use of the microplate reader.

## References

- Alakolanga AGAW, Siriwardane AMDA, Kumar NS, Jayasinghe L, Jaiswal R, Kuhnert N. 2014. LC-MS<sup>2</sup> identification and characterization of the phenolic compounds from the fruits of *Flacourtia indica* (Burm. F) Merr. and *Flacourt tinniermis* Roxb. Food Res Int 62:388–96.
- Apak R, Gorinstein S, Böhm V, Schaich KM, Özyürek M, Güçlü K. 2013. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). Pure Appl Chem 85(5):957–98.
- Bassani DC, Nunes DS, Granato D. 2014a. Quality control of *Camellia sinensis* and *Ilex paraguariensis* teas marketed in Brazil based on total phenolics, flavonoids and free-radical scavenging activity using chemometrics. In: Granato D, Ares G, Org., Mathematical and statistical approaches in food science and technology. 1st ed, Oxford, UK: Wiley Blackwell. p 219–30.
- Bassani DC, Nunes DS, Granato D. 2014b. Optimization of phenolics and flavonoids extraction conditions and antioxidant activity of roasted yerba-mate leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using response surface methodology. An Acad Bras Cienc 86:923–34.
- Blainski A, Lopes GC, Mello JCP. 2013. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense*. L.Molecules 18:6852–65.
- Bravo L, Mateos R. Analysis of flavonoids in functional foods and nutraceuticals. In: Hurst WJ, editor. Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals. 2nd ed. CRC Press, 2008, p 147–206.
- Brewer MS. 2011. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. Compr Rev Food Sci F 10:221–47.
- Bridi R, Troncoso MJ, Folch-Cano C, Fuentes J, Speisky H, López-Alarcón. 2014. A Polyvinylpyrrolidone (PVPP)-assisted Folin-Ciocalteu assay to assess total phenol content of commercial beverages. Food Anal Method 7(10):2075–83.
- Budini R, Tonelli D, Girotti S. 1980. Analysis of total phenols using the Prussian Blue method. J Agric Food Chem 28(6):1236–8.
- Bueno FG, Machareth MAD, Panizzon GP, Lopes GC, Leite-Mello EVS, Mello, JCP. 2012. Development of a UV/VIS spectrophotometric method for analysis of total polyphenols from *Caesalpinia peltophoroides* Benth. Quim Nova 35:822–6.

- Campos MRS, Ruiz JR, Chel-Guerrero L and Ancona DB. 2015. *Coccoloba wifera* (L.) (Polygonaceae) fruit: phytochemical screening and potential antioxidant activity. *J Chem*, Article ID 534954, 2015:1–9.
- Chen LY, Cheng CW, Liang JY. 2015. Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chem* 170:10–5.
- Cicco N, Lanorte MT, Paraggio M, Viggiano M, Lattanzio V. 2009. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem J* 91:107–10.
- Deshpande SS, Cheryan M. 1987. Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays. *J Food Sci* 52(2):332–4.
- Everette JD, Bryant QM, Green AM, Abbey YA, Wangila GW, Walker RB. 2010. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin–Ciocalteu reagent. *J Agric Food Chem* 58(14):8139–44.
- Finocchiaro F, Ferrari B and Gianinetti A. 2010. A study of biodiversity of flavonoid content in the rice caryopsis evidencing simultaneous accumulation of anthocyanins and proanthocyanidins in a black-grained genotype. *J Cereal Sci* 51:28–34.
- González-Sarriás A, Li L, Seeram NP. 2012. Anticancer effects of maple syrup phenolics and extracts on proliferation, apoptosis, and cell cycle arrest of human colon cells. *J Funct Foods* 4(1):185–96.
- González M, Guzmán B, Rudyk R, Romano E, Molina MAA. 2003. Spectrophotometric determination of phenolic compounds in propolis. *Lat Am J Pharm* 22(3):243–8.
- Graham HD. 1992. Stabilization of the Prussian Blue color in the determination of polyphenols. *J Agric Food Chem* 40:801–5.
- Granato D, Branco GF, Cruz AG, Faria JAF. 2011a. Characterization of Brazilian lager and brown ale beers based on color, phenolic compounds, and antioxidant activity using chemometrics. *J Sci Food Agric* 91:563–71.
- Granato D, Katayama FCU, Castro IA. 2011b. Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. *Food Chem* 129:366–73.
- Granato D, Calado VMA, Jarvis B. 2014a. Observations on the use of statistical methods in food science and technology. *Food Res Int* 55:137–49.
- Granato D, Grevink R, Zielinski AAF, Nunes DS, Van Ruth SM. 2014b. Analytical strategy coupled with response surface methodology to maximize the extraction of antioxidants from green, yellow, and red teas (*Camellia sinensis* var *sinensis*). *J Agric Food Chem* 62(42):10283–96.
- Granato D, Margraf T, Brotzakis I, Capoano E, Van Ruth SM. 2015a. Characterization of conventional, biodynamic, and organic purple grape juices by chemical markers, antioxidant capacity and instrumental taste profile. *J Food Sci* 80(1):C55–65.
- Granato D, Karnopp AR, Van Ruth SM. 2015b. Characterization and comparison of phenolic composition, antioxidant capacity and instrumental taste profile of juices from different botanical origins. *J Sci Food Agric* 95(10):1997–2006.
- Granato D, Koot A, Schnitzler E, Van Ruth SM. 2015c. Authentication of geographical origin and crop system of grape juices by phenolic compounds and antioxidant activity using chemometrics. *J Food Sci* 80(3):C584–93.
- Lester GE, Lewers KS, Medina MB, Saffner RA. 2012. Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu: assay interference by ascorbic acid. *J Food Compos Anal* 27:102–7.
- Li H, Lee HS, Kim SH, Moon B, Lee C. 2014. Antioxidant and anti-inflammatory activities of methanol extracts of *Tremella fuciformis* and its major phenolic acids. *J Food Sci* 79(4):460–8.
- Liu RH. 2013. Dietary bioactive compounds and their health implications. *J Food Sci* 78(s1):18–25.
- Lutz M, Henríquez C, Escobar M. 2011. Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. *J Food Compos Anal* 24:49–54.
- Magnusson B and Örnemark U. 2014. Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods — a laboratory guide to method validation and related topics, 2nd ed. Eurachem Publisher, 62p. ISBN: 978-91-87461-59-0.
- Medina-Remón A, Barrionuevo-González A, Zamora-Ros R, Andres-Lacueva C, Estruch R, Martínez-González MA, Díez-Espino J, Lamuela-Raventós RM. 2009. Rapid Folin–Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake. *Anal Chim Acta* 634(1):54–60.
- Medina MB. 2011. Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *J Funct Foods* 3(2):79–87.
- Milella RA, Antonacci D, Crupi P, Incampo F, Carrieri C, Semeraro N, Colucci M. 2012. Skin extracts from 2 Italian table grapes (*Italia* and *Pallier*) inhibit tissue factor expression by human blood mononuclear cells. *J Food Sci* 77(8):154–9.
- Mnaili F, Journi M, Chérif JK, Sokmen M, Sokmen A, Trabelsi-Ayadi M. 2013. Phenolic contents and antioxidant potential of crataegus fruits grown in Tunisia as determined by DPPH, FRAP, and  $\beta$ -carotene/linoleic acid assay. *J Chem* 1–6.
- Nunes CA, Alvarenga VO, Sant'ana AS, Santos JS, Granato D. 2015. The use of statistical software in food science and technology: advantages, limitations and misuses. *Food Res Int* 75:270–80.
- Olgun FAO, Ozyurt D, Berker KI, Demirata B, Apak R. 2014. Folin–Ciocalteu spectrophotometric assay of ascorbic acid in pharmaceutical tablets and orange juice with pH adjustment and pre-extraction of lanthanum(III)–flavonoid complexes. *J Sci Food Agric* 94(12):2401–08.
- Padda MS, Picha DH. 2007. Methodology optimization for quantification of total phenolics and individual phenolic acids in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) roots. *J Food Sci* 72(7):412–6.
- Portaccio M, Di Martino S, Maiuri P, Durante D, DeLuca P, Lepore M, Bencivenga U, Rossi S, De Maio A, Mita DG. 2006. Biosensors for phenolic compounds: The catechol as a substrate model. *J Mol Catal B Enzym* 41:97–102.
- Price ML, Butler LG. 1977. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *J Agric Food Chem* 26:1268–72.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53(10):4290–302.
- Pueyo IU, Calvo MI. 2009. Assay conditions and validation of a new UV spectrophotometric method using microplates for the determination of polyphenol content. *Fitoterapia* 80:465–7.
- Reis FS, Martins A, Barros L, Ferreira ICFR. 2012. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: a comparative study between *in vivo* and *in vitro* samples. *Food Chem Toxicol* 50:1201–7.
- Reta JV, Lanari MC, Valerga J. 2012. Polyphenol input to the antioxidant activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts. *LWT – Food Sci Technol* 45:28–35.
- Sánchez-Rangel JA, Benavides J, Heredia JB, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. 2013. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal Methods* 21(5):5990–9.
- Singleton VL, Rossi JR. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am J Enol Vitic* 16:144–58.
- Shrivastava A, Gupta VB. 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron Young Sci* 2:21–5.
- Slatnar A, Mikulic-Petkovsek M, Stampar F, Veberic R, Solar A. 2014. HPLC-MS<sup>n</sup> identification and quantification of phenolic compounds in hazelnut kernels, oil and bagasse pellets. *Food Res Int* 64:783–9.
- Slimestad R, Vangdal E, Brede C. 2009. Analysis of phenolic compounds in six Norwegian plum cultivars (*Prunus domestica* L.). *J Agric Food Chem* 57(23):11370–5.
- Sousa CMM, Silva HR, Vieira Jr. GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH. 2007. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. *Quim Nova* 30(2):351–5.
- Sreelatha S, Inbavalli R. 2012. Antioxidant, antihyperglycemic, and antihyperlipidemic effects of *Coriandrum sativum* leaf and stem in alloxan-induced diabetic rats. *J Food Sci* 77:119–23.
- Sreerama YN, Takahashi Y, Yamaki K. 2012. Phenolic antioxidants in some *Vigna* species of legumes and their distinct inhibitory effects on  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase activities. *J Food Sci* 77:927–33.
- U.S. FDA. 2000. Guidance for Industry (draft): Analytical Procedures and Methods Validation: Chemistry, Manufacturing, and Controls and Documentation 2000. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070489.pdf>. Accessed 08 November 2014.
- Wang C, Zuo Y. 2011. Ultrasound-assisted hydrolysis and gas chromatography–mass spectrometric determination of phenolic compounds in cranberry products. *Food Chem* 128(2):562–8.
- Zielinski AAF, Ávila S, Ito V, Nogueira A, Wosiacki G, Haminiuk CWI. 2014. The association between chromatography, phenolics, carotenoids, and *in vitro* antioxidant activity of frozen fruit pulp in Brazil: an application of chemometrics. *J Food Sci* 79:510–6.
- Zielinski AAF, Granato D, Alberti A, Nogueira A, Demiate IM, Haminiuk CWI. Modelling the extraction of phenolic compounds and *in vitro* antioxidant activity of mixtures of green, white and black teas (*Camellia sinensis* L. Kuntze). *J Food Sci Technol*. In press. DOI: 10.1007/s13197-015-1797-0